



HAL
open science

Caractérisation et quantification de la toxine et de l'anatoxine tétanique dans les vaccins par spectrométrie de masse

Nour Al Turihi

► **To cite this version:**

Nour Al Turihi. Caractérisation et quantification de la toxine et de l'anatoxine tétanique dans les vaccins par spectrométrie de masse. Chimie analytique. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1103 . tel-03336534

HAL Id: tel-03336534

<https://theses.hal.science/tel-03336534>

Submitted on 7 Sep 2021

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.



N°d'ordre NNT : 2019LYSE1103

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale de Chimie N° 206

Spécialité de doctorat : Chimie

Discipline : Sciences Analytiques

Soutenue à huis clos le 01/07/2019, par :

Nour AL TURIHI

CARACTERISATION ET QUANTIFICATION DE LA TOXINE ET DE L'ANATOXINE TETANIQUE DANS LES VACCINS PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Devant le jury composé de :

CHAMOT-ROOKE Julia, Directrice de recherche CNRS, Institut Pasteur de Paris	Présidente et Rapporteure
HIRTZ Christophe, Professeur des Universités, Université de Montpellier	Rapporteur
ROGNIAUX Hélène, Ingénieure de Recherche, INRA de Nantes	Examinatrice
COMPAGNON Isabelle, Maître de Conférences, Université Lyon 1	Examinatrice
MALLET Laurent, Chercheur, Sanofi Pasteur	Examineur
LEMOINE Jérôme, Professeur des Universités, Université Lyon 1	Directeur de thèse
SALVADOR Arnaud, Professeur des Universités, Université Lyon 1	Co-directeur de thèse
EYNARD Thierry, Chercheur, Sanofi Pasteur	Invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	M. le Professeur Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directrice Générale des Services	Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur G.RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. X. PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

« L'homme animé par l'esprit scientifique désire sans doute savoir, mais c'est aussitôt pour mieux interroger ».

Gaston BACHELARD

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse n'aurait pu aboutir sans la contribution de nombreuses personnes que je tiens absolument à remercier.

En premier lieu, je tiens à remercier Mesdames Sandrine LEMOINE et Stéphanie PRIZZON et Messieurs Laurent MALLET, Olivier PITIOT et Guillaume PUY pour m'avoir accueilli au sein de Sanofi Pasteur sur le site de Neuville-sur-Saône.

Je tiens également à remercier la Directrice de l'Institut des Sciences Analytiques Madame Nathalie SCHILDKNECHT et son successeur Monsieur Christophe MOREL pour m'avoir accueilli au sein de l'Institut des Sciences Analytiques.

J'adresse mes profonds remerciements au Professeur Jérôme LEMOINE pour n'avoir cessé de croire en moi du Master jusqu'au Doctorat. Je le remercie pour l'autonomie qu'il m'a accordée tout au long de cette thèse, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail, pour ses remarques constructives ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée. Il a toujours été disponible et à l'écoute de mes questions.

Je tiens également à remercier le Professeur Arnaud SALVADOR pour ses qualités pédagogiques et humaines, ses précieux conseils et pour son soutien technique. Je le remercie pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux.

Je tiens à remercier grandement la personne fondatrice de ce projet de thèse, le Docteur Thierry EYNARD, sans qui, ce projet n'aurait jamais vu le jour. Je le remercie pour son encadrement de qualité, ses précieux conseils, ses qualités humaines et scientifiques et sa correction du manuscrit. Il a toujours porté une grande attention à mon travail et à mon égard.

J'adresse mes plus vifs remerciements à l'une des personnes motrices de ce projet, le Docteur Fabien BARBIRATO. Je le remercie pour son efficacité, sa réactivité, sa bienveillance, ses conseils avisés, ses encouragements et pour sa correction minutieuse du manuscrit.

Je tiens à remercier spécialement Monsieur Sébastien PERONIN pour m'avoir transmis sa passion de la spectrométrie de masse. Je le remercie pour le partage de son savoir, sa pédagogie, sa disponibilité, sa bienveillance, ses qualités humaines et scientifiques, son attention de tout instant sur mes travaux et pour sa correction du manuscrit. Ce fut un réel plaisir de travailler à ses côtés.

Je désire également remercier le Docteur Marion GIROD pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses précieux conseils et pour la correction méticuleuse de cette thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Hervé GICQUIAUX pour la relecture de cette thèse.

Je souhaite bien évidemment remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit : les Docteurs Julia CHAMOT-ROOKE, Hélène ROGNIAUX, Isabelle COMPAGNON, Laurent MALLET et Christophe HIRTZ.

J'adresse mes profonds remerciements aux collaborateurs qui ont suivi de près ce projet : Mesdames Catherine JOURDAT, Céline ROCCA, Stéphanie FLOTTES, Sandrine JIMENEZ, Monsieur Laurent THION. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée, pour vos encouragements et vos remarques constructives. Je tiens particulièrement à remercier Monsieur Vincent COLOMBIE pour avoir cru en mes idées et m'avoir aidé à les concrétiser.

D'une manière informelle, je souhaite profondément remercier toute l'équipe de l'unité spectrométrie de masse pour cette ambiance conviviale. Je remercie Jean, François, Yves, Christelle, Catherine, Wahbi, Kévin, Julia, Aline... Un grand merci à Mynel pour sa gentillesse, son assistance technique et sa bonne humeur permanente! Je tiens en outre à remercier l'équipe de chimie organique : Joseph, Serge, Stéphanie, Marie... Un merci tout particulier à Caroline pour son aide précieuse et ses conseils avisés !

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe ANABIO-MS pour l'ambiance très chaleureuse. Je remercie profondément les permanents Catherine, Sophie, Fabien pour leur gentillesse et leur aide précieuse au laboratoire. Un grand merci à Romain pour son soutien technique, sa bonne humeur et son sens de l'humour. Je tiens également à remercier les anciens et nouveaux doctorants. Je remercie Blandine pour sa gentillesse et le partage de son savoir. Je remercie profondément Lény pour sa gentillesse inégalée, son soutien technique et pour m'avoir transmis ses compétences en spectrométrie de masse. J'adresse également un merci tout particulier à Sylvain, Elie et Nicolas pour leur optimisme et leur bonne humeur. Je n'oublie pas non plus de remercier Julien et Maxime pour leur amitié et leur soutien sans faille. Je remercie en outre ceux avec qui j'ai eu la chance de partager mon bureau : Antoine, Magalie, Rossana, Lucille, Mathilde, Aurélien, Jean Valéry, Numa, Iulia, Floriane...

Je tiens à remercier le personnel d'Anaquant pour ces moments de partage : Tanguy, Quentin, Christelle, Chloé, Xavier, Laura...

Plus globalement, je souhaite remercier l'ensemble des personnes que j'ai eu la joie de côtoyer à Sanofi Pasteur et à l'Institut des Sciences Analytiques.

Je tiens affectueusement à remercier mes amis et ma famille pour avoir toujours cru en moi, pour m'avoir soutenu et constamment encouragé et sans qui je n'aurais jamais pu y arriver.

Enfin, je souhaite remercier tout spécialement Anissa, la personne qui partage ma vie au quotidien. Merci pour m'avoir supporté durant ces trois années, pour ta correction du manuscrit et pour ton soutien indéfectible !

Je remercie toutes celles et ceux que je n'ai pas cités et qui m'ont consacré de leur temps et apporté leur soutien et conseils durant ces années.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	7
Liste des abréviations	13
Liste des figures	15
Liste des tableaux	19
Chapitre I	21
INTRODUCTION GENERALE	21
1. Le tétanos	25
2. La toxine tétanique.....	27
3. Le formaldéhyde et son action sur les protéines	32
4. L'anatoxine tétanique comme vaccin	36
5. Contrôle qualité du vaccin antitétanique.....	38
6. Analyse structurale de l'anatoxine tétanique et hypothèse de mécanisme de détoxification	40
7. Objectifs des travaux de thèse	44
8. Références bibliographiques	45
Chapitre II	53
Caractérisation structurale de l'anatoxine tétanique	53
1. Introduction.....	57
1.1. Les méthodologies « <i>Bottom Up</i> » et « <i>label free</i> » pour la caractérisation et la quantification des modifications induites par le formaldéhyde par LC-MS/MS	57
1.2. Contexte d'étude	59
2. Partie expérimentale	61
2.1. Produits chimiques et réactifs.....	61
2.2. Protocole de préparation des échantillons pour l'analyse SDS-PAGE	61
2.3. Protocole d'hydrolyse enzymatique en gel pour l'analyse nanoLC-MS/MS	62
2.4. Conditions opératoire pour l'analyse nanoLC-MS/MS.....	62
2.5. Traitement des données.....	63
3. Résultats	64
3.1. Méthodologie globale utilisée pour l'identification des modifications induites par le formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique	64
3.2. Purification des échantillons par SDS-PAGE	65
3.3. Analyse nanoLC-MS/MS de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique	66
3.4. Caractérisation structurale des peptides modifiés au formaldéhyde par nanoLC-MS/MS	67

3.5.	Caractérisation des réticulations intra et inter-chaînes induites par le formaldéhyde dans l'anatoxine tétanique	77
3.6.	Quantification « <i>label free</i> » des modifications induites par le formaldéhyde dans l'anatoxine tétanique	82
4.	Discussions	84
5.	Références bibliographiques	87
Chapitre III		89
Développement de méthodes de quantification ciblée relative et absolue de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique		89
1.	Introduction.....	93
1.1.	Les modes « Multiple Reaction Monitoring » (MRM) et « scheduled MRM » pour la quantification de protéines	93
1.2.	La méthodologie AQUA « <i>Absolute QUAntification</i> » pour la quantification absolue par LC-MS/MS de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique	94
2.	Matériels et méthodes	97
2.1.	Produits chimiques	97
2.2.	Echantillons	97
2.3.	Protocole de préparation des échantillons pour l'analyse SDS-PAGE	99
2.4.	Protocole d'hydrolyse enzymatique de l'anatoxine pour l'analyse quantitative relative des formes peptidiques chimiquement modifiées par le formaldéhyde	99
2.5.	Protocole de préparation des solutions standards des peptides étalons pour la quantification absolue de la toxine et de l'anatoxine tétanique	100
2.6.	Protocole d'hydrolyse enzymatique de la toxine et de l'anatoxine tétanique pour l'analyse quantitative absolue.....	100
2.7.	Protocole de préparation des échantillons pour étudier la stabilité des peptides étalons par analyse LC/UV	100
2.8.	Conditions opératoires du système LC/UV/MS pour étudier la stabilité des peptides étalons ¹⁰¹	
2.9.	Conditions opératoires du système LC-MS/MS pour la quantification ciblée relative et absolue de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique	101
2.10.	Analyse des données	102
3.	Résultats et discussions.....	104
3.1.	Développement de la méthode LC-MS/MS pour la quantification relative des peptides non modifiés et chimiquement modifiés par le formaldéhyde	104
3.2.	Développement de la méthode LC-MS/MS pour la quantification absolue de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique	112
4.	Conclusion	132
5.	Références bibliographiques.....	135

Conclusions et Perspectives	139
1. Conclusions et perspectives sur la caractérisation du vaccin antitétanique	141
2. Conclusions et perspectives sur l'utilisation des méthodes <i>in vitro</i> développées au cours de cette thèse.....	143
3. Perspectives générales quant à la fabrication du vaccin antitétanique et à l'usage du formaldéhyde	145
4. Conclusion générale	146
5. Références bibliographiques	147
ANNEXES.....	151

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acides Aminés
AAA	analyse des acides aminés
ABC	bicarbonate d'ammonium
AF	acide formique
AQUA	Absolute QUAntification
CD	dichroïsme circulaire
CID	Dissociation induite par la collision
CNS	System Nerveux Central
CV	Coefficient de Variation
CXP	Collision cell exit Potential
DOC	déoxycholate de sodium
DP	Declustering Potential
DRX	Diffraction des rayons X
DSF	fluorimétrie à balayage différentiel
DTT	DL-dithiothréitol
EP	Entrance Potential
FDA	Food and Drug Administration
GABA	acide γ -aminobutyrique
GPI	glycophosphatidylinositol
HC	chaîne lourde de la toxine tétanique
H _{CC}	C-terminal de la chaîne lourde de la toxine tétanique
HCD	Collision de haute énergie
H _{CN}	N-terminal de la chaîne lourde de la toxine tétanique
HPLC	High Performance Liquide Chromatography
IAM	iodoacétamide
LC	chaîne légère de la toxine tétanique
LC/UV	chromatographie liquide couplée à un détecteur UltraViolet
LC-MS/MS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	spectrométrie de masse
MS ¹	analyse des molécules sans fragmentation dans le spectromètre de masse
MS ²	analyse des molécules après leur fragmentation dans le spectromètre de masse
nanoLC-MS/MS	nanochromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
NPC	Net Peptide Content
PDA	PhotoDiode Array detector
PFBHA	Chlorhydrate de O-(2,3,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine
PP	PolyPropylène
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium
SNAP-25	Synaptosomal-associated protein 25
SV2	synaptic vesicle protein 2
TFA	acide trifluoroacétique
Th	Thomson
rpm	Révolution par minute
TRIS	2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
TT	toxine tétanique
TTD	toxine tétanique détoxifiée au formaldéhyde
TTDd	toxine tétanique détoxifiée au formaldéhyde deutéré
TTFC	Fragment de toxine tétanique C

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie d'une chèvre Jamunapari âgée de cinq mois souffrant du tétanos [4]	25
Figure 2 : Observation des spores de bactéries Clostridium tetani au microscope [9].	26
Figure 3 : Mécanisme d'action de la toxine tétanique dans l'organisme [6], [14], [17].	28
Figure 4 : Structures tridimensionnelle (A) et organisation en domaine (B) de la toxine tétanique [22].	29
Figure 5 : Structures des gangliosides GD1b et GT1b spécifiquement reconnus par la toxine tétanique [44].	31
Figure 6 : Réaction d'hydratation du formaldéhyde en méthylène glycol	32
Figure 7 : Réaction de polymérisation du formaldéhyde en paraformaldéhyde.	32
Figure 8 : Réactions du formaldéhyde sur les amines primaires conduisant à la formation de méthylol et de base de Schiff [54], [64], [65].	33
Figure 9 : Réactions de la formation de ponts méthylènes dans les protéines.	35
Figure 10 : Description des principales étapes des procédés ATP et PTC pour la fabrication de l'anatoxine tétanique des vaccins antitétaniques et hib.	37
Figure 11 : Stratégie utilisée par Thaysen Andersen et al. [51] et Bayart et al. [84] pour identifier les modifications chimiques induites par le formaldéhyde sur la structure primaire de l'anatoxine tétanique.	40
Figure 12 : Photographie du gel monodimensionnel SDS-PAGE d'un échantillon de toxine tétanique et de plusieurs lots industriels d'anatoxines tétaniques en conditions dénaturantes, non réductrices (pistes 1 à 4) et réductrices (pistes 5 à 8), adapté de [84].	41
Figure 13 : Méthodologie « Bottom Up » la plus répandue pour caractériser une protéine par LC-MS/MS.	58
Figure 14 : Nomenclature universelle proposée par Roepstorff et adaptée par Bienmann [2], [3] des principaux ions générés après fragmentation des peptides avec les modes HCD, CID dans la cellule de collision du spectromètre de masse.	58
Figure 15 : Principe de l'analyse label free « Area under the Curve ».	59
Figure 16 : Méthodologie globale appliquée pour l'identification de tous les peptides modifiés au formaldéhyde de la TTD.	64

Figure 17 : Purification par SDS-PAGE des échantillons de TT non traitée (A), de TT traitée au CH ₂ O (TTD) et de TT traitée au CD ₂ O (TTDd) en conditions dénaturantes et non réductrices (respectivement B et C).....	65
Figure 18 : Chromatogrammes de la toxine non traitée (TT), traitée avec du CH ₂ O (TTD), traitée avec du CD ₂ O (TTDd), et du mélange équimolaire des anatoxines tétanique (CH ₂ O, CD ₂ O) (TTD+TTDd).....	66
Figure 19 : Couverture de séquence obtenue pour la toxine et l’anatoxine tétanique.	67
Figure 20 : Marquage isotopique induit par l’utilisation du CH ₂ O et CD ₂ O.	68
Figure 21 : Liste des acides aminés impactés par les modifications +12 Da, méthylol, méthyle et diméthyle.	69
Figure 22 : Illustration de la fragmentation (CID ou HCD) d’un pont méthylène en phase gazeuse dans la cellule de collision du spectromètre de masse [5]	70
Figure 23 : Exemple d'identification d'un peptide intra-ponté intra-chaîne lourde de séquence NILMQYIK(+12,00)ANSK.	70
Figure 24 : Structure entière à boules (atomes) de la toxine tétanique avec les acides aminés modifiés avec des +12 Da, des adduits méthylol (+30 Da), des méthyles (+14 Da) et des diméthyles (+28 Da) colorés en bleu.....	76
Figure 25 : Identification d'un peptide inter-ponté intra-chaîne légère de séquence IINAIPYLGNSY(+12,00)SLLDK^VDNKNKNYFPC(carbamido)R.....	78
Figure 26 : Structure cristalline de la toxine tétanique avec les réticulations induites par le formaldéhyde.....	81
Figure 27 : Diagramme représentant l’impact du formaldéhyde sur l’anatoxine tétanique..	83
Figure 28 : Liste des peptides impactés par le formaldéhyde	83
Figure 29 : Représentations des modes MRM et scheduled MRM [45], [46].....	94
Figure 30 : Stratégie AQUA pour la quantification absolue et spécifique d’une protéine par LC-MS/MS.....	95
Figure 31 : Chromatogrammes reconstitués sur les n transitions suivies pour chacun des peptides non modifiés et modifiés pour la TT et la TTD de la branche industrielle ATP.....	105
Figure 32 : Optimisation du protocole d’hydrolyse trypsique de la TTD (branche ATP).	106
Figure 33 : Etude de la répétabilité de la méthode scheduled MRM..	107
Figure 34 : Comparaison des chromatogrammes reconstitués des différents lots de TTD âgés de 2 mois, 12 mois et 3 ans.	108

Figure 35 : Les graphiques (A), (B), (C) et (D) représentent les sommes des aires normalisées des peptides non modifiés et modifiés par le formaldéhyde. L	109
Figure 36 : Gel SDS-PAGE réalisé en conditions dénaturantes et réductrices.	110
Figure 37 : Evolution des proportions des oligomères, dimères et monomères dans les différents lots de TTD âgés de 2 mois, 7 mois, 9 mois, 12 mois, 17 mois, 24 mois et 3 ans.	111
Figure 38 : Profils densitométriques de différents lots de TTD âgés de 2 mois, 12 mois et 3 ans.	111
Figure 39 : Etude de la stabilité des poudres lyophilisées des peptides étalons au congélateur (-20°C) sur une période de 3 mois.....	115
Figure 40 : Etude de la stabilité des solutions de peptides étalons conservées au réfrigérateur (+5°C) sur une période de 7 jours.	116
Figure 41 : Etude de la nature du contenant et du solvant sur l'adsorption des peptides étalons.	117
Figure 42 : (A) Etude de l'influence de la quantité (ratio $m_{enzyme}/m_{protéine}$), (B) de la cinétique d'enzyme et (C) des étapes de dénaturation thermique et/ou chimique (DOC 5% m/v), de réduction/alkylation des cystéines sur le dosage de la TT (branche ATP).....	120
Figure 43 : Etude de l'influence de la (A) quantité (ratio $m_{enzyme}/m_{protéine}$), de la (B) cinétique d'enzyme, (C) des étapes de dénaturation thermique et/ou chimique (DOC 5% m/v), de réduction/alkylation des cystéines et de l'ajout de quencher TRIS/PFBHA sur le dosage de la TTD (branche ATP).....	121
Figure 44 : Rendements de digestion des peptides étalons..	122
Figure 45 : Etude de la linéarité entre 0 et 1000 ng/mL de la méthode LC-MS/MS sur la TT de la branche ATP.....	124
Figure 46 : Etude de la linéarité entre 0 et 1000 ng/mL de la méthode LC-MS/MS sur la TTD de la branche ATP.....	125
Figure 47 : Dosage des lots de TT des deux branche ATP et PTC avec la méthode LC-MS/MS.	126
Figure 48 : Dosage de deux lots différents de TT de la branche PTC.....	126
Figure 49 : Comparaison des écarts à la moyenne des puretés antigéniques (Lf/mg d'azote protéique) et des puretés calculées avec la méthode LC-MS/MS (g/L) des lots de TT des branches ATP et PTC.....	128

Figure 50 : Dosage des lots de TTD des deux branche ATP et PTC avec la méthode LC-MS/MS.	129
Figure 51 : Dosage de différents lots industriels de TTD issus de la branche ATP.....	129
Figure 52 : Comparaison des écarts à la moyenne des puretés antigéniques (Lf/mg d'azote protéique) et des puretés calculées avec la méthode LC-MS/MS (%) des lots de TTD des branche ATP et PTC.	130
Figure 53 : Exemple d'identification d'un peptide avec un méthyle de séquence AK(méthyle)WLGTVNTQFQK.....	153
Figure 54 : Exemple d'identification d'un peptide avec un diméthyle de séquence VGYAPGIPLYK(dimethyl)K.....	154
Figure 55 : Exemple d'identification d'un peptide inter-ponté inter-chaîne IIPPTNIR(+12.00)E^ITMTNSVDDALINSTK(+12.00)IYSYFPSVISK.....	155
Figure 56 : Exemple d'identification d'un peptide inter-ponté intra-chaîne légère VN(+12.00)TNAFRNVDSGLVSK^LSY(+12.00)FSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESK.....	156
Figure 57 : Exemple d'identification d'un peptide inter-ponté inter-chaîne NK(+12.00)PLNFNYSLDK^NDLYEK.....	157
Figure 58 : Exemple d'identification d'un peptide inter-ponté intra-chaîne lourde SNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQK(+12.00)SPTTLQR^SLEYVQVAIKK.....	158
Figure 59 : Exemple d'identification d'un peptide inter-ponté intra-chaîne lourde IFC(carbamido)K(+12.00)ALNPK^NLDC(carbamido)WVDNEEDIDVILKK.....	159
Figure 60 : Impact théorique du formaldéhyde sur la toxine tétanique.	160

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste non exhaustive de vaccins utilisant l’anatoxine tétanique (sanofipasteur.com, gsk.com, ssi.dk, umassmed.edu).....	37
Tableau 2 : Principaux tests in vitro et in vivo recommandés par l’OMS pour le suivi qualité de l’anatoxine tétanique du vaccin contre le tétanos. Ces tests figurent dans l’annexe 5 du document intitulée “Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of tetanus vaccines” et dans le manuel “Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccine” [77], [78].	38
Tableau 3 : Liste des peptides modifiés au formaldéhyde avec des bases de Schiff ou pont intra-peptidique (+12,000 Da), des adduits méthylol (+30,011 Da), des méthyles (+14,016 Da) et des diméthyles (+28,0312 Da). Les AA en gras sont ceux concernés par les modifications.	71
Tableau 4 : Liste des peptides inter-pontés (intra et inter-chaînes légère et lourde) induits par le formaldéhyde.	79
Tableau 5 : Lots de TT.....	98
Tableau 6 : Lots de TTD	98
Tableau 7 : Liste des peptides sélectionnés pour la quantification absolue de la TT et de la TTD	112
Tableau 8 : Liste des peptides étalons avec leur pureté HPLC et leur NPC respectifs.....	114
Tableau 9 : Etude de la répétabilité de la méthode LC/UV. Comparaison des aires des peptides étalons issus d’un triplicat d’injection.....	114
Tableau 10 : Etude de la répétabilité des aliquots fournis par le fabricant BACHEM. Comparaison des aires des peptides étalons de trois aliquots pris aléatoirement parmi les cent commandés.	115
Tableau 11 : Etude de la répétabilité de la méthode LC-MS/MS : les coefficients de variation (CV) intra jours, mono opérateur calculés sur les aires des peptides endogènes dans les deux types de matrices : TT et TTD de la branche ATP.....	123
Tableau 12 représentant les exactitudes et les précisions sur les concentrations calculées à partir de la droite de linéarité réalisée sur la TT de la branche ATP.....	124
Tableau 13 représentant les exactitudes et les précisions sur les concentrations calculées à partir de la droite de linéarité réalisée sur la TTD de la branche ATP	124

Tableau 14 : Comparaison des dosages des lots de TT des deux branches ATP et PTC par colorimétrie et par la méthode LC-MS/MS et estimation de la pureté en TT dans les différents lots.	128
Tableau 15 : Comparaison des dosages Bradford, Kjeldahl et LC-MS/MS des lots de TTD et estimation de la pureté en TTD dans les différents lots.	131
Tableau 16 : Liste non exhaustive de méthodes in vitro utilisables pour contrôler les caractéristiques immunologiques et physico-chimiques de l’anatoxine tétanique	144

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

De nos jours, les vaccins préventifs restent incontestablement les traitements prophylactiques par excellence pour se prémunir efficacement de plus d'une vingtaine de maladies potentiellement dangereuses comme le tétanos, la poliomyélite, la diphtérie ou encore la rage.

Qualifiés de médicaments immunologiques, ces outils de prévention se différencient des autres produits pharmaceutiques par l'origine biologique de leur principe actif. Ce dernier est obtenu à l'issue d'un système de production long et complexe faisant intervenir des micro-organismes tels que des bactéries et des virus.

Les industries du vaccin sont aujourd'hui confrontées à deux problèmes majeurs, à savoir une matière première biologique de départ intrinsèquement variable et un procédé de fabrication difficile à maîtriser. Pour les surmonter, elles se doivent d'opérer des contrôles qualité tout au long du processus d'élaboration du vaccin, dans le but de s'assurer de la reproductibilité, de la sécurité, de l'efficacité et de l'innocuité de leurs produits. Ces contrôles sont de deux types : les tests de caractérisation effectués à chaque étape de fabrication et les tests libératoires réalisés à la fin du processus de production. Les lots de vaccins conformes sont ensuite transmis aux autorités compétentes telles que l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) et la Food and Drug Administration (FDA) pour une ultime vérification avant leur mise sur le marché ; les vaccins ont en effet l'obligation de respecter les normes fixées, entre autres, par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et par les pharmacopées.

C'est dans ce contexte général que s'inscrit ce sujet de thèse. Sanofi Pasteur, acteur majeur de la production de vaccins dans le monde, a la volonté d'utiliser les technologies à la pointe de la science pour une meilleure compréhension de ses produits et le développement de nouveaux tests de caractérisation pour le suivi de ses procédés industriels.

Cette thèse porte sur la caractérisation et la quantification de l'anatoxine tétanique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Cette protéine complexe résulte de l'inactivation de la toxine tétanique au formaldéhyde. Cet antigène est employé dans de multiples vaccins et constitue l'unique principe actif du vaccin contre le tétanos.

Les objectifs de ces travaux de thèse sont multiples : d'une part, identifier et localiser finement à l'échelle moléculaire les modifications induites par le formaldéhyde sur la structure

tridimensionnelle entière de l'anatoxine tétanique et, d'autre part, élaborer des méthodes de contrôle qualité *in vitro* uniques par LC-MS/MS pour la quantification relative et absolue de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique ainsi que pour la quantification relative des formes de la toxine tétanique non modifiées et chimiquement modifiées au formaldéhyde. Ces méthodes *in vitro* sont complémentaires aux tests de caractérisation actuels et se veulent être simples et pratiques pour servir de support aux procédés industriels. Ces outils contribuent à un meilleur suivi qualité de la fabrication de l'anatoxine tétanique et peuvent être notamment appliqués pour suivre et contrôler à l'échelle moléculaire le procédé d'inactivation au formaldéhyde, vérifier la bonne reproductibilité des procédés, évaluer la qualité et la stabilité de l'antigène dans le temps, comprendre de futurs problèmes de production et participer à des études de validation de robustesse des procédés.

Sur le long terme, ces méthodes d'expertises contribuent au programme des « 3R : *Replacement, Reduction and Refinement* » établi en 1959 par Russel et Burch qui consiste à limiter, réduire et remplacer les tests qui sont actuellement utilisés sur les animaux.

1. Le tétanos

Le terme « tétanos » traduit littéralement du grec veut dire « contraction » [1]. Le tétanos est considéré comme l'une des maladies les plus dramatiques que l'homme ait connue depuis plus de 24 siècles [2]. Cette maladie neurologique est très grave, aiguë et non contagieuse. Elle affecte aussi bien les hommes que les animaux. Les symptômes les plus courants de la maladie sont des contractions involontaires et douloureuses localisées au niveau de la mâchoire qui ensuite se répartissent sur tous les muscles du corps conduisant, si elles ne sont pas traitées rapidement, à la mort (Figure 1) [3].



Figure 1 : Photographie d'une chèvre Jamunapari âgée de cinq mois souffrant du tétanos [4]

Les Egyptiens (2000 av J.C) et les Grecs (IV^e siècle av J.C) ont été les premiers à décrire la maladie [5] mais ce n'est qu'en 1884 que les Dr. Carle et Rattone découvrent son origine infectieuse [6]. La même année, le médecin allemand Nicolaier observe l'agent pathogène au microscope : une bactérie à gram positif, tellurique, sporulée du nom de « bacille de Nicolaier », autrement appelée « *Clostridium tetani* » (Figure 2) [1]. En 1886, Rosenbach et Flugge découvrent les formes sporulées de la bactérie qui s'apparentent à des épingles à grosse tête [1]. En 1890, le bactériologiste japonais Shibasaburō parvient à isoler l'agent infectieux [6]. Cette substance anaérobie stricte se retrouve principalement sous forme de spores dans les sols, dans les voies intestinales et les matières fécales des animaux, plus rarement de l'Homme [7]. Elles contaminent les êtres vivants dans 80% des cas en pénétrant des plaies non vascularisées, des tissus non oxygénés ou des brûlures souillées de terre [4]. Dans l'organisme, les spores germent puis les bactéries infectieuses se multiplient et sécrètent deux toxines : la tétanolysine et la tétanospasmine aussi connue sous le nom de toxine tétanique. La tétanolysine est constituée d'une chaîne unique d'un poids moléculaire de 45 kDa. Elle interagit avec le cholestérol présent sur les globules rouges et sur les liposomes. Elle

nécrose localement les tissus en modifiant la perméabilité des membranes cellulaires et des liposomes [8]. La toxine tétanique est la protéine responsable des signes cliniques de la maladie. La période d'incubation du tétanos varie de huit jours à plusieurs mois : plus elle est courte et plus les symptômes sont graves [4].



Figure 2 : Observation des spores de bactéries Clostridium tetani au microscope [9]. Les spores sont colorées en violet avec la coloration de Gram et indique que ce sont des bactéries à gram positif.

Malgré les programmes d'immunisation mis en place dans beaucoup de pays, le tétanos reste un sérieux problème de santé dans plusieurs régions du monde, principalement en Asie et en Afrique. Cette maladie infectieuse serait la cause de 56 000 décès dans le monde en 2015 [10]. Les principales victimes sont les nouveau-nés contaminés dès la naissance par des dispositifs médicaux souillés par la bactérie et utilisés pour couper le cordon ombilical : il s'agit dans ce cas du tétanos dit maternel et néonatal [11].

Le seul moyen de se protéger efficacement de la maladie est la vaccination. Entre 2000 et 2016, un programme d'immunisation a été lancé par l'OMS et a permis de réduire considérablement le nombre de décès causés par le tétanos néonatal d'environ 90% [12].

2. La toxine tétanique

En 1890, Tizzoni, Catani et Faber ont isolé et démontré qu'une seule protéine était responsable des signes cliniques du tétanos : la toxine tétanique (TeNT ou TT) [6]. La TT est l'une des toxines les plus neurotoxiques connues à ce jour. La dose létale minimale estimée chez l'homme est de 2,5 ng/kg de poids corporel [13]. Son mécanisme d'action dans l'organisme n'a été décrit qu'à la fin du XXème siècle et au début du XXIème (Figure 3). La protéine passe par le système lymphatique pour pénétrer dans le sang. Elle se fixe sur les terminaisons neuromusculaires, s'internalise dans l'axone puis remonte par transport rétrograde jusqu'à la moelle épinière et le système nerveux central (SNC) pour finalement atteindre le neurone inhibiteur. Du fait de l'acidité du milieu, la protéine change de conformation et déplie sa chaîne légère. Une thioredoxine vient ensuite cliver l'unique pont disulfure inter-chaîne de la toxine. Ce phénomène conduit à la libération de la chaîne légère (LC) de la protéine. Cette dernière va alors circuler librement dans le cytosol du neurone et agir comme une endopeptidase à zinc pour catalyser spécifiquement l'hydrolyse de la synaptobrevine-2 en position Gln76-Phe77 [4], [6], [14]–[16]. La synaptobrevine-2 participe à la formation du complexe protéique « *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor* » (SNARE) avec les protéines « *Synaptosomal nerve-associated protein 25* » SNAP-25 et Syntaxine. Ce complexe est responsable de la libération de la glycine et de l'acide γ -amino butyrique (GABA), neuromodulateurs de l'inhibition de la contraction musculaire. Lorsque la synaptobrevine-2 est clivée, celle-ci ne peut plus se complexer et bloque ainsi la libération des neuromodulateurs [17], [18]. Il en résulte des spasmes incontrôlés et douloureux.

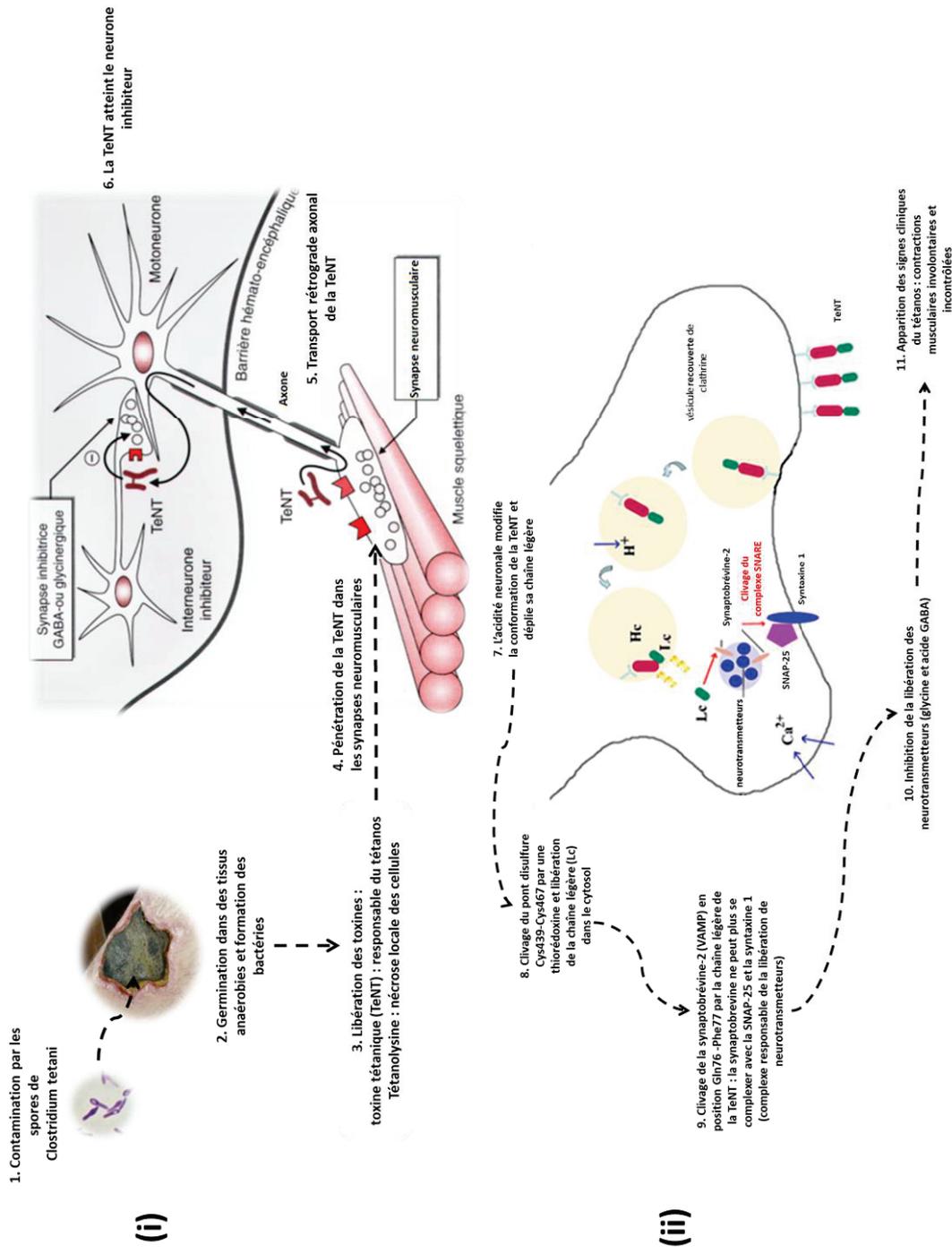


Figure 3 : Mécanisme d'action de la toxine tétanique dans l'organisme. (i) La bactérie synthétise la toxine tétanique dans la plaie anaérobie. (ii) La toxine atteint le neurone inhibiteur et provoque le tétanos [6], [14], [17].

Le gène de la toxine tétanique est codé sur un plasmide de 75 kilobases (kb) [2]. Ce dernier est compris dans le génome de la bactérie *Clostridium tetani* composé d'un chromosome qui contient 2 799 250 paires de bases (pb) et d'un plasmide, pE88 de 74 082 pb [2].

Dans la bactérie, la protéine est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur non-toxique appelé « *protoxin* » qui est constitué d'une seule chaîne de 1315 acides aminés [19], [20]. Au cours de son passage dans le milieu extracellulaire, elle perd d'abord sa méthionine située à l'extrémité N-terminale et subit ensuite différents clivages induits par les enzymes clostridiales en positions Ala456-Ser457 et Arg448-Glu449 [21]. Après maturation, la TT (150,6 kDa) est composée de deux chaînes : une chaîne lourde (H, 98,3 kDa) et une chaîne légère (Lc, 52,3 kDa) reliées par un simple pont disulfure (cys440 - cys467) (Figure 4) [21]. Un deuxième pont disulfure est également présent dans sa structure, localisé en position Cys869-Cys1093 [22]. D'autres toxines ont des structures similaires ; on peut citer la toxine diphtérique ou encore la toxine cholérique [23].

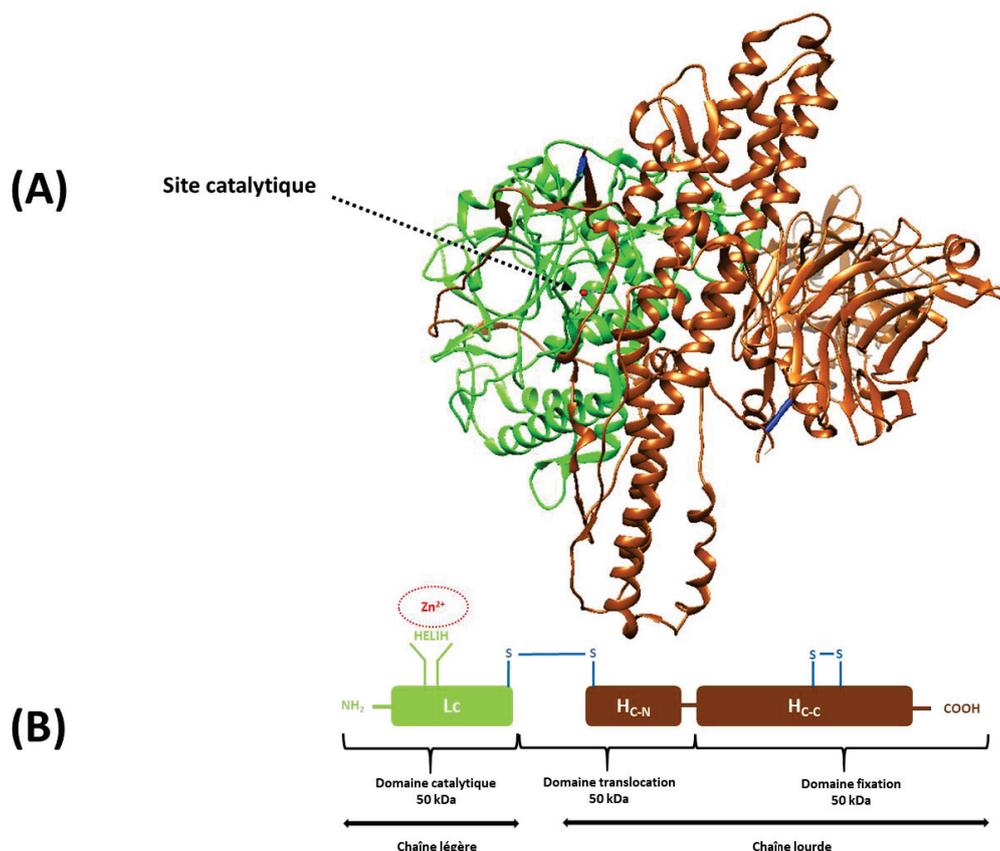


Figure 4 : Structures tridimensionnelle (A) et organisation en domaine (B) de la toxine tétanique [22]. Les ponts disulfures apparaissent en bleu, la chaîne lourde (Hc) en marron et la chaîne légère (Lc) en vert clair. L'atome de zinc présent au niveau du site catalytique est en rouge.

La séquence primaire de la toxine tétanique a été élucidée avec les travaux d'Eisel *et al.* (1986), de Fairweather *et al.* (1986) et de Finn *et al.* (1984) et figure dans les bases de données dont uniprot.org (n°P04958) [19], [20], [24].

La toxine tétanique comprend trois domaines distincts dans sa structure. La chaîne légère (Lc) de la toxine correspond au premier domaine et se comporte comme une endopeptidase à zinc, reconnaissable grâce à son motif « ²³³HELIH²³⁷ » qui est lié à un atome de zinc au niveau de son site actif [25]. Son rôle est de cliver la synaptobrevine-2 en position Gln76 -Phe77. Les acides aminés susceptibles d'être impliqués dans la coordination du zinc sont His233, His237 et Tyr365. Les acides aminés Glu234, Glu271 se lient aux molécules d'eau et catalysent la réaction d'hydrolyse de la synaptobrevine-2 [6].

Les deux autres domaines sont localisés sur la chaîne lourde en N-ter (H_{C-N}) et en C-ter (H_{C-C}). La partie H_{C-N} est responsable de la translocation de la chaîne légère dans le cytosol du neurone alors que le fragment H_{C-C} permet à la toxine de se fixer aux protéines de surface cellulaire telles que la « *glycophosphatidylinositol (GPI)-anchored protein* » et la « *nidogen-1* » ainsi que sur les récepteurs spécifiques gangliosides GT1b, GD1b qui sont à la surface des tissus nerveux (Figure 5) [26]–[29]. Les gangliosides appartiennent à la classe des glycosphingolipides et sont présents en pourcentage élevé dans les bicouches lipidiques des membranes des cellules neuronales [30]. Les galactoses et les acides polysialiques des gangliosides interagissent avec la toxine tétanique [22]. Les acides aminés His1271, Thr1270, Asp1222, Trp1289 Tyr1290, Asn1216, Asp1214, Arg1226, Tyr1229, Asp1147, Gly1215, Asn1219, Asn1220, Ser1287, His1293, Gly1300 sont susceptibles d'être impliqués dans les liaisons toxine tétanique-gangliosides [22], [28], [29]. [26], [27], [31].

Les structures cristallines des fragments (Lc) et (H_{C-N}, H_{C-C}) ont été élucidées séparément, avec les travaux de Breidenbach *et al.* et de Fotinou *et al.* [30], [32]. Récemment, la structure tridimensionnelle de la protéine entière a été caractérisée avec les travaux de Masuyer *et al.* (Figure 4)[22].

Plus d'une cinquantaine d'épitopes T ont été caractérisés dans la toxine tétanique. Deux épitopes T parmi ceux cités dans la littérature sont considérés comme étant universels : Met829-Leu844 et Phe947-Glu967 [33]–[43].

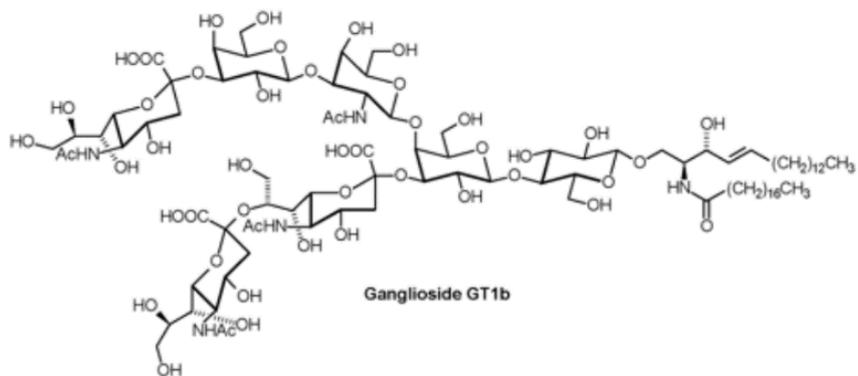
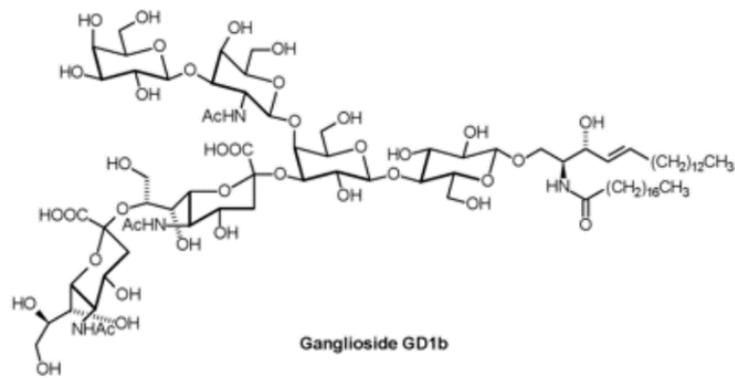


Figure 5 : Structures des gangliosides GD1b et GT1b spécifiquement reconnus par la toxine tétanique [44].

3. Le formaldéhyde et son action sur les protéines

Le formaldéhyde (n°CAS : 50-00-0) est le plus petit aldéhyde connu avec seulement un carbone et un poids moléculaire de 30 Da. Ce composé électrophile est produit naturellement à très faible concentration, dans la plupart des organismes vivants au cours du métabolisme intermédiaire mais également dans l'atmosphère, après oxydation de composés organiques volatils. Il est fabriqué par certaines bactéries et algues et est émis lors de combustions de matières organiques. Cette molécule chimique est produite industriellement à partir de l'oxydation du méthanol, à 400-650°C, à la pression atmosphérique, en phase vapeur et en présence de catalyseur [45]. Elle n'est commercialisée qu'en solution puisque sa forme gazeuse est difficile à produire et à stocker. La solution de formaldéhyde, appelée formol, contient typiquement entre 37-40 % m/m de formaldéhyde et 10-15% m/m de méthanol. Le méthanol stabilise le formaldéhyde en solution et l'empêche de polymériser. En solution aqueuse, le formaldéhyde est instable et a tendance à s'hydrater en méthylène glycol puis à se polymériser en paraformaldéhyde (Figure 6 et Figure 7) [46]. L'ajout d'acide et l'augmentation de la température favorisent la dépolymérisation. En présence d'oxygène, le formaldéhyde peut s'oxyder spontanément en acide formique. En milieu basique, le formaldéhyde subit une réaction de Cannizzaro et se transforme en acide formique et en méthanol.

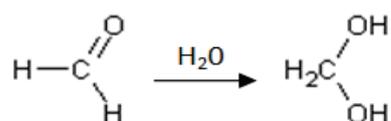


Figure 6 : Réaction d'hydratation du formaldéhyde en méthylène glycol

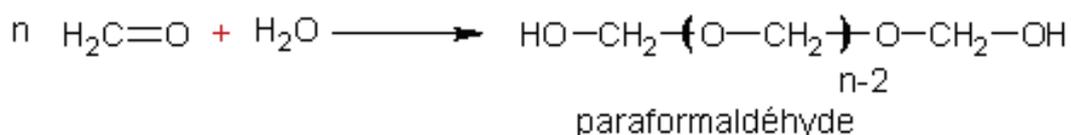


Figure 7 : Réaction de polymérisation du formaldéhyde en paraformaldéhyde

Depuis le début du XX^{ème} siècle, le formaldéhyde est un produit chimique largement utilisé dans l'industrie avec une production mondiale estimée à plus de 20 millions de tonnes par an [47]. Cette molécule intervient dans la production de nombreux produits tels que les

plastiques, les peintures et les résines [46], [48]. Il est employé en tant qu'agent fixant par les embaumeurs, les cytologistes et les pathologistes. Dans le processus de fabrication des vaccins, cet aldéhyde est un élément essentiel pour inactiver les virus [49] et détoxifier les toxines bactériennes [50].

La réaction du formaldéhyde sur les protéines est extrêmement complexe [45], [46], [51]–[53]. Le formaldéhyde réagit principalement sur les amines primaires des chaînes latérales des lysines (K) et sur les acides aminés situés en N-ter des protéines pour créer des dérivés méthylols réversibles (+30 Da) (Figure 8) [46], [54], [55]. Les méthylols se déshydratent et conduisent à des bases de Schiff/imines (+12 Da). Les chaînes latérales des cystéines (C), des arginines (R), des tryptophanes (W), des histidines (H), des asparagines (N) et des glutamines (Q) sont également susceptibles de générer des méthylols et des imines [46], [49], [51]–[53], [55]–[61]. Les chaînes latérales des cystéines modifiées avec des imines peuvent se réarranger en thiazolidine (+12 Da) [55]. Sur les acides aminés en position N-ter, les imines forment des groupements imidazolidinones (+12 Da) [54].

De surcroît, les amines primaires et les thiols modifiés avec des bases de Schiff peuvent se condenser sur les chaînes latérales vicinales des acides aminés tyrosines (Y), asparagines (N), glutamines (Q), histidines (H), arginines (R), tryptophanes (W) pour créer des réticulations de type méthylène covalentes intra et inter-protéines (Figure 9) [54], [62]. Ces réticulations se forment uniquement entre les acides aminés proches dans l'espace [63]. Metz *et al.* ont démontré que les amines primaires et les thiols modifiés avec des bases de Schiff réagissaient majoritairement sur les chaînes latérales des Y, des R et sur les acides aminés situés en N-ter pour créer des ponts méthylènes [54].

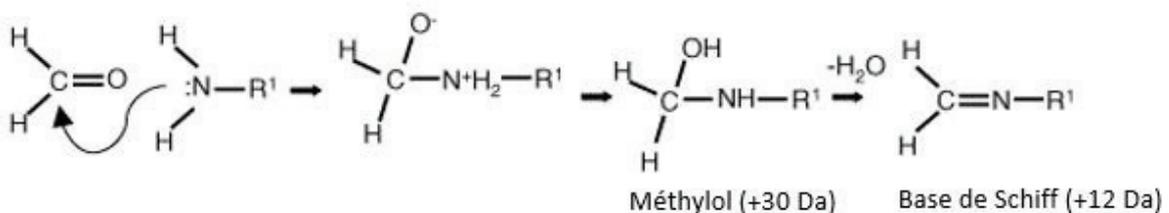
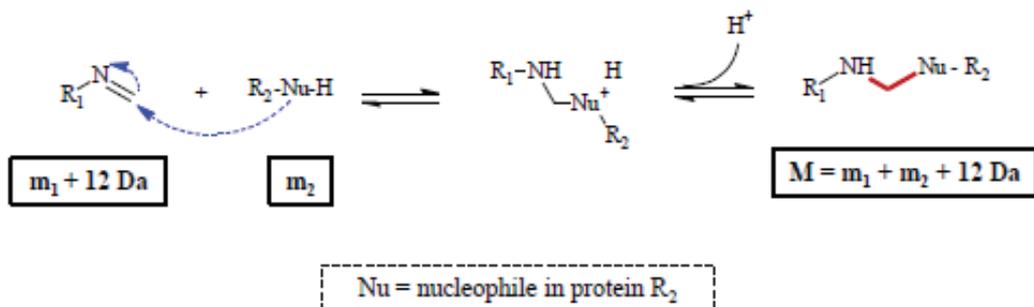


Figure 8 : Réactions du formaldéhyde sur les amines primaires conduisant à la formation de méthylol et de base de Schiff [54], [64], [65]. Le formaldéhyde réagit dans un premier temps sur l'amine primaire pour créer un adduit méthylol (+30 Da), qui peut se déshydrater et conduire à la base de Schiff.

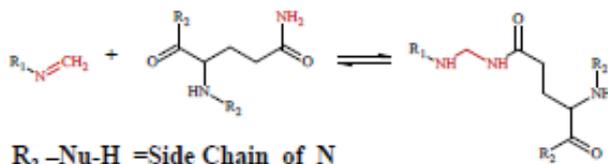
En présence d'un agent réducteur tel que le cyanoborohydrure de sodium (NaCNBH_3), les bases de Schiff se réduisent et forment des méthyles (+14 Da), des diméthyles (+28 Da), et des imidazolidinones méthylés sur les acides aminés en N-ter (+26 Da) [51], [66].

Les acides aminés les plus réactifs et les plus accessibles au solvant sont susceptibles d'être les plus modifiés par le formaldéhyde [62], [63], [67]. Les modifications chimiques dépendent considérablement des conditions de réaction [67]. La concentration en protéine et en formaldéhyde, le pH, la température et la composition de la matrice sont des paramètres à définir pour une réactivité optimale du formaldéhyde [67]. Celui-ci réagit préférentiellement à pH légèrement supérieur à 8 et à une température avoisinant les 37°C [51]. Les réactions intermédiaires conduisant à la formation d'adduits tels que des méthylols et des imines sont très rapides et réversibles contrairement aux réactions de pontage qui sont lentes et irréversibles [46]. Dans des conditions bien particulières (à 100°C et en présence de glycine ou de 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol), des auteurs ont démontré que les ponts méthylènes pourraient être réversibles [63], [68], [69].

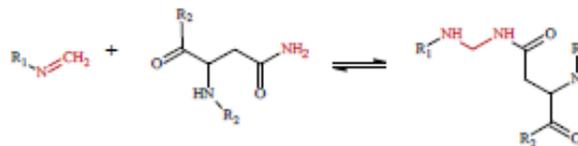
(a)



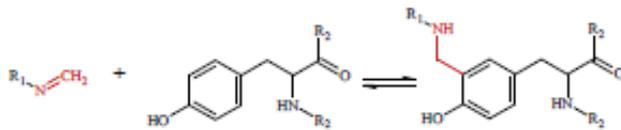
(b) R_2 -Nu-H = Side Chain of Q



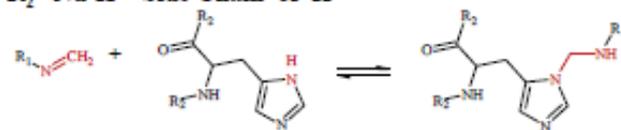
R_2 -Nu-H = Side Chain of N



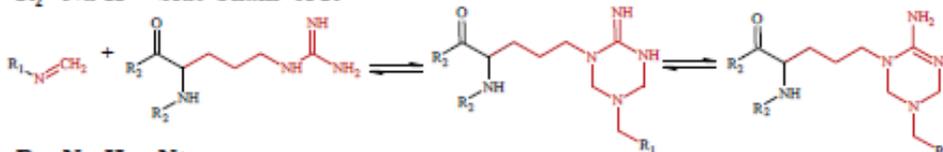
R_2 -Nu-H = Side Chain of Y



R_2 -Nu-H = Side Chain of H



R_2 -Nu-H = Side Chain of R



R_2 -Nu-H = Nterm

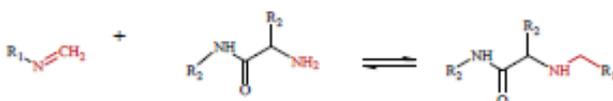


Figure 9 : Réactions de formation de ponts méthylènes dans les protéines. (a) Mécanisme général de formation du pont méthylène. (b) Réactions spécifiques de la base de Schiff sur les chaînes latérales des glutamines (Q), des asparagines (N), des tyrosines (Y), des histidines (H), des arginines (R) et des acides aminés situés en N-ter [70].

4. L'anatoxine tétanique comme vaccin

Le premier traitement thérapeutique du tétanos a été établi par Nocard en 1897 et consiste à injecter un sérum contenant des antitoxines tétaniques [1]. Il a surtout été utilisé pendant la première guerre mondiale. La durée d'immunisation de ce type de traitement est de courte durée : de quelques jours à quelques semaines [71].

Le médicament prophylactique ayant drastiquement réduit l'impact du tétanos sur les populations est le vaccin contre le tétanos. Dans les années 1920, Ramon et Descombey ont mis au point le principe actif de ce vaccin appelé communément anatoxine tétanique [72]. Cet antigène était obtenu par inactivation chimique de la toxine tétanique au formaldéhyde. À ce jour, il reste l'unique principe actif du vaccin contre le tétanos. En effet, bien que les procédés de production diffèrent selon les fabricants, les vaccins antitétaniques actuels contiennent tous de l'anatoxine tétanique (Tableau 1) [73], [74].

La production classique du vaccin antitétanique consiste dans un premier temps à mettre en culture des bactéries *Clostridium tetani* pendant plusieurs jours de manière à ce qu'elles produisent de la toxine tétanique (Figure 10). Cette dernière est ensuite purifiée, concentrée puis incubée avec du formaldéhyde entre 2 et 4 semaines. Avec ce processus chimique, la protéine n'est plus toxique mais conserve son caractère immunogène (vérifiée par des tests sur animaux). L'anatoxine tétanique est purifiée et adsorbée sur du gel d'aluminium [75]. Celle-ci est combinée la plupart du temps avec d'autres antigènes comme l'anatoxine diphtérique et le poliovirus inactivé dans le cas du vaccin trivalent DT-IPV [76].

L'anatoxine tétanique n'est pas seulement utilisée pour se prémunir du tétanos. Dans le vaccin conjugué *Haemophilus influenzae type b (Hib)*, cet antigène est employé en tant que protéine porteuse et permet d'améliorer l'immunogénicité du vaccin conjugué. L'anatoxine est couplée au polysaccharide d'*Hib* présent sur les enveloppes des bactéries *Hib*.

Sanofi Pasteur utilise deux types de procédés pour fabriquer l'anatoxine tétanique (Figure 10) : le procédé ancestral dit « Anatoxine Tétanique Purifiée » (ATP) pour fabriquer l'anatoxine tétanique du vaccin contre le tétanos et le procédé « Protéine Tétanique Concentrée » (PTC) dédié à la fabrication de l'anatoxine tétanique du vaccin conjugué *Hib*

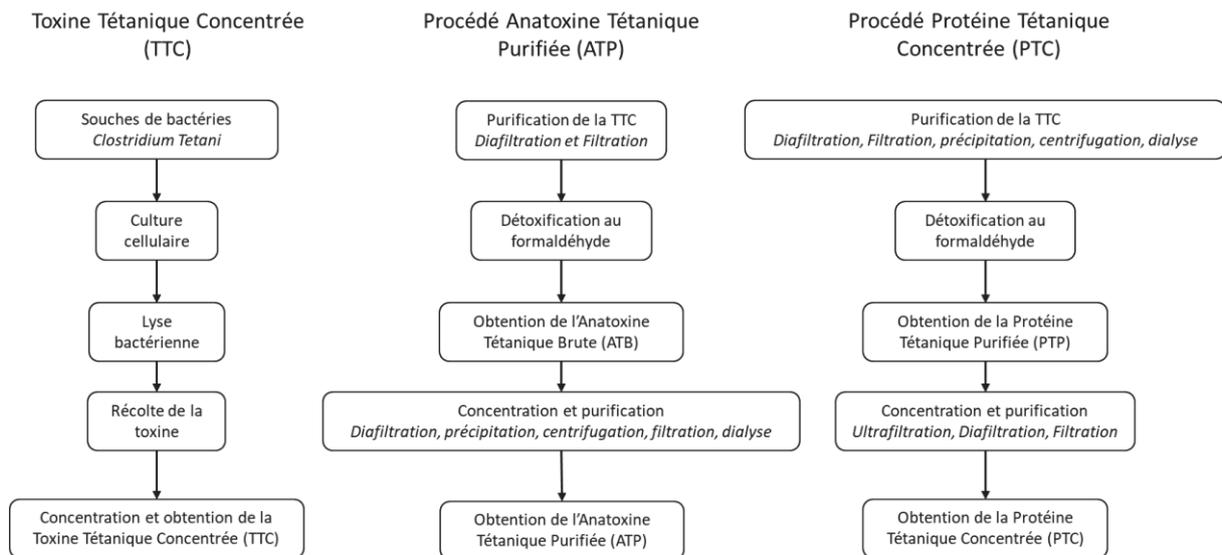


Figure 10 : Description des principales étapes des procédés ATP et PTC pour la fabrication de l'anatoxine tétanique des vaccins antitétaniques et hib.

Tableau 1 : Liste non exhaustive de vaccins utilisant l'anatoxine tétanique (sanofipasteur.com, gsk.com, ssi.dk, umassmed.edu).

Nom	Fabricant	Nom commercial
Vaccin antitétanique Tétanos	Sanofi Pasteur	Vaccin tétanique Pasteur®
Vaccin DT Diphthérie, tétanos	Sanofi Pasteur	DTvax®
Vaccin Td Tétanos, diphtérie	Sanofi Pasteur	TENIVAC®
Vaccin DTaP Tétanos, diphtérie, coqueluche	Sanofi Pasteur	Daptacel®
	GlaxoSmithKline	Infanrix (DTaP)®
Vaccin Tdap Tétanos, diphtérie, coqueluche	Sanofi Pasteur	Adacel®
	GlaxoSmithKline	Boostrix®
Vaccin dT-IPV Diphthérie, tétanos, poliomyélite	Sanofi Pasteur	Revaxis®
Vaccin DTaP-IPV Tétanos, diphtérie, coqueluche, poliomyélite	GlaxoSmithKline	Kinrix®
	Sanofi Pasteur	Quadracel®
		Tetravac®
Vaccin DTaP-HepB-IPV Tétanos, diphtérie, coqueluche, poliomyélite, hépatite B	GlaxoSmithKline	Pediarix®
Vaccin DTaP-IPV-Hib Tétanos, diphtérie, coqueluche, poliomyélite, haemophilus influenzae type b	Sanofi Pasteur	Pentacel®
	GlaxoSmithKline	Pentavac®
Vaccin DTaP-HepB-IPV-Hib Tétanos, diphtérie, coqueluche, poliomyélite, haemophilus influenzae type b, hépatite B	Sanofi Pasteur	InfanrixQuinta®
		Hexavac®
		Hexyon®
	Sanofi Pasteur et Merck Sharp & Co	Vaxelis®
	GlaxoSmithKline	Infanrixhexa®
Vaccin Hib Haemophilus influenzae type b	Sanofi Pasteur	ActHIB®
	GlaxoSmithKline	Hiberix®
	Merck Sharp & Co	PedvaxHIB®
Vaccin contre le méningocoque C, Y et Hib Haemophilus influenzae type b, méningocoque	GlaxoSmithKline	MenHibrix®
Vaccin contre le méningocoque C et Hib Haemophilus influenzae type b, méningocoque	GlaxoSmithKline	Menitorix®
Vaccin Hib et hépatite B Haemophilus influenzae type b	Merck Sharp & Co	Comvax®

5. Contrôle qualité du vaccin antitétanique

Dans l'industrie du vaccin, la principale préoccupation des producteurs est de fournir des produits d'excellente qualité. Pour cela, les industriels consacrent plus de 70 % du temps total de production du vaccin au contrôle qualité (leem.org).

Les contrôles opérés au cours de la production du vaccin antitétanique et les techniques mises en œuvre sont variés et multiples (Tableau 2). Ils consistent dans une première étape à valider la souche bactérienne. Ils sont ensuite réalisés sur l'anatoxine tétanique pour déterminer ses caractéristiques physico-chimiques (quantité, pureté, conformation...) ainsi que pour évaluer son innocuité, son immunogénicité et son antigénicité. Ces tests permettent notamment de vérifier que l'anatoxine ne présente aucune toxicité et que cette dernière est dans la capacité d'induire une réponse immunitaire efficace chez l'animal. Parallèlement aux tests qualités effectués sur l'anatoxine, des tests permettent de contrôler le pH de la solution vaccinale et les concentrations en formaldéhyde résiduel, en adjuvant et en excipients (stabilisateur, conservateur). Des tests qualité sont également effectués sur le vaccin pour vérifier l'intégrité, la stérilité et l'aspect du produit. Après leurs productions, les vaccins antitétaniques sont stockés pendant plus d'un an. Aussi, des tests sont opérés sur les vaccins pour contrôler leur stabilité au cours du stockage.

Tableau 2 : Principaux tests *in vitro* et *in vivo* recommandés par l'OMS pour le suivi qualité de l'anatoxine tétanique du vaccin contre le tétanos. Ces tests figurent dans l'annexe 5 du document intitulée "Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of tetanus vaccines" et dans le manuel "Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccine" [77], [78].

Techniques d'analyse	Informations sur le vaccin
Tests sur animaux (souris et cochons d'inde)	innocuité antigénicité, immunogénicité
ELISA « Enzyme linked ImmunoAssay »	Antigénicité, immunogénicité, quantité d'antigène exprimée en UI/mL
ToBI « Toxin binding Inhibition »	Innocuité
Mesure Ph-métrique	pH
Dosages colorimétriques	Teneurs en azote protéique (mg/L) et en formaldéhyde résiduel (µg/mL)
Test de flocculation de Ramon	Quantité d'antigène exprimée en limite de flocculation (Lf) Pureté antigénique en (Lf/mg d'azote protéique)
Dichroïsme circulaire	Conformation de l'antigène
Fluorescence	Conformation de l'antigène
SDS-PAGE	Caractérisation des impuretés protéiques, stabilité, pureté, altérabilité
Chromatographie en phase liquide (HPLC)	Intégrité, pureté, aggrégation

Les contrôles qualité posent actuellement des problèmes éthiques car une partie sont pratiqués *in vivo* sur des animaux de laboratoire. Ces dernières années, de nombreux progrès ont été réalisés pour limiter l'utilisation de ces animaux [79], [80]. Malgré ces efforts, les tests *in vivo* restent encore incontournables pour évaluer l'activité et la sécurité des vaccins antitétaniques et seul le développement d'un panel de méthodes *in vitro* pourrait permettre à long terme de les limiter voire de les remplacer [79], [81]–[86]. Les méthodes *in vitro* pourraient évaluer efficacement la qualité et la sécurité des vaccins antitétaniques et s'avèreraient plus précises, plus rapides et moins coûteuses que les tests *in vivo* qui sont actuellement employés [83], [85].

L'Agence européenne des médicaments (EMA) encourage les Etats membres de l'Union Européenne à limiter l'expérimentation animale, à initier, soutenir le développement et l'utilisation de méthodes *in vitro* définies par la directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Fin 2016, l'EMA, dans son document intitulé « *Guideline on the principles of regulatory acceptance of 3Rs (replacement, reduction, refinement) testing approaches* » (EMA/CHMP/CVMP/JEG-3Rs/450091/2012), a fourni la ligne directrice à suivre pour aider les industriels à instaurer ces nouvelles méthodes *in vitro*.

6. Analyse structurale de l'anatoxine tétanique et hypothèse de mécanisme de détoxification

La caractérisation structurale de l'anatoxine tétanique à l'échelle moléculaire est essentielle pour comprendre le mécanisme de détoxification ainsi que pour développer de nouvelles méthodes *in vitro* permettant de contrôler le procédé de fabrication. Pourtant, seulement deux études ont été publiées sur la structure de l'anatoxine tétanique afin d'identifier la nature et le positionnement des modifications chimiques induites par le formaldéhyde [51], [84]. Les auteurs de ces études ont utilisé la méthodologie illustrée sur la Figure 11.

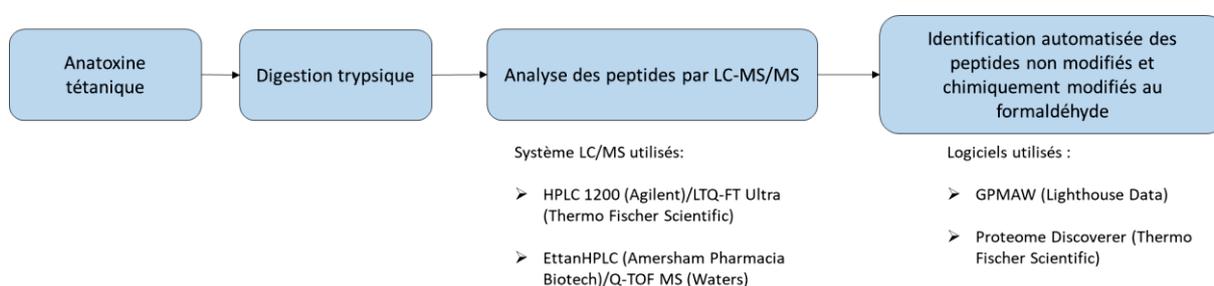


Figure 11 : Stratégie utilisée par Thaysen Andersen *et al.* [51] et Bayart *et al.* [84] pour identifier les modifications chimiques induites par le formaldéhyde sur la structure primaire de l'anatoxine tétanique.

Ils démontrent que seule la structure primaire de la protéine est fortement affectée par le traitement chimique au formaldéhyde [81], [84]. En effet, par spectrométrie de masse (MS), une quarantaine d'adduits, bases de Schiff et méthylols, ont été identifiés, localisés principalement sur les résidus lysines (K) mais également sur les résidus arginine (R), tryptophane (W), tyrosine (Y), histidine (H) et sur les acides aminés situés en N-ter. Étonnamment, Thaysen Andersen *et al.* ont observé plus d'une quinzaine d'adduits, méthyles et diméthyles, exclusivement localisés sur les résidus lysines alors qu'aucun agent chimique réducteur n'a été utilisé dans le protocole de digestion enzymatique [51]. L'origine de ces modifications n'est pas encore connue. Ces méthyles et diméthyles résulteraient de la réduction de bases de Schiff par un agent chimique ou biologique initialement présent dans l'anatoxine tétanique.

Les études réalisées par Bayart *et al.* et Thaysen Andersen *et al.* ne sont que qualitatives ; les auteurs n'ont pas évalué le taux moyen des modifications chimiques : bases de Schiff, méthylols, méthyles et diméthyles [51], [84].

Par ailleurs, le formaldéhyde est réputé pour être un puissant agent de réticulation et de stabilisation de protéines et, pourtant, aucun pont méthylène intra ou intermoléculaire n'a encore été caractérisé dans l'anatoxine tétanique. Les réticulations seraient extrêmement difficiles à identifier par LC-MS/MS [61], [70]. En effet, les peptides réticulés issus de la digestion trypsique de l'anatoxine tétanique seraient potentiellement très nombreux, hétérogènes et faiblement intenses. Le seul élément d'information permettant d'établir qu'un (ou plusieurs) pont(s) méthylène(s) est à l'évidence généré(s) à l'issue de la détoxification est l'observation du comportement de la toxine et de l'anatoxine tétanique dans le gel SDS-PAGE (Figure 12) [51], [84]. En effet, en conditions non réductrices, la toxine tétanique et l'anatoxine tétanique apparaissent à des bandes très intenses à 150 kDa (pistes 1 à 4). Après réduction des ponts disulfures (piste 5), la bande de la toxine tétanique à 150 kDa disparaît et seules deux bandes sont visibles, correspondant à la chaîne légère (50 kDa) et à la chaîne lourde (100 kDa). La bande de l'anatoxine tétanique à 150 kDa est quant à elle encore apparente même en conditions réductrices (pistes 6 à 8) ; les chaînes légère et lourde restent liées. Le formaldéhyde a potentiellement créé des réticulations entre les chaînes légère et lourde.

En outre, l'analyse SDS-PAGE a révélé une bande à 250 kDa pouvant correspondre à un dimère d'anatoxine (pistes 2 à 4, 6 à 8). Ce dimère pourrait témoigner de l'existence de réticulations inter-protéines.

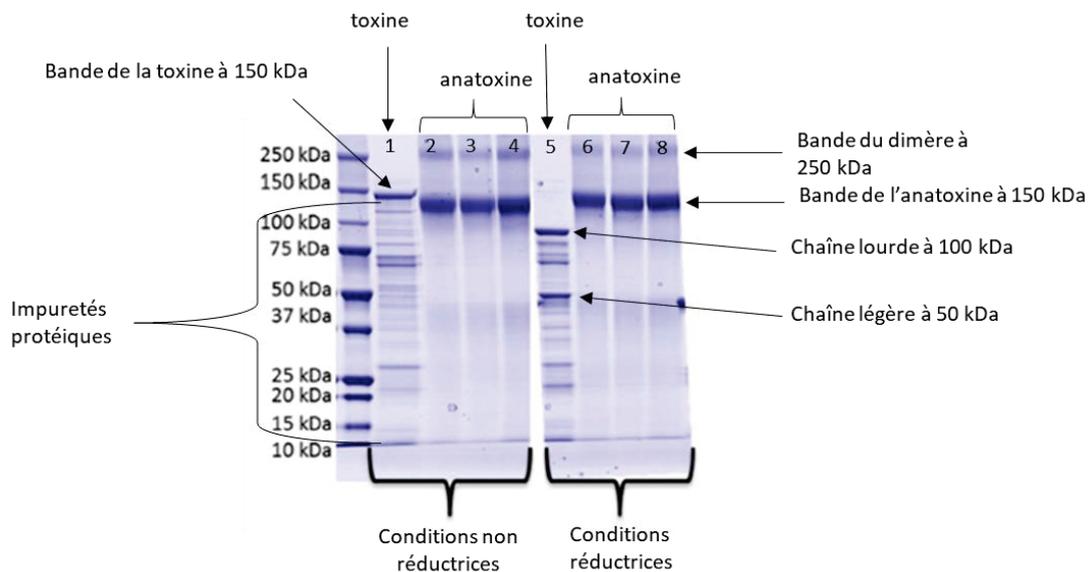


Figure 12 : Photographie du gel monodimensionnel SDS-PAGE d'un échantillon de toxine tétanique et de plusieurs lots industriels d'anatoxines tétaniques en conditions dénaturantes, non réductrices (pistes 1 à 4) et réductrices (pistes 5 à 8), adapté de [84].

Par ailleurs, les bandes correspondantes aux impuretés protéiques détectées dans la toxine (piste 1) sont plus diffuses dans l'anatoxine (pistes 2 à 4) [84]. Ce phénomène de diffusion pourrait s'expliquer par le fait qu'il existe de multiples formes modifiées au formaldéhyde pour chaque protéine contaminante.

Thaysen Andersen *et al.* et Bayart *et al.* suspectent les résidus lysines et tyrosines d'être impliqués dans les réticulations [51], [84]. En effet, par analyse des acides aminés, les auteurs ont démontré que ces résidus étaient les plus affectés par le formaldéhyde [51], [84]. De plus, comme évoqué précédemment, en théorie seuls les résidus lysines et cystéines modifiés avec des bases de Schiff peuvent induire des réticulations dans les protéines [54]. En outre, Metz *et al.* ont prouvé expérimentalement que, dans les protéines, les résidus lysines modifiés avec des bases de Schiff se condensaient majoritairement sur les résidus tyrosines pour créer des ponts méthylènes.

Les analyses issues de la fluorescence UV/visible et du dichroïsme circulaire ont révélés des différences conformationnelles entre la toxine et l'anatoxine tétanique. [51], [81], [84], [87]. Ces modifications de la structure secondaire et tertiaire de la protéine seraient causées par les ponts méthylènes.

Les études menées sur l'anatoxine tétanique avaient pour principal objectif de comprendre le mécanisme exact de détoxification de la toxine tétanique au formaldéhyde afin de développer de nouvelles méthodes *in vitro* pour contrôler l'activité et la sécurité du vaccin antitétanique. Cet objectif n'a pas été atteint puisqu'à ce jour, ce mécanisme reste encore obscur [51], [84].

Comme évoqué précédemment, pour que la toxine tétanique provoque le tétanos, celle-ci doit (i) se lier et s'internaliser dans le nerf, (ii) transloquer sa chaîne légère dans le cytosol du neurone afin qu'elle puisse (iii) cliver la synaptobrevine. Ainsi, pour que la toxine tétanique ne soit plus toxique, Thaysen Andersen *et al.* ont supposé que la modification de l'une de ces fonctions (i,ii,iii) au formaldéhyde suffisait à inhiber la toxicité de la protéine [51].

En outre, Bayart *et al.* et Thaysen Andersen *et al.* n'ont pas détecté de peptide résultant du site actif comme étant modifié par des adduits méthylols, bases de Schiff, méthyles et diméthyles [51]. En conséquence, la détoxification ne peut pas s'expliquer par la modification du site actif avec ces adduits.

Les adduits et les ponts méthylènes pourraient soit empêcher l'anatoxine tétanique de se lier et de s'internaliser dans le nerf, soit cacher le site actif de la protéine. En effet, certains adduits ont été localisés près du site catalytique [51].

Les ponts méthylènes intermoléculaires seraient suspectés d'être à l'origine de la détoxification dans la mesure où ils pourraient empêcher l'anatoxine tétanique de libérer sa chaîne légère dans le cytosol du neurone. Cette hypothèse est considérée par les auteurs comme étant la plus probable [51], [84]. La caractérisation de ponts méthylènes intermoléculaires pourrait ainsi expliquer en partie le mécanisme de détoxification.

7. Objectifs des travaux de thèse

Plusieurs questionnements ont été soulevés dans la partie « analyse structurale de l'anatoxine tétanique et hypothèse de mécanisme de détoxification » : quel est le taux moyen des modifications chimiques induites par le formaldéhyde dans l'anatoxine tétanique ? Existe-t-il réellement des réticulations dans l'anatoxine ? Si oui, est-il possible de les caractériser, à l'échelle moléculaire par LC-MS/MS? Quel est le mécanisme exact de détoxification de la toxine tétanique?

Pour répondre à ces questions, nous avons caractérisé, localisé et quantifié de manière la plus exhaustive possible les modifications induites par le formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique en utilisant la LC-MS/MS.

Aussi, pour un meilleur contrôle qualité de l'anatoxine tétanique, nous avons développé des tests *in vitro* par LC-MS/MS complémentaires aux tests existants, uniques, capables, d'une part, de quantifier de manière relative les formes de la toxine tétanique non modifiées et chimiquement modifiées au formaldéhyde et, d'autre part, de déterminer les concentrations spécifiques et absolues (en g/L) en toxine et en anatoxine tétanique dans des lots de vaccins.

Le **chapitre II** expose les résultats de caractérisation et de quantification des modifications induites par le formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique. Les modifications chimiques ont d'abord été identifiées par nanoLC-MS/MS puis localisées sur la structure tridimensionnelle entière de la toxine tétanique. Elles ont ensuite été quantifiées de manière relative en employant l'approche « *Label free* ».

Le **chapitre III** décrit le développement des méthodes de contrôle qualité *in vitro* par LC-MS/MS pour réaliser la quantification relative et absolue de la toxine et de l'anatoxine tétanique ainsi que pour effectuer la quantification relative des formes non modifiées et chimiquement modifiées au formaldéhyde de la toxine. La stratégie AQUA « *Absolute QUAntification* » a été appliquée pour la quantification absolue de la toxine et de l'anatoxine tétanique.

Enfin, la thèse est résumée et les perspectives sont discutées dans **le dernier chapitre**.

8. Références bibliographiques

- [1] P. Guilfoile, *Tetanus (Deadly Diseases & Epidemics)*. 2008.
- [2] H. Bruggemann *et al.*, "The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 3, pp. 1316–1321, Feb. 2003.
- [3] B. Hassel, "Tetanus: Pathophysiology, Treatment, and the Possibility of Using Botulinum Toxin against Tetanus-Induced Rigidity and Spasms," *Toxins (Basel)*, vol. 5, no. 1, pp. 73–83, Jan. 2013.
- [4] M. Ahaduzzaman, *Updates on tetanus toxin: a fundamental approach*, vol. 2. 2015.
- [5] B. R. Nathan and T. P. Bleck, "CHAPTER 42 - Tetanus A2 - Guerrant, Richard L.," D. H. Walker and P. F. B. T.-T. I. D. P. Weller *Pathogens and Practice (Third Edition)*, Eds. Edinburgh: W.B. Saunders, 2011, pp. 284–288.
- [6] O. Rossetto, M. Scorzeto, A. Megighian, and C. Montecucco, "Tetanus neurotoxin," *Toxicon*, vol. 66, pp. 59–63, May 2013.
- [7] C. L. Thwaites and L. M. Yen, "32 - Tetanus A2 - Farrar, Jeremy," P. J. Hotez, T. Junghanss, G. Kang, D. Laloo, and N. J. B. T.-M. T. I. D. (Twenty-T. E. White, Eds. London: W.B. Saunders, 2014, p. 399–403.e1.
- [8] R. Blumenthal and W. H. Habig, "Mechanism of tetanolysin-induced membrane damage: studies with black lipid membranes.," *J. Bacteriol.*, vol. 157, no. 1, pp. 321–323, 1984.
- [9] M. Ganesh, N. K. Sheikh, P. Shah, G. Mehetre, M. S. Dharne, and B. S. Nagoba, "Detection of *Clostridium tetani* in human clinical samples using tetX specific primers targeting the neurotoxin," *J. Infect. Public Health*, vol. 9, no. 1, pp. 105–109, 2016.
- [10] H. H. Kyu *et al.*, "Mortality from tetanus between 1990 and 2015: findings from the global burden of disease study 2015.," *BMC Public Health*, vol. 17, no. 1, p. 179, Feb. 2017.
- [11] C. L. Thwaites, N. J. Beeching, and C. R. Newton, "Maternal and neonatal tetanus," *Lancet*, vol. 385, no. 9965, pp. 362–370, Jan. 2015.
- [12] H. Blencowe, J. Lawn, J. Vandelaer, M. Roper, and S. Cousens, "Tetanus toxoid immunization to reduce mortality from neonatal tetanus," *Int. J. Epidemiol.*, vol. 39, no. Suppl 1, pp. i102–i109, Apr. 2010.

- [13] L. Rethy and L. A. Rethy, "Human lethal dose of tetanus toxin.," *Lancet (London, England)*, vol. 350, no. 9090. England, p. 1518, Nov-1997.
- [14] M. Pirazzini, D. Azarnia Tehran, O. Leka, G. Zanetti, O. Rossetto, and C. Montecucco, "On the translocation of botulinum and tetanus neurotoxins across the membrane of acidic intracellular compartments.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1858, no. 3, pp. 467–474, Mar. 2016.
- [15] G. Schiavo, E. Papini, G. Genna, and C. Montecucco, "An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin," *Infect. Immun.*, vol. 58, no. 12, pp. 4136–4141, Dec. 1990.
- [16] S. Surana, A. P. Tosolini, I. F. G. Meyer, A. D. Fellows, S. S. Novoselov, and G. Schiavo, "The travel diaries of tetanus and botulinum neurotoxins.," *Toxicon*, vol. 147, pp. 58–67, Jun. 2018.
- [17] R. Pellizzari, O. Rossetto, G. Schiavo, and C. Montecucco, "Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses.," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 354, no. 1381, pp. 259–268, Feb. 1999.
- [18] M. Aleman, Y. S. Nout-Lomas, and S. M. Reed, "Chapter 11 - Disorders of the Neurologic System," S. M. Reed, W. M. Bayly, and D. C. B. T.-E. I. M. (Fourth E. Sellon, Eds. W.B. Saunders, 2018, pp. 580–708.
- [19] U. Eisel *et al.*, "Tetanus toxin: primary structure, expression in {E}. coli, and homology with botulinum toxins.," *EMBO J*, vol. 5, no. 10, pp. 2495–2502, Oct. 1986.
- [20] "The complete nucleotide sequence of tetanus toxin." .
- [21] K. G. KRIEGLSTEIN, A. H. HENSCHEN, U. WELLER, and E. HABERMANN, "Limited proteolysis of tetanus toxin," *Eur. J. Biochem.*, vol. 202, no. 1, pp. 41–51, 1991.
- [22] G. Masuyer, J. Conrad, and P. al Stenmark, "The structure of the tetanus toxin reveals pH-mediated domain dynamics," *EMBO Rep.*, vol. 18, no. 8, pp. 1306–1317, 2017.
- [23] K. Bharati and N. K. Ganguly, "Cholera toxin: A paradigm of a multifunctional protein," *Indian J. Med. Res.*, vol. 133, no. 2, pp. 179–187, Feb. 2011.
- [24] C. W. Finn, R. P. Silver, W. H. Habig, M. C. Hardegree, G. Zon, and C. F. Garon, "The structural gene for tetanus neurotoxin is on a plasmid," *Science (80-.)*, vol. 224, no. 4651, pp. 881–884, 1984.
- [25] G. Schiavo, B. Poulain, O. Rossetto, F. Benfenati, L. Tauc, and C. Montecucco, "Tetanus

- toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc," *EMBO J.*, vol. 11, no. 10, pp. 3577–3583, Oct. 1992.
- [26] K. Bercsenyi *et al.*, "Nidogens are therapeutic targets for the prevention of tetanus," *Science (80-.)*, vol. 346, no. 6213, pp. 1118–1123, 2014.
- [27] P. Munro, H. Kojima, J. L. Dupont, J. L. Bossu, B. Poulain, and P. Boquet, "High sensitivity of mouse neuronal cells to tetanus toxin requires a GPI-anchored protein.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 289, no. 2, pp. 623–629, Nov. 2001.
- [28] A. C. Calvo, S. Oliván, R. Manzano, P. Zaragoza, J. Aguilera, and R. Osta, "Fragment {C} of {Tetanus} {Toxin}: {New} {Insights} into {Its} {Neuronal} {Signaling} {Pathway}," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 6, pp. 6883–6901, Jun. 2012.
- [29] C. Chen, Z. Fu, J.-J. P. Kim, J. T. Barbieri, and M. R. Baldwin, "Gangliosides as {High} {Affinity} {Receptors} for {Tetanus} {Neurotoxin}," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 39, pp. 26569–26577, Sep. 2009.
- [30] C. Fotinou *et al.*, "The crystal structure of tetanus toxin {Hc} fragment complexed with a synthetic {GT}1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 34, pp. 32274–32281, Aug. 2001.
- [31] F. L. Yeh *et al.*, "SV2 Mediates Entry of Tetanus Neurotoxin into Central Neurons," *PLOS Pathog.*, vol. 6, no. 11, pp. 1–12, 2010.
- [32] M. A. Breidenbach and A. T. Brunger, "2.3 {Å} crystal structure of tetanus neurotoxin light chain," *Biochemistry*, vol. 44, no. 20, pp. 7450–7457, May 2005.
- [33] A. Palermo *et al.*, "Identification of a Tetanus Toxin Specific Epitope in Single Amino Acid Resolution.," *Biotechnol. J.*, vol. 12, no. 10, Oct. 2017.
- [34] R. da Silva Antunes *et al.*, "Definition of Human Epitopes Recognized in Tetanus Toxoid and Development of an Assay Strategy to Detect Ex Vivo Tetanus CD4+ T Cell Responses," *PLoS One*, vol. 12, no. 1, p. e0169086, Jan. 2017.
- [35] P. C. Ho *et al.*, "Identification of two promiscuous T cell epitopes from tetanus toxin.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 20, no. 3, pp. 477–483, Mar. 1990.
- [36] P. Panina-Bordignon, A. Tan, A. Termijtelen, S. Demotz, G. Corradin, and A. Lanzavecchia, "Universally immunogenic {T} cell epitopes: promiscuous binding to human {MHC} class {II} and promiscuous recognition by {T} cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 19, no. 12, pp. 2237–2242, Dec. 1989.

- [37] K. Lockyer, F. Gao, J. P. Derrick, and B. Bolgiano, "Structural correlates of carrier protein recognition in tetanus toxoid-conjugated bacterial polysaccharide vaccines," *Vaccine*, vol. 33, no. 11, pp. 1345–1352, Mar. 2015.
- [38] N. Biradhar, S. V Nimmagadda, S. M. Aavula, S. Parthasarathy, S. Sula, and K. Maithal, "Identification and characterization of novel binding epitope of tetanus toxoid by phage display peptide library," *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, vol. 9, no. 1, pp. 49–58, Jan. 2015.
- [39] E. A. James, J. Bui, D. Berger, L. Huston, M. Roti, and W. W. Kwok, "Tetramer-guided epitope mapping reveals broad, individualized repertoires of tetanus toxin-specific {CD}4+ {T} cells and suggests {HLA}-based differences in epitope recognition," *Int. Immunol.*, vol. 19, no. 11, pp. 1291–1301, Nov. 2007.
- [40] B. M. Diethelm-Okita, D. K. Okita, L. Banaszak, and B. M. Conti-Fine, "Universal epitopes for human {CD}4+ cells on tetanus and diphtheria toxins," *J. Infect. Dis.*, vol. 181, no. 3, pp. 1001–1009, Mar. 2000.
- [41] B. M. Diethelm-Okita, R. Raju, D. K. Okita, and B. M. Conti-Fine, "Epitope repertoire of human {CD}4+ {T} cells on tetanus toxin: identification of immunodominant sequence segments," *J. Infect. Dis.*, vol. 175, no. 2, pp. 382–391, Feb. 1997.
- [42] J. C. Reece, H. M. Geysen, and S. J. Rodda, "Mapping the major human {T} helper epitopes of tetanus toxin. {The} emerging picture," *J. Immunol.*, vol. 151, no. 11, pp. 6175–6184, Dec. 1993.
- [43] D. Valmori, A. Pessi, E. Bianchi, and G. Corradin, "Use of human universally antigenic tetanus toxin {T} cell epitopes as carriers for human vaccination," *J. Immunol.*, vol. 149, no. 2, pp. 717–721, Jul. 1992.
- [44] H. Farwanah and T. Kolter, "Lipidomics of glycosphingolipids.," *Metabolites*, vol. 2, no. 1, pp. 134–164, Feb. 2012.
- [45] J. F. Walker, *Formaldehyde*. Reinhold, 1964.
- [46] R. Thavarajah, V. K. Mudimbaimannar, J. Elizabeth, U. K. Rao, and K. Ranganathan, "Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation," *J Oral Maxillofac Pathol*, vol. 16, no. 3, pp. 400–405, 2012.
- [47] J. A. Swenberg, B. C. Moeller, K. Lu, J. E. Rager, R. Fry, and T. B. Starr, "Formaldehyde Carcinogenicity Research: 30 Years and Counting for Mode of Action, Epidemiology, and

- Cancer Risk Assessment," *Toxicol. Pathol.*, vol. 41, no. 2, pp. 181–189, Feb. 2013.
- [48] "Assessment of total exposure to phenol-formaldehyde resin glue in plywood manufacturing. - PubMed - NCBI." .
- [49] H. Aggerbeck and I. Heron, "Detoxification of diphtheria and tetanus toxin with formaldehyde. Detection of protein conjugates," *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.*, vol. 20, no. 2, pp. 109–115, Jun. 1992.
- [50] T. Wilton, G. Dunn, D. Eastwood, P. D. Minor, and J. Martin, "Effect of Formaldehyde Inactivation on Poliovirus," *J. Virol.*, vol. 88, no. 20, pp. 11955–11964, Oct. 2014.
- [51] M. Thaysen-Andersen, S. B. Jørgensen, E. S. Wilhelmsen, J. W. Petersen, and P. Højrup, "Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin," *Vaccine*, vol. 25, no. 12, pp. 2213–2227, Mar. 2007.
- [52] S. Gard, "Inactivation of poliovirus by formaldehyde: Theoretical and practical aspects," *Bull. World Health Organ.*, vol. 17, no. 6, p. 979, 1957.
- [53] H. Fraenkel-Conrat, M. Cooper, and H. S. Olcott, "The {Reaction} of {Formaldehyde} with {Proteins}," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 67, no. 6, pp. 950–954, 1945.
- [54] B. Metz *et al.*, "Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 8, pp. 6235–6243, Feb. 2004.
- [55] N. H. Chen, K. Y. Djoko, F. J. Veyrier, and A. G. McEwan, "Formaldehyde {Stress} {Responses} in {Bacterial} {Pathogens}," *Front. Microbiol.*, vol. 7, 2016.
- [56] J.-M. Raquez, M. Deléglise, M. F. Lacrampe, and P. Krawczak, *Thermosetting (bio)materials derived from renewable resources: A critical review*, vol. 35. 2010.
- [57] S. Magdeldin and T. Yamamoto, *Toward deciphering proteomes of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues*, vol. 12. 2012.
- [58] J. H. Bedino, "Embalming chemistry: glutaraldehyde versus formaldehyde," *Champion Expand. Encycl. Mortu. Pract.*, vol. 649, pp. 2614–2632, 2003.
- [59] D. French and J. T. Edsall, "The Reactions of Formaldehyde with Amino Acids and Proteins," vol. 2, M. L. Anson and J. T. B. T.-A. in P. C. Edsall, Eds. Academic Press, 1945, pp. 277–335.
- [60] B. W. Sutherland, J. Toews, and J. Kast, "Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions," *J Mass Spectrom*, vol. 43, no. 6, pp. 699–715, Jun. 2008.

- [61] S. Srinivasa, X. Ding, and J. Kast, "Formaldehyde cross-linking and structural proteomics: {Bridging} the gap," *Methods*, vol. 89, pp. 91–98, Nov. 2015.
- [62] B. Metz *et al.*, "Identification of Formaldehyde-Induced Modifications in Proteins: Reactions with Insulin," *Bioconjug. Chem.*, vol. 17, no. 3, pp. 815–822, May 2006.
- [63] E. A. Hoffman, B. L. Frey, L. M. Smith, and D. T. Auble, "Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes," *J. Biol. Chem.*, p. jbc.R115.651679, Sep. 2015.
- [64] J. Toews, J. C. Rogalski, T. J. Clark, and J. Kast, "Mass spectrometric identification of formaldehyde-induced peptide modifications under in vivo protein cross-linking conditions.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 618, no. 2, pp. 168–183, Jun. 2008.
- [65] S. Barker, M. Weinfeld, and D. Murray, "DNA–protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences," *Mutat. Res. Mutat. Res.*, vol. 589, no. 2, pp. 111–135, 2005.
- [66] M. J. Gidley and J. K. Sanders, "Reductive methylation of proteins with sodium cyanoborohydride. Identification, suppression and possible uses of N-cyanomethyl by-products.," *Biochem. J.*, vol. 203, no. 1, pp. 331–334, Apr. 1982.
- [67] M. S. Salnikova, S. B. Joshi, J. H. Rytting, M. Warny, and C. R. Middaugh, "Physical {Characterization} of {Clostridium} {Difficile} {Toxins} and {Toxoids}: {Effect} of the {Formaldehyde} {Crosslinking} on {Thermal} {Stability}," *JPharmSci*, vol. 97, no. 9, pp. 3735–3752, Sep. 2008.
- [68] C. T. Vollert, W. J. Moree, S. Gregory, S. J. Bark, and J. L. Eriksen, "Formaldehyde scavengers function as novel antigen retrieval agents," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 17322, Nov. 2015.
- [69] S. Karmakar *et al.*, "Organocatalytic removal of formaldehyde adducts from RNA and DNA bases," *Nat. Chem.*, vol. 7, p. 752, Aug. 2015.
- [70] S. Srinivasa, "Comparison of formaldehyde with established crosslinkers to characterize transient protein structures using mass spectrometry." 2017.
- [71] S. H. E. Kaufmann, "Remembering Emil von Behring: from Tetanus Treatment to Antibody Cooperation with Phagocytes.," *mBio*, vol. 8, no. 1. United States, Feb-2017.
- [72] J. E. (Joseph E. . Alouf, M. R. Popoff, and S. (Online service), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, 3rd ed. Amsterdam ; Boston : Elsevier, 2006.

- [73] “WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-third report.,” *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, no. 980, p. 1–489, back cover, 2014.
- [74] F. B. Guilhen, A. G. Trezena, S. M. A. Prado, H. G. Higashi, and M. H. Sonobe, “Characterization of production processes for tetanus and diphtheria anatoxins,” *Biologicals*, vol. 42, no. 2, pp. 91–100, Mar. 2014.
- [75] M. H. Roper, S. G. F. Wassilak, H. M. Scobie, A. D. Ridpath, and W. A. Orenstein, “58 - Tetanus Toxoid BT - Plotkin’s Vaccines (Seventh Edition),” Elsevier, 2018, p. 1052–1079.e18.
- [76] V. Gajdos, E. Vidor, P. Richard, C. Tran, and C. Sadorge, “Diphtheria, tetanus and poliovirus antibody persistence 5 years after vaccination of pre-schoolers with two different diphtheria, tetanus and inactivated poliomyelitis vaccines (Td-IPV or DT-IPV) and immune responses to a booster dose of DTaP-IPV.,” *Vaccine*, vol. 33, no. 32, pp. 3988–3996, Jul. 2015.
- [77] W. H. Organization and others, “Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of tetanus vaccines (adsorbed),” *Replace. Annex*, vol. 2, 2012.
- [78] W. H. Organization and others, “Manual for quality control of diphtheria, tetanus and pertussis vaccines,” 2013.
- [79] R. McFarland *et al.*, “Non-animal replacement methods for human vaccine potency testing: state of the science and future directions,” *Procedia Vaccinol.*, vol. 5, pp. 16–32, 2011.
- [80] C. F. M. Hendriksen, “Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement.,” *Expert Rev. Vaccines*, vol. 8, no. 3, pp. 313–322, Mar. 2009.
- [81] B. Metz *et al.*, “Physicochemical and immunochemical assays for monitoring consistent production of tetanus toxoid,” *Biologicals*, vol. 41, no. 4, pp. 231–237, Jul. 2013.
- [82] B. Metz *et al.*, “Quality-control issues and approaches in vaccine development,” *Expert Rev. Vaccines*, vol. 8, no. 2, pp. 227–238, Feb. 2009.
- [83] B. Metz, C. F. M. Hendriksen, W. Jiskoot, and G. F. A. Kersten, “Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems,” *Vaccine*, vol. 20, no. 19–20, pp. 2411–2430, Jun. 2002.
- [84] C. Bayart, S. Peronin, E. Jean, J. Paladino, P. Talaga, and M. Le Borgne, “The combined

- use of analytical tools for exploring tetanus toxin and tetanus toxoid structures,” *J. Chromatogr. B*, vol. 1054, no. Supplement C, pp. 80–92, 2017.
- [85] B. Metz *et al.*, “The potential of physicochemical and immunochemical assays to replace animal tests in the quality control of toxoid vaccines. {The} report and recommendations of {ECVAM} workshop 61,” *Altern Lab Anim*, vol. 35, no. 3, pp. 323–331, Jun. 2007.
- [86] P.-L. Germain, L. Chiapperino, and G. Testa, “The European politics of animal experimentation: From Victorian Britain to ‘Stop Vivisection,’” *Stud. Hist. Philos. Sci. Part C Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.*, vol. 64, pp. 75–87, 2017.
- [87] H. Alsarraf *et al.*, “Biophysical comparison of diphtheria and tetanus toxins with the formaldehyde-detoxified toxoids, the main components of diphtheria and tetanus vaccines.,” *Virulence*, vol. 8, no. 8, pp. 1880–1889, Nov. 2017.

CHAPITRE II

CARACTERISATION STRUCTURALE DE L'ANATOXINE TETANIQUE

Résumé

La présente étude vise à évaluer les impacts du formaldéhyde sur la TTD en identifiant, en localisant et en quantifiant de manière la plus exhaustive possible toutes les modifications chimiques induites par le formaldéhyde et ce, sur l'ensemble de la structure tridimensionnelle de la TT. Pour ce faire, un unique lot industriel de TT a été inactivé soit avec du formaldéhyde « léger » (CH_2O ,TTD), soit avec du formaldéhyde deutéré « lourd » (CD_2O ,TTDd) puis purifié par SDS-PAGE. Un mélange équimolaire de toxine modifiée CH_2O et CD_2O digéré par la trypsine a ensuite été analysé par nano-chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (nanoLC-MS/MS).

Premièrement, nos résultats expérimentaux ont montré que certaines zones de la TTD sont non affectées par le formaldéhyde. En ne prenant en considération que les peptides non modifiés, 90 % de la couverture de séquence a été obtenue pour la TTD.

Deuxièmement, notre stratégie analytique s'est avérée efficace pour identifier les modifications chimiques dans la mesure où elle a permis, d'une part, de marquer isotopiquement les peptides modifiés au formaldéhyde et, d'autre part, de connaître le nombre de modifications greffées sur chaque peptide. Cette méthodologie nous a permis d'identifier 106 modifications chimiques comprenant des bases de Schiff, des adduits méthylols, des méthyles et des diméthyles. Pour la première fois, des réticulations de type méthylène ont été caractérisées sans ambiguïté dans la TTD, localisées dans les sous-unités et entre les chaînes légère et lourde. Les peptides chimiquement modifiés avec des ponts méthylènes ont été identifiées grâce à des mesures de masses précises (résolution du spectromètre de masse à 500 000 pour un m/z de 200) et à l'interprétation manuelle « *de novo* » de leur spectre de fragmentation.

La quantification « *label free* » des peptides a révélé que dans la TTD les peptides non chimiquement modifiés présentaient les signaux les plus intenses ; parmi les peptides impactés par le formaldéhyde, ceux contenant un pont méthylène et une base de Schiff étaient prédominants, tandis que les peptides contenant des dérivés méthylols, méthyles et diméthyles étaient peu abondants.

Les modifications induites par le formaldéhyde comprenant notamment les réticulations pourraient expliquer la perte de la toxicité de la TTD. Ces réticulations démontreraient pourquoi les chaînes légère et lourde restent liées même après réduction de l'unique pont

disulfure de la TTD. Avec ces nouvelles informations structurales, cette étude permet de développer de nouvelles méthodes *in vitro* pour suivre le procédé d'inactivation chimique au formaldéhyde ainsi que pour évaluer la reproductibilité et la qualité des TTD produites à l'échelle industrielle.

Mots-clés : Anatoxine tétanique, modifications induites par le formaldéhyde, nanoLC-MS/MS, caractérisation structurale et quantification « *label free* »

1. Introduction

Cette section décrit les méthodologies par LC-MS/MS utilisées pour l'identification et la quantification des modifications induites par le formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique (TTD) et le contexte d'étude.

1.1. Les méthodologies « *Bottom Up* » et « *label free* » pour la caractérisation et la quantification des modifications induites par le formaldéhyde par LC-MS/MS

La méthodologie utilisée pour la caractérisation de l'anatoxine tétanique est l'approche « *Bottom Up* » illustrée sur la Figure 13. La protéine est dans un premier temps digérée par la trypsine. Les fragments protéiques (peptides) résultants sont ensuite séparés par chromatographie liquide généralement en phase inverse (C₁₈) [1]. Puis, les peptides sont successivement ionisés et analysés par spectrométrie de masse (MS). Le spectromètre de masse mesure dans un premier temps les rapports masse/charge (m/z) des peptides ionisés (appelé ion précurseur/parent) et de ses différents isotopes. Ceux-ci figurent dans le spectre appelé « MS¹ ». Le peptide est ensuite fragmenté par un gaz inerte (azote) et une tension additionnelle en plusieurs fragments. Les modes de fragmentation utilisés dans cette étude sont les modes CID « *Collision-Induced Dissociation* » et HCD « *Higher-energy Collisional Dissociation* » qui permettent de générer des ions fragments caractéristiques b et y (Figure 14). Les rapports m/z des ions fragments (ions produits/fils) produits sont enregistrés dans le spectre « MS² » ou « MS/MS ». Un spectre de fragmentation MS² est spécifique à un unique peptide. À partir des spectres de fragmentation MS/MS, l'utilisation d'un algorithme de recherche et d'une base de donnée permet de déterminer automatiquement les séquences peptidiques. Les spectres de fragmentation peuvent également être interprétés manuellement « *de novo* ».

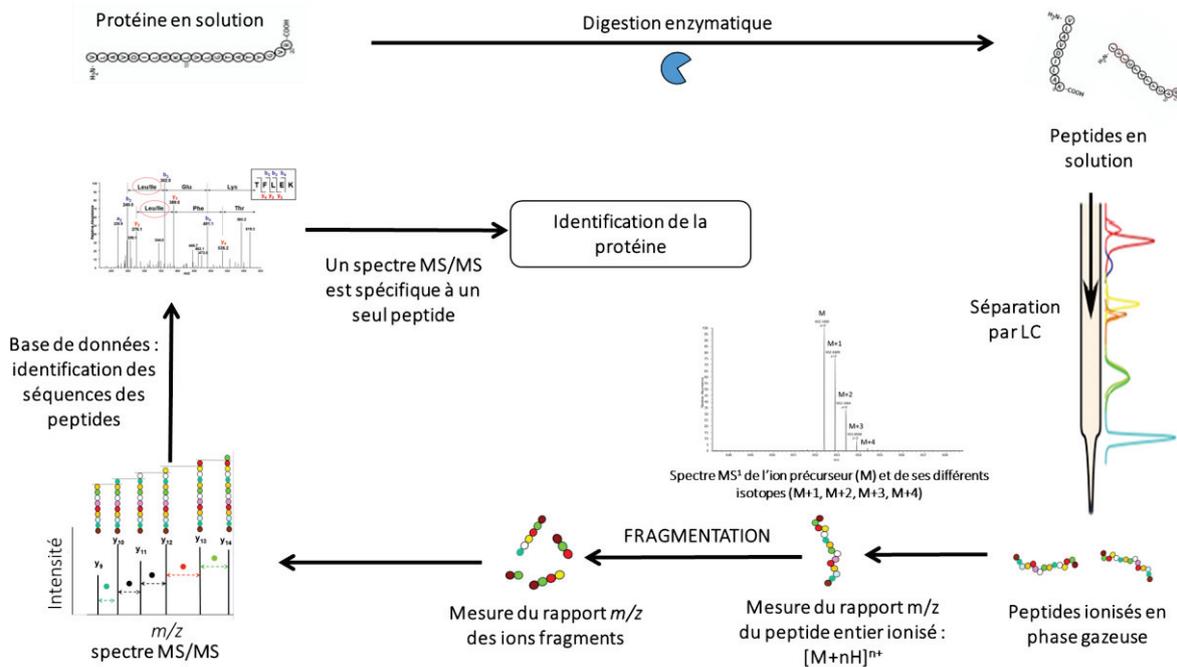


Figure 13 : Méthodologie « Bottom Up » la plus répandue pour caractériser une protéine par LC-MS/MS

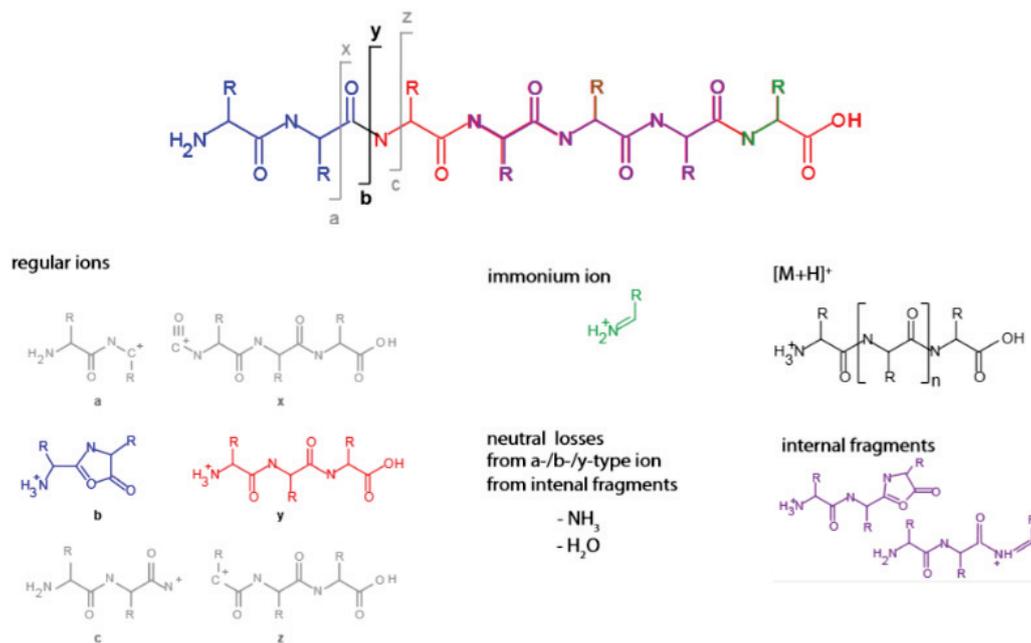


Figure 14 : Nomenclature universelle proposée par Roepstorff et adaptée par Bienmann [2], [3] des principaux ions générés après fragmentation des peptides avec les modes HCD, CID dans la cellule de collision du spectromètre de masse. Les ions fragments possédant la partie N-terminale du peptide sont appelés a, b, c et ceux comprenant la partie C-terminale sont nommés x, y, z. Les ions majoritaires après fragmentation CID et HCD sont les b et y. Ces derniers sont induits après clivage des liaisons amides des peptides [4].

La stratégie de quantification « *label free, Area Under the Curve* » a été employée pour la quantification relative des peptides non modifiés et modifiés par le formaldéhyde. Elle repose sur le principe que l'aire du pic chromatographique est proportionnelle à la concentration du peptide correspondant (Figure 15). La quantification relative est réalisée en comparant les aires des peptides.

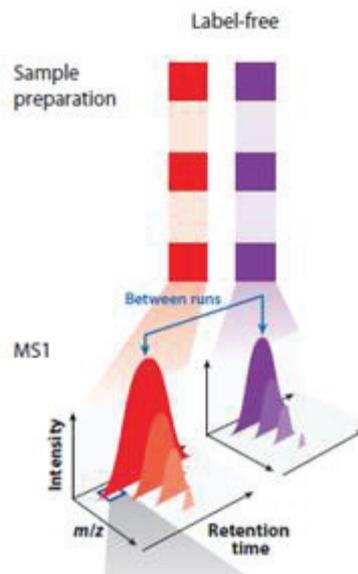


Figure 15 : Principe de l'analyse label free « *Area under the Curve* ».

1.2. Contexte d'étude

À ce jour, le mécanisme de détoxification au formaldéhyde de la TT à l'échelle moléculaire est incompris. Aussi, seules deux études décrivent les modifications induites par le formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique [5], [6]. C'est pourquoi cette étude vise à mieux comprendre l'action du formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique en identifiant, en positionnant et en quantifiant toutes les modifications induites par le formaldéhyde sur l'intégralité de la structure tridimensionnelle de la protéine [6]–[9]. Nous avons appliqué pour cela une méthodologie similaire à celle utilisée par Metz *et al.* pour étudier l'insuline modifiée au formaldéhyde, qui consiste à analyser par nano-chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (nanoLC-MS/MS) un mélange équimolaire de TT détoxifiée au CH₂O et au CD₂O [27]. Cette stratégie analytique a été utilisée pour différencier les peptides non modifiés des peptides impactés par le formaldéhyde. La nature et l'emplacement des modifications induites par le formaldéhyde ont été déterminés par des interprétations

manuelles et minutieuses des spectres de fragmentation MS² des peptides. Une quantification « *label free* » a été réalisée pour estimer les taux des peptides non modifiés et chimiquement modifiés par le formaldéhyde.

2. Partie expérimentale

2.1. Produits chimiques et réactifs

Le formaldéhyde (37 % m/m), le formaldéhyde deutéré (20 % m/m), l'acide formique (AF), le bicarbonate d'ammonium (ABC), le DL-dithiothréitol (DTT), l'iodoacétamide (IAM) ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le RapiGest SF a été acheté auprès de Waters (Milford, MA, USA). Le mélange Trypsin/Lys-C a été acheté chez Promega (Madison, WI, USA). Les solvants de préparation des solutions ainsi que ceux constituant les phases de chromatographie, i.e. eau pure (H₂O) et l'acétonitrile (CH₃CN) étaient de qualité LC-MS et ont été achetés auprès de Fisher Scientific (Strasbourg, France).

Le gel 4-15 % Criterion TGX, les marqueurs de poids moléculaires « *Precision Plus Protein™ Prestained Standards* » (PPPS), le tampon échantillon 4X, le tampon réducteur 20X et le tampon de migration 10X ont été achetés chez Biorad (Hercules, CA, USA). Le bleu de Coomassie (GelCode™) et l'acide trifluoroacétique (TFA) ont été commandés chez Thermo Scientific (Rockford, IL, USA).

L'échantillon de TT utilisé pour cette étude était un lot industriel du procédé « protéine tétanique purifiée » (PTP) qui a été fabriqué à Sanofi Pasteur (Marcy l'Etoile, France). Sa concentration en azote protéique déterminée par la méthode Kjeldhal était de 0,13 g/L.

2.2. Protocole de préparation des échantillons pour l'analyse SDS-PAGE

L'analyse SDS-PAGE a été réalisée en conditions dénaturantes, réductrices et non réductrices. Les solutions protéiques ont été préparées en mélangeant 70 µL de solution de TT ou TTD, 14 µL d'eau, 6 µL de tampon réducteur et 30 µL de tampon d'échantillon 4X. Pour les conditions non réductrices, le tampon réducteur 20X a été remplacé par de l'eau pure. Les protéines ont été dénaturées thermiquement à 100°C pendant 5 minutes puis déposées sur un gel Tris-Glycine 4-15 %. 10 µL de marqueurs de poids moléculaire ont été introduits dans le gel pour l'étalonnage en masse. 80 V et 200 V ont été appliqués sur le gel pendant respectivement 15 minutes et 30 minutes. Les protéines ont été colorées avec le bleu de Coomassie puis décolorées à l'eau.

2.3. Protocole d'hydrolyse enzymatique en gel pour l'analyse nanoLC-MS/MS

Les bandes protéiques correspondant à la TT et aux TT détoxifiées au formaldéhyde (TTD) et au formaldéhyde deutéré (TTDd) ont été dans un premier temps excisées du gel de polyacrylamide et lavées avec plusieurs bains successifs d'acétonitrile et de tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM. Les bandes de gel ont ensuite été réduites avec 200 µL de solution de DTT à 10 mM puis mises sous agitation, à 56 °C, pendant 30 minutes. Après avoir retiré l'agent réducteur, les échantillons de gel ont été alkylés avec 400 µL d'IAM 40 mM, pendant 1 heure à température ambiante, à l'obscurité et lavés comme précédemment. Puis, les bandes protéiques ont été dénaturées avec 200 µL de RapiGest à 0,1 % m/v, et incubées à 37°C pendant 10 minutes. Elles ont été lavées, séchées et digérées avec 80 µL de mélange de trypsine lys-C à 20 µg/mL pendant 20 heures à 37°C. L'ajout de 5 µL d'acide formique à 20 % v/v et de 1 µL de TFA concentré a permis de stopper l'hydrolyse enzymatique. Les digestats tryptiques ont été incubés pendant 45 minutes à 37°C pour cliver le surfactant RapiGest SF puis centrifugés à 10 000 rpm pendant 5 minutes. Les surnageants ont ensuite été transférés dans les vials d'injection. Pour extraire un maximum de peptides et notamment les moins polaires, 40 µL d'un mélange H₂O/CH₃CN/AF, 75/25/0,5 (v/v/v/v) ont été ajoutés aux fragments de gel. Les morceaux de gel ont été incubés pendant 10 minutes à 4°C puis centrifugés à 10 000 rpm pendant 5 minutes. Cette procédure d'extraction a été répétée à nouveau avec 40 µL d'un mélange H₂O/CH₃CN/AF, 50/50/0,5 (v/v/v/v). Les extraits ont été mélangés puis introduits dans les vials. Les échantillons ont été conservés à -20°C avant analyse nanoLC-MS/MS.

2.4. Conditions opératoire pour l'analyse nanoLC-MS/MS

Les digestats protéiques ont été analysés sur un système de nano-chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. L'appareillage était constitué d'une chromatographie liquide Ultimate 3000, (Thermo Scientific, Brême, Allemagne) et d'un spectromètre de masse Tribrid Fusion Lumos, (Thermo Scientific, San Diego, Etats-Unis). 6 µL d'échantillon a été injecté en mode « µL pick-up » dans le système LC-MS. Les analytes ont dans un premier temps été piégés dans une cartouche (PepMap100, C18, 300 µm × 5 mm, 100 Å) avec un débit de 20 µL/min à 100 % de solvant C (H₂O/CH₃CN/TFA (98/2/0.05) v/v/v).

pendant 3 minutes puis séparés sur la colonne analytique (Easy-Spray C18 75 μm \times 500 mm, diamètre des particules : 2 μm) à un débit de 300 nL/min en utilisant un gradient composé de solvant A H₂O/AF, 100/0,1 (v/v) et de solvant B H₂O/CH₃CN/AF, 20/80/0,1 (v/v/v/v). La séquence d'élution était composée d'un gradient linéaire de 0 à 100 minutes de 98 à 63 % de solvant A, d'un gradient linéaire de 20 minutes de 63 à 48 % de solvant A et d'un gradient linéaire de 8 minutes de 48 à 10 % de solvant A. La colonne a été rééquilibrée pendant 19 minutes avec 98 % de solvant A. Elle a été maintenue à 40°C durant toute l'analyse.

Les données MS² ont été acquises comme suit : tous les spectres MS¹ ont été enregistrés avec des ratios m/z compris entre 200-2000, dans l'Orbitrap à une résolution de 120 000 à m/z 200. Le contrôle automatique de gain (AGC) a été réglé pour accumuler 4×10^5 ions avec un temps d'injection maximum de 70 ms. Le mode d'acquisition était le mode « *Data Dependent Scanning* », top S avec un temps de cycle de 5 s. Tous les spectres MS² ont été enregistrés dans l'Orbitrap à une résolution de 15 000 à 200 m/z . L'énergie de collision normalisée a été fixée entre 25 et 35 % pour les fragmentations HCD et CID. Seuls les peptides comprenant les états de charge 2-6 avec une intensité supérieure à $5 \cdot 10^3$ ont été pris en compte pour la fragmentation. Une exclusion dynamique de 10 s a été appliquée. L'AGC «*Automatic Gain Control*» a été réglé à 50000 avec un temps d'injection maximum de 22 ms pour les spectre MS².

2.5. Traitement des données

Les données ont été traitées avec le logiciel Thermo Proteome Discoverer (v 2.1) et l'algorithme de recherche SEQUEST. Seule la séquence de la toxine tétanique (n°uniprot P04958) a été interrogée pour l'identification. Les paramètres ont été réglés comme suit : la tolérance en masse MS¹ était de 10 ppm et la tolérance en masse MS² de 0,02 Da. L'enzyme a été définie comme étant la trypsine avec deux clivages manqués autorisés « *misscleavages* ». La carbamidométhylation de la cystéine a été définie comme une modification fixe et l'oxydation de la méthionine comme étant une modification variable. Tous les spectres de fragmentation des peptides non modifiés et modifiés au formaldéhyde ont été interprétés manuellement avec le logiciel Xcalibur (v 2.2) et l'outil Qual Browser.

Le traitement de la structure tridimensionnelle de la TT a été réalisé avec les outils informatiques : Pymol (v 2.0.6), UCSF Chimera (v1.12) et le fichier pdb (5NOB) de la TT [11].

Xlink Analyzer (v1.1) a été exploité pour, d'une part, calculer les distances entre les chaînes latérales des AA et, d'autre part, pour positionner les ponts méthylènes induits par le formaldéhyde sur la structure tridimensionnelle de la TT.

L'accessibilité de chaque résidu d'acide aminé a été calculée à partir de la structure cristalline de la TT en utilisant le logiciel GETAREA accessible en ligne (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>) [12]. Les paramètres du logiciel étaient ceux définis par défaut. Si l'accessibilité calculée par le logiciel est supérieure à 50 % alors le résidu se trouve en surface ; sous cette valeur, il n'est pas exposé au solvant.

3. Résultats

3.1. Méthodologie globale utilisée pour l'identification des modifications induites par le formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique

Comme évoqué précédemment, la méthodologie utilisée dans cette étude s'apparente à celle utilisée par Metz *et al.* pour la caractérisation de l'insuline bovine (≈ 5 kDa) modifiée au formaldéhyde [13].

Notre stratégie analytique a consisté à utiliser un unique lot industriel de TT (Figure 16). La TT (150 kDa) a d'abord été détoxifiée à l'échelle du laboratoire, dans les conditions industrielles, soit avec du formaldéhyde « léger » (CH_2O) soit avec du formaldéhyde deutéré « lourd » (CD_2O). Les TTD traitées au CH_2O et CD_2O ont ensuite été purifiées par SDS-PAGE et digérées à la trypsine. Puis, un mélange équimolaire des deux digestats de TTD a été réalisé et analysé par nano-chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem (nanoLC-MS/MS).

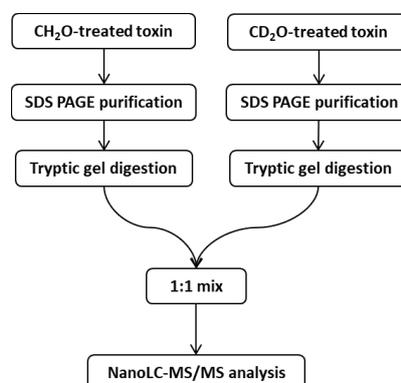


Figure 16 : Méthodologie globale appliquée pour l'identification de tous les peptides modifiés au formaldéhyde de la TTD.

3.2. Purification des échantillons par SDS-PAGE

Afin de maximiser nos chances d'identifier des peptides réticulés induits par le formaldéhyde, nous avons purifié par SDS-PAGE la TT et les TT traitées au CH₂O et au CD₂O (respectivement TTD et TTDd). Des profils identiques ont été observés sur le gel pour les deux toxines traitées (Figure 17). Les bandes à 150 kDa correspondant à la TT, TTD et TTDd ont été excisées du gel puis analysées par nanoLC-MS/MS.

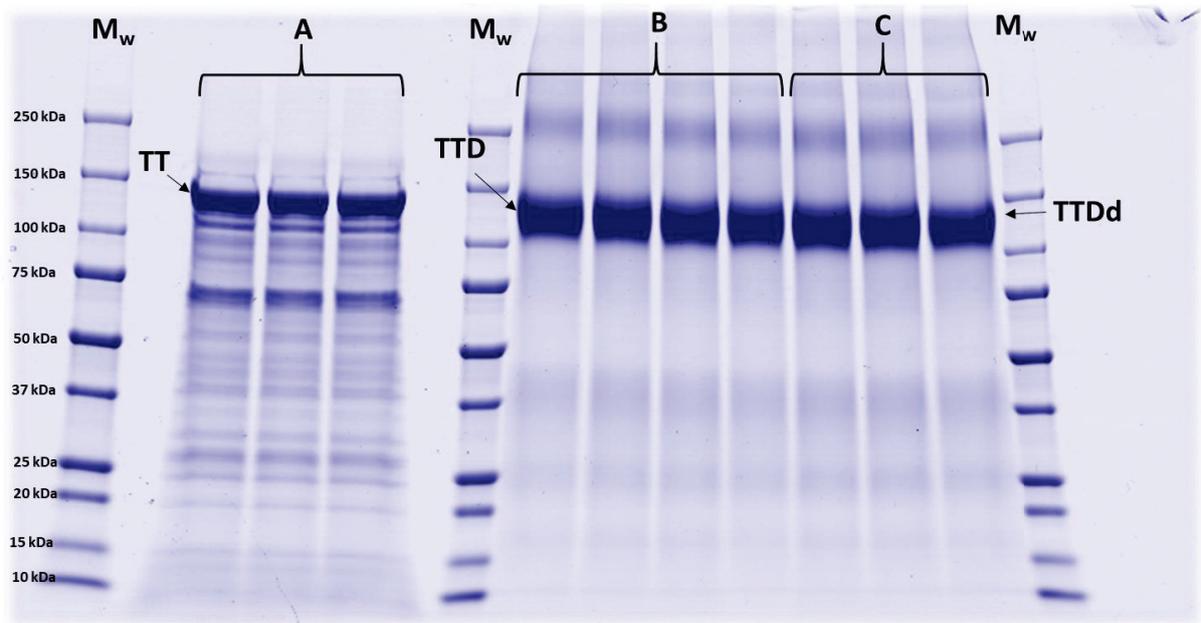


Figure 17 : Purification par SDS-PAGE des échantillons de TT non traitée (A), de TT traitée au CH₂O (TTD) et de TT traitée au CD₂O (TTDd) en conditions dénaturantes et non réductrices (respectivement B et C). M_w correspond aux marqueurs de poids moléculaire. La TT et la TTD apparaissent dans les bandes très intenses à 150 kDa.

3.3. Analyse nanoLC-MS/MS de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique

En vue d'identifier la nature et la position des modifications induites par le formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique, les échantillons purifiés par SDS-PAGE ont été digérés à la trypsine puis analysés par nanoLC-MS/MS. Les chromatogrammes obtenus pour les digestats tryptiques de la TT et de la TTD étaient complexes et distincts en raison du très grand nombre de peptides générés par l'hydrolyse enzymatique et de l'émergence d'espèces chimiquement modifiées par le formaldéhyde dans la TTD. Par ailleurs, les chromatogrammes des deux TT traitées par le CH₂O et le CD₂O étaient quasi identiques, signifiant que le CH₂O et le CD₂O avaient réagi de manière similaire sur la TT (Figure 18).

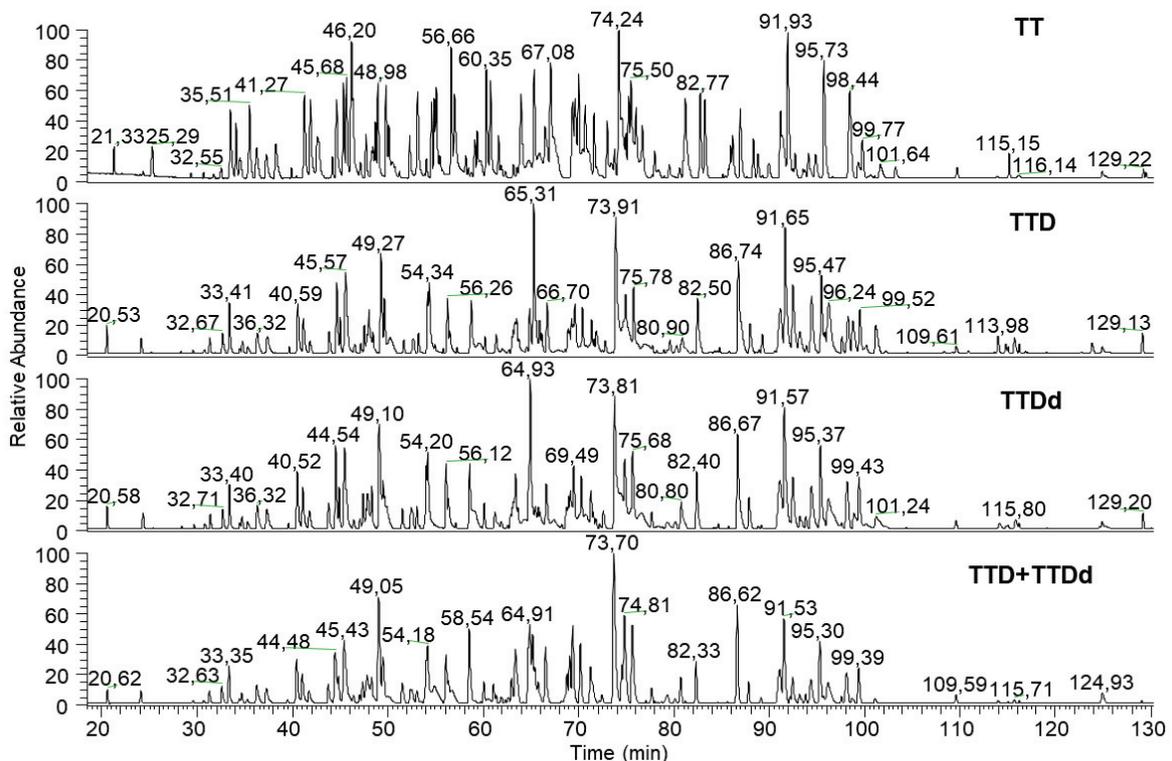


Figure 18 : Chromatogrammes de la toxine non traitée (TT), traitée avec du CH₂O (TTD), traitée avec du CD₂O (TTd), et du mélange équimolaire des anatoxines tétanique (CH₂O, CD₂O) (TTD+TTDd)

Les couvertures de séquence protéique ont été calculées pour chaque échantillon sans tenir compte des modifications induites par le formaldéhyde. Le traitement chimique au formaldéhyde n'a pas eu d'incidence sur les couvertures de séquence dans la mesure où ces dernières étaient identiques pour la TT et la TTD (90 %). Pour le calcul de la couverture de séquence, tous les peptides ont été validés manuellement en inspectant minutieusement chaque spectre de fragmentation MS². Sur la Figure 19, les zones non identifiées correspondaient à des peptides de trop faibles poids moléculaires pour être détectables en nanoLC-MS/MS.

```

1      PITINNFY  SDPVNNDTII  MMEPPYCKGL  DIYYKAFKIT  DRIWIVPERY  EFGTKPEDFN  PPSSLIEGAS  EYDPPNYLRT
81     DSDKDRFLQT  MVKLFNRKIN  NVAGEALLDK  IINAIPYLGK  SYSLLDKFDK  NSNSVSFNLL  EQDPSGATTK  SAMLTNLIIF
161    GPGPVLNKNE  VRGIVLRVDN  KNYFPCRDGF  GSIQMMAFCP  EYVPTFDNVI  ENITSLTIGK  SKYFQDPALL  LMHELIHVLH
241    GLYGMQVSSH  EIIPSKQEIY  MQHTYPIAE  ELFTFGGQDA  NLISIDIKND  LYEKTLDYK  AIANKLSQVT  SCNDPNIDID
321    SYKQIYQOKY  QFDKDSNGQY  IVNEDKFQIL  YNSIMYGFE  IELGKKFNK  TRLSYFSMNH  DPVKIPNLLD  DTIYNDTEG
401    NIESKDLKSE  YKGQNMVRVT  NAFRNVDSG  LVSKLIGLCK  KIIPPTNIRE  NLYNRTASLT  DLGGELCIKI  KNEDLTFIAE
481    KNSFSEEPFQ  DEIVSYNTKN  KPLNFNYSLD  KIIVDYNLQS  KITLPNDRTT  PVTKGIPYAP  EYKSNAASTI  EIHNIIDNTI
561    YQYLYAQKSP  TTLQRITMTN  SVDDALINST  KIYSYFPSVI  SKVNQGAQGI  LFLQWVRDII  DDFTNESSQK  TTIDKISDVS
641    TIVPYIGPAL  NIVKQGYEGN  FIGALETTGV  VLLLEYIPEI  TLPVIAALSI  AESSTQKEKI  IKTIDNFLEK  RYEKWIEVYK
721    LVKAKWLGTV  NTQFQKRSYQ  MYRSLEYQVD  AIKKIIDYEV  KISYGPDKQ  IADEINNLKN  KLEEKANKAM  ININIFMRES
801    SRSFLVNQMI  NEAKKQLLEF  DTQSKNILMQ  YIKANSKFIG  ITELKKLESK  INKVFSTPIP  FSYSKNLDGW  VDNEEDIDVI
881    LKKSTILNLD  INNDIISDIS  GFNSSVITYP  DAQLVPGING  KAIHLVNNES  SEVIVHKAMD  IEYNDFNNEF  TVSFWLRVPK
961    VSASHLEQYG  TNEYSIISSM  KKHSLSIGSG  WSVSLKGNL  IWTLKDSAGE  VRQITFRDLP  DKFNAYLANK  WVFITITNDR
1041   LSSANLYING  VLMGSAEITG  LGAIREDNNI  TLKLDRCNN  NQYVSIKFER  IFCKALNPKE  IEKLYTSYLS  ITFLRDFWGN
1121   PLRYDTEYYL  IPVASSSKDV  QLKNIIDYMY  LTNAPSYTNG  KLNIIYRRLY  NGLKFIKRY  TPNNEIDSFV  KSGDFIKLYV
1201   SYNNEHIVG  YPKDGNAFNN  LDRILRVGYN  APGIPLYKMK  EAVKLRDLKT  YSVQLKLYDD  KNASLGLVGT  HNGQIGNDPN
1281   RDILIASNWX  FNHLKDKILG  CDWYFVPTDE  GWTND

```

Figure 19 : Couverture de séquence obtenue pour la toxine et l'anatoxine tétanique. Les séquences colorées en noires représentent les zones non identifiées. Les AA en verts (chaîne légère) et en marron (chaîne lourde) indiquent les séquences qui ont été caractérisées par nanoLC-MS/MS pour la TT et la TTD.

3.4. Caractérisation structurale des peptides modifiés au formaldéhyde par nanoLC-MS/MS

La caractérisation des modifications induites par le formaldéhyde sur la TTD est une tâche laborieuse. En effet, la TT a un poids moléculaire très élevé (150 kDa) et comprend plus de 300 sites réactifs au formaldéhyde (annexe n°2). Le digestat trypsique de TTD peut contenir de nombreux peptides modifiés au formaldéhyde et il n'existe malheureusement aucun logiciel commercial capable d'identifier et de localiser automatiquement les modifications chimiques induites par le formaldéhyde sur les protéines. Partant de ce constat, nous avons

élaboré une méthodologie (détaillé ci-dessus) pour identifier la nature et le positionnement des modifications induites par le formaldéhyde dans la TTD. Le marquage isotopique induit par l'utilisation du CH₂O et CD₂O a permis de différencier les peptides non modifiés de ceux modifiés par le formaldéhyde. En effet, sur les spectres de masse MS¹, les peptides modifiés au formaldéhyde étaient facilement distinguables puisqu'ils apparaissaient sous forme de doublets (Figure 20). Les peptides non modifiés quant à eux avaient des profils isotopiques normaux. Les doublets résultaient de l'incubation de la TT avec les CH₂O et CD₂O et avaient des différences de masse de $n \cdot (2,0124 \text{ Da})$, où n est le nombre de résidus de formaldéhyde incorporés dans le peptide. L'interprétation manuelle et minutieuse des spectres de fragmentation MS² des peptides modifiés au formaldéhyde nous a permis d'identifier les séquences peptidiques, la nature des modifications chimiques et leur localisation.

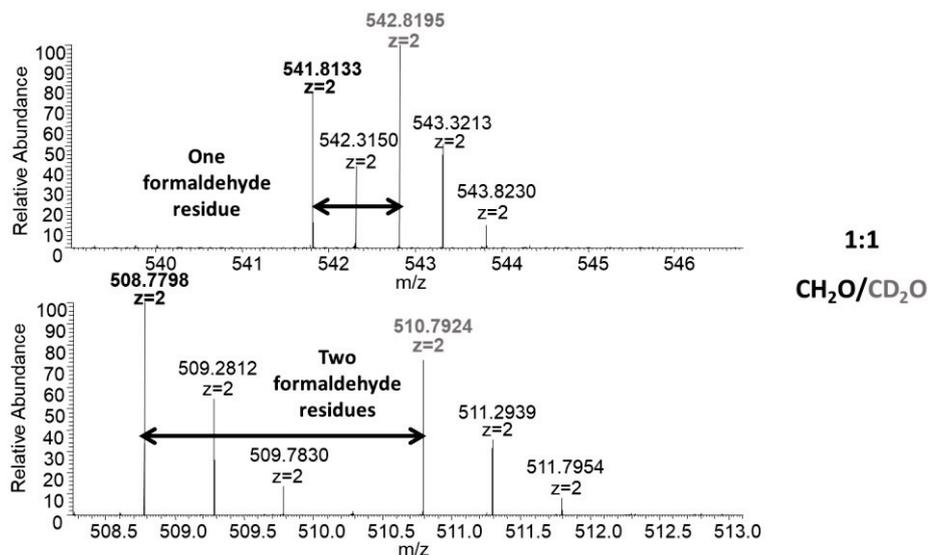


Figure 20 : Marquage isotopique induit par l'utilisation du CH₂O et CD₂O. Dans le mélange de quantités équimolaires de digestat de TTD (traitées CH₂O ou CD₂O), les peptides modifiés par le formaldéhyde apparaissent sur les spectres de masse sous forme de doublets contrairement aux peptides non modifiés. Les doublets avaient des différences de rapport m/z de $\frac{n \times 2,0124 \text{ Da}}{z}$ Th, où n est le nombre de résidus de formaldéhyde incorporés dans le peptide.

Cette stratégie analytique nous a permis d'identifier sans équivoque 106 modifications chimiques comprenant 36 adduits méthylols (+30 Da), 20 méthyles (+14 Da), 2 diméthyles (+28 Da) et 48 modifications (+12 Da) correspondant soit à des imidazolidinones sur les résidus N-terminaux, soit à des bases de Schiff (ou imines), soit à des réticulations de type méthylène (Tableau 3) [5], [13], [14]. Les modifications étaient localisées sur 70 résidus d'AA incluant 39

lysines (K), 8 tyrosines (Y), 13 asparagines (N), 2 tryptophanes (W), 2 glutamines (Q), 3 arginines (R), 1 histidine (H) et les deux AA N-terminaux des chaînes légère et lourde : proline (P) et sérine (S). L'acide aminé le plus affecté par le formaldéhyde était la lysine en raison de son amine primaire [29], [30], [32]. Les modifications +12 Da étaient situées principalement sur les chaînes latérales des K mais également sur les Q, H, N, R, W et Y et sur les AA en N-ter, les méthylols sur les K,Q,H,N,R les méthyles et diméthyles exclusivement sur les K (Figure 21) [5]. La présence de méthyles et des diméthyles dans la solution résultait probablement de la réduction de base de Schiff par un agent chimique ou biologique initialement présent dans l'hydrolysate trypsique de la TTD [5]. Tous les peptides modifiés au formaldéhyde ont été observés avec des modifications partielles signifiant que les peptides chimiquement modifiés par le formaldéhyde ont également été détectés non modifiés dans la TTD.

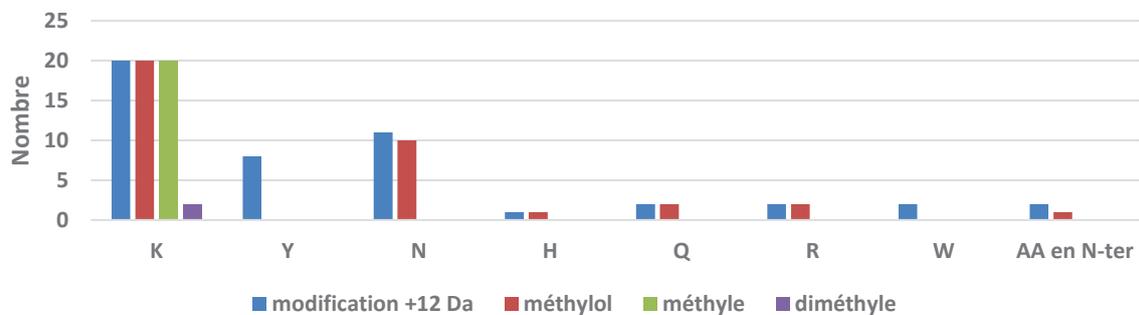


Figure 21 : Liste des acides aminés impactés par les modifications +12 Da, méthylol, méthyle et diméthyle.

Il était très difficile de différencier les modifications « base de Schiff » et « pont méthylène intra-peptidique » dans la mesure où, d'une part, ces dernières possédaient exactement la même masse moléculaire et, d'autre part, les spectres de fragmentation MS² des peptides contenant ces types de modifications étaient semblables. En effet, au cours de la fragmentation MS/MS, le pont méthylène se brise et génère sur le spectres MS² des incréments de masse de +12 Da sur les résidus des AA impliqués dans la réticulation (Figure 22) [5], [15], [16]. Ces mêmes résidus apparaissent également sans incrément de +12 Da sur le spectre MS². Ce sont les couples d'ions fragments non modifiés/modifiés avec des +12 Da qui permettent de localiser précisément le pont méthylène sur le peptide (ex : b₂/b₂+12 Da sur la Figure 23). Après fragmentation MS/MS, la base de Schiff produit le même type de spectre MS² avec des incréments de masse de +12 Da sur les résidus des AA concernés par la

modification. Seule l'interprétation manuelle et minutieuse de spectres MS² permet de déterminer la nature et le positionnement de la modification (Figure 23 et annexe n°1).

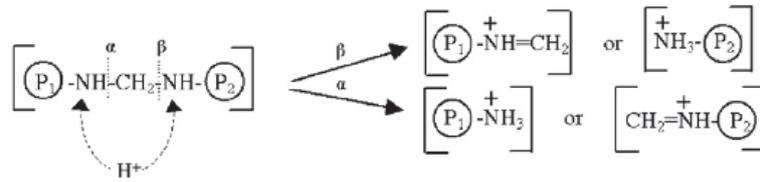


Figure 22 : Illustration de la fragmentation (CID ou HCD) d'un pont méthylène en phase gazeuse dans la cellule de collision du spectromètre de masse [5]

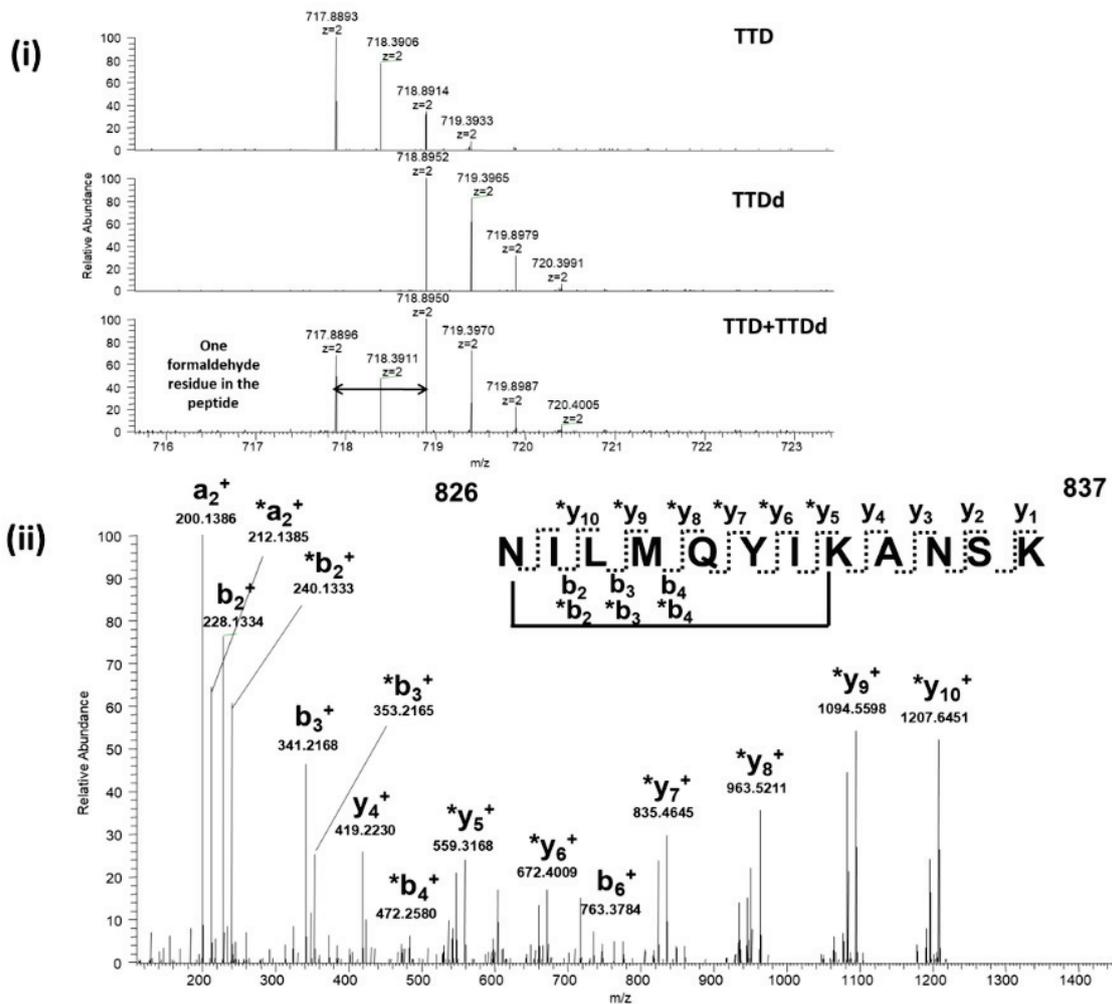


Figure 23 : Exemple d'identification d'un peptide intra-ponté intra-chaine lourde de séquence NILMQYIK(+12,00)ANSK. (i) représente la superposition des spectres de masse MS¹ du peptide modifié au formaldéhyde, de son homologue modifié au formaldéhyde deutéré et du mélange des deux formes. (ii) Le spectre MS² correspond au spectre de fragmentation HCD du peptide modifié au formaldéhyde. Un seul résidu de formaldéhyde a été incorporé dans le peptide. La modification induite par le formaldéhyde était un pont méthylène. Celui-ci a été clivé lors de la fragmentation MS/MS. La richesse en ions b et y incrémentés de +12,00 Da (*) a permis une localisation précise du pont méthylène.

Tableau 3 : Liste des peptides modifiés au formaldéhyde avec des bases de Schiff ou pont intra-peptidique (+12,000 Da), des adduits méthylol (+30,011 Da), des méthyles (+14,016 Da) et des diméthyles (+28,0312 Da). Les AA en gras sont ceux concernés par les modifications.

(1) Les accessibilités des résidus des AA ont été calculées à partir de la structure cristalline de la toxine tétranique avec le logiciel GETAREA [12]. Une accessibilité supérieure à 50 % signifie que les résidus sont en surface alors qu'une accessibilité inférieure à 50 % indique que les résidus ne sont pas ou peu exposés au solvant.

M _{theo} (Da)	M _{exp} (Da)	ΔM (Da)	Séquence du peptide	Mod.	Position	Accessibilité ⁽¹⁾ (%)
1430,7921	1430,7896	0,0025	¹²²⁷ VGYNAPGIPLYKK ¹²³⁹	+12.000	Y ¹²²⁹	12.9
923,5228	923,5230	-0,0001	⁴³ IWIVPER ⁴⁹	+12.000	W ⁴⁴	1.7
1203,6499	1203,6466	0,0033	⁵¹² IIVDYNLQSK ⁵²¹	+12.000	K ⁵²¹	87.6
1433,7700	1433,7674	0,0026	⁸²⁶ NILMQYIKANSK ⁸³⁷	+12.000	K ⁸³³	90.9
2982,4861	2982,4843	0,0018	⁷⁵⁵ IIDYEKIYSGPDKEQIADEINLK ⁷⁷⁹	+12.000	K ⁷⁶¹	73.9
2994,4861	2994,4835	0,0026	⁷⁵⁵ IIDYEKIYSGPDKEQIADEINLK ⁷⁷⁹	+12.000, +12.000	K ⁷⁶¹ , Q ⁷⁷⁰	92.6 (Q), 73.9 (K)
3110,5811	3110,5775	0,0036	⁷⁵⁴ KIIDYEKIYSGPDKEQIADEINLK ⁷⁷⁹	+12.000	K ⁷⁶¹	73.9 (K)
1522,6787	1522,6762	0,0025	⁶¹⁸ DIIDDFINNESSQK ⁶³⁰	+12.000	K ⁶³⁰	60.4
1483,7558	1483,7522	0,0036	¹²⁵⁰ TYSVQLKLYDDK ¹²⁶¹	+12.000	K ¹²⁵⁶	23.6
2013,0894	2013,0869	0,0025	⁵¹² IIVDYNLQSKITLPNDR ⁵²⁸	+12.000	K ⁵²¹	87.6
1347,7033	1347,7012	0,0022	⁸¹⁵ KQLLEFDTQSK ⁸²⁵	+12.000	K ⁸¹⁵	69.7
1033,5630	1033,5610	0,0021	⁸²⁶ NILMQYIK ⁸³³	+12.000	K ⁸³³	90.9
1069,5920	1069,5898	0,0023	⁹⁹⁷ GNNLIWTLK ¹⁰⁰⁵	+12.000	K ¹⁰⁰⁵	37.9
1744,8936	1744,8923	0,0013	¹²⁸² DILIASNWFNHLK ¹²⁹⁵	+12.000	K ¹²⁹⁵	100
985,5344	985,5330	0,0015	² PITINFR ⁹	+12.000	P ²	96.7
997,5344	997,5316	0,0029	² PITINFR ⁹	+12.000, +12.000	P ² , N ⁷	96.7(P), 85.3 (N)
2045,0038	2045,0000	0,0038	¹²⁶² NASLGLVGTHTNGIQIGNDPNR ¹²⁸¹	+12.000	N ¹²⁷²	62
832,4191	832,4174	0,0018	⁴¹⁸ VNTNAFR ⁴²⁴	+12.000	N ⁴¹⁹	9.9
1714,8453	1714,8434	0,0019	⁷⁵⁵ IIDYEKIYSGPDK ⁷⁶⁸	+12.000	K ⁷⁶¹	73.9
1920,9369	1920,9332	0,0037	¹¹⁹⁸ LYVSYNNEHIVGYPK ¹²¹³	+12.000	Y ¹¹⁹⁹	19.2
934,5599	934,5588	0,0012	⁴⁴² IIPPTNIR ⁴⁴⁹	+12.000	R ⁴⁴⁹	/

1746,8351	1746,8376	-0,0024	¹¹²⁴ YDTEYYLIPVASSK ¹¹³⁸	+12.000	Y ¹¹²⁸	7.6
714,4098	714,4090	0,0009	⁴³⁵ LJGLC(carbamido)K ⁴⁴⁰	+12.000	K ⁴⁴⁰	26.3
1063,6025	1063,6000	0,0025	⁴⁴² IIPPTNIRE ⁴⁵⁰	+12.000	R ⁴⁴⁹	/
1799,9529	1799,9501	0,0028	⁹²² AIHLVNNESEVIVHK ⁹³⁷	+12.000	H ⁹²⁴	14.9
986,5032	986,5016	0,0017	⁴²⁵ NVDGSGLVSK ⁴³⁴	+12.000	N ⁴²⁵	87.2
3679,8117	3679,8079	0,0038	⁵⁴⁴ SNAASTIEHNIDDNTIYQLYAQKSP ⁵⁷⁵ TLQR	+12.000	K ³⁶⁸	54.7
2079,9418	2079,9410	0,0008	³⁰⁶ LSQV ³²³ TSC(carbamido)NDPNIDIDSYK ³²³	+12.000	Q ³⁰⁸	44.4
867,3697	867,3676	0,0022	¹⁸² NYFPC(carbamido)R ¹⁸⁷	+12.000	N ¹⁸²	51.9
2483,1451	2483,1407	0,0044	¹²⁸ FDTNSNSVSNLLEQDPSGATK ¹⁵⁰	+12.000	K ¹⁵⁰	71.2
1146,5053	1146,5028	0,0026	¹²¹⁴ DGNAFNNLDR ¹²²³	+12.000	N ¹²¹⁶	63.2
1314,6859	1314,6916	-0,0057	⁵⁹² JSYFSPVISK ⁶⁰²	+12.000	Y ⁵⁹³	6.3
1316,6645	1316,6622	0,0024	⁴⁵⁸ SLTDLGGELC(carbamido)IK ⁴⁶⁹	+12.000	S ⁴⁵⁸	/
2058,0269	2058,0236	0,0033	⁷⁶² JYSGPDK ⁷⁷⁹ EQIAD ⁷⁷⁹ EINNLK	+12.000	K ⁷⁶⁸	37
1154,5931	1154,5906	0,0026	¹⁰⁰ NNVAGEALLDK ¹¹⁰	+12.000	N ¹⁰⁰	25.1
1297,6513	1297,6490	0,0023	⁷⁶⁹ EQIAD ⁷⁷⁹ EINNLK	+12.000	Q ⁷⁷⁰	92.6
1739,9470	1739,9444	0,0026	⁶⁰³ VNQGAQGI ⁶¹⁷ FLQWVR	+12.000	N ⁶⁰⁴	35.8
1519,7670	1519,7618	0,0052	¹⁰¹⁸ DL ¹⁰³⁰ PKFNAYLANK	+12.000	K ¹⁰²²	4.6
1219,6084	1219,6060	0,0025	⁸¹⁶ QLLEFDTQSK ⁸²⁵	+12.000	K ⁸²⁵	36.7
1463,7408	1463,7388	0,0021	⁵⁰⁰ NKPLNFNYS ⁵¹¹ LDK	+12.000	K ⁵⁰¹	21.2
2229,0622	2229,0599	0,0023	⁸⁶⁶ NLDC(carbamido)WVDNEEDIDVILKK ⁸⁸³	+12.000	N ⁸⁶⁶	78
852,4494	852,4470	0,0024	¹¹⁶² LNIYYR ¹¹⁶⁷	+12.000	N ¹¹⁶³	83.7
849,4595	849,4570	0,0026	¹²⁵⁰ YYSVQLK ¹²⁵⁶	+12.000	Y ¹²⁵¹	10.3
3509,5938	3509,5886	0,0052	⁵⁰ YEFG ⁷⁹ TKPEDFNPPSSLJEGASEYYDPN ⁷⁹ YLR	+12.000	K ⁵⁵	71
1015,4875	1015,4856	0,0019	¹¹¹⁶ DFWGNPLR ¹¹²³	+12.000	W ¹¹¹⁸	0.7
1392,6157	1392,6136	0,0022	³³⁵ DSNGQYIVNEDK ³⁴⁶	+12.000	K ³⁴⁶	43.2
2751,4628	2751,4499	0,0129	⁸¹⁵ KQLLEFDTQSKNLMQYIKANSK ⁸³⁷	+12.000	K ⁸¹⁵	69.7
4294,0615	4294,0404	0,0211	⁹²² AIHLVNNESEVIVHKAMDIEYNDMFN ⁹⁵⁷ TVSF ⁹⁵⁷ WLR	+12.000	Y ⁹⁴³	64
2073,9279	2073,9245	0,0034	³³⁰ YQFDKDSNGQYIVNEDK ³⁴⁶	+12.000	K ³³⁴	57.9
1593,7786	1593,7754	0,0032	¹¹⁷⁹ RYTPNNEIDSFVK ¹¹⁹¹	+12.000	K ¹¹⁹¹	39.3
718,4013	718,3972	0,0042	¹¹⁶⁹ LYNGLK ¹¹⁷⁴	+12.000	Y ¹¹⁷⁰	16.1
1304,6975	1304,7108	-0,0132	⁷⁴⁴ SLEYQVDAIKK ⁷⁵⁴	+12.000	Y ⁷⁴⁷	26.7
1101,6004	1101,5948	0,0057	¹⁰⁹¹ IFC(carbamido)KALNPK ¹⁰⁹⁹	+12.000	K ¹⁰⁹⁴	83.6

4029,0581	4029,0560	0,0021	884STILNLDINNDIISDISGFNSSVITYPDAQLVPGINGK ⁹²¹	N ⁹⁰³	+12.000	57.7
2015,0894	2015,0957	-0,0063	512IIVDYNLQSKITLPNDR ⁵²⁸	K ⁵²¹	+14.016	87.6
679,3384	679,3502	-0,0118	1192SGDFIK ¹¹⁹⁷	K ¹¹⁹⁷	+14.016	26.5
1304,6971	1304,7108	-0,0136	1227VGYNAPGIPLYK ¹²³⁸	K ¹²³⁸	+14.016	41.5
1346,7652	1346,7776	-0,0124	700IIKTIDNLFLEK ⁷¹⁰	K ⁷⁰²	+14.016	68.5
1533,8146	1533,8303	-0,0157	724AKWLGTVNTQFQK ⁷³⁶	K ⁷²⁵	+14.016	23.8
1207,6655	1207,6778	-0,0123	1247DLKTYSVQLK ¹²⁵⁶	K ¹²⁴⁹	+14.016	51.9
1205,6499	1205,6360	0,0140	512IIVDYNLQSK ⁵²¹	K ⁵²¹	+14.016	87.6
1148,6032	1148,6156	-0,0124	703TIDNLFLEK ⁷¹¹	K ⁷¹⁰	+14.016	11.2
1343,6888	1343,6936	-0,0048	1066EDNNITLKLDR ¹⁰⁷⁶	K ¹⁰⁷³	+14.016	30.8
2357,1052	2357,1143	-0,0091	961VSASHLEQYGTNEYSISSMK ⁹⁸¹	K ⁹⁸¹	+14.016	51.4
2485,1451	2485,1582	-0,0131	128FDTNSNSVSNLLEQDPSGATTK ¹⁵⁰	K ¹⁵⁰	+14.016	71.2
1801,9529	1801,9646	-0,0117	922AIHLVNNESSEVIVHK ⁹³⁷	K ⁹³⁷	+14.016	5.2
2444,0473	2444,0600	-0,0127	1296DKILGC(carbamido)DWYFVPTDEGWTD ¹³¹⁵	K ¹²⁹⁷	+14.016	100
3707,7404	3707,7407	-0,0003	188DGFSGSIMQMAFC(carbamido)PEYVPTFDNVNIENITSLTIGK ²²⁰	K ²²⁰	+14.016	3.1
2570,2648	2570,2775	-0,0127	1192SGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPK ¹²¹³	K ¹¹⁹⁷	+14.016	26.5
2279,1391	2279,1290	0,0101	347FQILYNSIMYGFTEIELGK ³⁶⁵	K ³⁶⁵	+14.016	68.3
1192,5818	1192,5952	-0,0133	472NEDLTFIAEK ⁴⁸¹	K ⁴⁸¹	+14.016	59.6
3307,5251	3307,5368	-0,0117	472NEDLTFIAEKNSFSEEPFQDEIVSYNTK ⁴⁹⁹	K ⁴⁸¹	+14.016	59.6
1785,9216	1785,9338	-0,0122	997GNLIWTLKDSAGEVR ¹⁰¹²	K ¹⁰⁰⁵	+14.016	37.9
1465,7408	1465,7560	-0,0151	500NKPLNFNYSLDK ⁵¹¹	K ⁵⁰¹	+14.016	21.2
1061,6328	1061,6316	0,0013	838FIGITELK ⁸⁴⁶	K ⁸⁴⁵	+14.016	50.2
2082,9800	2082,9920	-0,0120	618DIIDFTNESSQKTTIDK ⁶³⁵	K ⁶³⁰	+14.016	60.4
2332,1681	2332,1804	-0,0123	1124YDTEYYLIPVASSSKDVQLK ¹¹⁴³	K ¹¹³⁸	+14.016	28
1432,7921	1432,8002	-0,0081	1227VGYNAPGIPLYK ¹²³⁹	K ¹²³⁸	+14.016	41.5
1003,5450	1003,5430	0,0021	2PITINFR ⁹	P ²	+30.011	96.7
1081,6131	1081,6110	0,0022	442IIPPTNIRE ⁴⁵⁰	R ⁴⁴⁹	+30.011	/
1087,6025	1087,6006	0,0020	997GNLIWTLK ¹⁰⁰⁵	K ¹⁰⁰⁵	+30.011	37.9
1757,9576	1757,9546	0,0031	603VNOGAQGIPLQWVR ⁶¹⁷	N ⁶⁰⁴	+30.011	35.8
1051,5735	1051,5718	0,0018	826NILMQYIK ⁸³³	K ⁸³³	+30.011	90.9
952,5705	952,5682	0,0024	442IIPPTNIR ⁴⁴⁹	R ⁴⁴⁹	+30.011	/

1221,6604	1221,6580	0,0024		⁵¹² IIVDYNLQSK ⁵²¹	+30.011	K ³²¹	87.6
1164,5159	1164,5138	0,0022		¹²¹⁴ DGNAPNNLDR ¹²²³	+30.011	N ¹²¹⁶	63.2
850,4296	850,4280	0,0017		⁴¹⁸ VNTNAFR ⁴²⁴	+30.011	N ⁴¹⁹	9.9
1549,8252	1548,8186	0,0085		⁷²⁴ AKWLGTVNTQFQK ⁷³⁶	+30.011	K ⁷²⁵	23.8
2063,0143	2063,0111	0,0032		¹²⁶² NASLGLVGTNGQIGNDPNR ¹²⁸¹	+30.011	N ¹²⁷²	62
1422,7176	1422,7154	0,0023		⁸⁰³ SFLVNQMINAK ⁸¹⁴	+30.011	K ⁸¹⁴	42
1481,7514	1481,7496	0,0019		⁵⁰⁰ NKPLNFNYSLDK ⁵¹¹	+30.011	K ⁵⁰¹	21.2
1209,7080	1209,7060	0,0021		⁴⁴¹ KIIPPTNIRE ⁴⁵⁰	+30.011	R ⁴⁴⁹	/
2097,9524	2097,9492	0,0032		³⁰⁶ LSQVTSC(carbamido)NDPNIDIDSYK ³²³	+30.011	Q ³⁰⁸	44.4
1938,9475	1938,9440	0,0035		¹¹⁹⁸ LYVSYNNNEHIVGYPK ¹²¹³	+30.011	K ¹²¹³	51.7
1410,6262	1410,6242	0,0021		³³⁵ DSNGQYIVNEDK ³⁴⁶	+30.011	K ³⁴⁶	43.2
2373,1157	2373,1124	0,0033		⁹⁶¹ VSASHLEQYGTNEYSISSMK ⁹⁸¹	+30.011	K ⁹⁸¹	51.4
2247,0728	2247,0701	0,0027		⁸⁶⁶ NLDC(carbamido)WVDNEEDIDVILKK ⁸⁸³	+30.011	N ⁸⁶⁶	78
1315,6619	1315,6600	0,0020		⁷⁶⁹ EQIADEINNLK ⁷⁷⁹	+30.011	Q ⁷⁷⁰	92.6
4047,0687	4047,0608	0,0079		⁸⁸⁴ STILNLDINNDIISGFNSSVITYPDAQLVPGINGK ⁹²¹	+30.011	N ⁹⁰³	57.7
4395,1143	4395,1095	0,0048		¹¹²⁴ YDTEYYLIPVASSKDVQLKNITDYMYLTNAPSYTNGK ¹¹⁶¹	+30.011	K ¹¹³⁸	74.5
4339,0670	4339,0575	0,0095		³³⁰ YQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIMYGFTEIELGK ³⁶⁵	+30.011	K ³³⁴	43.2
1817,9635	1817,9606	0,0029		⁹²² AHLLVNNESEVIVHK ⁹³⁷	+30.011	H ⁹²⁴	14.9
1537,7776	1537,7758	0,0018		¹⁰¹⁸ DLDPDKFNAYLANK ¹⁰³⁰	+30.011	K ¹⁰²²	4.6
1237,6190	1237,6168	0,0023		⁸¹⁶ QLLEFDTQSK ⁸²⁵	+30.011	K ⁸²⁵	36.7
1455,6881	1455,6860	0,0022		¹¹⁸⁰ YTPNNEIDSFVK ¹¹⁹¹	+30.011	K ¹¹⁹¹	39.3
857,4607	857,4588	0,0019		⁵²² ITLPNDR ⁵²⁸	+30.011	R ⁵²⁸	39.1
1172,6036	1172,6014	0,0023		¹⁰⁰ NNVAGEALLDK ¹¹⁰	+30.011	N ¹⁰⁰	25.1
3527,6044	3527,5973	0,0071		⁵⁰ YEFGTKPEDFNPPSSLIEGASEYYDPNYLR ⁷⁹	+30.011	K ⁵⁵	71
1004,5138	1004,5122	0,0017		⁴²⁵ NVDGSGGLVSK ⁴³⁴	+30.011	N ⁴²⁵	87.2
1540,6892	1540,6874	0,0019		⁶¹⁸ DIIDDFITNESSQK ⁶³⁰	+30.011	K ⁶³⁰	60.4
2076,0374	2076,0344	0,0030		⁷⁶² IYSGPDKEQIADENNLK ⁷⁷⁹	+30.011	K ⁷⁶⁸	37
1497,6517	1497,6496	0,0022		¹⁰⁷⁷ C(carbamido)NNNNQYVSIDK ¹⁰⁸⁸	+30.011	N ¹⁰⁷⁸	79.9
2091,9384	2091,9347	0,0037		³³⁰ YQFDKDSNGQYIVNEDK ³⁴⁶	+30.011	K ³³⁴	57.9
736,4119	736,4078	0,0041		¹¹⁶⁹ LYNGLK ¹¹⁷⁴	+30.011	K ¹¹⁷⁴	41.9
4421,1167	4421,0895	0,0272		⁴³ IWVPERYEFGTKPEDFNPPSSLIEGASEYYDPNYLR ⁷⁹	+30.011	K ⁵⁵	71
1365,7140	1365,7076	0,0064		⁸¹⁵ KOLLEFDTQSK ⁸²⁵	+30.011	K ⁸¹⁵	69.7

3000,4967	3000,4823	0,0144	⁷⁵ IIDYEYKIYSGPDKEQIADEINNLK ⁷⁷⁹	+30.011	K ⁷⁶¹	73.9
2740,4104	2740,4023	0,0081	⁸⁰³ SFLVNQMINEAKKQLLEFDTQSK ⁸²⁵	+30.011	K ⁸¹⁵	69.7
2408,2732	2408,2625	0,0107	⁴⁵ NLYNRTASLTDLGELC(carbamido)IKIK ⁴⁷¹	+30.011	N ⁴⁵¹	/
2420,2732	2420,2619	0,0113	⁴⁵ NLYNRTASLTDLGELC(carbamido)IKIK ⁴⁷¹	+30.011 +12	R ⁴⁵⁵ , N ⁴⁵¹	/
1446,7921	1446,7852	0,0069	¹²²⁷ VGYNAPGIPLYKK ¹²³⁹	+28.0312	K ¹²³⁸	41.5
1357,6880	1357,6961	-0,0081	¹⁰⁶⁶ EDNNITLKLDR ¹⁰⁷⁹	+28.0312	K ¹⁰⁷⁶	30.8
3250,6257	3250,6100	0,0157	⁶⁰³ VNQGAQGILFLQWVRDIIDDFTNESSQK ⁶³⁰	30,011	N ⁶⁰⁴	35.8

Après avoir identifié la nature et le positionnement des modifications induites par le formaldéhyde sur les séquences primaires des peptides de la TTD, nous avons cartographié ces modifications chimiques sur la structure tridimensionnelle entière de la TT (Figure 24). Nos résultats expérimentaux ont montré que les modifications sont localisées sur l'ensemble de la protéine, suggérant que l'action du formaldéhyde sur la TT est non spécifique et non localisée.

Par ailleurs, l'accessibilité moyenne de tous les résidus d'AA modifiés au formaldéhyde calculée avec le logiciel GETAREA était supérieure à 50 % (67 %). Cela signifiait que la plupart des AA modifiés sont exposés au solvant et que le formaldéhyde avait réagi majoritairement avec les AA en surface (Tableau 3) [12]. Pour certains résidus d'AA modifiés au formaldéhyde, les accessibilités calculées étaient faibles (0-10%). Ces résidus semblaient, par conséquent, inaccessibles. Le formaldéhyde a donc réussi à pénétrer l'intérieur de la protéine pour modifier ces AA.

Le site catalytique de la TT (His232 - His236) n'a pas été détecté modifié par le formaldéhyde [5]. Néanmoins, des modifications ont été identifiées près du site catalytique.

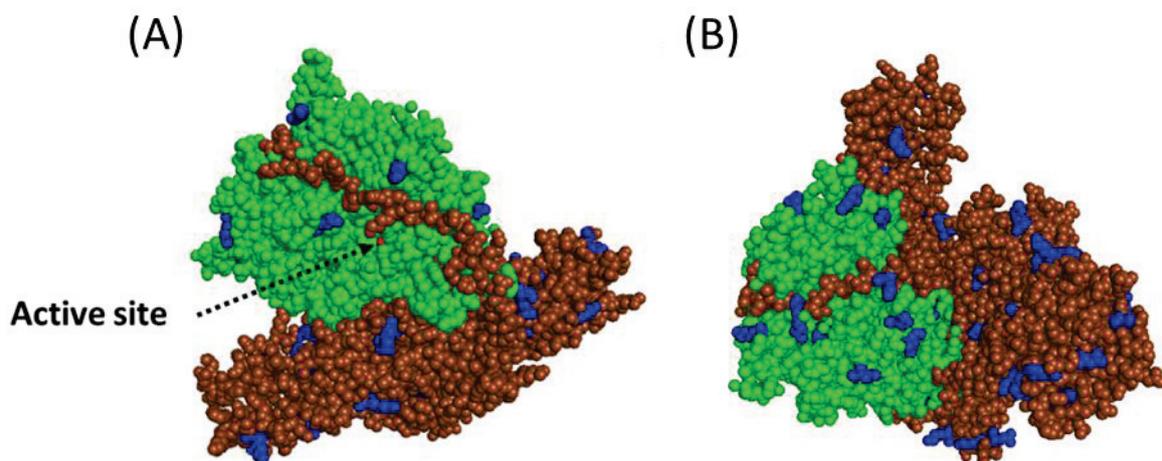


Figure 24 : (A) et (B) représentent les différentes vues de la structure entière à boules (atomes) de la toxine tétanique avec les acides aminés modifiés avec des +12 Da, des adduits méthylol (+30 Da), des méthyles (+14 Da) et des diméthyles (+28 Da) colorés en bleu. Les chaînes légère et lourde sont colorées respectivement en vert et en marron. L'ion Zn^{2+} situé au niveau du site actif est en rouge.

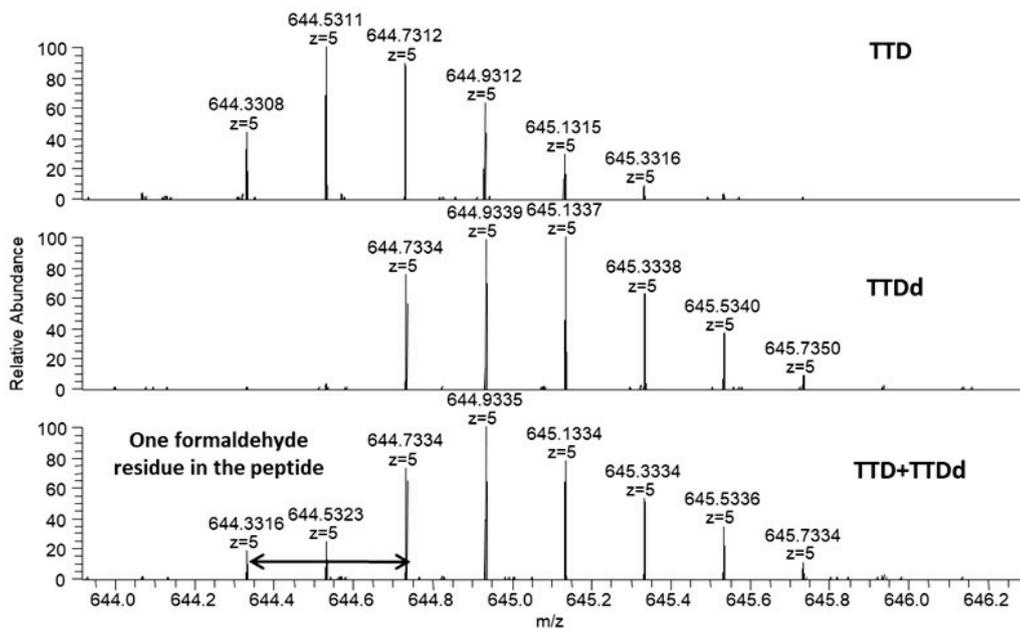
3.5. Caractérisation des réticulations intra et inter-chaînes induites par le formaldéhyde dans l'anatoxine tétanique

À ce jour, aucune réticulation intra ou intermoléculaire induite par le formaldéhyde n'a encore été caractérisée à l'échelle moléculaire dans la TTD [5]. Ces modifications chimiques sont très difficiles à identifier par LC-MS/MS. En effet, comme évoqué précédemment, après digestion trypsique de la TTD, les peptides réticulés sont potentiellement très nombreux, hétérogènes, faiblement intenses et génèrent des spectres de fragmentation MS² complexes et difficilement interprétables.

La méthodologie suivie dans cette étude a été appliquée avec succès pour identifier sans ambiguïté des réticulations intra et inter-chaînes induites par le formaldéhyde dans la TTD. L'analyse nanoLC-MS/MS du digestat trypsique de TTD a révélé la présence de 25 peptides inter-pontés localisés dans les chaînes lourde, légère et entre ces deux chaînes (Tableau 4). La plupart de ces peptides étaient faiblement intenses en raison de leur haut poids moléculaire et de leur état de charge élevé. Comme attendu, les peptides inter-pontés possédaient des lysines et des tyrosines modifiées avec un décalage en masse de +12 Da (Tableau 4). Ces AA sont connus dans la littérature pour être responsables de la formation de réticulations intra et inter-protéines [13].

Tous les spectres de fragmentation MS² ont été interprétés manuellement pour identifier sans ambiguïté les séquences peptidiques. Cependant, les emplacements précis des ponts méthylènes étaient difficiles à définir puisque les réticulations se rompent au cours de la fragmentation MS/MS (Figure 25). Afin de positionner les ponts méthylènes dans les séquences primaires des peptides inter-réticulés ainsi que dans la structure tridimensionnelle de la protéine (Figure 26), nous avons considéré que les AA détectés avec des modifications +12 Da ainsi que les AA les plus réactifs et accessibles au solvant étaient ceux impliqués dans les ponts (Tableau 4) [14], [17]. Les réactivités des AA au formaldéhyde ont été évaluées dans l'étude de Metz *et al.* [14]. Les accessibilités des résidus des AA ont été calculées à partir de la structure cristalline de la TT avec le logiciel GETAREA [12].

(i)



(ii)

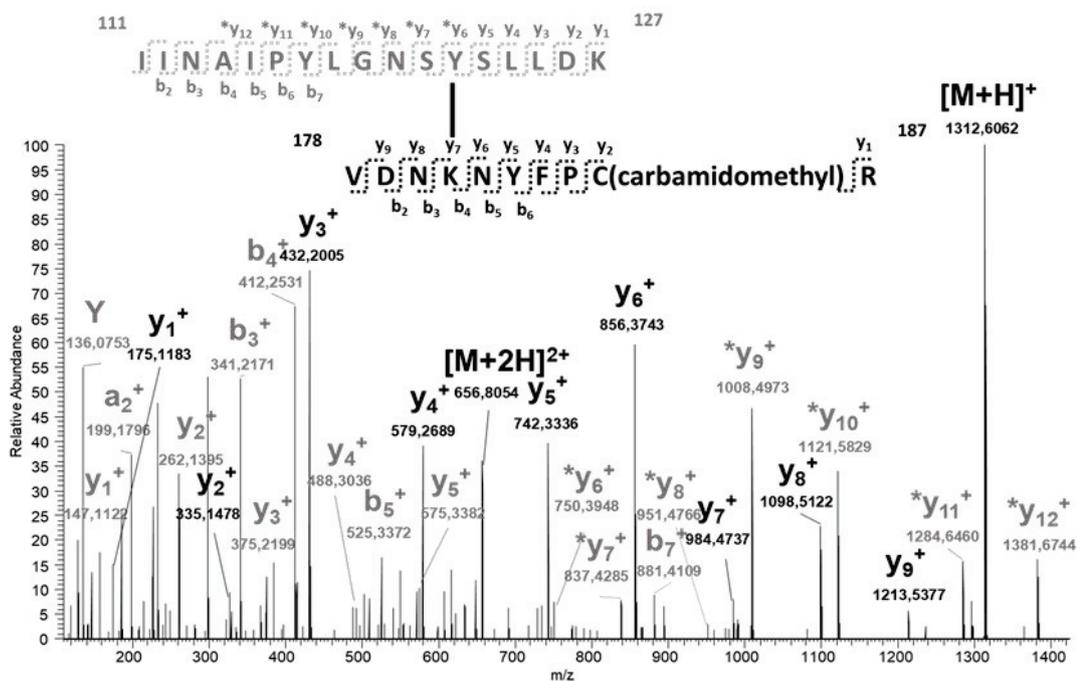


Figure 25 : Identification d'un peptide inter-ponté intra-chaîne légère de séquence IINAIPYLGNSY(+12,00)SLLDK^VDNKNKNYFPC(carbamido)R. (i) représente la superposition des spectres de masse MS¹ du peptide modifié au formaldéhyde, de son homologue modifié au formaldéhyde deutéré et du mélange des deux formes. Le spectre MS² (ii) correspond au spectre de fragmentation HCD du peptide modifié au formaldéhyde. Un seul résidu de formaldéhyde a été incorporé dans le peptide. La modification chimique est un pont méthylène clivé lors de la fragmentation MS/MS La richesse en ions b et y incrémentés de +12,00 Da (*) a permis une localisation précise du pont méthylène.

Tableau 4 : Liste des peptides inter-pontés (intra et inter-chaînes légère et lourde) induits par le formaldéhyde.

Les AA soulignés étaient probablement impliqués dans le pont méthylène. Ceux en gras ont été détectés modifiés au formaldéhyde.

(1) Les accessibilités des résidus des AA ont été calculées à partir de la structure cristalline de la TT avec le logiciel GETAREA [12]. Une accessibilité supérieure à 50 % signifiait que les résidus sont en surface alors qu'une accessibilité inférieure à 50% indiquait que les résidus n'étaient pas exposés au solvant.

(2) Les distances ont été calculées avec la structure cristalline de la toxine tétanique.

M _{theo} (Da)	M _{exp} (Da)	ΔM (Da)	Peptide	Mod.	Position et accessibilité ⁽¹⁾ (%)	Nature	Longueur du pont méthylène calculé ⁽²⁾ (Å)
4546,1167	4546,1134	0,0033	⁵⁰ YFEGTKPEDFNPPSSLLIEGASEYYDPNYLR ⁷⁹ AS ⁵³ GIPYAPEYK ⁸³	+12.00	K ⁵⁵ :71	Inter-chaîne	≈11
4082,1284	4082,1223	0,0061	⁴⁴² IIPPTNIRE ⁴⁵⁰ AS ⁵⁷ 6ITMTNSVDDALINSTK ⁵⁹ ISYSPFVSK ⁶⁰²	+12.00 +12.00	K ⁵⁹ :32.8	Inter-chaîne	/
4210,2234	4210,2234	0,0000	⁴⁴¹ KIIPP ⁴⁵⁰ AS ⁵⁷ 6ITMTNSVDDALINSTK ⁵⁹ ISYSPFVSK ⁶⁰²	+12.00	K ⁵⁹ :32.8	Inter-chaîne	/
2244,1061	2244,1028	0,0033	⁵⁰ NKPLNFNYSLDK ⁵¹ A ²⁸ NDLYEK ³⁹⁴	+12.00	K ³⁰ :21.2	Inter-chaîne	≈10
4767,2367	4767,2307	0,0060	¹⁸⁸ DGFSIMQMAFC(carbamido)PEYPTFDNVENTISLTIGKSK ²²² A ⁷⁸ SYQMYR ⁷⁴³	+12.00	K ²⁰ :3.1	Inter-chaîne	≈11
4221,2571	4221,2529	0,0042	¹⁰⁶ NNVAGEALLDKIINAIPYLGNSYSLLDK ¹²⁷ AS ¹² IIVDYNLQSK ²¹	+12.00	K ¹⁰ :25.2	Inter-chaîne	≈9
2479,2124	2479,2095	0,0029	¹⁰⁷ LDRC(carbamido)NNNQYVSIDK ¹⁰⁸⁸ AS ⁸⁶ KLESK ⁸⁵⁰	+12.00,-1 2.00	K ⁸⁶ :94.1 K ⁸⁰ :81.2	Intra-chaîne lourde	≈63
4972,5092	4972,4934	0,0158	⁵⁴⁴ SNAASTIEIHNDNTIYQLYAQKSPPTLQR ⁵⁷⁵ A ⁷⁴ SLEYQVDAIKK ⁷⁵⁴	+12.00	K ⁵⁶⁸ :54.7	Intra-chaîne lourde	≈9
4844,4143	4844,3894	0,0249	⁵⁴⁴ SNAASTIEIHNDNTIYQLYAQKSPPTLQR ⁵⁷⁵ A ⁷⁴ SLEYQVDAIKK ⁷⁵³	+12.00	K ⁵⁶⁸ :54.7	Intra-chaîne lourde	≈9
3318,6626	3318,6509	0,0117	¹⁰⁹ IFC(carbamido)KALNPK ¹⁰⁹⁹ AS ⁸⁶⁶ NLDC(carbamido)WVDNEEDIDVILK ⁸⁸³	+12.00	K ¹⁰⁹⁴ :23.6	Intra-chaîne lourde	≈15
2234,2269	2234,2167	0,0102	⁷⁴⁴ SLEYQVDAIKK ⁷⁵⁴ AS ⁵⁶⁸ KSPPTLQR ⁵⁷⁵	+12.00	K ⁵⁶⁸ :54.7	Intra-chaîne lourde	≈9
4004,0278	4004,0099	0,0179	⁷⁸⁰ NKLEEK ⁷⁸⁵ AS ⁶⁰³ VNOGAQGIQLQWVRDIIDDFINSSQK ⁶³⁰	+12.00, +12.00	K ⁷⁸¹ :45 K ⁶³⁰ :60.4	Intra-chaîne lourde	≈19
3097,4489	3097,4351	0,0138	¹²⁴ LRDLK ¹²⁴⁹ A ¹²⁹⁶ DKILGC(carbamido)DWYFVPTDEGWTD ¹³¹⁵	+12.00, +12.00	K ¹²⁴⁹ :51.9 K ¹²⁹⁷ :100	Intra-chaîne lourde	≈9
2856,4696	2856,4799	-0,0103	¹²²⁷ VGYNAPGIPLYKK ¹²³⁹ A ¹¹⁷⁹ YTPNNEIDSFVK ¹¹⁹¹	+12.00	K ¹²³⁸ :41.5	Intra-chaîne lourde	≈9
3012,5707	3012,5539	0,0168	¹²²⁷ VGYNAPGIPLYKK ¹²³⁹ A ¹¹⁷⁸ RYTPNNEIDSFVK ¹¹⁹¹	+12.00	K ¹²³⁸ :41.5	Intra-chaîne lourde	≈9
6794,3447	6794,3219	0,0228	¹⁰⁰ NNVAGEALLDKIINAIPYLGNSYSLLDKFDNTNSVSENLLEQDFSGATTK ¹⁵⁰ ¹⁷⁸ VDNKNYFPC(carbamido)R ¹⁸⁷	+12.00	K ¹⁸¹ :81.5	Intra-chaîne légère	≈12
4341,2101	4341,1919	0,0182	¹⁰⁰ NNVAGEALLDKIINAIPYLGNSYSLLDK ¹²⁷ A ¹⁷⁸ VDNKNYFPC(carbamido)R ¹⁸⁷	+12.00	K ¹⁸¹ :81.5	Intra-chaîne légère	≈12

5669,7622	5669,7394	0,0228	¹¹¹ IINAIPLYLGNSYSLLDKFDITNSNSVSFNLLLEQDPSGATTK ^{150A178} VDNKNYFPC(carbamido) ^{R187}	+12.00	K ¹⁸¹ : 81.5	Intra-chaîne légère	≈12
3216,6276	3216,6149	0,0127	¹¹¹ IINAIPLYLGNSYSLLDK ^{127A178} VDNKNYFPC(carbamido) ^{R187}	+12.00	K ¹⁸¹ : 81.5	Intra-chaîne légère	≈12
3246,6382	3246,6209	0,0173	¹¹¹ IINAIPLYLGNSYSLLDK ^{127A178} VDNKNYFPC(carbamido) ^{R187}	+12.00, +30.011	K ¹⁸¹ :81.5 R ¹⁸⁷ : 34.5	Intra-chaîne légère	≈12
5629,7309	5629,7114	0,0195	⁴¹⁸ VNTNAFRNVDSGLVSK ^{434A373} LSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESK ⁴⁰⁵	+12.00, +12.00	K ³⁸⁴ : 33.3 K ⁴³⁴ : 7.3	Intra-chaîne légère	≈9
5659,7415	5659,7164	0,0251	⁴¹⁸ VNTNAFRNVDSGLVSK ^{434A373} LSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESK ⁴⁰⁵	+12.00, +12.00, +30.011	K ³⁸⁴ : 33.3 K ⁴³⁴ : 7.3 N ⁴¹⁹ :9.9	Intra-chaîne légère	≈9
4611,2850	4611,2729	0,0121	¹⁸⁸ DGFGSIMQM AFC(carbamido)PEYVPTFDNVIENTSLTI GK ^{220A366} KFNKTR ³⁷²	+12.00	K ³⁷⁰ :12.7	Intra-chaîne légère	≈13
4483,1901	4483,1749	0,0152	¹⁸⁸ DGFGSIMQM AFC(carbamido)PEYVPTFDNVIENTSLTI GK ^{220A369} FNIKTR ³⁷²	+12.00	K ³⁷⁰ :12.7	Intra-chaîne légère	≈13
5339,5509	5339,5334	0,0175	¹⁸⁸ DGFGSIMQM AFC(carbamido)PEYVPTFDNVIENTSLTI GK ^{222A413} GQNM RVNTNAFR ⁴²⁴	+12.00, +12.00	K ²²⁰ : 3.1 N ⁴¹⁹ : 9.9	Intra-chaîne légère	≈10

La grande majorité des peptides inter-réticulés caractérisés dans la TTD avaient des ponts méthylènes de longueur moyenne très courte de seulement $\approx 10 \text{ \AA}$, indiquant que ces réticulations s'étaient formées uniquement avec les AA proches dans l'espace. La conformation de la protéine a donc joué un rôle crucial dans la création de ces réticulations. Étonnamment, un seul peptide inter-ponté avait un très long pont méthylène de $\approx 60 \text{ \AA}$. Ce pont indiquerait un changement de la structure tridimensionnelle de la protéine [6], [7].

L'ensemble des ponts méthylènes étaient localisés sur l'intégralité de la TTD et devaient probablement stabiliser la structure de la protéine (Figure 26). Il est possible que la TTD soit aussi plus stable que la TT. Cette hypothèse a également été avancée par d'autres études [6]–[8].

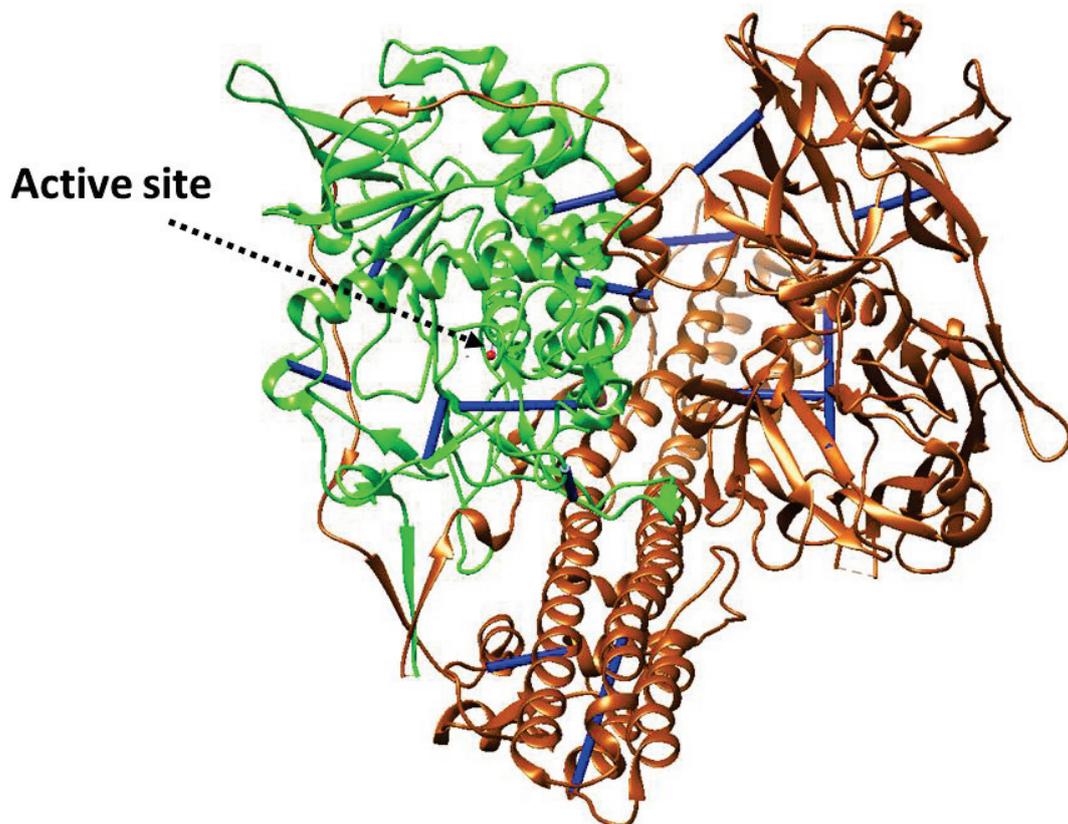


Figure 26 : Structure cristalline de la toxine tétanique avec les réticulations induites par le formaldéhyde. Les chaînes légère et lourde sont colorées respectivement en vert et en marron. L'ion Zn^{2+} situé dans le site actif est en rouge et toutes les liaisons intermoléculaires induites par le formaldéhyde caractérisées par nanoLC-MS/MS sont en bleu.

3.6. Quantification « *label free* » des modifications induites par le formaldéhyde dans l'anatoxine tétanique

Une quantification sans marquage isotopique « *label free* » a été réalisée pour déterminer les taux des peptides non modifiés et chimiquement modifiés au formaldéhyde dans la TTD (Figure 27). A notre connaissance, aucune étude de quantification n'a été mise en œuvre pour les évaluer. La méthode de quantification employée dans cette étude est basée sur l'intensité du signal des ions précurseurs MS^1 de chaque peptide. Un seul fichier de données brutes de digestat de TTD a été traité pour effectuer la quantification « *label free* ». Le logiciel Skyline (v 4.1.0) a été utilisée pour extraire des données brutes MS^1 , les signaux des ions isotopes précurseurs (M, M+1, M+2, M+3) pour les états de charge ($z=2,3,4,5,6$) de chaque peptide. Le logiciel a intégré tous les pics chromatographiques et calculé la somme des surfaces des pics des ions isotopes précurseurs pour chaque peptide. Tous les peptides modifiés par le formaldéhyde et leur forme non modifiée (avec un « *misscleavage* » autorisé) ont été pris en considération pour la quantification relative des modifications chimiques. Pour chaque peptide, le taux de conversion a été calculé comme suit : (Somme des surfaces des pics des ions isotopes précurseurs d'une forme donnée / Somme des surfaces des pics des ions isotopes précurseurs de toutes les formes modifiées et non modifiées) X 100.

Nous avons constaté qu'en moyenne, dans la TTD, les peptides étaient impactés à environ 35 % par le formaldéhyde : 11,7 % étaient dus à des ponts inter-peptidiques, 8,6 % à des méthyles, 0,06 % à des diméthyles, 4,3 % à des dérivés méthylols et 9,0 % à des modifications +12 Da correspondant soit à des bases de Schiff, soit à des réticulations intra-peptidiques, soit à des imidazolidinones. Les bases de Schiff et les réticulations intra et inter-peptidiques étaient majoritaires contrairement aux méthyles et diméthyles qui étaient présents en faible quantité. Le formaldéhyde n'a pas affecté toutes les molécules de TT de la même manière puisque les formes non modifiées des peptides étaient prédominantes (66 %).

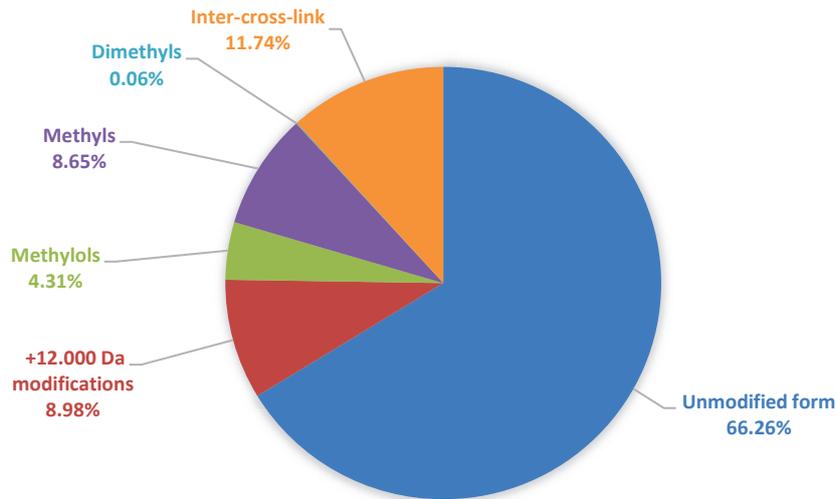


Figure 27 : Diagramme représentant l'impact du formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique. Tous les peptides modifiés par le formaldéhyde et leur forme non modifiée ont été pris en considération pour la quantification relative des modifications chimiques.

Par ailleurs, l'hydrolyse trypsique était peu efficace en présence des modifications chimiques induites par le formaldéhyde puisque nous avons observé des peptides comportant des « *misscleavages* » comme les peptides IIDYEYK(+12Da)IYSGPDKEQIAD EINN LK et SGDFIK(méthyle)LYVSYNNNEHIVGYPK (Tableau 3) [5], [18]. Les formes sans « *misscleavages* » de ces peptides étaient faiblement intenses (ex : SGDFIK et IIDYEYK) (Figure 28).

En outre, les peptides situés en N-ter des chaînes ont fortement été affectés par le formaldéhyde. En effet, ces peptides étaient très exposés au solvant et possédaient des amines primaires très réactives comme le peptide PITINNFR situé en N-ter de la chaîne légère.

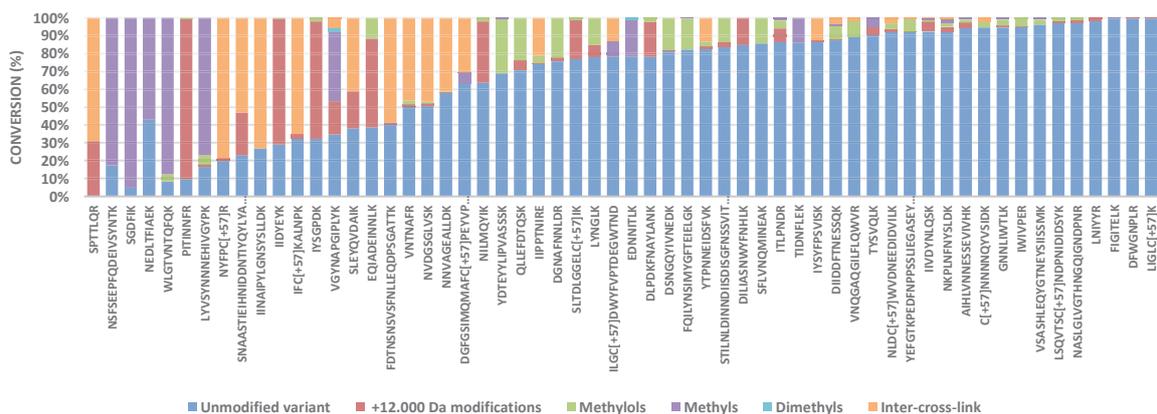


Figure 28 : Liste des peptides impactés par le formaldéhyde

4. Discussions

Pour l'établissement de futures méthodes *in vitro* et pour une meilleure compréhension du mécanisme de détoxification chimique au formaldéhyde, nous avons caractérisé l'anatoxine tétanique, le principe actif du vaccin contre le tétanos. Plusieurs travaux ont été menés sur l'anatoxine tétanique pour étudier l'impact du formaldéhyde sur la structure de la protéine [5]–[8]. Malgré ces différentes investigations, le mécanisme exact de détoxification à l'échelle moléculaire n'est toujours pas élucidé. Les modifications induites par le formaldéhyde sur l'anatoxine sont hétérogènes, nombreuses et difficiles à identifier ; c'est pourquoi cette étude a été entreprise pour caractériser finement par nano-chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse les modifications induites par le formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique. Les modifications chimiques ont été quantifiées afin d'évaluer leur impact sur la structure primaire de la protéine.

La méthodologie développée dans cette étude avec l'utilisation du formaldéhyde deutéré s'est avérée très efficace pour identifier et cartographier les modifications induites par le formaldéhyde sur la structure de la TTD. En effet, nous avons caractérisé sans équivoque un total de 106 modifications chimiques. À l'instar des précédentes études [5], [6], nos résultats expérimentaux ont mis en exergue la présence de modifications +12 Da, de méthylols (+30 Da), de méthyles (+14 Da) et de diméthyles (+28 Da). Les méthyles et diméthyles observés résulteraient de la réduction de bases de Schiff par un agent chimique ou biologique initialement présent dans la TTD.

Par ailleurs, la lysine a été détectée comme étant l'acide aminé le plus impacté par le formaldéhyde en raison de son amine primaire. Elle jouerait un rôle crucial dans le processus de détoxification et serait responsable des ponts méthylènes intra et intermoléculaires. Ce résultat expérimental est en accord avec d'autres études qui ont observé une baisse des amines primaires dans la TTD [5], [6], [8].

De nombreux ponts méthylènes induits par le formaldéhyde ont été caractérisés à l'échelle moléculaire dans la TTD : 5 inter-chaînes, 6 intra-chaîne lourde et 4 chaîne intra-chaîne légère. À notre connaissance, ce type de modification n'avait jamais été identifié auparavant dans la TTD. Ces réticulations ont été créés à l'intérieur et entre les chaînes légère et lourde de la TT au cours du processus de détoxification. Ces modifications stabiliseraient la structure de la protéine et expliqueraient en partie la perte de la toxicité de la TT [5], [6]. En

effet, les liaisons intermoléculaires entre la chaîne légère et la chaîne lourde pourraient empêcher la libération de la chaîne légère dans le cytosol du neurone. En outre, les ponts méthylènes pourraient empêcher l'anatoxine tétanique de se lier et de s'internaliser dans le nerf.

Pour la première fois, l'ensemble des modifications chimiques induites par le formaldéhyde ont été localisées sur la structure tridimensionnelle entière de la toxine tétanique. Nous avons remarqué que ces dernières étaient réparties sur l'intégralité de la structure de la protéine. Certaines d'entre elles ont été localisées sur la partie C-ter de la chaîne lourde (AA : 865-1315), impliquée dans l'adhésion de la toxine aux membranes neuronales. Celles-ci pourraient empêcher la TT de se lier au nerf en cachant les neurorécepteurs.

Bien que l'anatoxine tétanique ne soit pas toxique, le site catalytique contenant le motif « HELIH » n'a pas été affecté par le formaldéhyde. Des modifications chimiques ont été localisées à proximité du site catalytique de la toxine impliqué dans le clivage de la synaptobrevine. La synaptobrevine participe au complexe SNARE qui est responsable de la libération de neurotransmetteurs. Les modifications chimiques identifiées à proximité du site actif pourraient limiter l'accès au substrat et éviter ainsi le clivage de la synaptobrevine-2.

L'ensemble des modifications apportées par le formaldéhyde (base de Schiff, méthylols, méthyles, diméthyles, ponts méthylènes intra et intermoléculaires) sur la protéine pourraient empêcher la TTD de se mouvoir pour traverser les membranes du système nerveux central (SNC).

L'étude tridimensionnelle de la TTD a montré que la plupart des ponts méthylènes ont été construits entre des AA proches dans l'espace ($\approx 10 \text{ \AA}$), suggérant que la conformation de la TTD aurait joué un rôle crucial dans la création de ces réticulations et que le formaldéhyde aurait peu impacté la structure 3D de la protéine. En utilisant plusieurs méthodes analytiques telles que le dichroïsme circulaire (CD) ou la fluorescence UV, plusieurs études scientifiques sont arrivées à la même conclusion, à savoir que très peu de différences ont été observées entre les structures secondaires et tertiaires de la toxine et de l'anatoxine tétanique. Seule la structure primaire de la protéine semble être fortement impactée par le formaldéhyde [5], [6].

Nos résultats expérimentaux ont démontré que la chimie du formaldéhyde sur la TTD n'était pas spécifique puisque les modifications induites par le formaldéhyde étaient

nombreuses et hétérogènes et réparties sur l'ensemble de la protéine. Nos résultats ont également montré que le formaldéhyde avait réagi majoritairement avec les AA les plus accessibles et les plus réactifs.

Après avoir identifié et cartographié les modifications chimiques sur l'anatoxine tétanique, nous les avons quantifiées pour évaluer leur impact sur la structure primaire de la protéine. À notre connaissance, aucune étude de quantification n'a été mise en œuvre pour évaluer les taux des modifications induites par le formaldéhyde dans la TTD. Nous avons constaté que les réticulations de type méthylène et les modifications +12 Da étaient les plus abondantes (respectivement 9 et 12 %) tandis que les dérivés méthylols (4 %), les méthyles (9 %), les diméthyles (0.06 %) étaient minoritaires. Le formaldéhyde n'a pas affecté toutes les molécules de TT de la même manière puisque les formes non modifiées des peptides étaient prédominantes (66 %).

En conclusion, la TTD est un mélange extrêmement complexe. La détoxification de la TT pourrait s'expliquer par l'ensemble des modifications chimiques caractérisées dans cette étude. On peut supposer que celles-ci affectent les fonctions biologiques de la TT : (i) liaison et internalisation dans le neurone (C-terminal de la chaîne lourde), (ii) translocation de la chaîne légère dans le cytosol (N-terminal de la chaîne lourde), (iii) clivage de la synaptobrevine-2 (chaîne légère). La modification de l'une de ces fonctions pourrait suffire à inhiber la toxicité de la protéine.

Une compréhension approfondie de l'action du formaldéhyde sur la toxine au niveau moléculaire est essentielle pour le développement de nouvelles méthodes *in vitro*. En se basant sur cette étude, les modifications induites par le formaldéhyde dans la TTD pourraient servir de critères de qualité pour être utilisées par de futures méthodes *in vitro* pour contrôler l'activité, la qualité et la sécurité des anatoxines tétaniques.

La méthodologie utilisée dans cette étude peut bien évidemment être appliquée à d'autres protéines modifiées par le formaldéhyde pour identifier et cartographier les modifications chimiques.

5. Références bibliographiques

- [1] R. Simon, Q. Enjalbert, J. Biarc, J. Lemoine, and A. Salvador, "Evaluation of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) versus C18 reversed-phase chromatography for targeted quantification of peptides by mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1264, pp. 31–39, 2012.
- [2] K. Biemann, "Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions).," *Methods Enzymol.*, vol. 193, pp. 886–887, 1990.
- [3] P. Roepstorff and J. Fohlman, "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides.," *Biomedical mass spectrometry*, vol. 11, no. 11. England, p. 601, Nov-1984.
- [4] A. Michalski, N. Neuhauser, J. Cox, and M. Mann, "A Systematic Investigation into the Nature of Tryptic HCD Spectra," *J. Proteome Res.*, vol. 11, no. 11, pp. 5479–5491, Nov. 2012.
- [5] M. Thaysen-Andersen, S. B. Jørgensen, E. S. Wilhelmsen, J. W. Petersen, and P. Højrup, "Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin," *Vaccine*, vol. 25, no. 12, pp. 2213–2227, Mar. 2007.
- [6] C. Bayart, S. Peronin, E. Jean, J. Paladino, P. Talaga, and M. Le Borgne, "The combined use of analytical tools for exploring tetanus toxin and tetanus toxoid structures," *J. Chromatogr. B*, vol. 1054, no. Supplement C, pp. 80–92, 2017.
- [7] H. Alsarraf *et al.*, "Biophysical comparison of diphtheria and tetanus toxins with the formaldehyde-detoxified toxoids, the main components of diphtheria and tetanus vaccines.," *Virulence*, vol. 8, no. 8, pp. 1880–1889, Nov. 2017.
- [8] B. Metz *et al.*, "Physicochemical and immunochemical assays for monitoring consistent production of tetanus toxoid," *Biologicals*, vol. 41, no. 4, pp. 231–237, Jul. 2013.
- [9] H. A. Behrendorf-Nicol, U. Bonifas, B. Kegel, K. Silberbach, B. Krämer, and K. Weisser, "In vitro determination of tetanus toxicity by an endopeptidase assay linked to a ganglioside-binding step," *Toxicol Vitro.*, vol. 24, no. 3, pp. 988–994, Apr. 2010.
- [10] B. Metz, C. F. M. Hendriksen, W. Jiskoot, and G. F. A. Kersten, "Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems," *Vaccine*, vol. 20, no. 19–20, pp. 2411–2430, Jun. 2002.
- [11] G. Masuyer, J. Conrad, and P. al Stenmark, "The structure of the tetanus toxin reveals

- pH-mediated domain dynamics," *EMBO Rep.*, vol. 18, no. 8, pp. 1306–1317, 2017.
- [12] R. Fraczkiwicz and W. Braun, "Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules," *J. Comput. Chem.*, vol. 19, no. 3, pp. 319–333, 1998.
- [13] B. Metz *et al.*, "Identification of Formaldehyde-Induced Modifications in Proteins: Reactions with Insulin," *Bioconjug. Chem.*, vol. 17, no. 3, pp. 815–822, May 2006.
- [14] B. Metz *et al.*, "Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 8, pp. 6235–6243, Feb. 2004.
- [15] S. Srinivasa, "Comparison of formaldehyde with established crosslinkers to characterize transient protein structures using mass spectrometry." 2017.
- [16] X. Ding, "A method to characterize formaldehyde cross-linking in proteins by mass spectrometry," 2011.
- [17] J. Kosinski, A. von Appen, A. Ori, K. Karius, C. W. Müller, and M. Beck, "Xlink Analyzer: Software for analysis and visualization of cross-linking data in the context of three-dimensional structures," *J. Struct. Biol.*, vol. 189, no. 3, pp. 177–183, 2015.
- [18] S. Magdeldin and T. Yamamoto, *Toward deciphering proteomes of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues*, vol. 12. 2012.

CHAPITRE III

DEVELOPPEMENT DE METHODES DE QUANTIFICATION CIBLEE RELATIVE ET ABSOLUE DE LA TOXINE TETANIQUE ET DE L'ANATOXINE TETANIQUE

Résumé

L'anatoxine tétanique (TTD) est un antigène complexe produit par action prolongée du formaldéhyde sur la toxine tétanique (TT, 150 kDa). Cette inactivation chimique est critique et a un impact notable sur la toxicité, l'antigénicité et l'immunogénicité de la TTD. Plusieurs tests de caractérisation *in vivo* et *in vitro* sont réalisés tout au long de la chaîne de fabrication pour contrôler industriellement la qualité de la TTD. Toutefois, à ce jour, aucun de ces tests ne permet d'évaluer, à l'échelle moléculaire, la reproductibilité du processus de détoxification, et en particulier des modifications induites par le formaldéhyde sur la TTD.

Le premier objectif de cette présente étude est de développer une méthode unique de contrôle qualité *in vitro* par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) en mode ciblé « *scheduled multiple reaction monitoring* » capable d'analyser spécifiquement 148 peptides de la TTD comprenant 74 peptides non modifiés et 74 peptides modifiés chimiquement par le formaldéhyde incluant 21 peptides modifiés par un groupe méthylol (+30 Da), 37 peptides modifiés par un pont méthylène intra-peptidique ou une base de Schiff/imidazolidinone (+12 Da), 12 peptides modifiés par un groupe méthyle (+14 Da), 2 peptides modifiés par un groupe diméthyle (+28 Da) et 2 peptides inter-pontés comprenant des ponts méthylènes inter-peptidiques (+12 Da). La méthode LC-MS/MS permet de réaliser la quantification relative de la toxine tétanique, de l'anatoxine tétanique, ainsi qu'une quantification relative des différents peptides chimiquement modifiés par le formaldéhyde.

La méthode a été appliquée dans le cadre d'une étude de stabilité de plusieurs lots de TTD âgés de 2 mois, 7 mois, 9 mois, 12 mois, 17 mois, 24 mois et 3 ans. La quantification relative des différents échantillons a montré que le procédé industriel de détoxification chimique au formaldéhyde était reproductible. L'étude de ces lots de vaccins n'a pas mis en évidence de modifications claires de la structure primaire de la TTD au cours du temps, celle-ci étant très stable ; seule une légère oxydation de la TTD a pu être constatée. Un gel SDS-PAGE a été réalisé en parallèle des analyses LC-MS/MS pour quantifier les formes monomères et dimères induits par le formaldéhyde. Celui-ci a révélé que les dimères covalents de TTD diminuaient entre 2 mois et 3 ans au profit des formes monomères. De hauts poids moléculaires ($M_w > 250$ kDa) ont été identifiés dans les lots et pourraient correspondre à des oligomères. Ces derniers semblent être de plus en plus nombreux au cours du temps.

Le deuxième objectif de cette étude est d'élaborer une méthode physico-chimique d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) en mode ciblé « *scheduled multiple reaction monitoring* » pour déterminer spécifiquement les concentrations absolues (g/L) en TT et en TTD dans les lots de vaccins. Cette méthode permet de quantifier la toxine et l'anatoxine tétanique avec au moins quatre peptides et sur au moins trois transitions/peptide. La méthode a été pré-évaluée et celle-ci est répétable, précise (CV<20%) et linéaire entre 0-1000 ng/mL. Elle a été appliquée pour doser plusieurs lots industriels de TT et de TTD.

Les deux méthodes développées au cours de cette étude se veulent être simples et pratiques afin d'évaluer, à l'échelle moléculaire, la reproductibilité et la qualité des lots industriels de TT et de TTD. Ces outils d'expertise en combinaison avec les méthodes *in vitro* existantes contribuent à limiter les contrôles qualité qui sont actuellement réalisés sur les animaux.

Mots clés : méthode de contrôle qualité par LC-MS/MS, anatoxine tétanique, modifications chimiques induites par le formaldéhyde, quantification, lots industriels

1. Introduction

Cette section décrit les méthodes LC-MS/MS en mode MRM et *scheduled MRM*, la stratégie AQUA pour la quantification absolue de protéines ainsi que le contexte d'étude.

1.1. Les modes « Multiple Reaction Monitoring » (MRM) et « scheduled MRM » pour la quantification de protéines

Les méthodes LC-MS/MS ciblées développées dans cette étude utilisent les modes MRM et *scheduled MRM*. Le mode MRM est celui de référence pour la quantification de protéines et consiste à suivre spécifiquement et uniquement les peptides d'intérêt tout au long de l'analyse (Figure 29) [37], [43], [44]. Dans ce mode, le spectromètre de masse isole un peptide de m/z choisit, le fragmente et sélectionne un seul ion fragment de m/z donné. Cette double sélection en m/z d'un peptide et d'un unique ion fragment est appelée transition. Il convient de suivre 3-4 transitions peptide. Ce mode autorise le suivi spécifique de 100 voire 200 transitions au maximum, soit 20 -30 peptides, en une seule analyse. Il existe des méthodes dérivées du mode MRM pour augmenter le nombre de transitions suivies comme la méthode « *scheduled MRM* » (Figure 29) [45]. Celle-ci consiste à suivre les transitions des peptides seulement autour de leur temps de rétention en créant des fenêtres de détection de 1 à 2 minutes. Cette stratégie permet de suivre plusieurs milliers de transitions. Les données générées après analyse LC-MS/MS en mode MRM ou *scheduled MRM* sont ensuite traitées par des outils tels que Skyline pour réaliser la quantification par intégration des pics chromatographiques des peptides reconstitués à partir des transitions suivies en mode MRM ou *scheduled MRM* [45], [46].

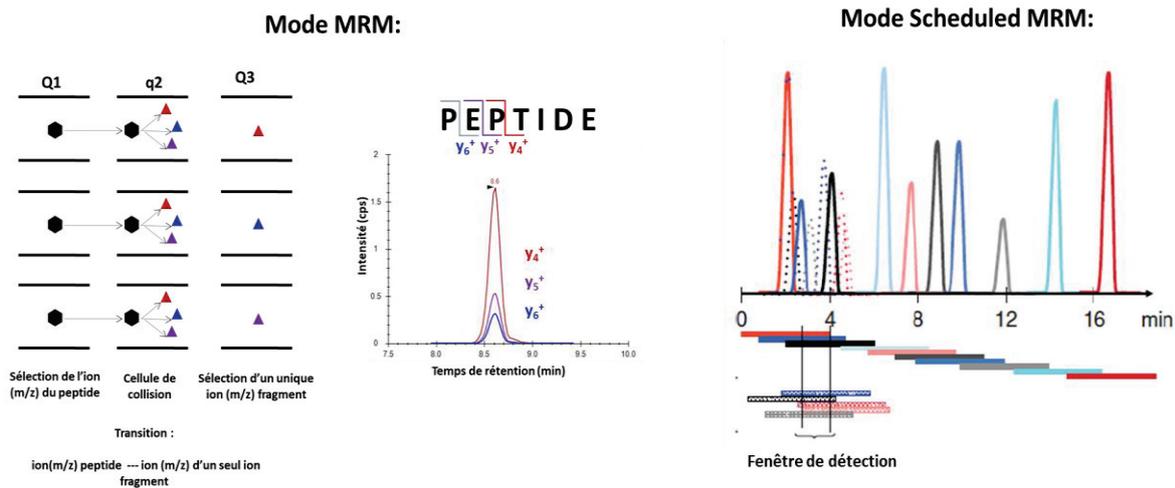


Figure 29 : Représentations des modes MRM et scheduled MRM [45], [46]

1.2. La méthodologie AQUA « Absolute QUAntification » pour la quantification absolue par LC-MS/MS de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique

Plusieurs stratégies de quantification absolue par LC-MS/MS existent, mais celle employée dans cette étude est la méthode de dilution isotopique développée par le laboratoire du Dr. Steve Gygi (Figure 30), appelée « Absolute QUAntification » (AQUA), [37]. Cette dernière est réputée être la plus exacte et la plus précise des méthodes existantes [16]–[19]. Elle consiste à introduire des peptides synthétiques enrichis en isotopes lourds stables (¹³C, ¹⁵N) dits « peptides AQUA » à une concentration connue avant ou après digestion. Les peptides synthétiques possèdent les mêmes séquences d'acides aminés que les peptides endogènes à doser mais comportent un acide aminé alourdi par plusieurs isotopes stables (¹³C, ¹⁵N). Les standards alourdis ont rigoureusement les mêmes caractéristiques physico-chimiques que leurs homologues légers. Le peptide endogène et le peptide AQUA sont détectés au même temps de rétention, possèdent les mêmes propriétés d'ionisation et sont facilement distingués en spectrométrie de masse par la différence de masse due au marquage isotopique. La quantité de peptide endogène peut alors être déterminée à partir du rapport d'intensité observé entre le signal correspondant au peptide natif et le signal correspondant au peptide AQUA présent en quantité connue.

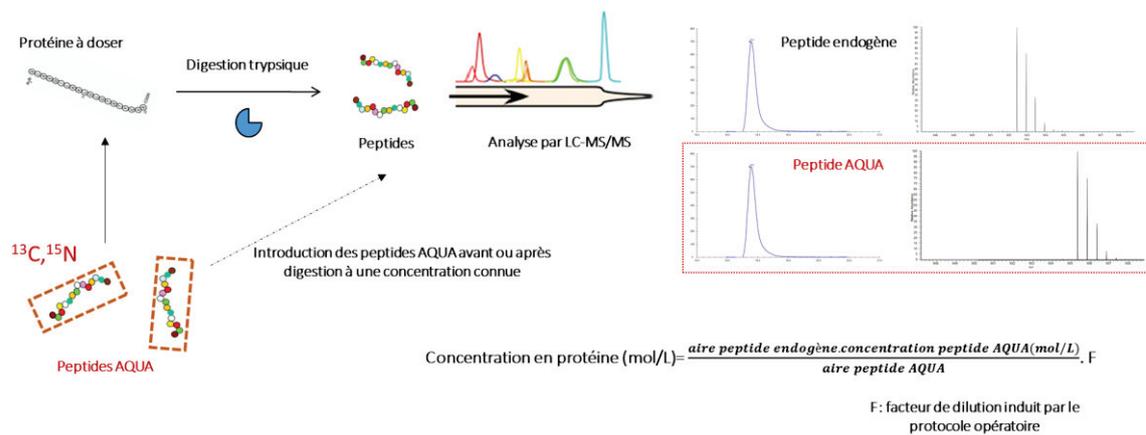


Figure 30 : Stratégie AQUA pour la quantification absolue et spécifique d'une protéine par LC-MS/MS

Contexte d'étude

Comme évoqué dans l'introduction générale, à ce jour, des outils de caractérisation permettent d'évaluer la qualité de l'anatoxine tétanique (TTD) telles que les méthodes SDS-PAGE, Fluorescence ou Dichroïsme Circulaire (DC) mais aucune d'entre elles n'est capable d'évaluer, à l'échelle moléculaire, la reproductibilité du processus de détoxification et en particulier des modifications induites par le formaldéhyde sur la TTD [3], [7], [10]–[12].

Le premier objectif de cette étude est de développer une méthode *in vitro* unique par LC-MS/MS en mode ciblé *Scheduled MRM* pour la quantification relative de différents peptides de la toxine tétanique non modifiés et modifiés au formaldéhyde. La méthode se veut être simple, pratique et facile à mettre en œuvre pour contrôler à l'échelle moléculaire la qualité de la toxine tétanique aux stades avant et après inactivation au formaldéhyde.

Le développement de la méthode a débuté par l'optimisation du protocole de préparation d'échantillon. Puis, la méthode a été employée dans le cadre d'une étude de stabilité de lots de TTD âgés de 2 mois, 7 mois, 9 mois, 12 mois, 17 mois, 24 mois et 3 ans.

Dans la mesure où la méthode LC-MS/MS n'est pas capable de quantifier les formes monomères et potentiels dimères de TTD qui ont pu être générés au cours de la détoxification au formaldéhyde, un gel SDS-PAGE suivi d'une analyse densitométrique ont été réalisés en parallèle des analyses LC-MS/MS afin de quantifier ces différentes formes.

Un des paramètres essentiels qui influe sur l'efficacité du vaccin antitétanique est la quantité de TTD. Pour l'évaluer, des outils de caractérisation tels que les dosages colorimétriques et Kjeldahl sont employés pour déterminer les teneurs en protéines totales [13]. Cependant, ces méthodes ne dosent pas spécifiquement la TTD. Des tests immunologiques tels que les tests de Flocculation de Ramon et «*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*» (ELISA) le permettent mais sont relativement coûteux et imprécis [3], [7]. La spectrométrie de masse est une technologie émergente qui pourrait constituer une alternative ou une approche orthogonale aux outils existants [14]. Elle a été employée avec succès dans l'industrie du vaccin pour quantifier des virus tel que le sérotype IV du virus de la dengue [15].

Le deuxième objectif de cette étude est de développer une méthode de quantification absolue par LC-MS/MS en mode ciblé *Scheduled MRM* pour déterminer les concentrations absolues (en g/L) en TT à différentes étapes de fabrication industrielle des vaccins antitétaniques et Hib et notamment aux étapes avant et après inactivation au formaldéhyde.

Le développement de la méthode LC-MS/MS a débuté par la sélection des peptides d'intérêt. Ils ont ensuite été synthétisés avec des isotopes lourds stables ^{13}C , ^{15}N . Selon la méthode de dilution isotopique AQUA, la quantification a été réalisée en introduisant ces standards alourdis à une concentration connue dans les échantillons.

Le protocole de digestion enzymatique a été optimisé pour obtenir le dosage le plus juste et exacte possible. La méthode LC-MS/MS a été pré-évaluée pour vérifier sa répétabilité, sa linéarité et a été appliquée pour quantifier différents lots industriels de TT et de TTD. Une méthode LC/UV a été élaborée en parallèle pour étudier la stabilité des peptides étalons.

Les méthodes LC-MS/MS développées dans cette étude contribuent à un meilleur contrôle qualité des vaccins. Elles permettront à long terme, en combinaison avec d'autres méthodes *in vitro*, de limiter les tests qui sont actuellement réalisés sur les animaux [3], [20]. Les développements analytiques menés dans cette étude ont la possibilité d'être extrapolés pour d'autres vaccins utilisant du formaldéhyde tels que le vaccin contre la poliomyélite.

2. Matériels et méthodes

2.1. Produits chimiques

L'acide formique (AF), le bicarbonate d'ammonium (ABC), le DL-dithiothréitol (DTT), l'iodoacétamide (IAM), le déoxycholate de sodium (DOC), la trypsine porcine type IX-S, le chlorhydrate de O-(2,3,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine (PFBHA, HCl), le 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (TRIS) et la caféine ont été achetés auprès de Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Les solvants de préparation des solutions ainsi que ceux constituant les phases de chromatographie, i.e. eau pure (H₂O) et l'acétonitrile (CH₃CN) étaient de qualité LC-MS et ont été achetés auprès de Fisher Scientific (Strasbourg, France). Le gel Criterion TGX 4-15%, les marqueurs de poids moléculaires, « *Precision Plus Protein™ Prestained Standards* » (PPPS), le tampon échantillon 4X, l'agent réducteur 20X et le tampon de migration 10X ont été achetés chez Biorad (Hercules, CA, USA). Le bleu de Coomassie GelCode™ et l'acide trifluoroacétique (TFA) ont été commandés chez Thermo Scientific (Rockford, IL, USA).

Les peptides de synthèse alourdis avec des isotopes lourds stables ¹³C, ¹⁵N ont été achetés chez BACHEM (Bubendorf, Suisse) et ont été stockés à -20°C.

2.2. Echantillons

Tous les échantillons ont été produits chez Sanofi Pasteur (Marcy l'Etoile, France) et conservés à +5°C. Un mélange de TTD de 30 lots de la branche de production ATP a été utilisé pour le développement de la méthode de quantification absolue de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique. La concentration moyenne du mélange de lots en protéines totales évaluée par la méthode de Bradford était de 18,8 g/L.

Dans les Tableau 5 et Tableau 6, la concentration en protéines totales a été calculée avec la formule : [Protéines totales] = dosage en azote protéique x Facteur de Jones. Ce facteur est égal à 6,25 et correspond à la teneur moyenne en azote dans les protéines.

Des puretés antigéniques ont été évaluées pour tous les lots industriels. Ces dernières ont été calculées par la formule : Pureté antigénique = Limite de flocculation (Lf) / milligramme d'azote protéique. Les limites de flocculation (titres Lf) ont été déterminées par le test de Flocculation

de Ramon. Le formaldéhyde résiduel présent dans les échantillons de TTD a été dosé par colorimétrie.

Tableau 5 : Lots de TT

Lots de TT	Branche industrielle	Dosage en azote protéique par colorimétrie en g/L	Dosage en protéines totales (g/L)	Concentration en Lf/mL	Pureté antigénique (Lf/mg d'azote protéique)
n°FA582687 ⁽²⁾	ATP	0,7	4,3	450	643
n°FA580140	PTC	0,1	0,8	270	2056
n°FA632908 ⁽¹⁾	PTC	0,1	0,7	270	2209

Tableau 6 : Lots de TTD

Lots de TTD	Branche industrielle	Dosage en azote protéique par la méthode Kjeldahl en g/L	Dosage en protéines totales (g/L)	Formol résiduel dosé par colorimétrie (µg/mL)	Concentration en Lf/mL	Pureté antigénique (Lf/mg d'azote protéique)
n°FA670799	ATP	5,0	30,7	/	4750	956
n°FA622880	ATP	/	/	/	4750	1029
n°FA658145 âgé de 2 mois	ATP	4,5	28,1	59,1	4750	1043
n°FA646365 âgé de 7 mois	ATP	4,5	27,5	54,4	4750	1067
n°FA639771 âgé de 9 mois	ATP	5,9	36,6	57,2	5250	887
n°FA630508 âgé de 12 mois	ATP	4,4	26,9	56,3	5250	1204
n°FA616616 âgé de 17 mois	ATP	5,3	33,0	70,9	5250	984
n°FA593530 âgé de 24 mois	ATP	4,6	28,4	65,8	4500	979
n°FA559917 âgé de 3 ans	ATP	4,0	24,8	69,0	3600	896
n°FA578894 ⁽¹⁾	PTC	5,2	32,1	/	12000	2304

(1) Ces lots ont été utilisés pour le développement de la méthode de quantification de la toxine tétanique, de l'anatoxine tétanique et des formes chimiquement modifiées par le formaldéhyde.

(2) Ce lot a été utilisé pour le développement de la méthode de quantification absolue de la toxine tétanique.

2.3. Protocole de préparation des échantillons pour l'analyse SDS-PAGE

Le gel SDS-PAGE a été réalisé en conditions réductrices et dénaturantes. Le lot de référence de TT n° n°FA582687 a été dilué en mélangeant 230 µL de solution de TT et 770 µL d'eau. Les lots de TTD ont préalablement été dilués en ajoutant 35 µL d'échantillon dans 965 µL d'eau. Les échantillons de TT et de TTD ont été préparés en mélangeant 64 µL de solution diluée, 20 µL d'eau, 6 µL de tampon réducteur 20X et 30 µL de tampon d'échantillon 4X. Ces derniers ont été dénaturés thermiquement à 100°C pendant 5 minutes et déposés sur le gel. Des marqueurs de poids moléculaire ont également été introduits dans le gel pour la calibration en masse. Les tensions 80 V et 200 V ont été appliquées sur le gel pendant respectivement 15 et 30 minutes. Les protéines ont été colorées par le bleu de Coomassie pendant 2 heures. Le gel a ensuite été décoloré à l'eau.

2.4. Protocole d'hydrolyse enzymatique de l'anatoxine pour l'analyse quantitative relative des formes peptidiques chimiquement modifiées par le formaldéhyde

Dans un tube eppendorf de qualité « *protein lo-bind* », 200 µL d'anatoxine à 0,28 g/L en azote protéique ont d'abord été dénaturées thermiquement pendant 5 min à 850 rpm et à 100°C. Puis, 30 µL de DOC à 5 % m/v et 30 µL de DTT à 100 mM ont successivement été ajoutés dans l'échantillon afin de réduire les ponts disulfures. Après incubation à 56°C et à 850 rpm pendant 30 min, les fonctions thiols ont été alkylées par ajout de 30 µL d'IAM à 400 mM. Le tube a été laissé dans l'obscurité et à température ambiante pendant 1h. Les protéines ont ensuite été soumises à une hydrolyse enzymatique à 37°C pendant 5h à 850 rpm en ajoutant 10 µL d'une solution de trypsine à 2,6 g/L. L'hydrolyse a été stoppée par l'ajout de 10 µL d'AF à 20 % v/v dans H₂O qui de surcroît a entraîné la précipitation du DOC. L'échantillon a été centrifugé à 10000 rpm pendant 5 min. Le surnageant a été transféré dans un vial et celui-ci a été conservé à +5°C avant analyse LC-MS/MS.

2.5. Protocole de préparation des solutions standards des peptides étalons pour la quantification absolue de la toxine et de l'anatoxine tétanique

Les peptides étalons présents dans les aliquots ont été mis en solution par 2 mL d'un mélange H₂O/MeOH/AF (90/10/0,5 v/v/v), puis cette solution a été diluée au 1/10^{ème} dans un vial par le mélange H₂O/MeOH/AF (90/10/0,5 v/v/v) afin d'obtenir une concentration finale de 0,005 g/L. La solution de peptides étalons a été stockée à +5°C.

2.6. Protocole d'hydrolyse enzymatique de la toxine et de l'anatoxine tétanique pour l'analyse quantitative absolue

Dans un tube eppendorf, 50 µL de solution de TT et de TTD préalablement dilués à 0,11 g/L en azote protéique ont d'abord été dénaturés chimiquement avec du DOC à 5% m/v (70 µL) et du PFBHA à 0,02 mol/L (70 µL) puis thermiquement pendant 5 min à 100°C et à 850 rpm. L'échantillon a ensuite été dilué avec du tampon ABC à 50 mM (360 µL) puis ramené à température ambiante. Puis, 20 µL de solution de peptides étalons à 0,005 g/L ont été ajoutés dans l'échantillon. Les protéines ont ensuite été soumises à une hydrolyse enzymatique à 37°C pendant 20h à 850 rpm en ajoutant 50 µL de trypsine à 1,4 g/L. L'hydrolyse a été stoppée par l'ajout de 10 µL d'AF à 40 % v/v dans H₂O qui, de surcroît, a entraîné la précipitation du DOC. L'échantillon a été centrifugé à 10 000 rpm pendant 5 min. Le surnageant a été transféré dans un vial et celui-ci a été conservé à +5°C avant analyse LC-MS/MS.

2.7. Protocole de préparation des échantillons pour étudier la stabilité des peptides étalons par analyse LC/UV

La caféine a été utilisée comme référence pour normaliser les aires des peptides. La solution standard de caféine à 2 g/L a été préparée en diluant 2 mg de caféine avec 1 mL d'eau. Cette solution a été diluée au ¼ par de l'eau afin d'obtenir une concentration de 0,5 g/L. 330 µL de cette dernière ont été ajoutés à 670 µL d'eau pour obtenir une solution finale de caféine à 0,17 g/L. Les peptides étalons contenus dans les aliquots ont été mis en solution par 2 mL d'un mélange H₂O/MeOH/AF (90/10/0,5 v/v/v) afin d'obtenir une concentration à 0,05 g/L. L'échantillon de stabilité des peptides étalons était composé de : 250 µL de solution de

peptides étalons à 0,05 g/L, 735 µL de mélange H₂O/MeOH/AF (90/10/0.5 v/v/v) et de 15 µL de caféine à 0,17 g/L.

2.8. Conditions opératoires du système LC/UV/MS pour étudier la stabilité des peptides étalons

Les analyses LC/UV/MS ont été réalisées sur un système HPLC 1200 couplé à un détecteur ultraviolet-visible (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) et à un spectromètre de masse haute résolution LTQFT-Ultra (Thermo Scientific, Brême, Allemagne). Le pilotage du système et l'acquisition des données étaient gérés par le logiciel Xcalibur 2.0. La séparation HPLC a été réalisée sur une colonne CSH C₁₈ (2,1 mm x 150 mm, diamètre de particule : 1,7 µm, Waters). L'élution a été réalisée à un débit de 250 µL/min avec un solvant A composé d'eau acidifiée à 0,1% v/v en AF et d'un solvant B composé d'acétonitrile acidifiée à 0,1% v/v en AF. La séquence d'élution était composée d'un gradient linéaire de 0 à 14 min de 2 à 30 % en B et d'un plateau de 6 min à 100 % en B. La colonne a été rééquilibrée pendant 10 min à 2 % en B. La température de la colonne a été fixée à 50°C et le volume d'injection à 10 µL.

Les données MS(/MS) ont été acquises en mode Full Scan MS. Tous les spectres MS¹ ont été enregistrés avec des ratio *m/z* compris entre 120-1200, dans l'analyseur FTICR à une résolution de 50 000 à *m/z* 400. Les longueurs d'ondes spécifiques de 200 nm, 210 nm et d'un scan « *PhotoDiode Array detector* » (PDA) balayant les longueurs d'ondes comprises entre 190-900 nm ont été suivies dans la méthode UV.

2.9. Conditions opératoires du système LC-MS/MS pour la quantification ciblée relative et absolue de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique

Les analyses LC-MS/MS ont été réalisées sur un système HPLC 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) couplé à un spectromètre de masse quadripôle hybride trappe à ion linéaire (QTRAP® 6500) équipé d'une source électrospray turbo V™ (AB Sciex, Foster City, CA, USA). Le pilotage du système et l'acquisition des données ont été gérés par le logiciel Analyst 1.6.2. La séparation chromatographique des peptides a été effectuée sur une colonne CSH C₁₈ (2,1 mm x 150 mm, diamètre de particule : 3,5 µm, Waters). Les phases mobiles étaient constituées d'un solvant A H₂O/AF 0,1% v/v et d'un solvant B CH₃CN/AF 0,1% v/v. La séquence d'élution suivante a été appliquée à un débit de 300 µL/min : un gradient linéaire de 0 à 40

min de 2 à 40 % en B et d'un plateau de 5 min à 100 % en B. La colonne a été rééquilibrée pendant 8 min à 2 % en B. La colonne de chromatographie était thermostatée à 50°C et le volume d'injection était de 20 µL.

Les séquences des peptides non modifiés et modifiés au formaldéhyde qui ont été préalablement caractérisées en haute résolution lors de notre précédente étude ont été ajoutées dans le logiciel Skyline 4.1.0. Les séquences des peptides étalons ont également été ajoutées dans le logiciel. Skyline a permis de générer la liste des transitions théoriques avec les paramètres d'ionisation et de fragmentation comprenant les énergies de collision (CE) et les tensions (DP) « *Declustering Potential* » de tous les peptides pour les ions moléculaires doublement et triplement chargés. Les EP « *Entrance Potential* » et CXP « *Collision cell eXit Potential* » ont été fixés à 10 et 11 V pour tous les ions. Pour la méthode *scheduled MRM*, la fenêtre de détection des pics chromatographiques a été fixée à 120s et la durée de balayage à 1s. L'analyse MS a été menée en mode d'ions positifs. La tension du spray a été fixée à 5500 V, le gaz rideau à 50 psi, les gaz de nébulisation et auxiliaire à respectivement 70 et 60 psi. Les trois gaz étaient de l'azote. La température de la source Turbo V était utilisée à 550°C avec un capillaire de spray de 100 µm de diamètre interne.

2.10. Analyse des données

Pour le traitement des données des analyses LC/UV, les intégrations des pics ont été réalisées à 200 nm avec le logiciel Xcalibur (v 2.2) et l'outil Qual Browser. Les aires des peptides ont été normalisées par l'aire du pic chromatographique correspondant à la caféine.

Pour traiter les données LC-MS/MS, les ions précurseurs et fragments des peptides suivis dans la méthode LC-MS/MS ont été intégrés dans le logiciel Skyline 4.1.0. Les masses exactes des modifications étaient de : +12,000 Da pour la base de Schiff ou le pont méthylène intra-peptidique, +30,0106 Da pour l'adduit méthylol, +28,0535 Da pour le groupement diméthyle, +14,0156 Da pour le groupement méthyle, +57,0215 Da pour la carbamidométhylation de la cystéine, +15,9949 Da pour l'oxydation de la méthionine. Les incréments de masse induits par les isotopes lourds stables (¹³C, ¹⁵N) sur les arginines et lysines des peptides étalons étaient de +10,0083 Da pour l'arginine et de +8,0142 Da pour la lysine.

Les données brutes issues des analyses LC-MS/MS ont été importées dans le logiciel Skyline pour l'intégration manuelle des pics chromatographiques des peptides reconstitués à partir

des signaux suivis en mode *scheduled MRM*. Les aires des peptides ont été exportées et retraitées sur Excel. Pour la quantification relative des peptides, les aires ont été normalisées par l'aire du peptide non modifié TLNDYK. Pour la quantification absolue de la TT et de la TTD, la formule suivante a été appliquée :

$$\text{Concentration en toxine tétanique (mol/L)} = \frac{\text{Aire du peptide endogène} \times \text{Concentration finale en peptide étalon (mol/L)}}{\text{Aire du peptide étalon}} \times F$$

Où : F égal à 12,6 est le facteur de dilution induit par le protocole d'hydrolyse enzymatique.

L'analyse densitométrique du gel SDS-PAGE a été réalisée avec le logiciel ImageQuant TL 8.1.

3. Résultats et discussions

3.1. Développement de la méthode LC-MS/MS pour la quantification relative des peptides non modifiés et chimiquement modifiés par le formaldéhyde

En vue d'établir la méthode LC-MS/MS ciblée pour la quantification relative des peptides de la TT non modifiés et chimiquement modifiés au formaldéhyde, nous avons utilisé un système LC-MS composé d'une chaîne HPLC 1290 (Agilent Technologies) couplé à un MS hybride QTRAP® 6500 (AB Sciex), différent de celui qui avait été employé pour l'étude de caractérisation de la TTD, à savoir un système nanoLC Ultimate 3000 couplé à un spectromètre de masse Tribrid Fusion Lumos (Thermo Scientific).

Du fait de la différence de sensibilité entre les deux instruments, il a fallu vérifier que les peptides caractérisés en haute résolution (listés dans le chapitre II) pouvaient être détectés avec ce nouveau système dédié à la quantification. Pour ce faire, les séquences des peptides ont été récupérées et intégrées dans le logiciel Skyline. Ce dernier a permis de générer la liste théorique des transitions à tester. Nous avons sélectionné et suivi 10 transitions/peptide en mode MRM et seules les 3-5 transitions les plus intenses ont été conservées pour chaque peptide.

Au final, une méthode unique de type *scheduled MRM* (annexe n°3) a été développée, comprenant plus de 500 transitions et permettant d'analyser spécifiquement 148 peptides de la TTD (Figure 31) : 74 peptides non modifiés et 74 peptides modifiés chimiquement par le formaldéhyde incluant 21 peptides modifiés par un groupe méthylol (+30 Da), 37 peptides modifiés par un pont méthylène intra-peptidique ou une base de Schiff/imidazolidinone (+12 Da), 12 peptides modifiés par un groupe méthyle (+14 Da), 2 peptides modifiés par un groupe diméthyle (+28 Da) et 2 peptides inter-pontés comprenant des ponts méthylènes inter-peptidiques (+12 Da). Les peptides qui n'ont pas pu être ciblés et intégrés dans la méthode MS finale étaient ceux trop faiblement intenses à l'instar de certains peptides inter-pontés qui étaient lourds et difficilement ionisables.

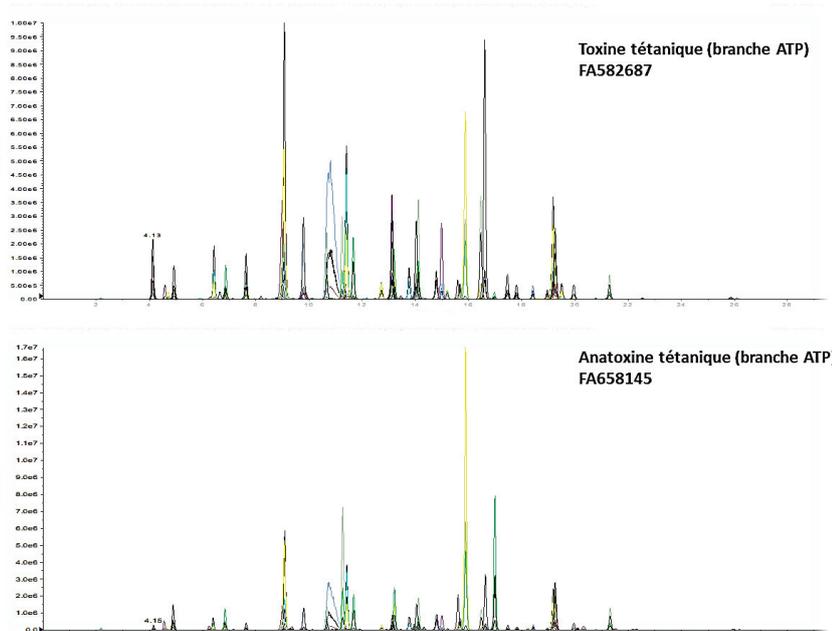


Figure 31 : Chromatogrammes reconstitués sur les n transitions suivies pour chacun des peptides non modifiés et modifiés pour la TT et la TTD de la branche industrielle ATP.

3.1.1. Optimisation du protocole opératoire pour la quantification relative des peptides de la TT non modifiés et chimiquement modifiés par le formaldéhyde

Les échantillons protéiques de TT et de TTD ne peuvent pas être analysés directement dans le système LC-MS et doivent au préalable subir un protocole de digestion enzymatique. Ce dernier comprend classiquement une étape de dénaturation pour déplier les protéines et exposer les sites réactifs à l'enzyme, une étape de réduction/alkylation pour cliver les ponts disulfures et alkyler les cystéines libres et une étape d'hydrolyse trypsique pour générer le mélange peptidique. Afin d'obtenir le meilleur rendement de digestion, nous avons optimisé le protocole d'hydrolyse enzymatique. Pour ce faire, nous avons étudié l'influence de certains paramètres, à savoir la quantité d'enzyme, le temps de digestion et la dénaturation thermique sur les aires des peptides obtenus (Figure 32).

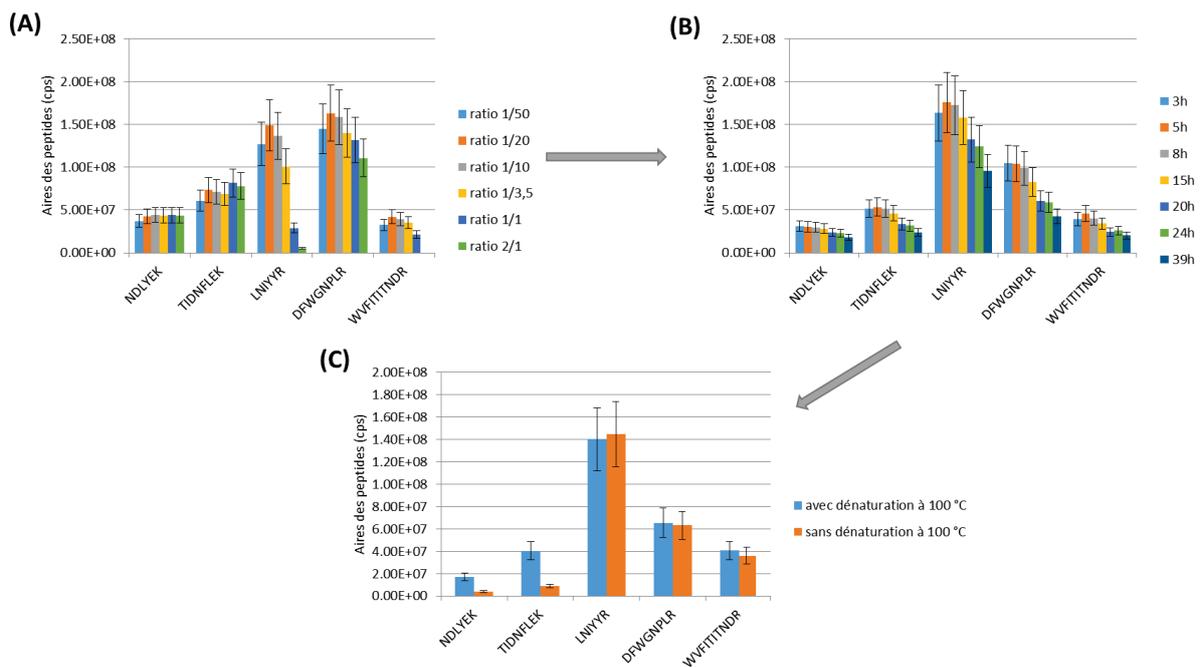


Figure 32 : Optimisation du protocole d'hydrolyse trypsique de la TTD (branche ATP). Les graphiques (A) et (B) correspondent aux optimisations de la quantité d'enzyme [ratio trypsine/protéine (m/m)] et du temps de digestion respectivement. Le graphique (C) montre l'influence de la dénaturation thermique. Les barres d'erreurs correspondent aux déviations standards des triplicats.

Différents ratio trypsine/protéine (m/m) ont été testés (Figure 32). Le ratio optimal est le ratio 1/10. En effet, une quantité trop importante de trypsine est problématique dans la mesure où la chymotrypsine résiduelle présente dans la trypsine commerciale induit des clivages indésirables en C-ter des acides aminés F, Y, W, M, L des peptides d'intérêt. À l'inverse, une quantité trop faible d'enzyme n'est pas suffisante pour correctement digérer la protéine. Un temps de digestion de 5 heures est optimal ; au-delà les peptides s'adsorbent sur les parois et/ou se dégradent avec la température. La dénaturation thermique est indispensable pour correctement déplier la protéine (5min, 100°C) et améliorer ainsi le rendement de digestion enzymatique.

3.1.2. Pré-évaluation de la répétabilité du processus analytique comprenant le protocole opératoire et l'analyse LC-MS/MS pour la quantification relative des peptides de la TT non modifiés et chimiquement modifiés par le formaldéhyde

Avant de pouvoir exploiter la méthode *scheduled MRM*, nous avons pré-évalué la répétabilité du processus analytique comprenant le protocole de digestion enzymatique et l'analyse LC-MS/MS. Pour ce faire, un triplicat de digestat tryptique de TTD de la branche ATP a été analysé et les aires des peptides ont été comparées entre les répliquats (Figure 33). Tous les coefficients de variations ($CV = \text{écart-type/moyenne} \times 100$) sur les aires des pics chromatographiques calculés pour les peptides suivis dans la méthode sont inférieurs à 20 %. Les CV moyen et médian sont respectivement de 4 et 3 % indiquant une bonne répétabilité du processus analytique (Figure 33).

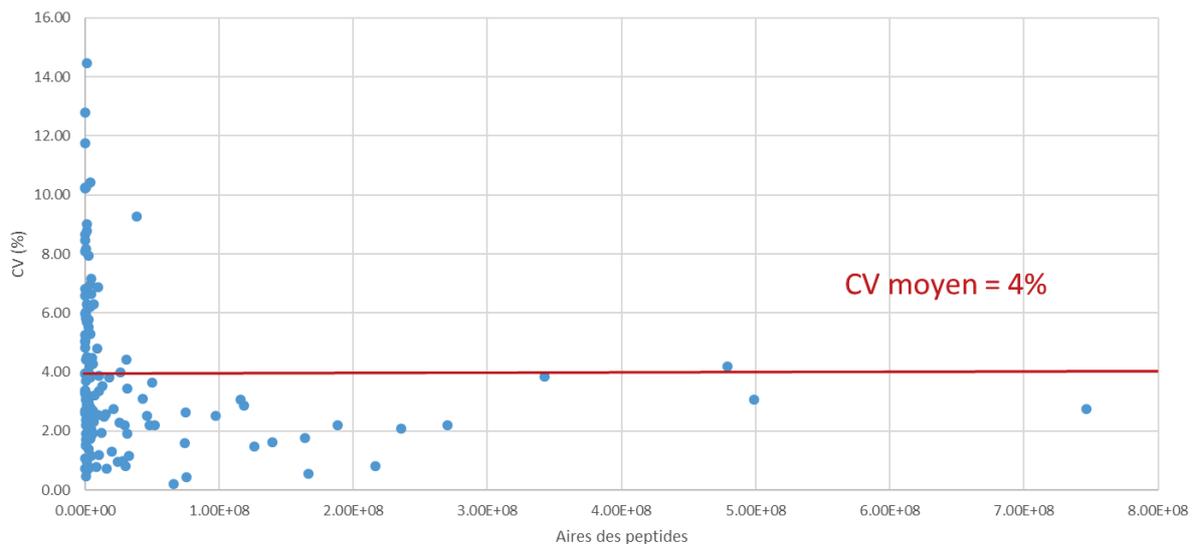


Figure 33 : Etude de la répétabilité de la méthode *scheduled MRM*. Graphique représentant les coefficients de variations sur les aires des pics chromatographiques calculés pour les 148 peptides suivis dans la méthode. Les peptides les moins intenses ont les coefficients de variations les plus élevés.

3.1.3. Etude de la stabilité des lots de TTD de la branche ATP

Après avoir développé et pré-validé la méthode LC-MS/MS pour la quantification relative des peptides de la TT non modifiés et chimiquement modifiés par le formaldéhyde, cette dernière a été appliquée à une étude concrète de stabilité de lots de TTD de la branche

ATP. Les échantillons utilisés étaient des lots industriels conformes âgés de 2 mois, 7 mois, 9 mois, 12 mois, 17 mois, 24 mois et 3 ans et conservés à +5°C.

Pour étudier la stabilité de la TTD, tous les lots industriels de TTD ont été dilués à une même concentration de 0,28 g/L en azote protéique. Pour le retraitement des données, les aires des peptides ont été normalisées par un unique peptide endogène stable de séquence TLNDYK.

Comme nous pouvons le constater sur la Figure 34, les différents lots ont des chromatogrammes très similaires indiquant une bonne reproductibilité du procédé industriel de détoxification au formaldéhyde de la branche industrielle ATP.

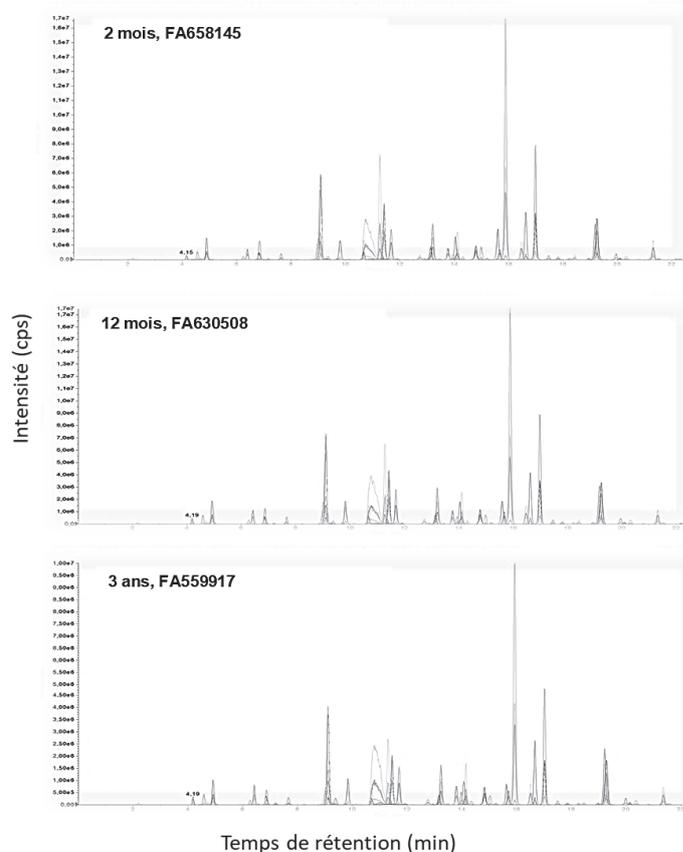


Figure 34 : Comparaison des chromatogrammes reconstitués des différents lots de TTD âgés de 2 mois, 12 mois et 3 ans.

Globalement, les peptides non modifiés sont stables entre les différents lots de TTD (Figure 35). Les aires des peptides comportant des méthionines, des tryptophanes et des tyrosines diminuent au cours du temps ; cela peut s'expliquer par une potentielle oxydation de ces acides aminés [24]. Les aires des peptides modifiés avec des bases de Schiff (+12 Da) décroissent légèrement au cours du temps et semblent être au profit des peptides modifiés

avec des méthylols (+30 Da) qui tendent à augmenter (Figure 35). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les bases de Schiff et méthylols sont en équilibre réversible ; les bases de Schiff peuvent s'hydrater en méthylols [9]. Les peptides méthylés (+14Da) et diméthylés (+28Da) sont très stables entre les lots (Figure 35). En effet, les méthyles et les diméthyles sont des modifications irréversibles et ne semblent pas se dégrader avec le temps. À l'inverse, les deux peptides inter-pontés suivis dans la méthode paraissent légèrement instables. Cette instabilité peut potentiellement s'expliquer par une destruction des ponts méthylènes avec les ions H⁺ présents en solution, telle que décrite par Thaysen Andersen *et al.* [9].

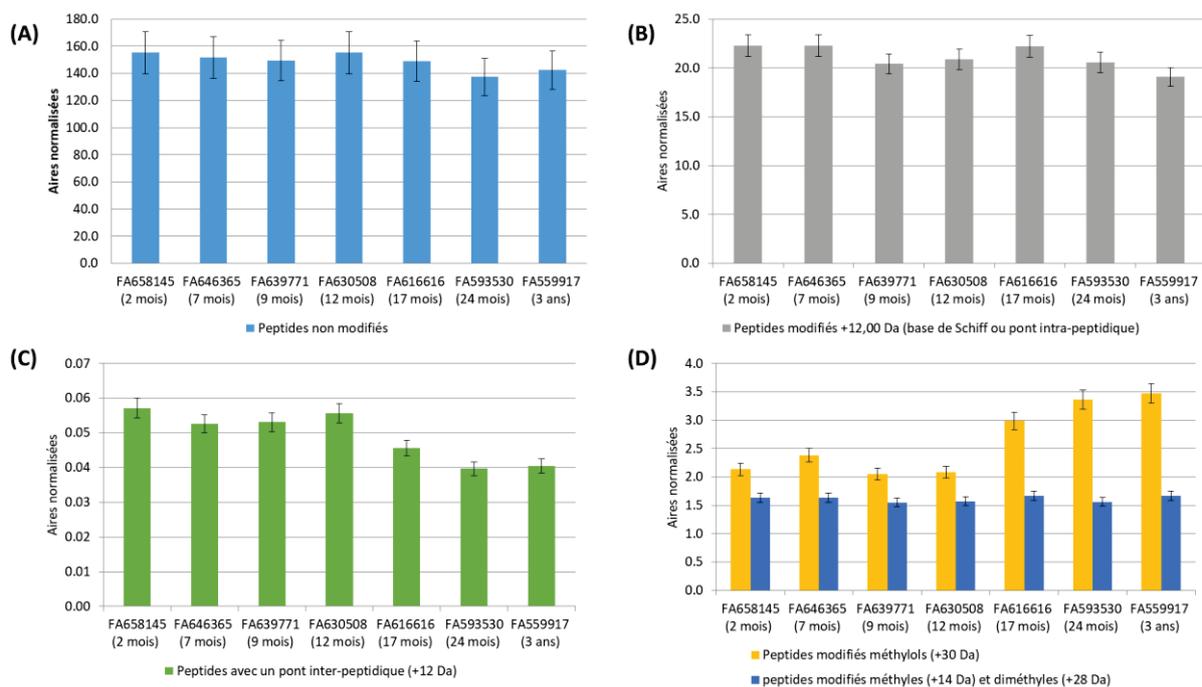


Figure 35 : Les graphiques (A), (B), (C) et (D) représentent les sommes des aires normalisées des peptides non modifiés et modifiés par le formaldéhyde. Les barres d'erreurs correspondent aux déviations standards des triplicats.

3.1.4. Etude de la stabilité de lots de TTD de la branche ATP par analyse SDS-PAGE

La méthode LC-MS/MS ne permet pas de quantifier les potentiels dimères induits par le formaldéhyde dans les échantillons. C'est pourquoi nous avons réalisé en parallèle des analyses LC-MS/MS, un gel SDS-PAGE en conditions réductrices et dénaturantes (Figure 36) suivi d'une analyse densitométrique pour évaluer l'abondance relative de ces espèces modifiées.

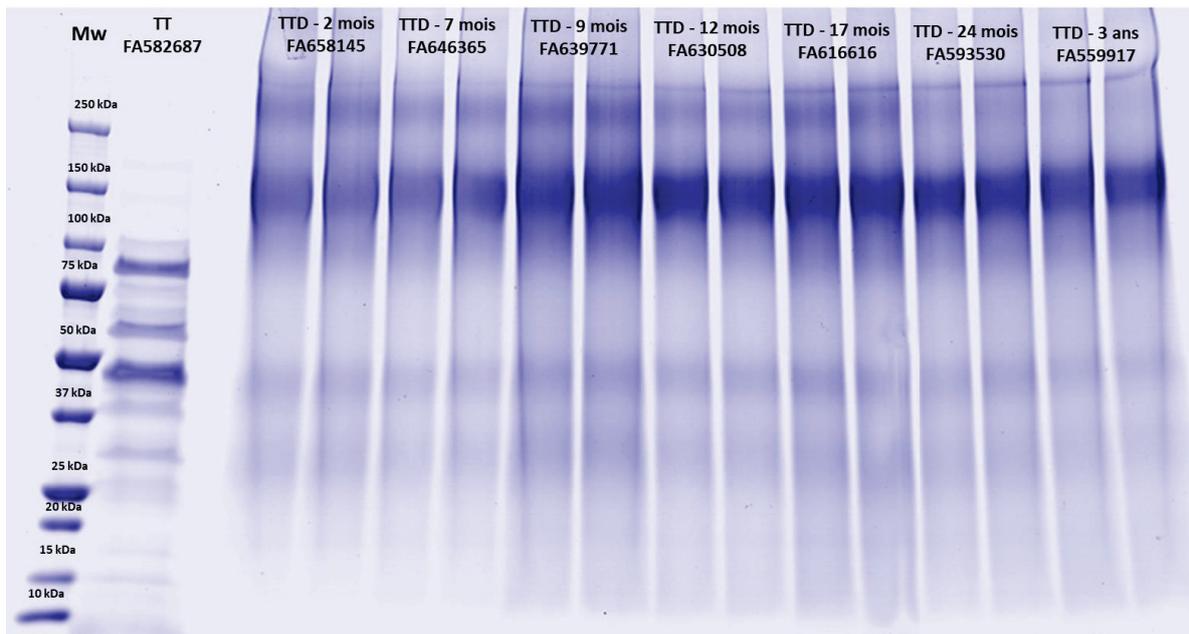


Figure 36 : Gel SDS-PAGE réalisé en conditions dénaturantes et réductrices. Mw « molecular weight » indiquent les marqueurs de poids moléculaire.

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 36, des bandes à Mw > 250 kDa correspondant à des dimères et des supposés oligomères sont visibles dans les différents lots industriels de TTD. Ces dimères et oligomères résulteraient du traitement au formaldéhyde et témoigneraient de l'existence de ponts méthylènes inter-protéines dans la TTD. L'analyse densitométrique du gel SDS-PAGE a révélé que ces dimères covalents de TTD diminuaient entre 2 mois et 3 ans au profit des formes monomères (Figure 37). Les suspectés oligomères semblent être de plus en plus nombreux au cours du stockage (Figure 38).

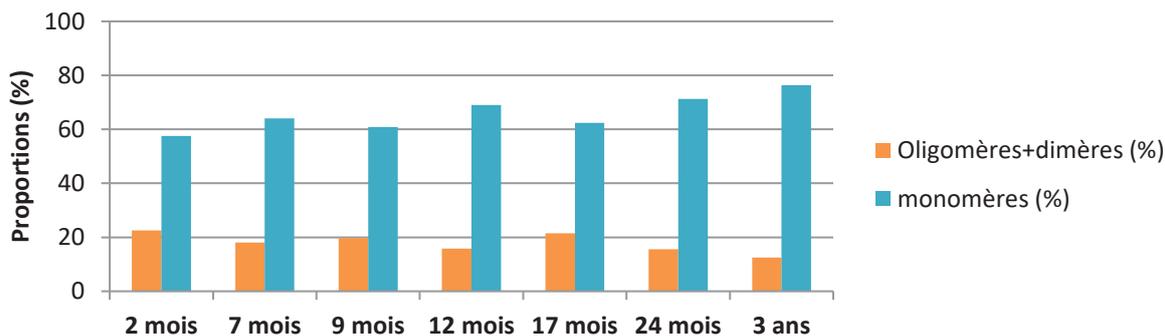
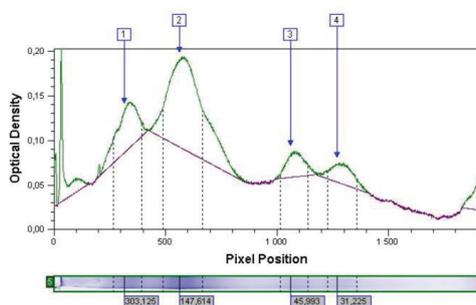
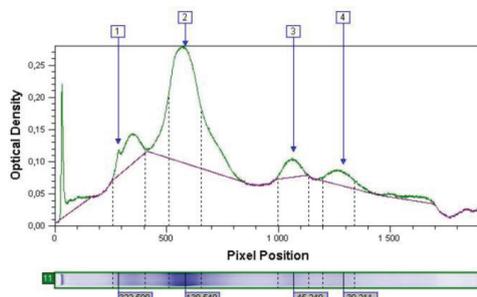


Figure 37 : Evolution des proportions des oligomères, dimères et monomères dans les différents lots de TTD âgés de 2 mois, 7 mois, 9 mois, 12 mois, 17 mois, 24 mois et 3 ans.

A T=2 mois :



A T=12 mois :



A T=3 ans :

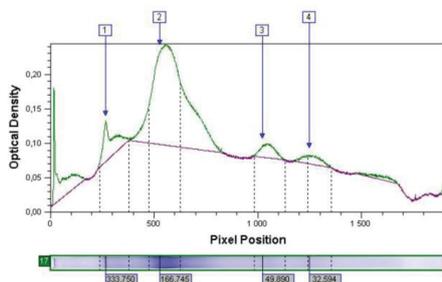


Figure 38 : Profils densitométriques de différents lots de TTD âgés de 2 mois, 12 mois et 3 ans. Le pic n°1 correspond à un potentiel oligomère, le pic n°2 à une forme monomère de la TTD, les pics n°3 et 4 à de la toxine tétanique dégradée et/ou de la chaîne légère de la TTD intacte.

3.2. Développement de la méthode LC-MS/MS pour la quantification absolue de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique

3.2.1. Sélection des peptides endogènes à doser

La première étape du développement de la méthode LC-MS/MS pour la quantification absolue de la TT et de la TTD a consisté à sélectionner les séquences des peptides de la TT à doser. Cette étape était cruciale et déterminait en grande partie la robustesse de la méthode. Les peptides devaient refléter les quantités réelles en TT dans l'échantillon. Ils devaient pour cela être spécifiques de la TT « protéospécifiques » et les plus robustes possibles [19], [26], [27]. Ils ne devaient pas contenir de cystéines (formation spontanée de ponts disulfures, carbamidométhylation possible lors de la préparation d'échantillon), de glutamine en N-ter (formation de pyroglutamate), de méthionine (oxydation), de séquences Asn-Glu ou Asp-Glu (séquences sujettes aux déamidations) et leur taille devait être comprise entre 4 et 20 AA. De surcroît, les peptides devaient impérativement être faiblement voire non impactés par le formaldéhyde pour avoir la quantification la plus exacte possible sur la TTD. Enfin, idéalement, ces derniers devaient être répartis sur l'intégralité de la protéine.

Les résultats de caractérisation obtenus lors de notre précédente investigation nous ont permis de sélectionner six peptides éligibles à la quantification. Leurs séquences primaires figurent dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Liste des peptides sélectionnés pour la quantification absolue de la TT et de la TTD

Positionnement sur la séquence de la TT	Chaîne légère (CL) ou lourde (CH) ⁽²⁾	Nom	Impact au formaldéhyde dans la TTD ⁽¹⁾	Autres formes (oxydées, déamidées) ⁽¹⁾	Nombre d'AA
1113-1126	CH	DFWGNPLR	Peptide observé avec des modifications +12 Da	/	8
1028-1043	CH	WVFITITNDR	Pas détecté impacté	Forme déamidée	10
700-713	CH	TIDNFLEK	Peptide observé avec des modifications +12 Da, et +14 Da	Formes déamidée et « <i>misscleavage</i> »	8
1159-1170	CH	LNIYYR	Peptide observé avec des modifications +12 Da	Forme « <i>misscleavage</i> » (RR)	6
327-337	CL	YQFDK	Peptide observé avec des modifications +12 Da et +30 Da	/	5
286-297	CL	NDLYEK	Peptide observé avec des modifications +12 Da	/	6

(1) Les formes modifiées au formaldéhyde ont été détectés en haute résolution lors de l'étude de caractérisation de la TTD détaillée dans le chapitre II.

(2) La TT est composée de deux chaînes : une chaîne légère de ≈ 50 kDa et une chaîne lourde de ≈ 100 kDa.

3.2.2. Synthèse des peptides étalons pour la quantification absolue de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique par LC-MS/MS

La deuxième étape du développement analytique pour la quantification absolue de la TT et de la TTD a consisté à synthétiser les peptides étalons. Ces derniers devaient posséder les mêmes séquences en acides aminés que les peptides endogènes à doser figurant dans le Tableau 7 mais alourdis avec des isotopes lourds stables ^{13}C , ^{15}N .

Les peptides étalons comprenant des isotopes lourds stables sont coûteux et souvent source de problèmes. En effet, ceux-ci doivent être, entre autres, purs, faciles à synthétiser et à solubiliser [19]. Le choix du fabricant est primordial et conditionne la qualité des peptides. Nous avons fait le choix de synthétiser les peptides étalons par la société BACHEM.

Les peptides étalons ont été synthétisés sous une forme enrichie à l'aide d'isotopes lourds stables en utilisant comme précurseur de synthèse de la lysine (K ; $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_4$) ou de l'arginine (R ; $^{13}\text{C}_6,^{15}\text{N}_2$). Les peptides étalons ont été commandés sous forme d'aliquots contenant chacun un mélange de 100 μg de poudre lyophilisée de chaque peptide étalon (Tableau 8). Les aliquots à usage unique étaient pratiques, faciles à utiliser et permettaient de s'affranchir de l'étape de pesée des peptides. Les peptides ont été commandés avec un très haut degré de qualité correspondant à une pureté HPLC supérieure à 95 %. Des analyses HPLC/UV, « *Amino Acids Analysis* » (AAA) et MALDI-MS ont été réalisées par BACHEM sur les solutions de peptides étalons avant lyophilisation afin d'évaluer la pureté en peptides et la quantité exacte de peptides et d'impuretés peptidiques « *Net Peptide Content* » (NPC) ainsi que pour confirmer les structures primaires des peptides étalons.

Nous avons fait le choix de synthétiser les peptides légèrement plus longs de 3 AA en N_{ter} et en C_{ter} afin de mimer la digestion de la protéine et de réduire les potentiels biais introduits au cours de la digestion enzymatique.

Tableau 8 : Liste des peptides étalons avec leur pureté HPLC et leur NPC respectifs

Séquence	Incrément de masse induit par les isotopes lourds stables (Da)	Quantité (µg) ⁽¹⁾	Pureté HPLC (%)	NPC (%)	Quantité exacte de peptide dans chaque aliquot (µg) ⁽²⁾
FLRDFWGNPL[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]YDT	+10	100	96.8	75.6	96.8
ANKWVFITITND[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]LSS	+10	100	90.3	76.1	90.3
IIKTIDNFLE[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]RYE	+8	100	96.7	73.4	96.7
NGKLNIIYY[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]RLY	+10	100	96.7	73.6	96.7
YQQKYQFD[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]DSN	+8	100	96.9	75.7	96.9
DIKNDLYE[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]TLN	+8	100	97	80.9	97.0

(1) Quantité qui prend en compte le NPC = quantité totale de poudre – [les quantités en eau, en trifluoroacétate (contre-ion) et en impuretés non peptidiques]

(2) Quantité calculée à partir des puretés HPLC et NPC

3.2.3. Création de la méthode LC/UV pour étudier la conformité, la stabilité et l'adsorption des peptides étalons

Pour contrôler la stabilité des poudres lyophilisées des peptides étalons stockées à -20°C, nous avons développé une méthode LC/UV. Cette dernière contrairement à la LC-MS/MS est simple, peu chère, robuste et a l'avantage d'utiliser le détecteur UV qui ne s'encrasse pas au cours du temps.

Nous avons testé la répétabilité de cette méthode LC/UV en évaluant les coefficients de variation (CV) à l'injection pour chacun des peptides. Pour ce faire, nous avons injecté trois fois une même solution de peptides étalons. Le CV moyen sur les aires des pics chromatographiques calculé pour les six peptides est seulement de 6 % indiquant une bonne répétabilité de la méthode LC/UV (Tableau 9).

Tableau 9 : Etude de la répétabilité de la méthode LC/UV. Comparaison des aires des peptides étalons issus d'un triplicat d'injection.

Séquence	Aire normalisée du réplikat n°1	Aire normalisée du réplikat n°2	Aire normalisée du réplikat n°3	CV sur les aires des peptides (%)
YQQKYQFD[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]DSN	2.51	2.38	2.31	4.3
NGKLNIIYY[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]RLY	3.09	2.68	2.80	7.4
DIKNDLYE[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]TLN	1.53	1.39	1.62	7.6
IIKTIDNFLE[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]RYE	2.10	1.83	2.15	8.6
ANKWVFITITND[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]LSS	2.31	2.17	2.27	3.2
FLRDFWGNPL[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]YDT	2.08	1.91	2.09	5.0

Avant d'évaluer la stabilité des peptides étalons, nous avons vérifié que les aliquots fournis par BACHEM étaient tous identiques. Pour cela, trois aliquots ont été pris aléatoirement parmi les cents commandés et ont été analysés en LC/UV (Tableau 10). Le CV moyen calculé sur les aires des six peptides est de 6 % entre les trois aliquots soit équivalent au CV à l'injection. Les aliquots sont par conséquent parfaitement répétables.

Tableau 10 : Etude de la répétabilité des aliquots fournis par le fabricant BACHEM. Comparaison des aires des peptides étalons de trois aliquots pris aléatoirement parmi les cent commandés.

Séquences	Aire normalisée de l'aliquot n°1	Aire normalisée de l'aliquot n°2	Aire normalisée de l'aliquot n°3	CV sur les aires des peptides entre les différents aliquots (%)
YQQKYQFD[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]DSN	2.71	2.72	2.47	5.4
NGKLNIIYY[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]RLY	3.05	3.01	2.97	1.3
DIKNDLYE[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]TLN	1.78	1.62	1.56	7.0
IIKTIDNFLE[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]RYE	2.18	2.23	2.00	5.6
ANKWVFITIND[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]LSS	2.46	2.55	2.32	4.8
FLRDFWGNPL[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]YDT	2.29	2.35	2.09	6.0

Après avoir vérifié la conformité des aliquots, nous avons évalué la stabilité des poudres lyophilisées des peptides à -20°C. Trois aliquots différents ont été utilisés pour réaliser cette étude. Les peptides ont été injectés à T0, à T+1 mois et à T+3 mois. Les peptides étalons sous forme de poudre lyophilisée sont stables au congélateur pendant au moins 3 mois (Figure 39).

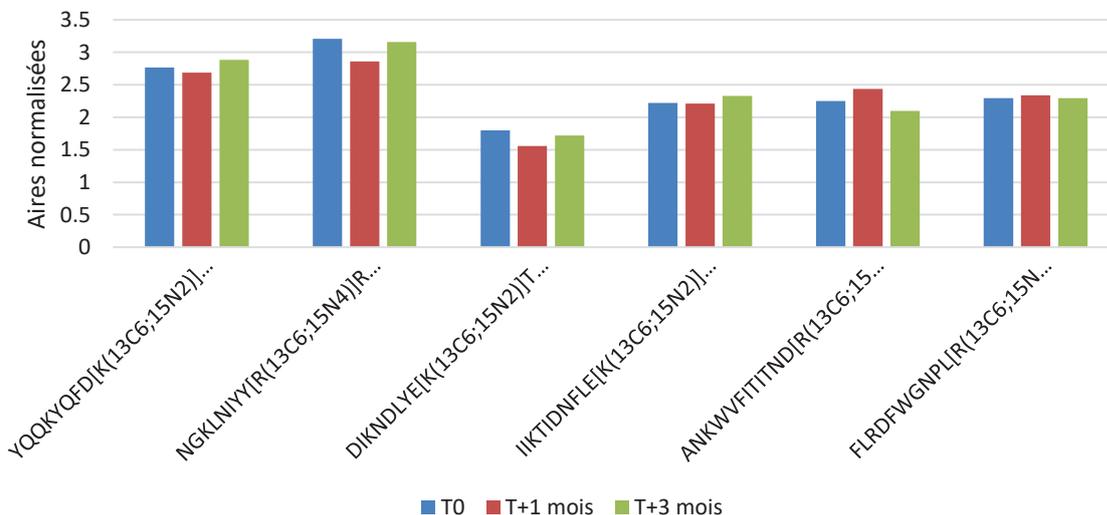


Figure 39 : Etude de la stabilité des poudres lyophilisées des peptides étalons au congélateur (-20°C) sur une période de 3 mois.

Nous avons également étudié la stabilité des peptides en solution à +5°C pour voir au bout de combien de temps l'aliquot était stable et utilisable pour la quantification absolue de la TT et de la TTD. Pour ce faire, nous avons injecté un seul aliquot conservé à +5°C pendant 7 jours. Nous avons constaté qu'après trois jours, seuls les peptides ANKWVFITITNDR(¹³C,¹⁵N)LSS et NGKLNIIYY[R(¹³C₆,¹⁵N₄)]RLY s'adsorbaient ou se dégradait. L'aliquot est donc stable et utilisable pendant trois jours à +5°C au maximum (Figure 40).

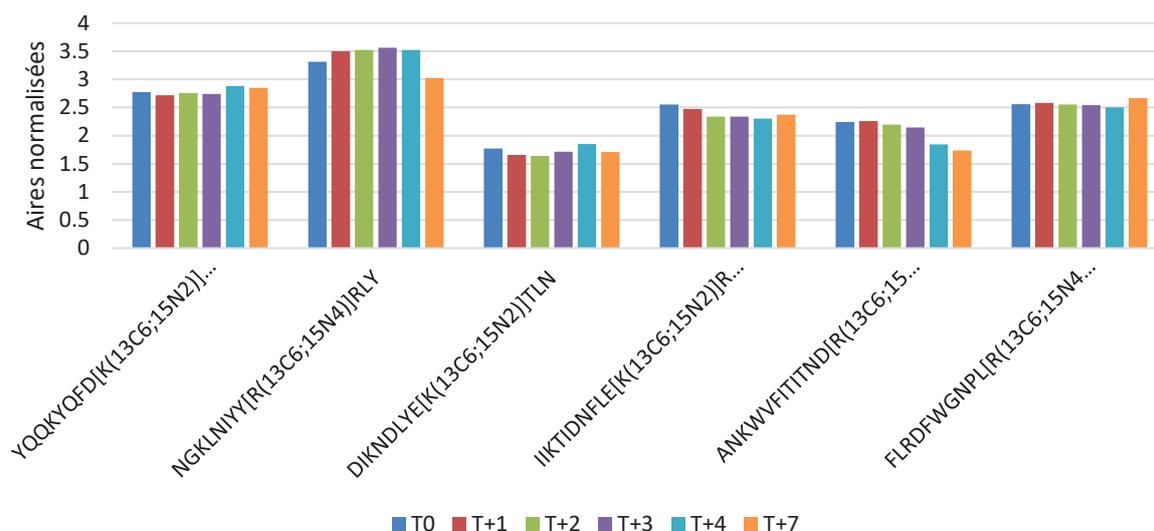


Figure 40 : Etude de la stabilité des solutions de peptides étalons conservées au réfrigérateur (+5°C) sur une période de 7 jours.

Pour réduire les biais lors de la quantification absolue de la TT et de la TTD, il était important de limiter au maximum les phénomènes d'adsorption des peptides étalons. Deux paramètres ont été étudiés : la nature du contenant et du solvant (Figure 41). Les peptides ont été mis en contact deux heures dans le solvant/contenant avant analyse LC/UV. Les peptides étalons ne semblent s'adsorber ni sur le verre ni sur le plastique.

Par ailleurs, le solvant préférentiel de dissolution des peptides est le mélange H₂O/MeOH/AF (90/10/0,5 v/v/v). En effet, l'augmentation de la quantité de phase organique au-delà de 10% ne permet pas de dissoudre correctement les poudres des peptides étalons lyophilisées.

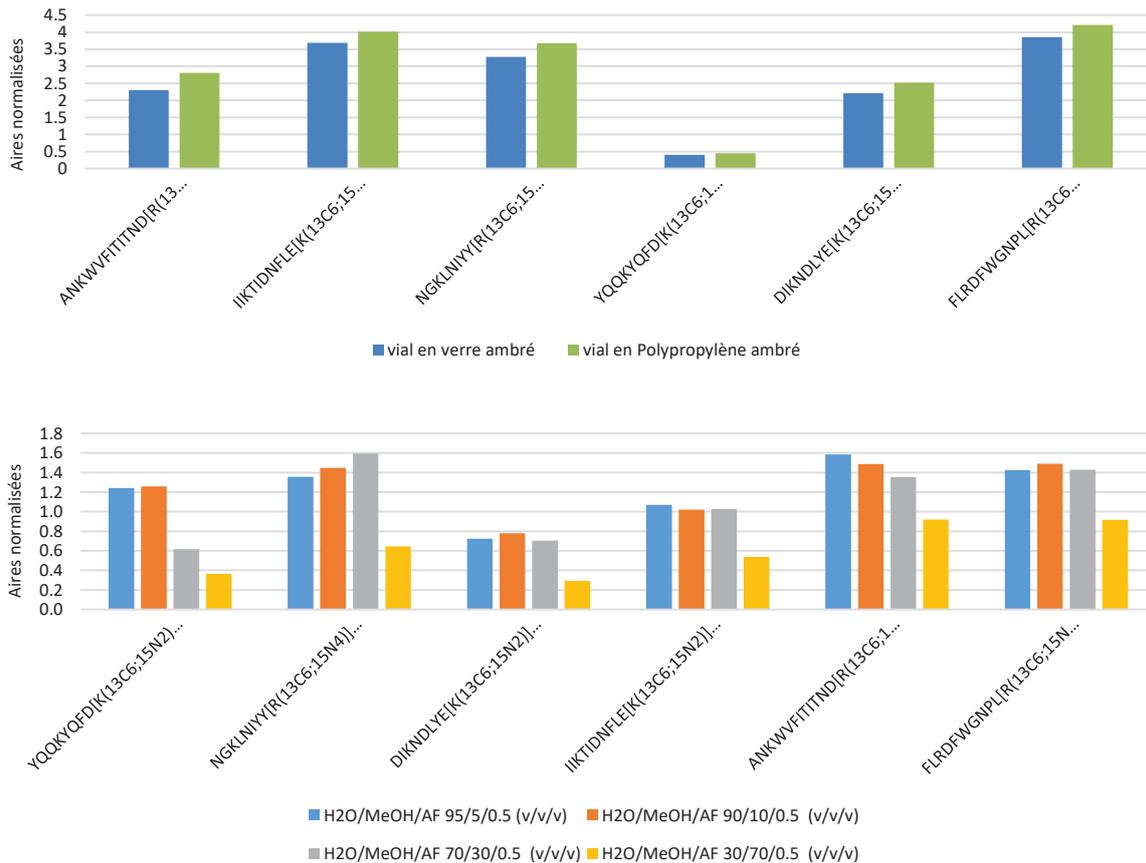


Figure 41 : Etude de la nature du contenant et du solvant sur l'adsorption des peptides étalons.

3.2.4. Détermination des transitions suivies pour la quantification absolue

Lors de notre précédente étude, nous avons mis au point une méthode LC-MS/MS de quantification relative de peptides de la TT non modifiés et modifiés au formaldéhyde. Cette méthode permet de quantifier les six peptides endogènes à doser mais ne cible pas les peptides étalons. C'est pourquoi ces derniers ont été intégrés dans la méthode MS avec les mêmes types de transitions et paramètres MS que les peptides endogènes. La méthode MS finale permet de doser sur les six peptides avec au moins trois transitions par peptide (annexe n°3).

Pour rappel, nous avons fait le choix de synthétiser les peptides étalons légèrement plus longs de 3 AA en N_{ter} et en C_{ter} afin de mimer la digestion de la protéine et de réduire les potentiels biais introduits au cours de la digestion enzymatique.

Afin de vérifier que tous les peptides étalons étaient complètement digérés en N-ter et en C-ter, nous avons introduit dans la méthode MS finale les formes des peptides étalons non

clivés et semi-clivés en N-ter et C-ter. Pour ce faire, les séquences des peptides ont été intégrées dans le logiciel Skyline. Celui-ci a permis de générer la liste théorique des transitions. Nous avons sélectionné et suivi 10 transitions/peptide en mode MRM et seules 3-4 transitions les plus intenses ont été conservées pour chaque peptide et intégrées dans la méthode MS finale.

3.2.5. Optimisation du protocole de digestion enzymatique pour la quantification absolue de la TT et de la TTD

Les échantillons protéiques ont été préalablement digérés par la trypsine avant analyse LC-MS/MS. Les peptides étalons ont été introduits à une concentration connue avant l'étape de digestion enzymatique afin de réaliser la quantification de la TT et de la TTD.

Afin d'obtenir la quantification absolue la plus exacte possible, il était nécessaire d'optimiser la digestion enzymatique de la TT et de la TTD pour s'assurer de complètement digérer la TT et la TTD.

En premier lieu, la quantité de l'enzyme et le temps d'hydrolyse tryptique ont été optimisés. Puis, les étapes de dénaturation thermique et/ou chimique et de réduction/alkylation des cystéines ont été investiguées. Enfin, l'ajout d'un agent « *quencher* » de formaldéhyde dans le protocole de préparation d'échantillon a été testé sur la TTD. En effet, dans les lots de TTD, il restait une quantité de formaldéhyde résiduel issu de la détoxification. Le formaldéhyde pouvait modifier la trypsine utilisée dans le protocole enzymatique ainsi que les peptides étalons. L'ajout de « *quencher* » tels que le PFBHA ou le TRIS pouvait inhiber la réactivité du formaldéhyde.

Les résultats d'optimisation du protocole sont similaires pour la TT et la TTD (Figure 42 et Figure 43). Le ratio $m_{\text{enzyme}}/m_{\text{protéine}}$ optimal est le ratio 2/1 dans la mesure où il permet d'obtenir le meilleur rendement de digestion pour la protéine et les peptides étalons. En deçà de ce ratio, les peptides étalons ne se digèrent pas correctement et surdosent les concentrations calculées en TT et TTD. Un temps de digestion de 20 heures est optimal pour hydrolyser la TT et la TTD.

Par ailleurs, la dénaturation thermique (5 min, 100°C) est indispensable pour correctement déplier la protéine et rendre accessible les sites de clivage enzymatique. Sans

elle, la trypsine n'agit pas correctement et biaise les résultats de dosage. La dénaturation chimique (ajout de DOC 5% m/v) est recommandée pour améliorer la digestion trypsique de certains peptides (ex : YQFDK).

Les étapes de réduction/alkylation des cystéines et l'ajout de « *quencher* » à l'instar du PFBHA et du TRIS ne sont pas indispensables et ne permettent pas d'améliorer le rendement d'hydrolyse enzymatique. Néanmoins, les lots industriels de TTD possèdent différentes concentrations en formaldéhyde résiduel. C'est pourquoi, afin d'augmenter la robustesse du protocole, l'ajout de PFBHA a été conservé dans le protocole de digestion final.

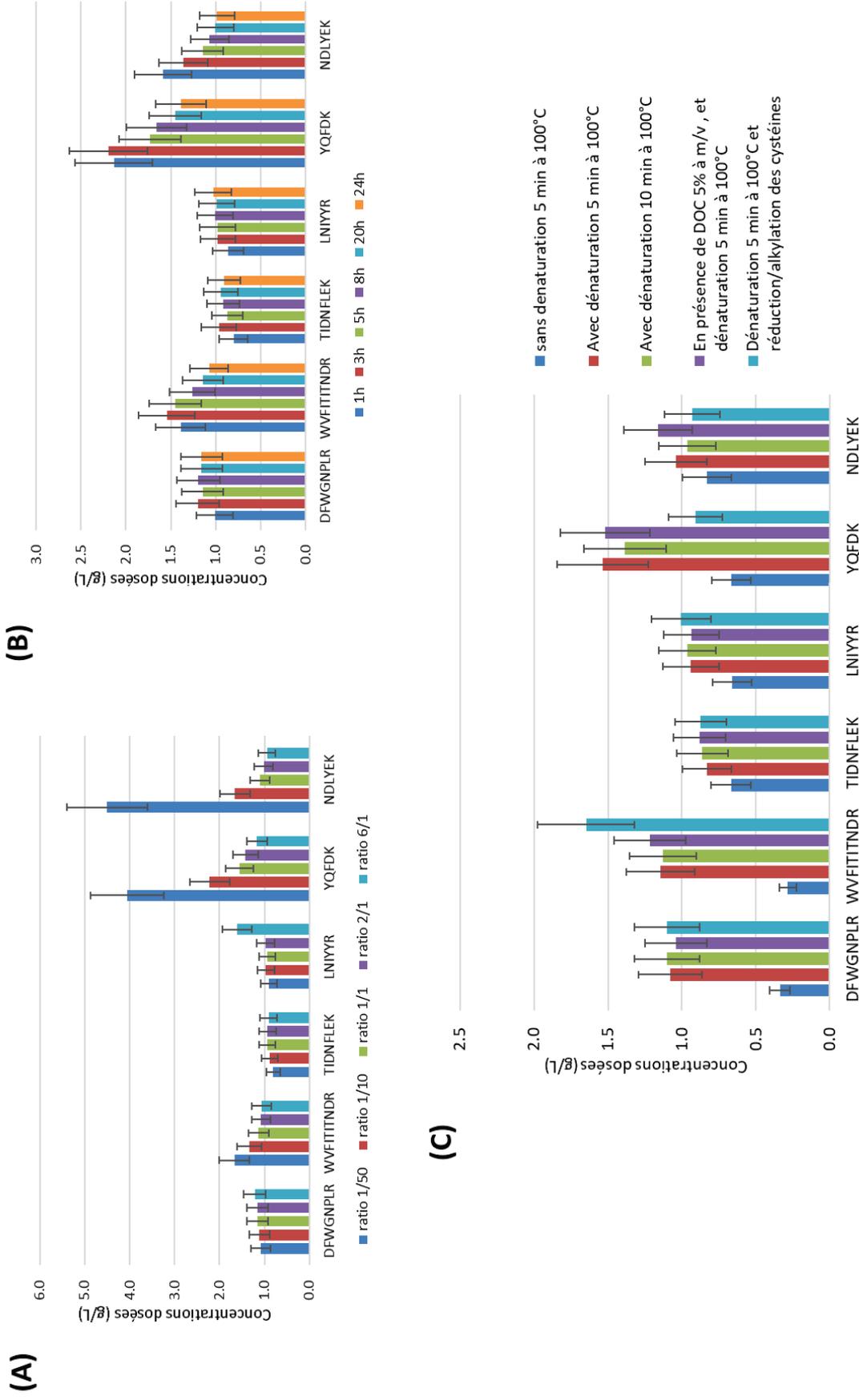


Figure 42 : (A) Etude de l'influence de la quantité (ratio $m_{enzyme}/m_{protéine}$), (B) de la cinétique d'enzyme et (C) des étapes de dénaturation thermique et/ou chimique (DOC 5% m/v), de réduction/alkylation des cystéines sur le dosage de la TT de la branche ATP. Les barres d'erreurs correspondent aux déviations standards des triplicats.

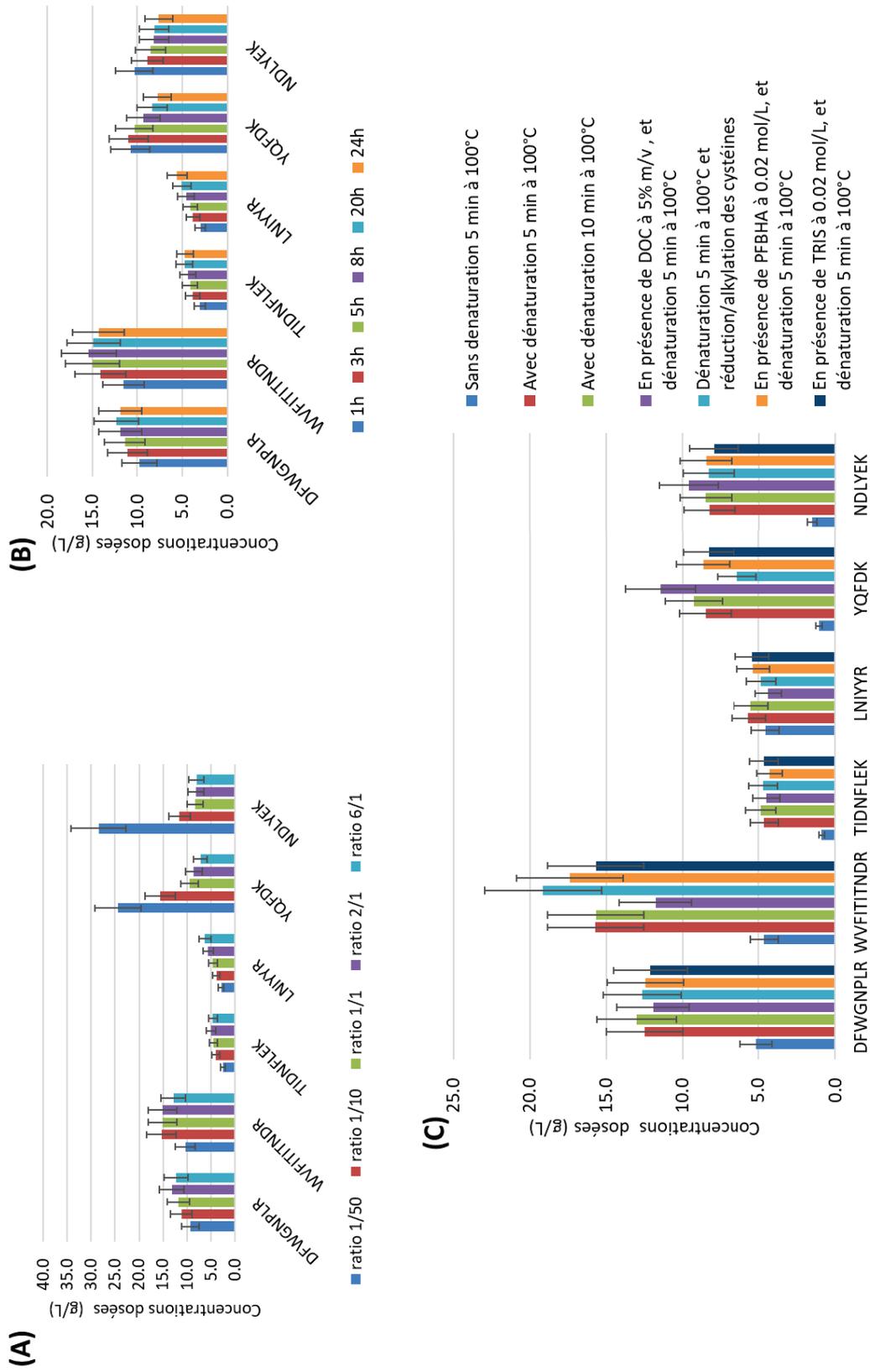


Figure 43 : Etude de l'influence de la (A) quantité (ratio $m_{enzyme}/m_{protéine}$), de la (B) cinétique d'enzyme, (C) des étapes de dénaturation thermique et/ou chimique (DOC 5% m/v), de réduction/alkylation des cystéines et de l'ajout de quencher TRIS/PFBHA sur le dosage de la TTD de la branche ATP. Les barres d'erreurs correspondent aux déviations standards des triplicats.

Après avoir optimisé le protocole de digestion de la TT et de la TTD, nous avons évalué les rendements de digestion des peptides étalons dans différents types de matrices, sans ou en présence de TT ou de TTD, avec la formule suivante :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{Aire de la forme clivée du peptide étalon}}{\text{Somme des aires de toutes les formes du peptide étalon clivée, semi-clivée et non clivée}} \times 100$$

Les rendements de digestion des peptides endogènes n'ont pas pu être calculés avec cette formule puisque les formes non clivées des peptides endogènes étaient trop lourdes ($M_w > 4000$ Da) pour pouvoir être ciblées et analysées par LC-MS/MS.

Expérimentalement, nous avons constaté que les rendements de digestion des peptides étalons étaient équivalents entre les différentes matrices. Étonnamment, les peptides étalons ne se digèrent pas à 100 % avec le protocole de digestion optimisé (Figure 44). Nous avons supposé que les rendements de digestion des peptides étalons étaient les mêmes que ceux des peptides endogènes dans la mesure où les peptides étalons possèdent les mêmes séquences en acides aminés que les peptides endogènes. Le fait d'avoir synthétisé les peptides étalons allongés de trois acides aminés résiduels en N-ter et en C-ter a été judicieux puisqu'il nous a permis de s'affranchir des biais induits par la digestion (Figure 44 et Figure 42).

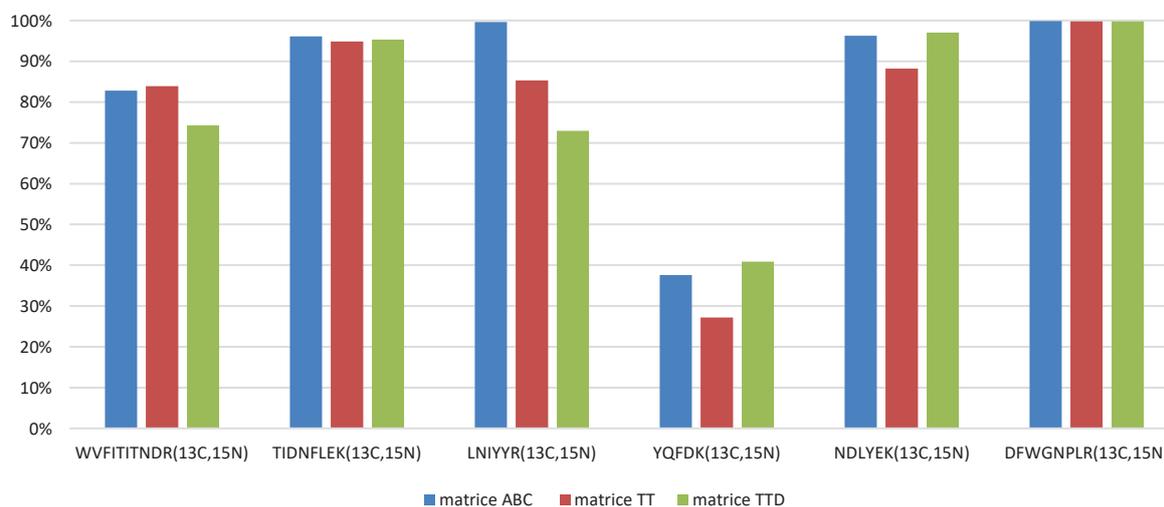


Figure 44 : Rendements de digestion des peptides étalons. Ces rendements ont été calculés dans la matrice bicarbonate d'ammonium (ABC) sans présence de TT et de TTD (en bleu) et dans les matrices TT et TTD (en rouge et vert).

3.2.6. Pré-évaluation de la répétabilité et de la linéarité de la méthode LC-MS/MS pour la quantification absolue de la TT et de la TTD

Comme évoqué précédemment, le processus analytique comprenant le protocole de digestion et la méthode LC-MS/MS a été développé et optimisé pour obtenir la quantification la plus exacte possible sur la TT et sur la TTD de la branche ATP. Dans cette partie, la linéarité et la répétabilité de la méthode ont été pré-évaluées.

La répétabilité a été déterminée par la mesure du coefficient de variation (CV) de l'aire mesurée entre trois triplicats de digestion de TT et de TTD. La méthode s'est avérée être répétable sur la TT et sur la TTD de la branche ATP puisque le CV moyen des peptides est seulement de 4 % dans les deux types de matrices (Tableau 11).

La concentration en peptides étalons dans le protocole final de digestion est de 150 ng/mL. C'est pourquoi le domaine de linéarité de la méthode a été étudié entre 0 et 1000 ng/mL en réalisant quatre points de gamme : 0, 50, 100, 200 et 1000 ng/mL. Chaque point de concentration a été réalisé en duplicat et a permis de calculer des CV et des exactitudes (exactitude = Concentration calculée par la droite/concentration nominale des peptides étalons x 100). La méthode est parfaitement linéaire entre 0 et 1000 ng/mL dans les deux matrices TT et TTD puisque les R^2 des droites de linéarité de chacun des peptides sont supérieurs à 0,99 (Tableau 12 et Tableau 13, Figure 45 et Figure 46) et que les exactitudes sont comprises entre 80 et 120 %.

Tableau 11 : Etude de la répétabilité de la méthode LC-MS/MS : les coefficients de variation (CV) intra jours, mono opérateur calculés sur les aires des peptides endogènes dans les deux types de matrices : TT et TTD de la branche ATP.

Séquence des peptides	TT	TTD
	CV (%)	CV (%)
DFWGNPLR	6%	4%
WVFITITNDR	4%	0%
TIDNFLEK	5%	3%
LNIYYR	4%	5%
YQFDK	4%	3%
NDLYEK	2%	2%

Tableau 12 représentant les exactitudes et les précisions sur les concentrations calculées à partir de la droite de linéarité réalisée sur la TT de la branche ATP

Concentration nominale (ng/mL)	DFWGNPL[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]	WVFITND[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]	TIDNFLE[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]	LNIYY[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]	YQFD[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]	NDLYE[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]						
	Exactitude (%)	CV (%)	Exactitude (%)	CV (%)	Exactitude (%)	CV (%)	Exactitude (%)	CV (%)	Exactitude (%)	CV (%)	Exactitude (%)	CV (%)
50	99%	3%	78%	10%	103%	6%	88%	7%	102%	7%	106%	1%
100	105%	5%	110%	2%	104%	1%	104%	3%	101%	5%	102%	4%
200	102%	6%	118%	6%	96%	4%	102%	2%	102%	9%	100%	1%
1000	100%	6%	99%	2%	100%	4%	100%	0%	100%	6%	100%	5%

Tableau 13 représentant les exactitudes et les précisions sur les concentrations calculées à partir de la droite de linéarité réalisée sur la TTD de la branche ATP

Concentration nominale (ng/mL)	DFWGNPL[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]	WVFITND[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]	TIDNFLE[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]	LNIYY[R(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄)]	YQFD[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]	NDLYE[K(¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂)]						
	Exactitude (%)	CV (%)	Exactitude (%)	CV (%)	Exactitude (%)	CV (%)	Exactitude (%)	CV (%)	Exactitude (%)	CV (%)	Exactitude (%)	CV (%)
50	100%	0%	72%	4%	101%	1%	92%	1%	107%	6%	104%	5%
100	96%	4%	113%	1%	97%	1%	104%	3%	97%	13%	100%	7%
200	102%	3%	119%	4%	100%	3%	102%	4%	103%	6%	103%	1%
1000	100%	6%	99%	2%	100%	8%	100%	0%	100%	2%	100%	2%

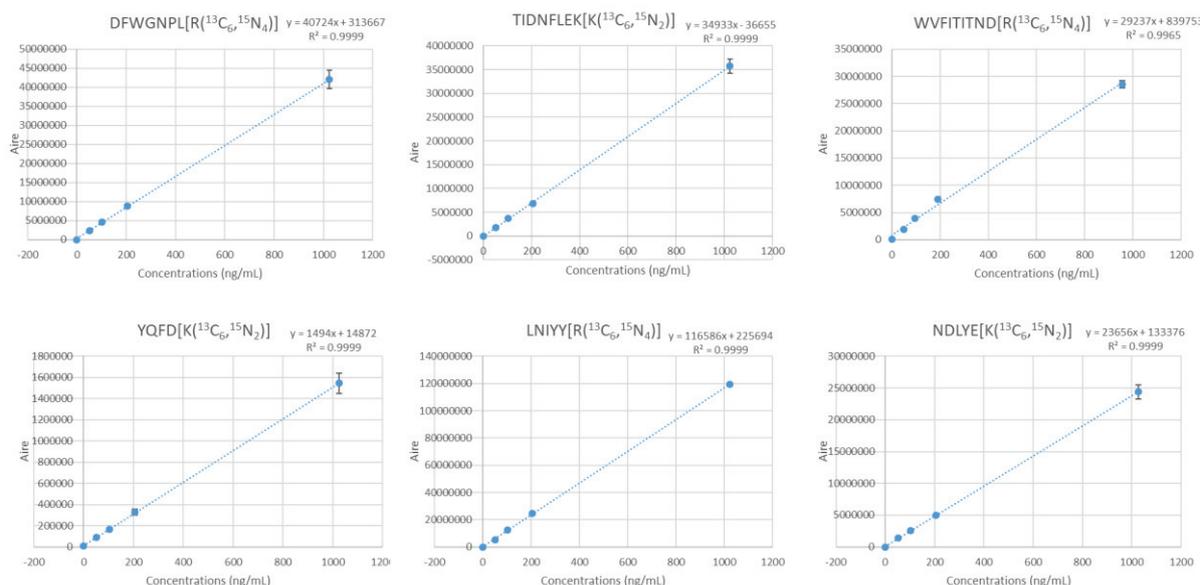


Figure 45 : Etude de la linéarité entre 0 et 1000 ng/mL de la méthode LC-MS/MS sur la TT de la branche ATP.

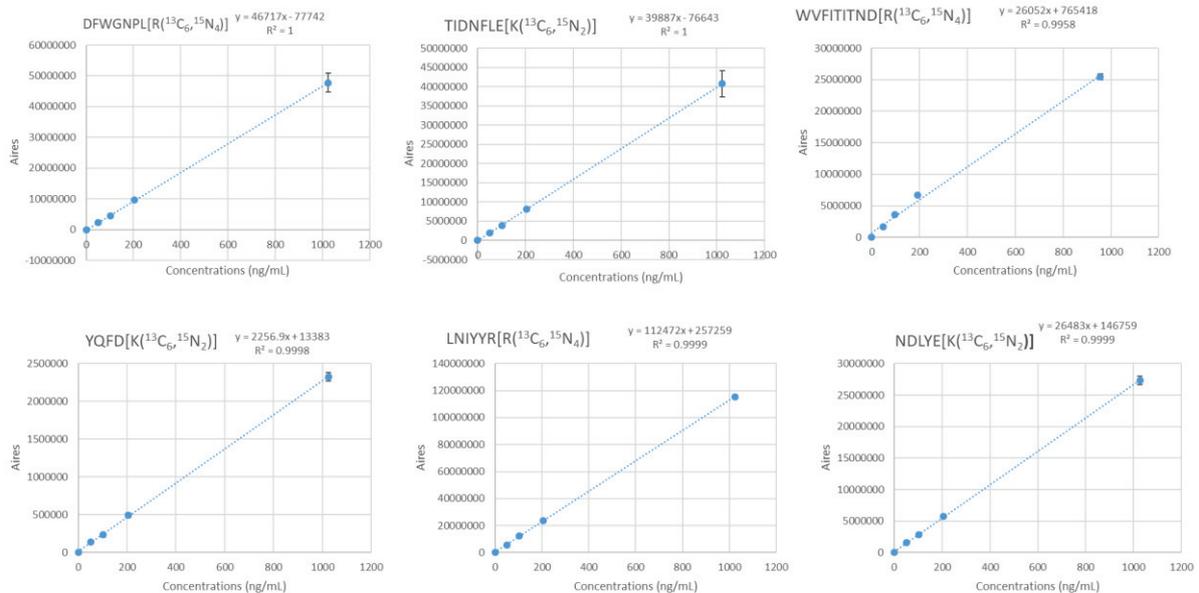


Figure 46 : Etude de la linéarité entre 0 et 1000 ng/mL de la méthode LC-MS/MS sur la TTD de la branche ATP

3.2.7. Estimation de la pureté en TT et quantification absolue de la TT et de la TTD dans des lots industriels de vaccins issus des procédés ATP et PTC

3.2.7.1. Dosage des lots de TT

Après avoir développé et optimisé la méthode LC-MS/MS pour la quantification absolue de la TT et de la TTD, celle-ci a été appliquée pour doser différents lots industriels de TT et de TTD issus des branches ATP et PTC. Nous avons d'abord quantifié trois lots différents de TT à savoir : un lot de TT de la branche ATP et deux lots de TT de la branche PTC.

Pour rappel, selon la méthodologie de dilution isotopique (AQUA), pour chaque peptide, la concentration en TT a été calculée avec la formule suivante:

$$\text{Concentration en toxine tétanique (mol/L)} = \frac{\text{aire du peptide endogène} \times \text{concentration finale en peptide étalon (mol/L)}}{\text{aire du peptide étalon}} \times F$$

Où : F égal à 12,6 est le facteur de dilution induit par le protocole d'hydrolyse enzymatique.

En premier lieu, nous avons comparé deux TT produites avec les branches industrielles PTC et ATP. Les ratios des concentrations des six peptides pour les TT issus des deux types de procédés sont similaires (Figure 47). Les concentrations calculées avec les quatre peptides DFWGNPLR, WVFITITNDR, YQFDK, NDLYEK dans les lots de TT (n° FA582687 et FA580140) sont

équivalentes. Étonnamment, les peptides TIDNFLEK et LNIYYR sous-dosent légèrement dans ces lots. Ces deux peptides peuvent être potentiellement impactés par des phénomènes de « *misscleavages* » (oublis de coupure par la trypsine) puisqu'ils comportent des séquences de type KR et RR, connues pour être difficiles à cliver par la trypsine. Lors de leur sélection pour le développement de la méthode LC-MS/MS, leur formes « *misscleavées* » avaient probablement été sous-évaluées. Des facteurs correctifs tels que les écarts à la moyenne calculés avec la formule : $\text{Ecart à la moyenne} = (\text{concentration du peptide} \times \text{moyenne}) / \text{moyenne} \times 100$ peuvent être utilisés pour corriger ce problème de sous-dosage.

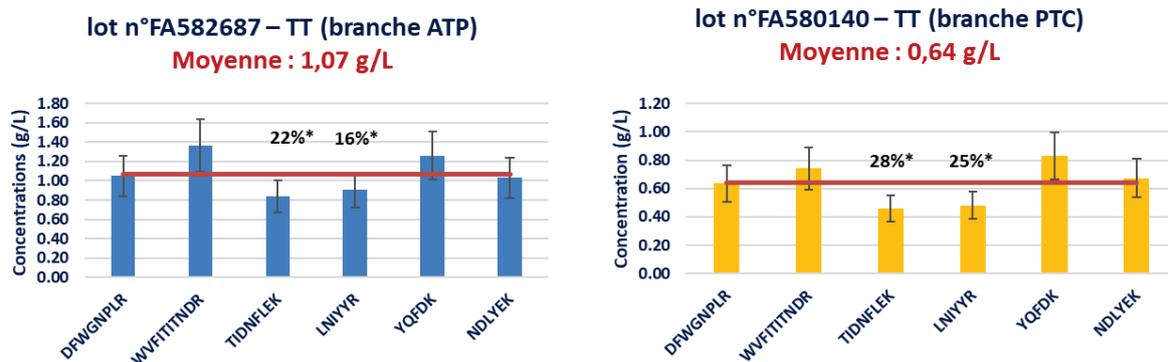


Figure 47 : Dosage des lots de TT des deux branches ATP et PTC avec la méthode LC-MS/MS. Le symbole * indique les écarts à la moyenne.

L'étude comparative de deux lots de TT (n° FA580140 et n°FA632908) issus d'une même branche industrielle PTC a démontré une bonne reproductibilité du procédé de fabrication PTC puisque les quantités en TT entre les deux lots de TT étaient similaires (Figure 48).

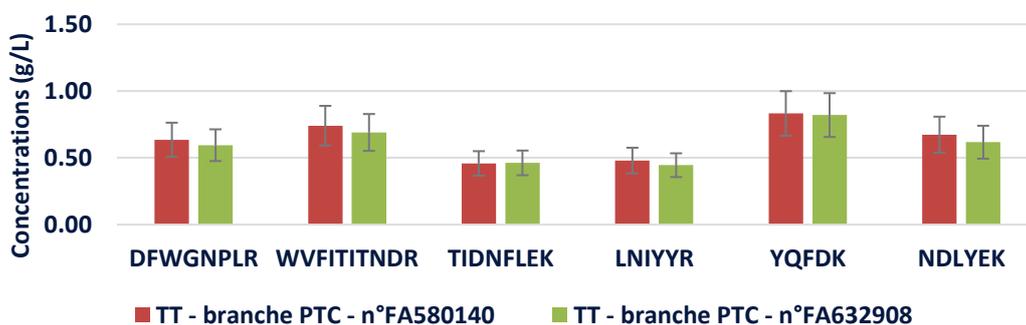


Figure 48 : Dosage de deux lots différents de TT de la branche PTC. Les concentrations calculées pour les six peptides sont identiques entre les deux lots. Les lots de TT de la branche PTC sont par conséquent répétables.

Comme nous pouvons le constater Figure 47, quatre peptides dosent environ exactement une même concentration en TT pour les deux branches industrielles ATP et PTC. Ces quatre peptides sont jugés suffisants pour quantifier la TT dans la mesure où en moyenne, dans la littérature, deux peptides sont utilisés pour la quantification absolue d'une protéine donnée [15], [27], [28].

Pour aller encore plus loin dans l'utilisation de la méthode LC-MS/MS, nous avons exploité les résultats de dosage issus des analyses LC-MS/MS pour déterminer des puretés en TT dans les lots industriels (Tableau 14). En prenant en considération les concentrations en protéines totales déterminées par colorimétrie ainsi que les concentrations spécifiques en TT évaluées par la méthode LC-MS/MS, nous avons pu calculer des puretés en TT avec la formule suivante, où le facteur de Jones est égal à 6,25 :

$$\text{« Pureté LC-MS/MS »} = \frac{\text{Concentration évaluée par le dosage LC-MS/MS}}{\text{dosage en protéines totales (dosage en azote protéique par colorimétrie x Facteur de Jones)}} \times 100$$

L'étude de la pureté de la TT dans les différents lots industriels a montré que le lot de TT de la branche ATP était environ trois fois moins pur que la TT produite avec le procédé PTC. Ce résultat est cohérent puisque le procédé PTC comporte beaucoup plus d'étapes de purification que le procédé ATP.

Les « puretés LC-MS/MS » ont pu être comparées avec les puretés antigéniques des lots. Pour comparer ces deux types de puretés, nous avons calculé les écarts à la moyenne des puretés antigéniques et LC-MS/MS. Cette étude comparative a montré que les puretés antigéniques étaient semblables aux puretés calculées avec la méthode LC-MS/MS (Figure 49).

$$\text{Ecart à la moyenne de la pureté antigénique} = \frac{\text{Pureté antigénique du lot} - \text{moyenne des puretés antigéniques des lots}}{\text{moyenne des puretés antigéniques des lots}} \times 100$$

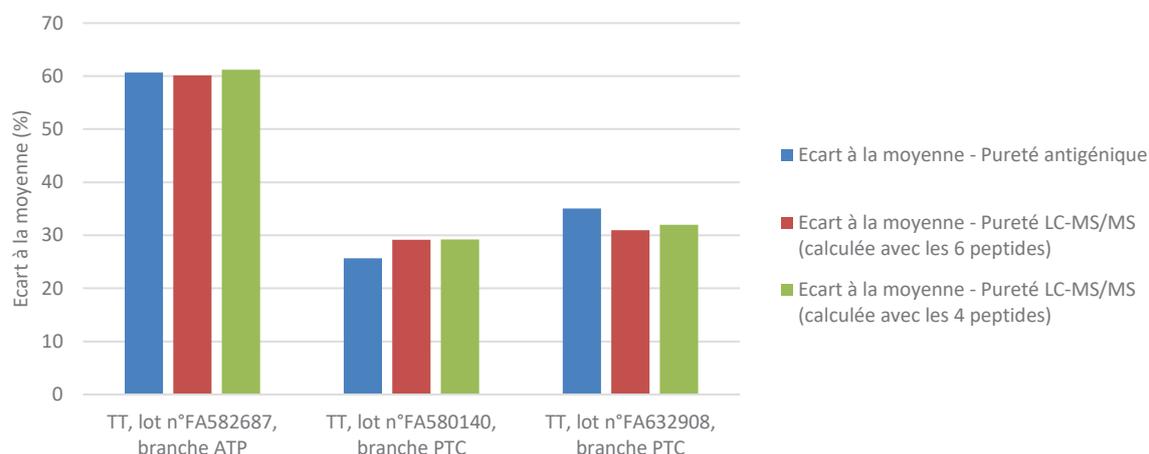


Figure 49 : Comparaison des écarts à la moyenne des puretés antigéniques (Lf/mg d'azote protéique) et des puretés calculées avec la méthode LC-MS/MS (g/L) des lots de TT des branches ATP et PTC.

Tableau 14 : Comparaison des dosages des lots de TT des deux branches ATP et PTC par colorimétrie et par la méthode LC-MS/MS et estimation de la pureté en TT dans les différents lots.

Lots de TT	Branche industrielle	Dosage en azote protéique par colorimétrie en g/L	Dosage en protéines (g/L)	Concentration en Lf/mL	Pureté antigénique (Lf/mg azote protéique)	Dosage méthode LC-MS/MS avec les 6 peptides (g/L)	Dosage méthode LC-MS/MS avec les 4 peptides (g/L)	Pureté LC-MS/MS (%) (calculées avec les 6 peptides)	Pureté LC-MS/MS (%) (calculées avec les 4 peptides)
n°FA582687	ATP	0,7	4,3	450	643	1,1	1,2	24,7	27,0
n°FA580140	PTC	0,1	0,8	270	2056	0,6	0,7	80,0	90,0
n°FA632908	PTC	0,1	0,7	270	2209	0,6	0,7	81,1	91,9

3.2.7.2. Dosage des lots de TTD des branches industrielles ATP et PTC

Après avoir dosé des lots de TT avec la méthode LC-MS/MS, nous avons réalisé la quantification absolue de 11 lots industriels de TTD (Tableau 15).

Les remarques qui avaient été faites sur le dosage de la TT étaient les mêmes que pour le dosage des lots de TTD des deux branches ATP et PTC. En effet, les quatre peptides WVFITITNDR, DFWGNPLR, YQFDK, NDLYEK dosent pratiquement la même concentration en TT (Figure 50). Les deux peptides TIDNFLEK et LNIYYR sous-dosent. Ce phénomène de sous-dosage est bien plus important dans les lots de TTD que dans les lots de TT et peut s'expliquer par l'impact du formaldéhyde sur ces deux peptides. Lors de leur sélection pour le développement de la méthode, leur forme chimiquement modifiée au formaldéhyde avait probablement été sous-évaluée. Tout comme pour la TT, des facteurs correctifs tels que les écarts à la moyenne peuvent être utilisés pour corriger ce problème de sous-dosage.

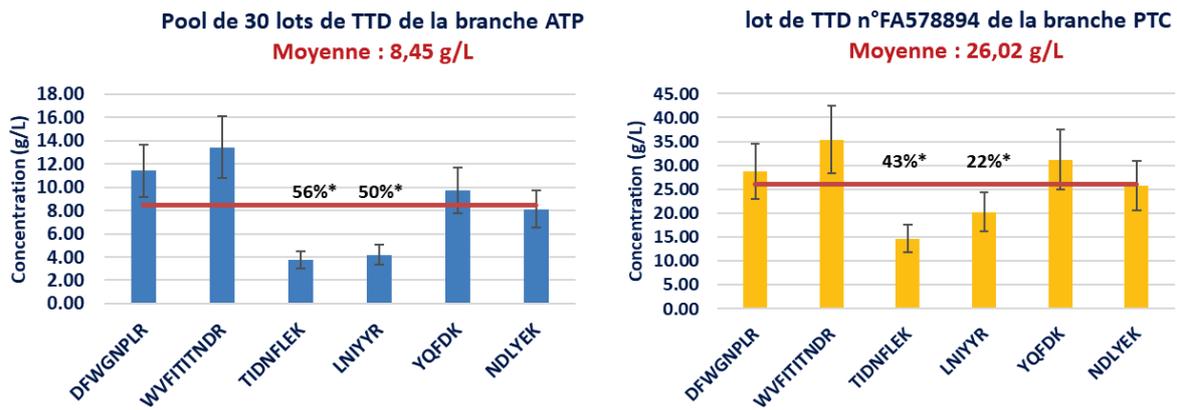


Figure 50 : Dosage des lots de TTD des deux branches ATP et PTC avec la méthode LC-MS/MS. Le symbole * indique les écarts à la moyenne.

L'étude comparative des lots de TTD de la branche industrielle ATP a démontré une bonne reproductibilité du procédé de fabrication ATP puisque les quantités en TT calculées avec les six peptides entre les différents lots étaient similaires (Figure 51).

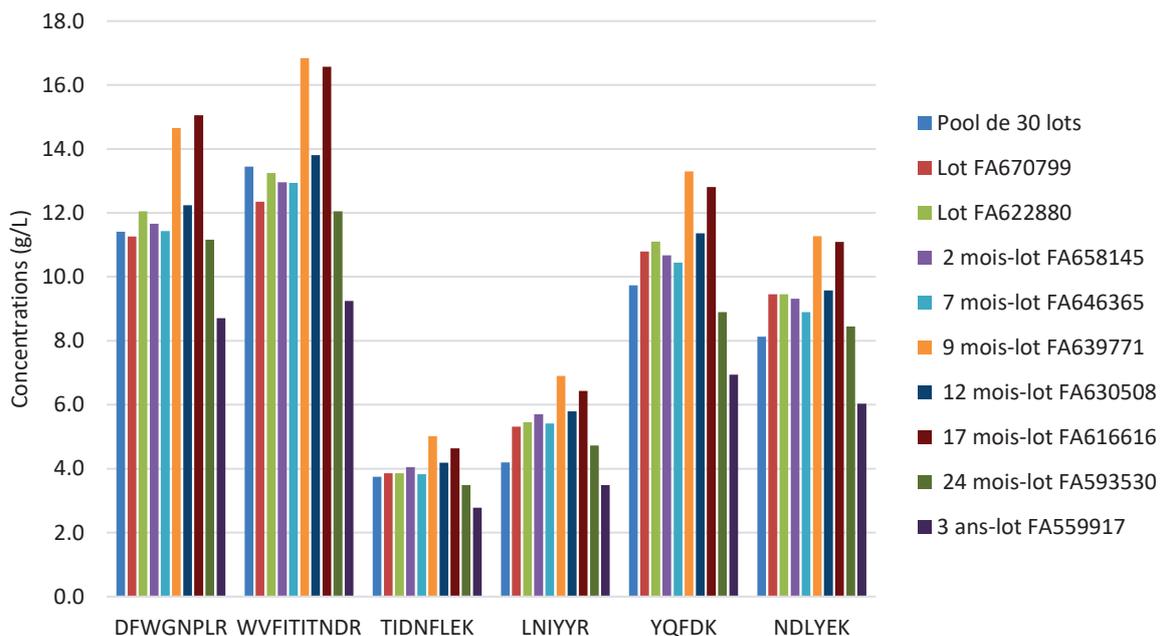


Figure 51 : Dosage de différents lots industriels de TTD issus de la branche ATP.

Seule la méthode LC-MS/MS permet aujourd'hui de doser spécifiquement la concentration absolue en g/L en TTD. C'est pourquoi nous n'avons pas pu comparer les résultats de dosage LC-MS/MS avec les méthodes de quantification existantes. Tout comme pour le dosage des lots de TT, nous sommes néanmoins confiants dans le dosage LC-MS/MS puisqu'au moins quatre peptides dosent une même concentration en TTD.

Tout comme pour la TT, nous avons exploité les résultats de dosage issus des analyses LC-MS/MS pour déterminer des puretés en TTD.

$$\text{« Pureté LC-MS/MS »} = \frac{\text{Concentration évaluée par le dosage LC-MS/MS}}{\text{dosage en protéines totales (dosage en azote protéique par Kjeldahl x Facteur de Jones)}} \times 100$$

L'étude de la pureté des lots de TTD a montré que la TTD de la branche ATP était environ deux à trois fois moins pure que la TTD produite avec le procédé PTC. Cela est cohérent puisque que le procédé PTC comporte beaucoup plus d'étapes de purification que le procédé ATP.

Comme pour les lots de TT, nous avons comparé les puretés antigéniques des échantillons de TTD avec les puretés calculées avec la méthode LC-MS/MS. Contrairement aux lots de TT, la corrélation entre les deux types de puretés n'est pas vérifiée au stade TTD (Figure 52). Les puretés antigéniques seraient potentiellement impactées par le formaldéhyde.

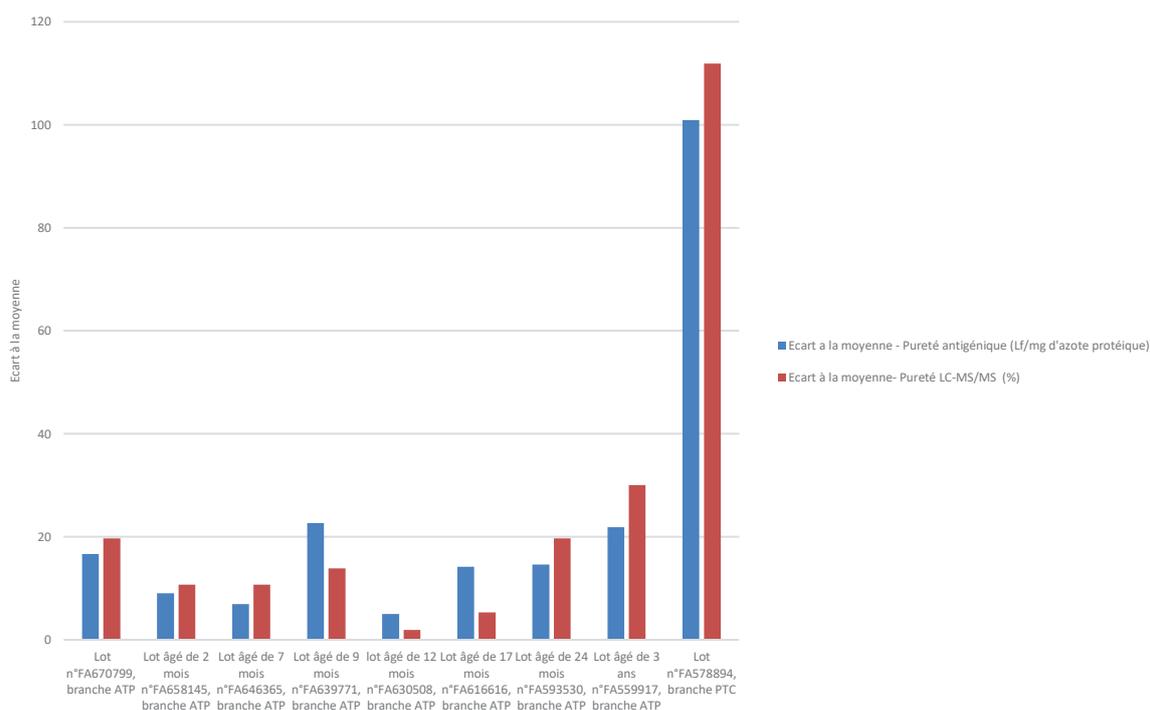


Figure 52 : Comparaison des écarts à la moyenne des puretés antigéniques (Lf/mg d'azote protéique) et des puretés calculées avec la méthode LC-MS/MS (%) des lots de TTD des branche ATP et PTC.

Tableau 15 : Comparaison des dosages Bradford, Kjeldahl et LC-MS/MS des lots de TTD et estimation de la pureté en TTD dans les différents lots.

Lots de TTD	Branche industrielle	Dosage en azote protéique par la méthode Kjeldahl en g/L	Concentration en Lf/mL	Pureté antigénique (Lf/mg d'azote protéique)	Protéines totales (Bradford) (g/L)	Dosage en protéines totales (g/L)	Dosage méthode LC-MS/MS (g/L) ⁽¹⁾	Pureté LC-MS/MS (%)
Mélange de 30 lots	ATP	/	/	/	18,8	/	10,7	/
n°FA670799	ATP	4,97	4750	956	/	30,7	11,0	35,7
n°FA622880	ATP	NR	4750	1029	/	/	11,5	/
n° FA658145 âgé de 2 mois	ATP	4,5	4750	1043	21	28,1	11,1	39,7
n° FA646365 âgé de 7 mois	ATP	4,4	4750	1067	19,3	27,5	10,9	39,7
n°FA639771 âgé de 9 mois	ATP	5,9	5250	887	29,6	36,6	14,0	38,3
n° FA630508 âgé de 12 mois	ATP	4,4	5250	1204	19,9	26,9	11,7	43,6
n° FA616616 âgé de 17 mois	ATP	5,3	5250	984	21,5	33,0	13,9	42,1
n° FA593530 âgé de 24 mois	ATP	4,6	4500	979	/	28,4	10,1	35,7
n°FA559917 âgé de 3 ans	ATP	4,0	3600	896	/	24,8	7,7	31,1
n°FA578894	PTC	5,2	12000	2304	/	32,1	30,3	94,2

(1) Moyenne des concentrations dosées par la méthode LC-MS/MS avec les quatre peptides suivants : WVFITITNDR, DFWGNPLR, YQFDK, NDLYEK

4. Conclusion

Une série de contrôles analytiques est réalisée à chaque étape de fabrication des vaccins antitétaniques. La plus critique et la plus complexe est la détoxification de la toxine tétanique au formaldéhyde. Cette dernière impacte l'antigénicité, l'immunogénicité et la toxicité de l'antigène. Elle doit être parfaitement comprise et maîtrisée pour s'assurer de sa bonne reproductibilité. Une précédente investigation avait été menée pour comprendre le mécanisme d'action du formaldéhyde à l'échelle moléculaire sur la TTD. Celle-ci avait contribué à une meilleure compréhension du procédé d'inactivation en identifiant et en localisant les modifications chimiques induites par le formaldéhyde sur la TTD.

De nos jours, aucun outil de caractérisation ne permet d'évaluer, à l'échelle moléculaire, la qualité de la TTD et la reproductibilité du processus chimique d'inactivation au formaldéhyde. C'est pourquoi, nous avons développé, dans cette présente étude, une méthode unique par LC-MS/MS pour la quantification relative de 74 peptides non modifiés et 74 peptides modifiés chimiquement par le formaldéhyde incluant : 21 peptides modifiés par un groupe méthylol (+30 Da), 37 peptides modifiés par un pont méthylène intra-peptidique ou une base de Schiff/imidazolidinone (+12 Da), 12 peptides modifiés par un groupe méthyle (+14 Da), 2 peptides modifiés par un groupe diméthyle (+28 Da) et 2 peptides « inter-pontés » comprenant des ponts méthylènes inter-peptidiques (+12 Da). Cette méthode *in vitro* est complémentaire aux tests de caractérisation actuels et se veut être simple et pratique pour servir de support aux procédés industriels.

Le développement de méthode a débuté par une optimisation du protocole de préparation d'échantillon. La LC-MS/MS a ensuite été appliquée à une étude concrète de stabilité de lots de TTD de la branche ATP de différents âges : 2 mois, 7 mois, 9 mois, 12 mois, 17 mois, 24 mois et 3 ans.

Les premières observations avec cette méthode LC-MS/MS tendent à montrer que la structure primaire de la TTD n'évolue pratiquement pas hormis une légère oxydation ; la structure de la TTD est stable au cours du temps. L'étude comparative des lots a démontré que la chimie du formaldéhyde ainsi que le procédé industriel de détoxification étaient reproductibles. En effet, tous les peptides ciblés dans la méthode ont été retrouvés en quantité équivalente entre les différents lots industriels de TTD. Une analyse SDS-PAGE a été réalisée en parallèle des analyses LC-MS/MS pour quantifier les formes monomères et suspectées dimères/oligomères de TTD présentes dans les lots de TTD. L'analyse SDS-PAGE a

montré une diminution de la quantité de dimère et une augmentation de monomère et de structure de haut poids moléculaire (oligomères ?) dans le même temps.

Dans cette étude, nous avons également développé une méthode *in vitro* par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) pour la quantification absolue et spécifique de la TT et de la TTD. Cette méthode est simple pour comparer les lots industriels de vaccins et constitue une alternative ou une approche orthogonale aux tests de contrôle qualité existants.

Le développement de la méthode a débuté par la sélection des peptides de la TT à doser ; six peptides ont été judicieusement sélectionnés pour quantifier la TT. Selon la méthodologie de dilution isotopique, les peptides ont été synthétisés avec des acides aminés enrichis en isotopes lourds stables ^{13}C , ^{15}N . Nous avons fait le choix de les commander sous formes de poudres lyophilisées aliquotées (mélange de 100 μg de chaque peptide/aliquot) pour leur simplicité d'utilisation. Une méthode LC/UV a été élaborée en parallèle de la méthode LC-MS/MS pour le suivi en stabilité des peptides étalons. Les peptides étalons lyophilisés se sont avérés être stables à -20°C sur une période de 3 mois. En solution, les peptides sont stables 3 jours à $+5^\circ\text{C}$.

Pour réduire les biais lors de la mesure de la concentration en TT, il était important de limiter au maximum les phénomènes d'adsorption des peptides. C'est pourquoi nous avons étudié l'impact de la nature du contenant et du solvant de reprise. Les peptides ne s'adsorbent ni sur du verre, ni sur du plastique. Le solvant de reprise idéal est un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{AF}$ 90/10/0,5 (v/v/v).

Le protocole de digestion enzymatique a été optimisé pour la TT et la TTD. Les paramètres optimaux sont les mêmes pour la TT et la TTD, à savoir un ratio $m_{\text{enzyme}}/m_{\text{protéine}}$ de 2/1, une durée de digestion de 20 heures et une étape de dénaturation thermique de 5 minutes à 100°C . La méthode LC-MS/MS a été pré-évaluée et s'est avérée répétable (CV moyen des peptides < 20% évalué sur un triplicat de digestion) et linéaire entre 0 et 1000 ng/mL.

La méthode LC-MS/MS a été appliquée pour doser des lots de TT et de TTD issus des branches industrielles ATP et PTC.

Pour les lots de TT et de TTD, quatre peptides déterminent des concentrations équivalentes en TT. Seuls deux peptides sont problématiques car ils sont impactés par le formaldéhyde et par des phénomènes de « *misscleavages* ». Néanmoins, les concentrations

dosées en TT et en TTD par ces deux peptides peuvent être corrigées avec des facteurs correctifs à l'instar des écarts à la moyenne. L'unique lot de TT de la branche ATP a été dosé à 1 g/L, les lots de TT de la branche PTC à 0,6 g/L, les lots de TTD de la branche ATP entre 11-14 g/L et le lot de TTD de la branche PTC à 30 g/L. La méthode LC-MS/MS a permis de vérifier que les procédés de fabrication PTC et ATP étaient parfaitement reproductibles.

La méthode LC-MS/MS a également été exploitée pour estimer les puretés en TT dans les lots industriels de vaccins. L'étude de la pureté de la TT a montré que la TT produite avec le procédé PTC était trois fois plus pure que celle fabriquée avec le procédé ATP et que la TTD de la branche PTC était deux à trois fois plus pure que la TTD de la branche ATP. Pour les lots de TT, nous avons constaté que les puretés antigéniques corrélaient avec les puretés calculées avec la méthode LC-MS/MS ; cette corrélation n'était pas évidente au stade TTD.

En conclusion, les méthodes LC-MS/MS d'expertise développées au cours de cette étude sont des outils de caractérisation uniques qui contribuent à un meilleur suivi qualité de la fabrication de la TTD. Ils peuvent être appliqués dans de nombreux cas comme pour suivre et contrôler à l'échelle moléculaire le procédé d'inactivation chimique au formaldéhyde, vérifier la bonne reproductibilité des procédés industriels, évaluer la qualité et la stabilité des lots de TT et de TTD dans le temps, comparer différents lots, comprendre de futurs problèmes de production « *troubleshooting* » et participer à des études de validation de robustesse de procédés. À long terme, ces outils de caractérisation en combinaison avec d'autres méthodes *in vitro* participent à limiter les tests de contrôle qualité qui sont actuellement réalisés sur les animaux pour évaluer l'activité et la sécurité des vaccins [29].

5. Références bibliographiques

- [1] J. E. (Joseph E. . Alouf, M. R. Popoff, and S. (Online service), *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*, 3rd ed. Amsterdam ; Boston : Elsevier, 2006.
- [2] S. Plotkin, J. M. Robinson, G. Cunningham, R. Iqbal, and S. Larsen, "The complexity and cost of vaccine manufacturing - An overview," *Vaccine*, vol. 35, no. 33, pp. 4064–4071, Jul. 2017.
- [3] B. Metz *et al.*, "Physicochemical and immunochemical assays for monitoring consistent production of tetanus toxoid," *Biologicals*, vol. 41, no. 4, pp. 231–237, Jul. 2013.
- [4] M. H. Roper, S. G. F. Wassilak, H. M. Scobie, A. D. Ridpath, and W. A. Orenstein, "58 - Tetanus Toxoid BT - Plotkin's Vaccines (Seventh Edition)," Elsevier, 2018, p. 1052–1079.e18.
- [5] M. S. Salnikova, S. B. Joshi, J. H. Rytting, M. Warny, and C. R. Middaugh, "Physical {Characterization} of {Clostridium} {Difficile} {Toxins} and {Toxoids}: {Effect} of the {Formaldehyde} {Crosslinking} on {Thermal} {Stability}," *JPharmSci*, vol. 97, no. 9, pp. 3735–3752, Sep. 2008.
- [6] B. METZ, "Structural {Characterisation} of {Diphtheria} {Toxoid}," Utrecht University, 2005.
- [7] B. Metz *et al.*, "Quality-control issues and approaches in vaccine development," *Expert Rev. Vaccines*, vol. 8, no. 2, pp. 227–238, Feb. 2009.
- [8] B. Metz *et al.*, "Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 8, pp. 6235–6243, Feb. 2004.
- [9] M. Thaysen-Andersen, S. B. Jørgensen, E. S. Wilhelmsen, J. W. Petersen, and P. Højrup, "Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin," *Vaccine*, vol. 25, no. 12, pp. 2213–2227, Mar. 2007.
- [10] B. Metz *et al.*, "Quality control of routine, experimental and real-time aged diphtheria toxoids by in vitro analytical techniques," *Vaccine*, vol. 25, no. 39–40, pp. 6863–6871, Sep. 2007.
- [11] H. Alsarraf *et al.*, "Biophysical comparison of diphtheria and tetanus toxins with the formaldehyde-detoxified toxoids, the main components of diphtheria and tetanus vaccines.," *Virulence*, vol. 8, no. 8, pp. 1880–1889, Nov. 2017.
- [12] C. Bayart, S. Peronin, E. Jean, J. Paladino, P. Talaga, and M. Le Borgne, "The combined use of analytical tools for exploring tetanus toxin and tetanus toxoid structures," *J.*

Chromatogr. B, vol. 1054, no. Supplement C, pp. 80–92, 2017.

- [13] J. B. Doshi, S. D. Ravetkar, V. S. Ghole, and K. Rehani, “Comparative quantitation for the protein content of diphtheria and tetanus toxoids by DC protein assay and Kjeldahl method,” *Biologicals*, vol. 31, no. 3, pp. 187–189, 2003.
- [14] V. K. Sharma, I. Sharma, and J. Glick, “The expanding role of mass spectrometry in the field of vaccine development.,” *Mass Spectrom. Rev.*, May 2018.
- [15] B. Rougemont *et al.*, “Absolute quantification of dengue virus serotype 4 chimera vaccine candidate in {Vero} cell culture by targeted mass spectrometry,” *Proteomics*, vol. 15, no. 19, pp. 3320–3330, Oct. 2015.
- [16] S. A. Gerber, J. Rush, O. Stemman, M. W. Kirschner, and S. P. Gygi, “Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 12, pp. 6940–6945, Jun. 2003.
- [17] L. V. DeSouza and K. W. M. Siu, “Mass spectrometry-based quantification,” *Clin. Biochem.*, vol. 46, no. 6, pp. 421–431, Apr. 2013.
- [18] C. M. Shuford *et al.*, “Absolute Protein Quantification by Mass Spectrometry: Not as Simple as Advertised.,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 14, pp. 7406–7415, Jul. 2017.
- [19] A. N. Hoofnagle *et al.*, “Recommendations for the Generation, Quantification, Storage, and Handling of Peptides Used for Mass Spectrometry-Based Assays.,” *Clin. Chem.*, vol. 62, no. 1, pp. 48–69, Jan. 2016.
- [20] R. McFarland *et al.*, “Non-animal replacement methods for human vaccine potency testing: state of the science and future directions,” *Procedia Vaccinol.*, vol. 5, pp. 16–32, 2011.
- [21] J. Norrgran, T. L. Williams, A. R. Woolfitt, M. I. Solano, J. L. Pirkle, and J. R. Barr, “Optimization of digestion parameters for protein quantification,” *Anal. Biochem.*, vol. 393, no. 1, pp. 48–55, 2009.
- [22] T. Muller and D. Winter, “Systematic Evaluation of Protein Reduction and Alkylation Reveals Massive Unspecific Side Effects by Iodine-containing Reagents.,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 16, no. 7, pp. 1173–1187, Jul. 2017.
- [23] Z. Yang and A. B. Attygalle, “LC/MS characterization of undesired products formed during iodoacetamide derivatization of sulfhydryl groups of peptides.,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 42, no. 2, pp. 233–243, Feb. 2007.
- [24] J. Bergès, P. Trouillas, and C. Houée-Levin, “Oxidation of protein tyrosine or methionine

- residues: From the amino acid to the peptide," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 261, no. 1, p. 12003, 2011.
- [25] K. G. KRIEGLSTEIN, A. H. HENSCHEN, U. WELLER, and E. HABERMANN, "Limited proteolysis of tetanus toxin," *Eur. J. Biochem.*, vol. 202, no. 1, pp. 41–51, 1991.
- [26] C. Chiva and E. Sabidó, "Peptide Selection for Targeted Protein Quantitation," *J. Proteome Res.*, vol. 16, no. 3, pp. 1376–1380, Mar. 2017.
- [27] C. Schmidt and H. Urlaub, "Absolute quantification of proteins using standard peptides and multiple reaction monitoring," *Methods Mol. Biol.*, vol. 893, pp. 249–265, 2012.
- [28] D. C. Liebler and L. J. Zimmerman, "Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry," *Biochemistry*, vol. 52, no. 22, pp. 3797–3806, Jun. 2013.
- [29] B. Metz, C. F. M. Hendriksen, W. Jiskoot, and G. F. A. Kersten, "Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems," *Vaccine*, vol. 20, no. 19–20, pp. 2411–2430, Jun. 2002.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1. Conclusions et perspectives sur la caractérisation du vaccin antitétanique

L'activité et la sécurité du vaccin antitétanique sont déterminés en grande partie par la détoxification de la toxine tétanique au formaldéhyde [2]. Le formaldéhyde modifie la structure complexe de la toxine pour la rendre inoffensive et immunogène. Plusieurs tests de contrôle qualité sont réalisés tout au long de la chaîne de production et sur le produit final avant la libération des lots de vaccins antitétaniques pour s'assurer de l'activité et de l'innocuité de l'antigène. Cependant, ces contrôles ne sont pas exhaustifs et les industriels continuent à investir en recherche et développement (R&D) pour une meilleure connaissance de la reproductibilité de leurs procédés et de leurs produits. Elles veulent notamment établir de nouvelles méthodes qualité pour optimiser et rentabiliser au mieux leur production. Dans cette optique, cette thèse a porté sur la caractérisation de l'anatoxine tétanique, principe actif du vaccin contre le tétanos. Cet antigène est complexe et difficile à caractériser dans la mesure où cette protéine (150 kDa) est modifiée chimiquement par le formaldéhyde. Les travaux menés au cours de ces trois dernières années ont permis d'élaborer une méthodologie efficace pour identifier et localiser, à l'échelle moléculaire, les modifications induites par le formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique. Plus d'une centaine de modifications ont été identifiées et localisées sur la protéine. Cependant, ces résultats ne sont pas exhaustifs. En effet, le système LC-MS utilisé au cours de cette étude est l'un des plus sensibles sur le marché. Néanmoins, chaque année, les systèmes sont toujours plus performants. Ainsi, il convient de poursuivre ce travail de caractérisation avec les systèmes de dernière génération pour identifier les modifications chimiques les moins abondantes.

Par ailleurs, aucun logiciel commercial n'existe pour identifier et localiser automatiquement toutes les modifications chimiques induites par le formaldéhyde sur les protéines ; ces dernières ont été identifiées manuellement au cours de cette thèse. C'est pourquoi, il serait intéressant de développer un logiciel performant pour une caractérisation plus exhaustive des modifications sur l'anatoxine tétanique.

Les travaux expérimentaux menés au cours de cette thèse ont mis en évidence des modifications chimiques méthyles et diméthyles sur l'anatoxine tétanique. L'origine de ces modifications n'a pas clairement été identifiée. Pour une meilleure caractérisation de l'anatoxine tétanique, il serait intéressant de comprendre comment elles se produisent. Ces modifications seraient des produits issus de réductions potentielles de bases de Schiff par des agents chimiques contenus dans la solution.

Au cours de cette thèse, aucune étude n'a été menée pour corréler les modifications induites par le formaldéhyde sur l'anatoxine tétanique avec l'efficacité et l'innocuité du vaccin antitétanique. Il serait intéressant de démontrer s'il existe un lien entre ces différents paramètres et s'il est possible d'influer sur les conditions opératoires pour changer le type et le nombre de modifications chimiques afin d'obtenir une meilleure efficacité du vaccin.

Durant ces trois dernières années, il a été mis en évidence des produits pontés au formaldéhyde dans l'anatoxine tétanique tels que des dimères et des oligomères. La caractérisation structurale qui a été menée dans cette thèse a été effectuée uniquement sur le monomère d'anatoxine tétanique. Il serait intéressant de caractériser finement ces dimères et oligomères pour une meilleure connaissance du produit ainsi que pour vérifier si ces composés impactent l'antigénicité et l'immunogénicité du vaccin.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a été la technique de choix utilisée au cours de ces travaux de thèse. Cette méthode physico-chimique a été employée pour caractériser uniquement la structure primaire de l'antigène. D'autres moyens analytiques par spectrométrie de masse tels que les échanges proton/deutérium existent pour investiguer les structures secondaire et tertiaire de la protéine et permettraient une caractérisation complémentaire de l'antigène.

Nos résultats expérimentaux ont permis d'apporter des éléments de réponse pour une meilleure compréhension du mécanisme de la détoxification chimique de la toxine tétanique à l'échelle moléculaire notamment avec l'identification de ponts méthylènes. Cependant, à ce jour, il est encore difficile de confirmer quelles modifications chimiques seraient à l'origine de la perte de la toxicité de la protéine. D'autres études *in vivo* et *in vitro* doivent être menées pour comprendre ce mécanisme. En effet, nous savons que dans l'organisme, la toxine tétanique pénètre le nerf, remonte par transport rétrograde axonal, s'introduit dans le neurone inhibiteur, libère sa chaîne légère dans le cytosol du neurone pour que celle-ci clive la synaptobrevine-2 et provoque les signes cliniques du tétanos. Mais comment se comporte l'anatoxine tétanique dans l'organisme ? Arrive-t-elle à pénétrer le nerf ? Peut-elle libérer sa chaîne légère dans le cytosol du neurone ? Pour répondre à ces questions, il peut être envisageable de réaliser une étude *in vivo* qui consisterait à injecter de l'anatoxine tétanique dans l'animal et suivre cette dernière par des moyens luminescents tels que la fluorescence et la phosphorescence. Cette expérience pourrait aider à une meilleure compréhension du

mécanisme d'action du formaldéhyde sur la toxine tétanique et à identifier les principales modifications chimiques qui impacteraient fortement sur la détoxification.

La caractérisation de l'antigène menée au cours de cette thèse a été réalisée uniquement aux stades toxine et anatoxine tétanique. Il serait judicieux de poursuivre ce travail de caractérisation aux stades ultérieurs, avant et après adsorption sur le gel d'aluminium et notamment au stade du vaccin final avec la combinaison des autres antigènes à l'instar du vaccin trivalent DT-IPV, composé des antigènes de la poliomyélite, du tétanos et de la diphtérie. Cette caractérisation plus approfondie permettrait de vérifier si les modifications chimiques induites par le formaldéhyde sont stables au cours du temps et/ou si elles sont impactées par les étapes de production : en présence de gel d'aluminium, d'agents conservateurs, des autres antigènes ...

2. Conclusions et perspectives sur l'utilisation des méthodes *in vitro* développées au cours de cette thèse

La caractérisation de l'anatoxine tétanique nous a permis d'établir de nouvelles méthodes *in vitro* pour évaluer la qualité à l'échelle moléculaire de la toxine et de l'anatoxine tétanique. Elles ont été appliquées pour étudier la stabilité de l'anatoxine dans le temps ainsi que pour doser les concentrations absolues (g/L) en toxine et en anatoxine tétanique dans différents lots industriels de vaccins.

Pour une future implémentation de ces tests dans des laboratoires de contrôles qualité, il conviendra de valider rigoureusement ces méthodes afin de s'assurer de leur robustesse. Elles pourront ensuite être employées dans de nombreux cas, notamment pour suivre le processus de détoxification, étudier la reproductibilité des procédés...

À ce jour, les tests *in vivo* sont inévitables pour s'assurer de l'innocuité et de l'efficacité des vaccins antitétaniques. Cependant, ces tests sont imprécis, coûteux et posent des problèmes éthiques. À long terme, un panel de méthodes *in vitro* pourrait aider à limiter le nombre de tests *in vivo*. Les méthodes *in vitro* devront bien évidemment être judicieusement sélectionnées pour être exhaustives afin de juger de la qualité du vaccin. À cette fin, la première étape consistera à lister les critères qualité essentiels puis à sélectionner les méthodes *in vitro* qui pourraient être utilisées. Ces dernières devront ensuite être testées sur plusieurs lots conformes et non conformes pour vérifier leur capacité à évaluer la qualité du

vaccin. Il faudra notamment s’assurer que les données issues des méthodes *in vitro* corréleront parfaitement avec les données fournies par les tests *in vivo*. À titre d’exemple, les méthodes LC-MS/MS développées au cours de cette thèse peuvent être utilisées pour juger de la qualité de la toxine et de l’anatoxine tétanique. Cependant, celles-ci ne peuvent pas être utilisées seules pour évaluer la qualité de l’antigène. Les méthodes doivent impérativement être combinées avec d’autres tests *in vitro* pour évaluer toutes les caractéristiques physico-chimiques et immunologiques de l’antigène [3]–[10]. Elles peuvent être associées, par exemple, avec les méthodes listées dans le Tableau 16 [5], [8], [9], [11], [12].

Tableau 16 : Liste non exhaustive de méthodes *in vitro* utilisables pour contrôler les caractéristiques immunologiques et physico-chimiques de l’anatoxine tétanique

Méthodes	Informations sur l’antigène	Références
SDS-PAGE	Stabilité, pureté, altérabilité, détermination poids moléculaire	[2], [3], [10]
Chromatographie d’exclusion stérique (SEC)	Stabilité, pureté, altérabilité, détermination poids moléculaire	[4]
A4F « <i>Asymmetrical flow field-flow fractionation</i> »	Détermination poids moléculaire, conformation	[10]
Fluorescence	Conformation	[3], [10]
Dichroïsme Circulaire (DC)	Conformation (secondaire et tertiaire)	[3], [10]
DSC « <i>Differential Scanning Calorimetry</i> »	Conformation	[3], [4]
DSF « <i>differential scanning fluorimetry</i> »	Conformation	[4]
SAXS « <i>Small-Angle X-ray Scattering</i> »	Conformation	[4]
Dosages colorimétriques (Kjeldahl, Bradford)	Quantité en protéines totales	[10]
Test de Flocculation de Ramon	Quantité d’antigène	[3]
Méthode TNBS « <i>2,4,6-Trinitrobenzene-1-Sulfonic Acid</i> »	Quantité d’amines primaires	[3]
Analyse triple AAA « <i>Amino Acid Analysis</i> »	Quantité d’acides aminés	[10]
ELISA « <i>Enzyme linked ImmunoAssay</i> »	Antigénicité et immunogénicité	[3], [13]
Analyse « <i>Biosensor</i> »	Antigénicité et immunogénicité	[3]
Western blot	Antigénicité et immunogénicité	[3]
ToBI « <i>Toxin binding Inhibition</i> »	Activité et innocuité	[3]
Tests à la synaptobrevine et au ganglioside GT1b	Activité et innocuité	[5]–[7], [11]
Autres méthodes immunologiques	Production de substance immunitaire (cytokines et anticorps) - activation et prolifération des cellules immunitaires (lymphocytes)	[9], [14]–[17]

3. Perspectives générales quant à la fabrication du vaccin antitétanique et à l'usage du formaldéhyde

Le vaccin antitétanique est ancien et son efficacité n'est plus à prouver. Etabli en 1920 par le vétérinaire Gaston Ramon, sa fabrication est ancestrale. Son principe actif résulte de l'inactivation de la toxine tétanique au formaldéhyde. Aujourd'hui, l'usage du formaldéhyde est controversé. Ce composé chimique a été défini en 2004 comme cancérigène, mutagène et reprotoxique par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Pour éviter l'emploi de ce processus chimique dans la fabrication du vaccin antitétanique, plusieurs pistes pourraient être envisagées :

- En supposant que les ponts méthylènes induits par le formaldéhyde soient à l'origine de la détoxification de la toxine tétanique, il pourrait être intéressant de réaliser des expériences de détoxification avec d'autres agents chimiques non toxiques et/ou naturels tel que le génipin [18] qui pourraient établir des ponts intra et inter-protéines. Il faudra bien évidemment s'assurer que le produit résultant ait la même efficacité et la même innocuité que l'anatoxine tétanique détoxifiée au formaldéhyde.
- Le gène de la toxine tétanique est connu. A long terme, il pourrait être envisageable de créer soit une toxine tétanique génétiquement modifiée au niveau du site actif soit une toxine tétanique composée d'une seule chaîne d'acides aminés non toxique et immunogène. Ceci a déjà été réalisé sur l'anatoxine diphtérique. La protéine CRM197 est issue de la mutation génétique de la toxine diphtérique [19]. Cette dernière est non toxique et immunogène.
- Plusieurs épitopes de la toxine tétanique sont décrits dans la littérature [3], [20]–[30]. On pourrait imaginer créer un polypeptide synthétique composé de tous les épitopes de la toxine tétanique existants et vérifier que celui-ci est non toxique et aussi efficace que l'anatoxine tétanique.

4. Conclusion générale

Cette thèse est le fruit de trois années de travaux scientifiques menés sur le principe actif du vaccin antitétanique. Elle a permis d'obtenir une meilleure connaissance du produit et des procédés industriels de fabrication, notamment par la caractérisation de l'anatoxine tétanique et le développement de méthodes physico-chimiques d'analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Ces dernières contribuent actuellement à un meilleur suivi de la qualité de la fabrication du principe actif.

Deux pistes sont envisageables pour la suite de cette thèse :

- À court terme, il conviendrait de continuer à développer de nouvelles méthodes *in vitro* et à caractériser le principe actif aux différents stades de production pour un meilleur suivi de la qualité du vaccin antitétanique.
- À long terme, il serait intéressant d'élaborer un nouveau principe actif qui soit non toxique, aussi efficace que l'anatoxine tétanique, facile à synthétiser, peu coûteux et n'employant aucun produit chimique dangereux pour sa production.

Les travaux de thèse exposés dans ce mémoire peuvent bien évidemment être extrapolés pour caractériser et quantifier d'autres antigènes modifiés au formaldéhyde tels que l'anatoxine diphtérique ou le poliovirus inactivé.

5. Références bibliographiques

- [1] V. Vetter, G. Denizer, L. R. Friedland, J. Krishnan, and M. Shapiro, "Understanding modern-day vaccines: what you need to know.," *Ann. Med.*, vol. 50, no. 2, pp. 110–120, Mar. 2018.
- [2] M. Thaysen-Andersen, S. B. Jørgensen, E. S. Wilhelmsen, J. W. Petersen, and P. Højrup, "Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin," *Vaccine*, vol. 25, no. 12, pp. 2213–2227, Mar. 2007.
- [3] B. Metz *et al.*, "Physicochemical and immunochemical assays for monitoring consistent production of tetanus toxoid," *Biologicals*, vol. 41, no. 4, pp. 231–237, Jul. 2013.
- [4] H. Alsarraf *et al.*, "Biophysical comparison of diphtheria and tetanus toxins with the formaldehyde-detoxified toxoids, the main components of diphtheria and tetanus vaccines.," *Virulence*, vol. 8, no. 8, pp. 1880–1889, Nov. 2017.
- [5] H. A. Behrens-Nicol, U. Bonifas, L. Böhl, B. Krämer, and K. Weisser, *Methods for the functional in vitro characterization of tetanus neurotoxin and toxoids*. 2012.
- [6] B. Kegel *et al.*, "An in vitro assay for detection of tetanus neurotoxin activity: Using antibodies for recognizing the proteolytically generated cleavage product," *Toxicol. Vit.*, vol. 21, no. 8, pp. 1641–1649, 2007.
- [7] H. A. Behrens-Nicol, K. Weisser, and B. Krämer, "'{BINACLE}' assay for in vitro detection of active tetanus neurotoxin in toxoids," *ALTEX*, vol. 32, no. 2, pp. 137–142, 2015.
- [8] J. van der Gun, A. Akkermans, C. Hendriksen, and H. van de Donk, "Validation of the toxin-binding inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of the tetanus toxoid component in vaccines.," *Dev. Biol. Stand.*, vol. 86, pp. 199–206, 1996.
- [9] S. J. Piersma, M. P. P. A. M. Leenaars, L. Guzylack-Piriou, A. Summerfield, C. F. M. Hendriksen, and K. C. McCullough, "An in vitro immune response model to determine tetanus toxoid antigen (vaccine) specific immunogenicity: Selection of sensitive assay criteria.," *Vaccine*, vol. 24, no. 16, pp. 3076–3083, Apr. 2006.
- [10] C. Bayart, S. Peronin, E. Jean, J. Paladino, P. Talaga, and M. Le Borgne, "The combined use of analytical tools for exploring tetanus toxin and tetanus toxoid structures," *J. Chromatogr. B*, vol. 1054, no. Supplement C, pp. 80–92, 2017.
- [11] H. A. Behrens-Nicol, U. Bonifas, B. Kegel, K. Silberbach, B. Krämer, and K. Weisser, "In vitro determination of tetanus toxicity by an endopeptidase assay linked to a

- ganglioside-binding step," *Toxicol Vitro.*, vol. 24, no. 3, pp. 988–994, Apr. 2010.
- [12] P. P. Leenaars, G. F. Kersten, M. L. de Bruijn, and C. F. Hendriksen, "An in vitro approach in quality control of toxoid vaccines.," *Vaccine*, vol. 19, no. 17–19, pp. 2729–2733, Mar. 2001.
- [13] L. Coombes, R. Tierney, P. Rigsby, D. Sesardic, and P. Stickings, "In vitro antigen {ELISA} for quality control of tetanus vaccines," *Biologicals*, vol. 40, no. 6, pp. 466–472, Nov. 2012.
- [14] S. Mayer, M. Laumer, A. Mackensen, R. Andreesen, and S. W. Krause, "Analysis of the immune response against tetanus toxoid: enumeration of specific T helper cells by the Elispot assay.," *Immunobiology*, vol. 205, no. 3, pp. 282–289, Jul. 2002.
- [15] M. Yousefi, R. Khosravi-Eghbal, A. Reza Mahmoudi, M. Jeddi-Tehrani, H. Rabbani, and F. Shokri, "Comparative in vitro and in vivo assessment of toxin neutralization by anti-tetanus toxin monoclonal antibodies," *Hum. Vaccin. Immunother.*, vol. 10, no. 2, pp. 344–351, Feb. 2014.
- [16] R. K. Gupta and G. R. Siber, "Use of in vitro Vero cell assay and ELISA in the United States potency test of vaccines containing adsorbed diphtheria and tetanus toxoids.," *Dev. Biol. Stand.*, vol. 86, pp. 207–215, 1996.
- [17] C. Hendriksen and R. Winsnes, *Serological methods for potency testing of tetanus toxoid vaccines for human use*, vol. 111. 2002.
- [18] B. Manickam, R. Sreedharan, and M. Elumalai, "'Genipin' - the natural water soluble cross-linking agent and its importance in the modified drug delivery systems: an overview.," *Curr. Drug Deliv.*, vol. 11, no. 1, pp. 139–145, 2014.
- [19] E. Malito *et al.*, "Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 14, pp. 5229–5234, Apr. 2012.
- [20] R. da Silva Antunes *et al.*, "Definition of Human Epitopes Recognized in Tetanus Toxoid and Development of an Assay Strategy to Detect Ex Vivo Tetanus CD4+ T Cell Responses," *PLoS One*, vol. 12, no. 1, p. e0169086, Jan. 2017.
- [21] D. Valmori, A. Pessi, E. Bianchi, and G. Corradin, "Use of human universally antigenic tetanus toxin {T} cell epitopes as carriers for human vaccination," *J. Immunol.*, vol. 149, no. 2, pp. 717–721, Jul. 1992.
- [22] J. J. Farrar *et al.*, "Tetanus," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 69, no. 3, pp. 292–301, 2000.

- [23] P. C. Ho *et al.*, "Identification of two promiscuous T cell epitopes from tetanus toxin.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 20, no. 3, pp. 477–483, Mar. 1990.
- [24] B. M. Diethelm-Okita, R. Raju, D. K. Okita, and B. M. Conti-Fine, "Epitope repertoire of human {CD}4+ {T} cells on tetanus toxin: identification of immunodominant sequence segments," *J. Infect. Dis.*, vol. 175, no. 2, pp. 382–391, Feb. 1997.
- [25] P. Panina-Bordignon, A. Tan, A. Termijtelen, S. Demotz, G. Corradin, and A. Lanzavecchia, "Universally immunogenic {T} cell epitopes: promiscuous binding to human {MHC} class {II} and promiscuous recognition by {T} cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 19, no. 12, pp. 2237–2242, Dec. 1989.
- [26] A. Palermo *et al.*, "Identification of a Tetanus Toxin Specific Epitope in Single Amino Acid Resolution.," *Biotechnol. J.*, vol. 12, no. 10, Oct. 2017.
- [27] N. Biradhar, S. V Nimmagadda, S. M. Aavula, S. Parthasarathy, S. Sula, and K. Maithal, "Identification and characterization of novel binding epitope of tetanus toxoid by phage display peptide library," *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, vol. 9, no. 1, pp. 49–58, Jan. 2015.
- [28] E. A. James, J. Bui, D. Berger, L. Huston, M. Roti, and W. W. Kwok, "Tetramer-guided epitope mapping reveals broad, individualized repertoires of tetanus toxin-specific {CD}4+ {T} cells and suggests {HLA}-based differences in epitope recognition," *Int. Immunol.*, vol. 19, no. 11, pp. 1291–1301, Nov. 2007.
- [29] B. M. Diethelm-Okita, D. K. Okita, L. Banaszak, and B. M. Conti-Fine, "Universal epitopes for human {CD}4+ cells on tetanus and diphtheria toxins," *J. Infect. Dis.*, vol. 181, no. 3, pp. 1001–1009, Mar. 2000.
- [30] J. C. Reece, H. M. Geysen, and S. J. Rodda, "Mapping the major human {T} helper epitopes of tetanus toxin. {The} emerging picture," *J. Immunol.*, vol. 151, no. 11, pp. 6175–6184, Dec. 1993.

ANNEXES

Annexe n°1: exemple d'identification de peptides modifiés au formaldéhyde par LC-MS/MS

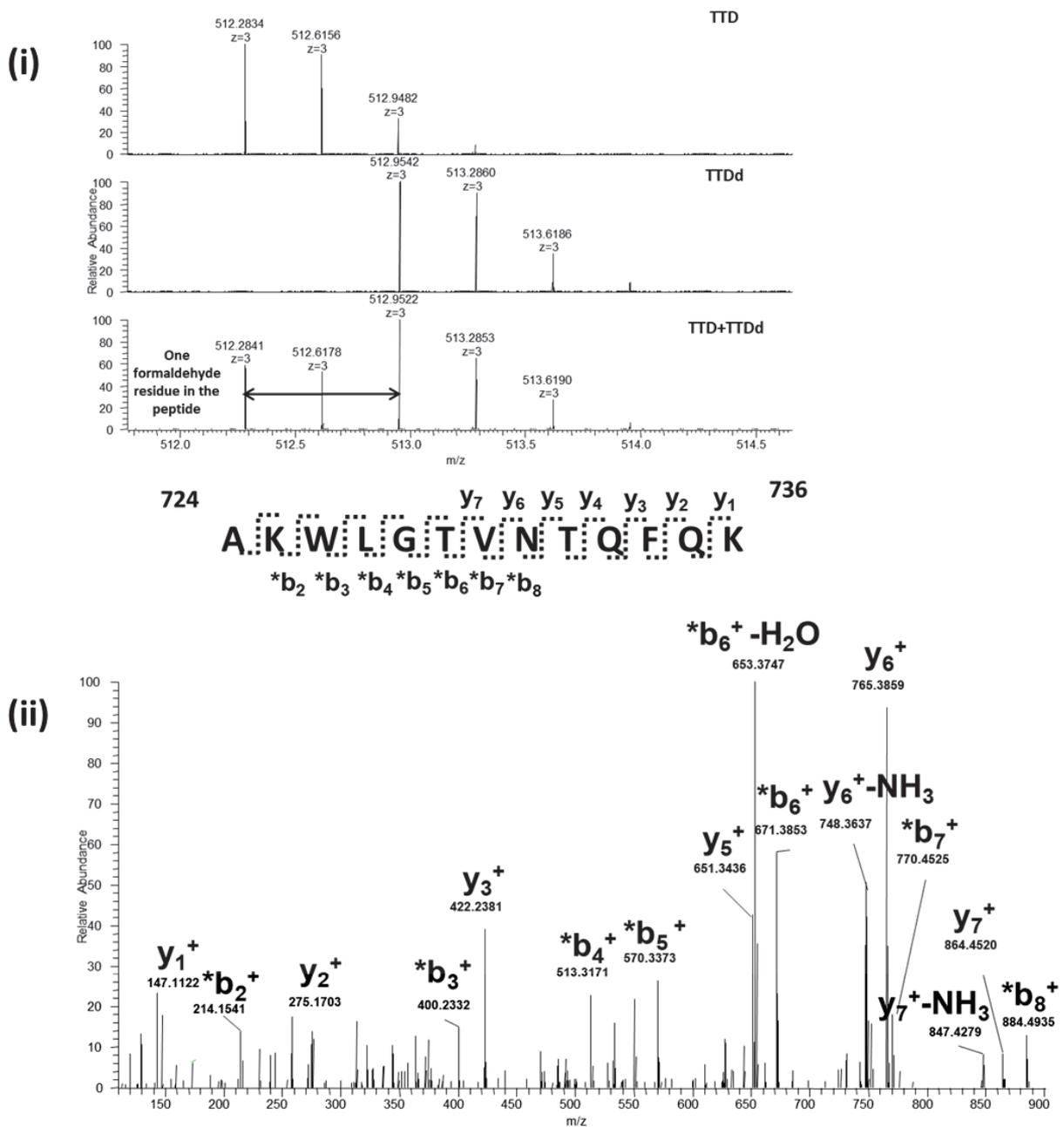


Figure 53 : Exemple d'identification d'un peptide avec un méthyle de séquence AK(méthyle)WLGTVNTQFQK. (i) représente la superposition des spectres de masse MS¹ du peptide modifié au formaldéhyde, de son homologue modifié au formaldéhyde deutéré et du mélange des deux formes du peptide. (ii) indique le spectre de fragmentation HCD du peptide modifié au formaldéhyde. Un seul résidu de formaldéhyde a été incorporé dans le peptide. La richesse en ions fragments b et y a permis de localiser précisément la modification. Le methyl est indiqué avec une (*).

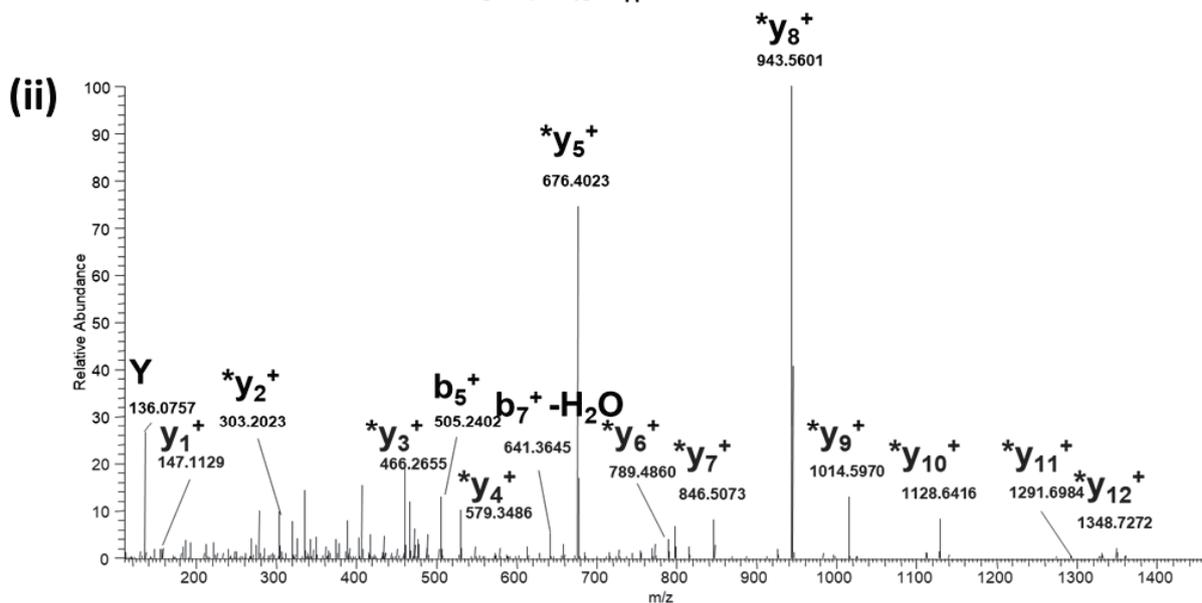
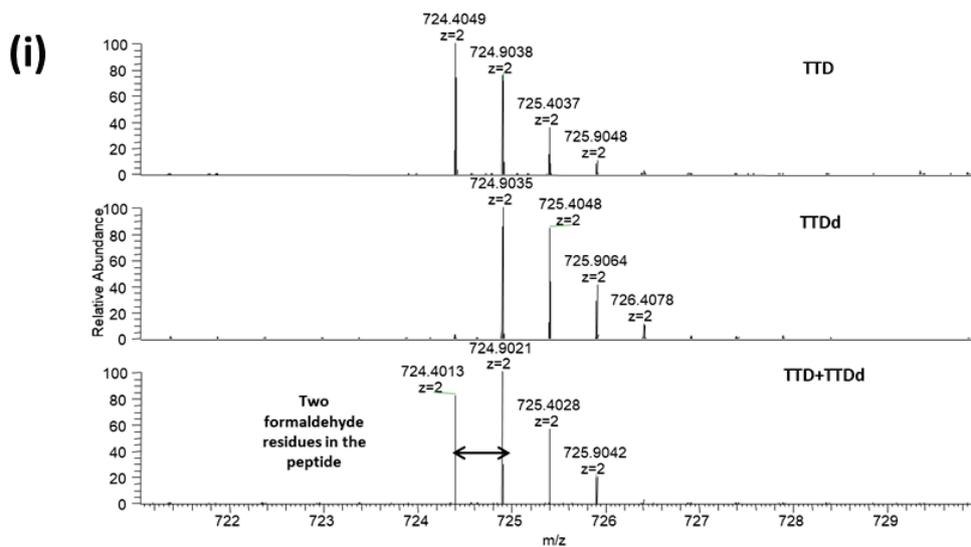


Figure 54 : Exemple d'identification d'un peptide avec un diméthyle de séquence VGYAPGIPLYK(dimethyl)K. (i) représente la superposition des spectres de masse MS^1 du peptide modifié au formaldéhyde, de son homologue modifié au formaldéhyde deutéré et du mélange des deux formes du peptide. (ii) indique le spectre de fragmentation HCD du peptide modifié au formaldéhyde. Deux résidus de formaldéhyde ont été incorporés dans le peptide. La richesse en ions fragments b et y a permis de localiser précisément la modification. Le diméthyle est indiqué avec une (*).

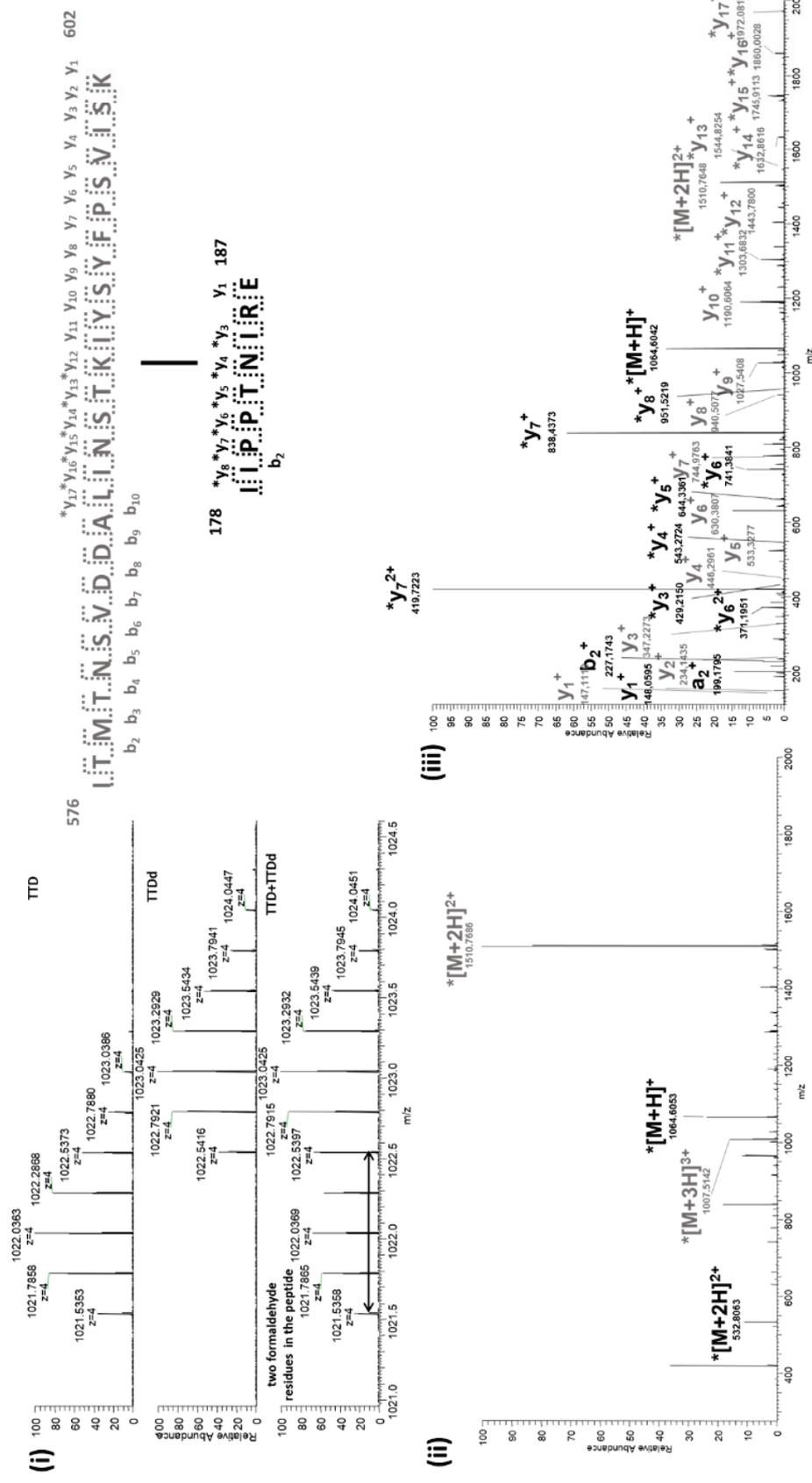


Figure 55 : Exemple d'identification d'un peptide inter-ponté inter-chaîne IIPPTNIR(+12.00)E[MTMTNSVDDALINSTK(+12.00)]YSYFSPVSK. (i) représente la superposition des spectres de masse MS¹ du peptide modifié au formaldéhyde, de son homologue modifié au formaldéhyde deutéré et du mélange des deux formes. Deux résidus de formaldéhyde ont été incorporés dans le peptide. Le spectre de fragmentation CID (ii) met en évidence le clivage du pont méthylène et la libération des deux ions précurseurs des deux peptides qui composent le peptide inter-ponté. La fragmentation HCD (iii) a permis de déterminer la séquence du peptide modifié et la localisation de la modification. (*) désigne un incrément de +12.000 Da.

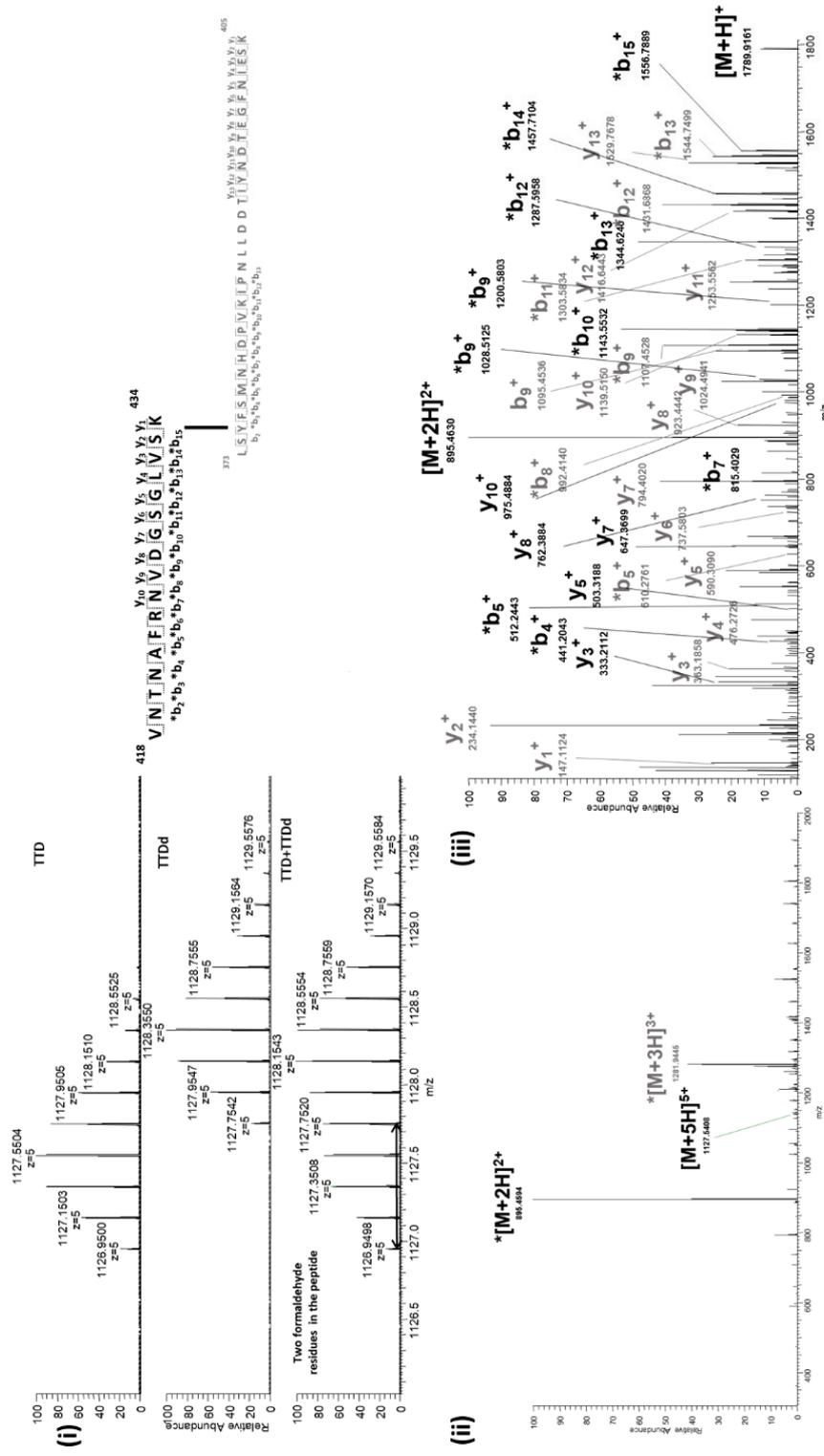


Figure 56 : Exemple d'identification d'un peptide inter-ponté intra-chaîne légère VN(+12.00)TNAFRNVDSGLVSK^1SY(+12.00)FSMNHDPVKIPNLLDDTYNDTEGFNIESK. (i) représente la superposition des spectres de masse MS¹ du peptide modifié au formaldéhyde, de son homologue modifié au formaldéhyde deutéré et du mélange des deux formes. Deux résidus de formaldéhyde ont été incorporés dans le peptide. Le spectre de fragmentation CID (ii) met en évidence le clivage du pont méthylène et la libération des deux ions précurseurs des deux peptides qui composent le peptide inter-ponté. La fragmentation HCD (iii) a permis de déterminer la séquence du peptide modifié et la localisation de la modification. (*) indique un incrément de +12.00 Da.

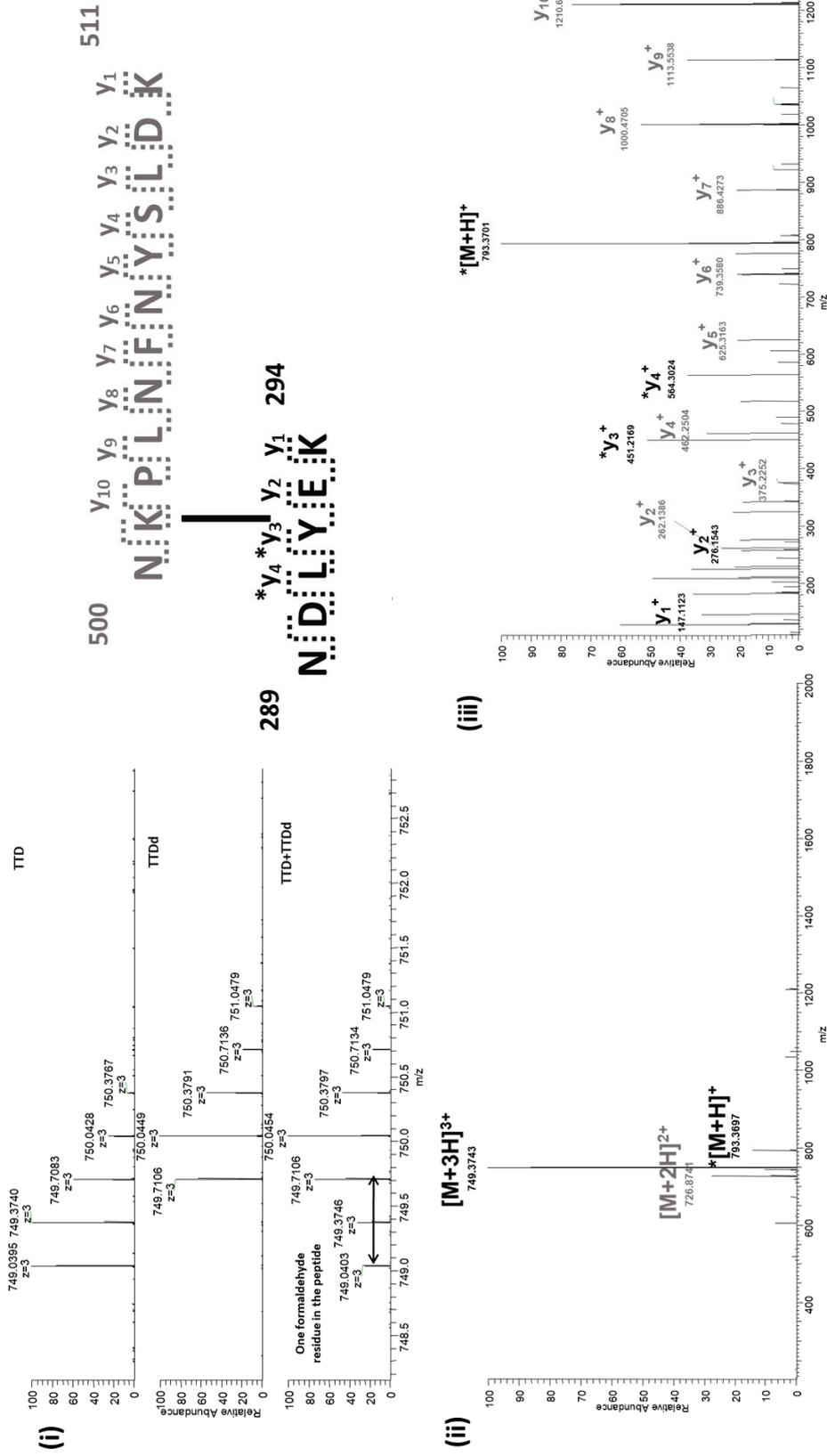


Figure 57 : Exemple d'identification d'un peptide inter-ponté inter-chaîne NK(+12.00)PLNFNYSLDK^NNDLYEK. (i) représente la superposition des spectres de masse MS² du peptide modifié au formaldéhyde, de son homologue modifié au formaldéhyde deutéré et du mélange des deux formes. Un seul résidu de formaldéhyde a été incorporé dans le peptide. Le spectre de fragmentation CID (ii) met en évidence le clivage du pont méthylène et la libération des deux ions précurseurs des deux peptides qui composent le peptide inter-ponté. La fragmentation HCD (iii) a permis de déterminer la séquence du peptide modifié et la localisation de la modification. (*) indique un incrément de +12.00 Da.

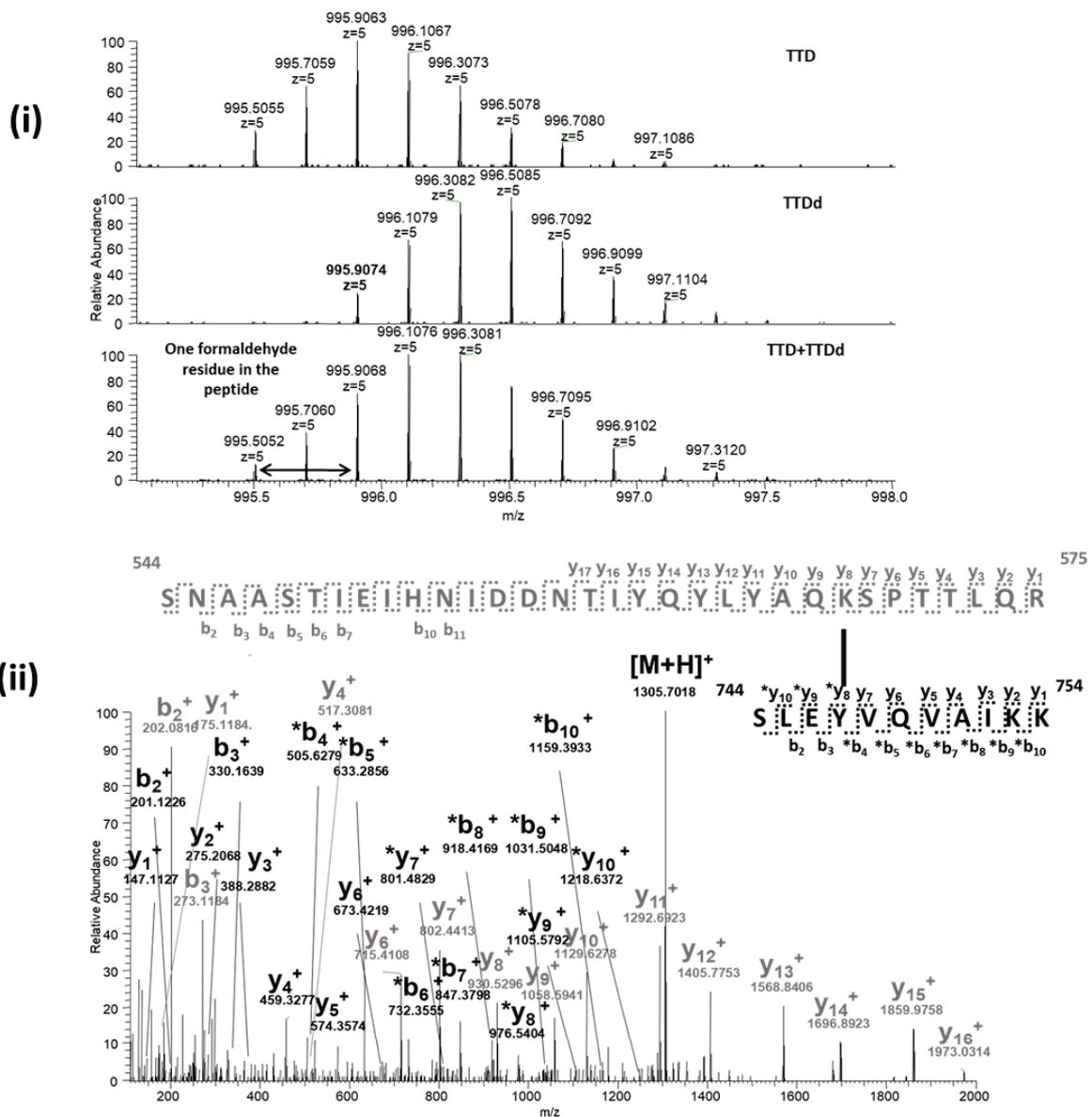


Figure 58 : Exemple d'identification d'un peptide inter-ponté intra-chaîne lourde SNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQK(+12.00)SPTTLQR^ΔSLEYVQVAIKK . (i) représente la superposition des spectres de masse MS¹ du peptide modifié au formaldéhyde, de son homologue modifié au formaldéhyde deutéré et du mélange des deux formes. (ii) indique le spectre de fragmentation HCD du peptide modifié au formaldéhyde. Un seul résidu de formaldéhyde a été incorporé dans le peptide. La richesse en ions fragments b et y a permis de localiser précisément la modification. La modification +12.00 Da est indiquée avec un (*).

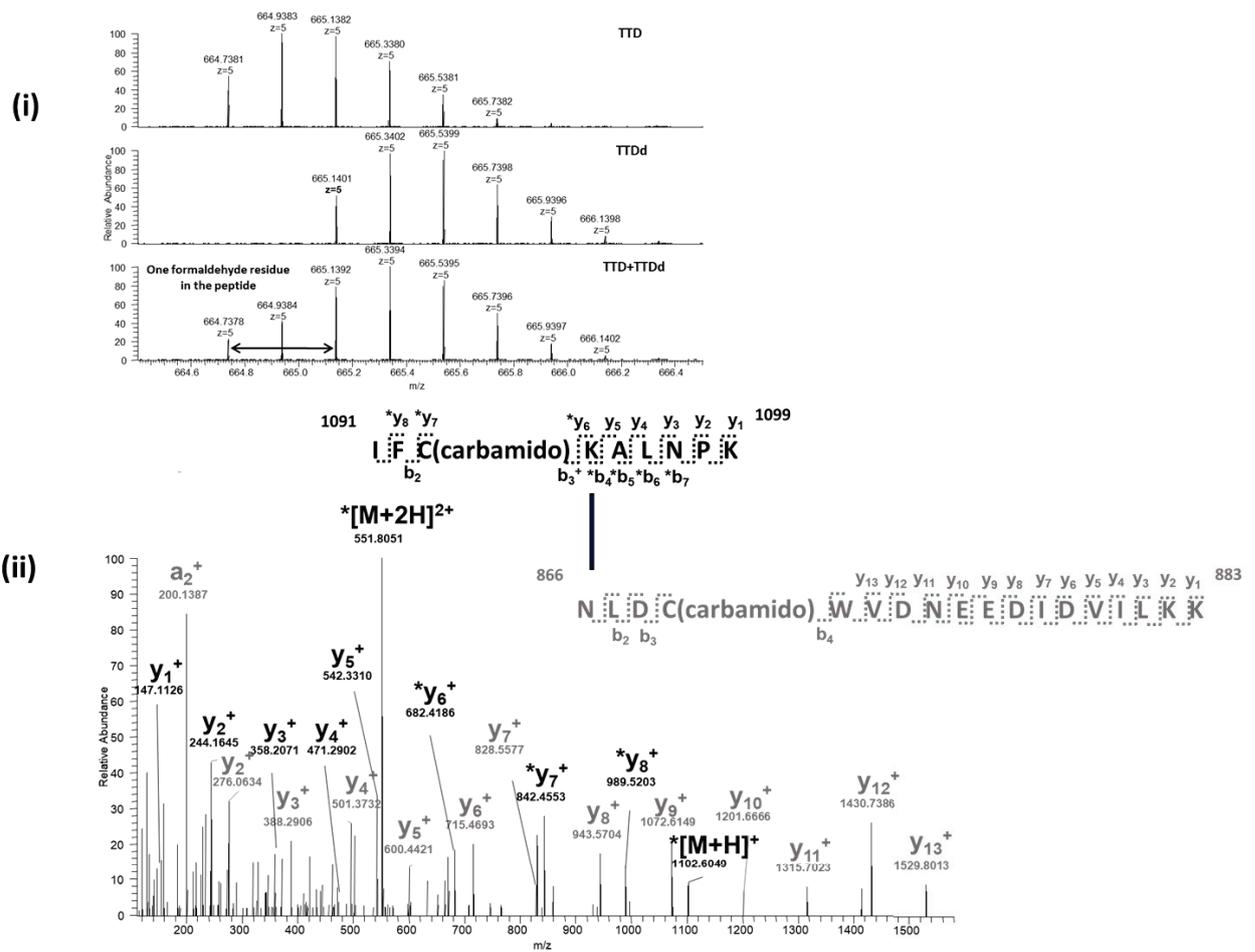


Figure 59 : Exemple d'identification d'un peptide inter-ponté intra-chaîne lourde IFC(carbamido)K(+12.00)ALNPK^NLDC(carbamido)WVDNEEDIDVILKK . (i) représente la superposition des spectres de masse MS¹ du peptide modifié au formaldéhyde, de son homologue modifié au formaldéhyde deutéré et du mélange des deux formes. (ii) indique le spectre de fragmentation HCD du peptide modifié au formaldéhyde. Un seul résidu de formaldéhyde a été incorporé dans le peptide. La richesse en ions fragments b et y a permis de localiser précisément la modification. L'incrément de masse +12.00 Da est indiquée avec un (*).

Annexe n°2 : Impact théorique du formaldéhyde sur la toxine tétanique

1 PITINFRY SDPVNNDTII MMEPPYCKGL DIYYKAFKIT DRIVIVPERY EFGTKPEDFN PPSSLIEGAS EYYDPNYLRT
 81 DSDKDRFLQT MVKLFNRIGN NVAGEALLDK IINAIPYLGK SYSLDKFDT NSNSVSFNLL EQDPSGATTK SAMLTNLIIF
 161 GPGPVLNKNE VRGIVLRVDN KNYFPCRDFG GSIMQMAFCP EYVPTFDNVI ENITSLTIGK SKYFQDPALL LMHELIVLH
 241 GLYGMQVSSH EIIPSKQEIY MQHTYPISAE ELFTFGGQDA NLISIDIKND LYEKLNDYK AIANKLSQVT SCNDPNIDID
 321 SYKQIQQKY QFDKDSNGQY IVNEDKFQIL YNSIMYGFTS IELGKKFNIK TRLSYFSMNH DPVKIPNLLD DTIYNDTEGF
 401 NIESKDLKSE YKGQNMVRNT NAFRNVDGSG LVSKLIGLCK KIIPPTNIRE NLYNRTASLT DLGGELCIKI KNEDLTFIAE
 481 KNSFSEEPFQ DEIVSYNTKN KPLNFNYSLD KIIVDYNLQS KITLPNDRTT PVTKGIPYAP EYKSNAASTI EIHNIDNTI
 561 YQYLYAQKSP TTLQRITMTN SVDDALINST KIYSYFPSVI SKVNQGAQGI LFLQWVRDII DDFTNESSQK TTIDKISDVS
 641 TIVPYIGPAL NIVKQGYEGN FIGALETTGV VLLLEYIPEI TLPVIAALSI AESSTQKEKI IKTIDNFLEK RYEKWIEVYK
 721 LVKAKWLGTV NTQFQKRSYQ MYRSLEYQVD AIKKIIDYEV KIYSGPDKQ IADEINNLKN KLEEKANKAM ININIFMRES
 801 SRSFLVNMKI NEAKKQLLEF DTQSKNILMQ YIKANSKFIG ITELKLESK INKVFSTPIP FSYSKNLDCW VDNEEDIDVI
 881 LKKSTILNLD INNDIISDIS GFNSSVITYP DAQLVPGING KAIHLVNNESEVIVHKAMD IEYNDMFNNF TVSFVLRVPK
 961 VSASHLEQYG TNEYSIISM KKHLSISGSG WSVSLKGNL IWTLKDSAGE VRQITFRDLP DKFNAYLANK WVFITINDR
 1041 LSSANLYING VLMGSAEITG LGAIREDDNI TLKLDRCNNN NQYVSIDKFR IFCKALNPKE IEKLYTSYLS ITFLRDFWGN
 1121 PLRYDTEYYL IPVASSSKDV QLNITDYMV LTNAPSNTNG KLNIIYRRLY NGLKFIKRY TPNNEIDSFV KSGDFIKLYV
 1201 SYNNEHIVG YPKDGNFNN LDRILRVGYN APGIPLYKMM EAVKLRDLKT YSVQLKLYDD KNASLGLVGT HNGQIGNDPN
 1281 RDILIASNWI FNHLKDKILG CDWYFVPTDE GWTND

Figure 60 : Impact théorique du formaldéhyde sur la toxine tétanique. Les AA en rouge peuvent théoriquement être impactés par le formaldéhyde. Le formaldéhyde réagit principalement sur les résidus lysines, tyrosines, tryptophanes, cystéine, asparagines, glutamines, arginines, histidines et sur les AA situés en N-ter.

Annexe n°3 : Méthode *scheduled MRM*

Méthode *Scheduled MRM* pour la quantification ciblée relative de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique et des formes chimiquement modifiées par le formaldéhyde ainsi que pour la quantification absolue de la toxine tétanique et de l'anatoxine tétanique. Le signe « ^ » indique un pont méthylène inter-peptidique. Les modifications +12 Da correspondent à des bases de Schiff ou à des ponts intra-peptidique ; les incréments +30 Da à des méthylols; les +14 Da à des méthyles ; les +28 Da à des diméthyles ; les « Oxi » à des oxydations (+16 Da) ; Les « CAM » à des carbamidométhylations (+57 Da)

Séquence du peptide	Charge de l'ion précurseur	Charge de l'ion fragment	m/z de l'ion précurseur	m/z de l'ion fragment	Tr (min)	DP (V)	CE (V)
TTPVTK	2+	γ ₅ ⁺	323,7	545,3	1,9	24,7	25
	2+	Y ₄ ⁺	323,7	444,3	1,9	24,7	25
	2+	γ ₃ ⁺	323,7	347,2	1,9	24,7	25
SPTTLQR	2+	γ ₅ ⁺	401,7	618,4	3,9	30,4	25
	2+	Y ₄ ⁺	401,7	517,3	3,9	30,4	25
	2+	γ ₃ ⁺	401,7	416,3	3,9	30,4	25
	2+	b ₆ ⁺	401,7	628,3	3,9	30,4	25
TLNDYK	2+	γ ₅ ⁺	377,2	652,3	4,5	28,6	25
	2+	Y ₄ ⁺	377,2	539,3	4,5	28,6	25
	2+	γ ₃ ⁺	377,2	425,2	4,5	28,6	25
	2+	b ₄ ⁺	377,2	444,2	4,5	28,6	25
IYSGPDK	2+	γ ₆ ⁺	390,2	666,3	4,6	29,6	25
	2+	γ ₅ ⁺	390,2	503,3	4,6	29,6	25
	2+	Y ₄ ⁺	390,2	416,2	4,6	29,6	25
	2+	γ ₃ ⁺	390,2	359,2	4,6	29,6	25
NDLYEK	2+	γ ₅ ⁺	391,2	667,3	4,8	29,6	25
	2+	Y ₄ ⁺	391,2	552,3	4,8	29,6	25
	2+	γ ₃ ⁺	391,2	439,2	4,8	29,6	25
	2+	γ ₂ ⁺	391,2	276,2	4,8	29,6	25
NDLYEK(13C,15N)	2+	γ ₅ ⁺	395,2	675,3	4,8	29,6	25
	2+	Y ₄ ⁺	395,2	560,3	4,8	29,6	25
	2+	γ ₃ ⁺	395,2	447,2	4,8	29,6	25
	2+	γ ₂ ⁺	395,2	284,2	4,8	29,6	25
YQFDK	2+	Y ₄ ⁺	350,7	537,3	6,3	26,7	25
	2+	γ ₃ ⁺	350,7	409,2	6,3	26,7	25
	2+	b ₃ ⁺	350,7	439,2	6,3	26,7	25
YQFDK(13C,15N)	2+	Y ₄ ⁺	354,7	545,3	6,3	26,7	25
	2+	γ ₃ ⁺	354,7	417,2	6,3	26,7	25
	2+	b ₃ ⁺	354,7	439,2	6,3	26,7	25
SGDFIK	2+	γ ₅ ⁺	333,7	579,3	6,3	25,4	25
	2+	Y ₄ ⁺	333,7	522,3	6,3	25,4	25
	2+	γ ₃ ⁺	333,7	407,3	6,3	25,4	25
YQQKYQFDK(¹³ C, ¹⁵ N)DSN	3+	γ ₆ ⁺	524,6	733,3	6,5	39,2	26
	3+	γ ₅ ⁺	524,6	586,3	6,5	39,2	26

	3+	γ_{11}^{2+}	524,6	704,8	6,5	39,2	26
	3+	γ_{10}^{2+}	524,6	640,8	6,5	39,2	26
LNIYYR(¹³ C, ¹⁵ N)RLY	3+	γ_8^{2+}	428,6	553,8	6,7	32,1	20,7
	3+	γ_4^+	428,6	617,4	6,7	32,1	20,7
	3+	γ_8^{2+}	428,6	585,8	6,7	32,1	20,7
	3+	γ_7^{2+}	428,6	528,8	6,7	32,1	20,7
	2+	γ_5^+	411,2	608,3	6,7	32,2	30
VNTNAFR	2+	γ_4^+	411,2	507,3	6,7	32,2	30
	2+	γ_3^+	411,2	393,2	6,7	32,2	30
	2+	γ_2^+	411,2	322,2	6,7	32,2	30
	2+	γ_5^+	426,2	608,3	6,7	32,2	30
VN[+30]TNAFR	2+	γ_4^+	426,2	507,3	6,7	32,2	30
	2+	γ_3^+	426,2	393,2	6,7	32,2	30
	2+	γ_2^+	426,2	322,2	6,7	32,2	30
	2+	γ_5^+	354,2	594,3	6,8	26,9	25
LYNGLK	2+	γ_4^+	354,2	431,3	6,8	26,9	25
	2+	γ_3^+	354,2	317,2	6,8	26,9	25
	2+	γ_5^+	417,2	608,3	6,8	32,2	30
VN[+12]TNAFR	2+	γ_4^+	417,2	507,3	6,8	32,2	30
	2+	γ_3^+	417,2	393,2	6,8	32,2	30
	2+	γ_2^+	417,2	322,2	6,8	32,2	30
	2+	γ_5^+	340,7	593,3	6,9	25,4	25
SGDFIK[+14]	2+	γ_4^+	340,7	536,3	6,9	25,4	25
	2+	γ_3^+	340,7	421,3	6,9	25,4	25
	2+	γ_5^{2+}	512,7	390,7	6,9	38,2	27,2
YQFDK(¹³ C, ¹⁵ N)DSN	2+	γ_6^+	512,7	733,3	6,9	38,2	27,2
	2+	γ_5^+	512,7	586,3	6,9	38,2	27,2
	2+	γ_4^+	512,7	471,2	6,9	38,2	27,2
	2+	γ_2^+	424,2	338,2	7,2	32	24,1
SYQMYR	2+	b_2^+	424,2	251,1	7,2	32	24,1
	2+	γ_5^+	424,2	760,4	7,2	32	24,1
	2+	γ_4^+	424,2	597,3	7,2	32	24,1
	2+	γ_3^+	424,2	469,2	7,2	32	24,1
	2+	γ_5^+	369,2	594,3	7,4	26,9	25
LYNGLK[+30]	2+	γ_4^+	369,2	431,3	7,4	26,9	25
	2+	γ_3^+	369,2	317,2	7,4	26,9	25
	2+	γ_5^+	360,2	606,3	7,4	26,9	25
LY[+12]NGLK	2+	γ_4^+	360,2	431,3	7,4	26,9	25
	2+	γ_3^+	360,2	317,2	7,4	26,9	25
	2+	γ_8^+	503,3	762,4	7,8	37,1	30
N[+30]VDGSGLVSK	2+	γ_7^+	503,3	647,4	7,8	37,1	30
	2+	γ_6^+	503,3	590,4	7,8	37,1	30
	2+	γ_3^+	503,3	333,2	7,8	37,1	30
	2+	γ_8^+	488,3	762,4	7,8	37,1	30
NVDGSGLVSK	2+	γ_7^+	488,3	647,4	7,8	37,1	30
	2+	γ_6^+	488,3	590,4	7,8	37,1	30
	2+	γ_3^+	488,3	333,2	7,8	37,1	30
	2+	γ_7^+	473,8	817,4	7,8	35,7	25,9
EDNNITLK	2+	γ_6^+	473,8	702,4	7,8	35,7	25,9
	2+	γ_5^+	473,8	588,4	7,8	35,7	25,9
	2+	γ_3^+	473,8	361,3	7,8	35,7	25,9
	2+	γ_8^+	494,3	762,4	7,8	37,1	30
N[+12]VDGSGLVSK	2+	γ_7^+	494,3	647,4	7,8	37,1	30
	2+	γ_6^+	494,3	590,4	7,8	37,1	30

	2+	γ_3^+	494,3	333,2	7,8	37,1	30
LDRC[CAM]NNNNQVYSIDK^K[+12]LESK[+12]	4+	/	621,1	616,4	8,1	70	30
	4+	/	621,1	724,4	8,1	70	30
	4+	/	621,1	561,3	8,1	70	30
	4+	/	621,1	462,3	8,1	70	30
NGKLNIIYR(¹³ C, ¹⁵ N)	3+	γ_4^+	384,2	624,3	8,5	28,9	18,3
	3+	γ_8^{2+}	384,2	518,8	8,5	28,9	18,3
	3+	b_5^+	384,2	527,3	8,5	28,9	18,3
	3+	γ_8^+	384,2	945,5	8,5	28,9	18,3
DIKNDLYEK(¹³ C, ¹⁵ N)	3+	γ_3^+	382,5	447,2	9,0	28,8	18,3
	3+	γ_7^{2+}	382,5	459,2	9,0	28,8	18,3
	3+	b_4^+	382,5	471,3	9,0	28,8	18,3
	3+	b_5^+	382,5	586,3	9,0	28,8	18,3
C[CAM]N[+30]NNNQVYSIDK	2+	γ_9^+	749,8	1080,5	9,0	55,8	35
	2+	γ_8^+	749,8	966,5	9,0	55,8	35
	2+	γ_6^+	749,8	724,4	9,0	55,8	35
	2+	γ_5^+	749,8	561,3	9,0	55,8	35
C[CAM]NNNNQVYSIDK	2+	γ_9^+	734,8	1080,5	9,1	55,8	35
	2+	γ_8^+	734,8	966,5	9,1	55,8	35
	2+	γ_6^+	734,8	724,4	9,1	55,8	35
	2+	γ_5^+	734,8	561,3	9,1	55,8	35
TYSVQLK	2+	γ_6^+	419,7	737,4	9,3	31,7	24
	2+	γ_5^+	419,7	574,4	9,3	31,7	24
	2+	γ_4^+	419,7	487,3	9,3	31,7	24
	2+	γ_3^+	419,7	388,3	9,3	31,7	24
NYFPC[CAM]R	2+	b_2^+	428,7	278,1	9,3	32,4	24,3
	2+	γ_3^+	428,7	432,2	9,3	32,4	24,3
	2+	γ_4^+	428,7	579,3	9,3	32,4	24,3
	2+	γ_4^{2+}	428,7	290,1	9,3	32,4	24,3
ITLPNDR	2+	γ_6^+	414,7	715,4	9,3	32,4	30
	2+	γ_5^+	414,7	614,3	9,3	32,4	30
	2+	γ_4^+	414,7	501,2	9,3	32,4	30
	2+	γ_3^+	414,7	404,2	9,3	32,4	30
ITLPNDR[+30]	2+	γ_6^+	429,7	715,4	9,3	32,4	30
	2+	γ_5^+	429,7	614,3	9,3	32,4	30
	2+	γ_4^+	429,7	501,2	9,3	32,4	30
	2+	γ_3^+	429,7	404,2	9,3	32,4	30
N[+12]YFPC[CAM]R	2+	b_2^+	434,7	290,1	9,5	32,4	24,3
	2+	γ_3^+	434,7	432,2	9,5	32,4	24,3
	2+	γ_4^+	434,7	579,3	9,5	32,4	24,3
	2+	γ_4^{2+}	434,7	290,1	9,5	32,4	24,3
LIGLC[CAM]K	2+	γ_5^+	352,2	590,3	9,6	26,8	25
	2+	γ_4^+	352,2	477,3	9,6	26,8	25
	2+	γ_3^+	352,2	420,2	9,6	26,8	25
	2+	γ_2^+	352,2	307,1	9,6	26,8	25
DSNGQYIVNEDK	2+	γ_9^+	691,3	1065,5	9,8	51,5	35
	2+	γ_7^+	691,3	880,4	9,8	51,5	35
	2+	γ_6^+	691,3	717,4	9,8	51,5	35
	2+	γ_5^+	691,3	604,3	9,8	51,5	35
NKPLNFNYSIDK	2+	γ_9^+	726,9	1113,6	9,8	55,2	35
	2+	γ_8^+	726,9	1000,5	9,8	55,2	35
	2+	γ_9^{2+}	726,9	557,3	9,8	55,2	35
	2+	γ_8^{2+}	726,9	500,7	9,8	55,2	35
DSNGQYIVNEDK[+30]	2+	γ_9^+	706,3	1065,5	9,8	51,5	35

	2+	γ_7^+	706,3	880,4	9,8	51,5	35
	2+	γ_6^+	706,3	717,4	9,8	51,5	35
	2+	γ_5^+	706,3	604,3	9,8	51,5	35
FNAYLANK	2+	γ_7^+	470,8	793,4	9,9	35,4	25,8
	2+	γ_6^+	470,8	679,4	9,9	35,4	25,8
	2+	γ_5^+	470,8	608,3	9,9	35,4	25,8
	2+	γ_4^+	470,8	445,3	9,9	35,4	25,8
DSNGQYIVNEDK[+12]	2+	γ_9^+	697,3	1065,5	10,0	51,5	35
	2+	γ_7^+	697,3	880,4	10,0	51,5	35
	2+	γ_6^+	697,3	717,4	10,0	51,5	35
	2+	γ_5^+	697,3	604,3	10,0	51,5	35
IIKTIDNFLEK(¹³ C, ¹⁵ N)	3+	γ_4^+	447,9	544,3	10,6	33,6	21,8
	3+	γ_3^+	447,9	397,3	10,6	33,6	21,8
	3+	γ_{10}^{2+}	447,9	614,9	10,6	33,6	21,8
	3+	γ_9^{2+}	447,9	558,3	10,6	33,6	21,8
VFSTPIPFYSYSK	2+	γ_{10}^+	686,9	1126,6	10,6	51,2	25
	2+	γ_{10}^{2+}	686,9	563,8	10,6	51,2	25
	2+	γ_8^{2+}	686,9	469,8	10,6	51,2	25
	2+	γ_{10}^{2+}	686,9	570,3	10,6	51,2	25
AIH[+30]LVNNESEVIVHK	3+	γ_8^+	607,0	898,5	10,6	44,9	35
	3+	γ_7^+	607,0	811,5	10,6	44,9	35
	3+	γ_6^+	607,0	724,4	10,6	44,9	35
IIPPTNIR	2+	γ_6^+	462,3	697,4	10,8	34,8	25,5
	2+	γ_5^+	462,3	600,4	10,8	34,8	25,5
	2+	γ_6^{2+}	462,3	349,2	10,8	34,8	25,5
	2+	γ_5^{2+}	462,3	300,7	10,8	34,8	25,5
AIHLVNNESEVIVHK	3+	γ_8^+	597,0	898,5	10,8	44,9	35
	3+	γ_7^+	597,0	811,5	10,8	44,9	35
	3+	γ_6^+	597,0	724,4	10,8	44,9	35
IIDYEYK	2+	γ_6^+	472,2	830,4	10,9	35,5	25,9
	2+	γ_5^+	472,2	717,3	10,9	35,5	25,9
	2+	γ_4^+	472,2	602,3	10,9	35,5	25,9
	2+	γ_2^+	472,2	310,2	10,9	35,5	25,9
IIPPTNIR[+30]	2+	γ_6^+	477,3	697,4	11,0	34,8	25,5
	2+	γ_5^+	477,3	600,4	11,0	34,8	25,5
	2+	γ_6^{2+}	477,3	349,2	11,0	34,8	25,5
	2+	γ_5^{2+}	477,3	300,7	11,0	34,8	25,5
IIPPTNIR[+12]	2+	γ_6^+	468,3	697,4	11,0	34,8	25,5
	2+	γ_5^+	468,3	600,4	11,0	34,8	25,5
	2+	γ_6^{2+}	468,3	349,2	11,0	34,8	25,5
	2+	γ_5^{2+}	468,3	300,7	11,0	34,8	25,5
NASLGLVGTHNGQIGNDPNR	3+	γ_6^+	678,7	672,3	11,4	50,6	34,5
	3+	γ_3^+	678,7	386,2	11,4	50,6	34,5
	3+	γ_{18}^{2+}	678,7	925,0	11,4	50,6	34,5
	3+	γ_{16}^{2+}	678,7	824,9	11,4	50,6	34,5
FLQTMVK	2+	γ_6^+	433,7	719,4	11,4	32,7	24,5
	2+	γ_5^+	433,7	606,3	11,4	32,7	24,5
	2+	γ_4^+	433,7	478,3	11,4	32,7	24,5
	2+	γ_3^+	433,7	377,2	11,4	32,7	24,5
NASLGLVGTHN[+30]GQIGNDPNR	3+	γ_6^+	688,7	672,3	11,4	50,6	34,5
	3+	γ_3^+	688,7	386,2	11,4	50,6	34,5
	3+	γ_{18}^{2+}	688,7	925,0	11,4	50,6	34,5
	3+	γ_{16}^{2+}	688,7	824,9	11,4	50,6	34,5
IIPPTNIR[+30]E	2+	γ_7^+	541,8	826,4	11,5	40,6	35

	2+	γ_6^+	541,8	729,4	11,5	40,6	35
	2+	γ_5^+	541,8	632,3	11,5	40,6	35
	2+	γ_6^{2+}	541,8	365,2	11,5	40,6	35
IIPPTNIR[+12]E	2+	γ_7^+	532,8	826,4	11,5	40,6	35
	2+	γ_6^+	532,8	729,4	11,5	40,6	35
	2+	γ_5^+	532,8	632,3	11,5	40,6	35
	2+	γ_6^{2+}	532,8	365,2	11,5	40,6	35
IIPPTNIRE	2+	γ_7^+	526,8	826,4	11,5	40,6	35
	2+	γ_6^+	526,8	729,4	11,5	40,6	35
	2+	γ_5^+	526,8	632,3	11,5	40,6	35
	2+	γ_6^{2+}	526,8	365,2	11,5	40,6	35
NASLGLVGTHN[+12]GQIGNDPNR	3+	γ_6^+	682,7	672,3	11,5	50,6	34,5
	3+	γ_3^+	682,7	386,2	11,5	50,6	34,5
	3+	γ_{18}^{2+}	682,7	931,0	11,5	50,6	34,5
	3+	γ_{16}^{2+}	682,7	830,9	11,5	50,6	34,5
DGNAFNNLDR	2+	γ_7^+	568,3	849,4	11,7	43	35
	2+	γ_6^+	568,3	778,4	11,7	43	35
	2+	γ_5^+	568,3	631,3	11,7	43	35
	2+	b_4^+	568,3	358,1	11,7	43	35
LNIYYR	2+	γ_5^+	421,2	728,4	11,7	32,3	24
	2+	γ_4^+	421,2	614,3	11,7	32,3	24
	2+	γ_3^+	421,2	501,3	11,7	32,3	24
	2+	γ_2^+	421,2	338,2	11,7	32,3	24
LNIYYR(13C,15N)	2+	γ_5^+	426,2	738,4	11,7	32,3	24
	2+	γ_4^+	426,2	624,3	11,7	32,3	24
	2+	γ_3^+	426,2	511,2	11,7	32,3	24
	2+	γ_2^+	426,2	348,2	11,7	32,3	24
LN[+12]IYYR	2+	γ_5^+	427,2	740,4	11,7	32,3	24
	2+	γ_4^+	427,2	614,3	11,7	32,3	24
	2+	γ_3^+	427,2	501,3	11,7	32,3	24
	2+	γ_2^+	427,2	338,2	11,7	32,3	24
N[+12]NVAGEALLDK	2+	γ_9^+	578,3	915,5	11,7	42,8	29,5
	2+	γ_8^+	578,3	816,5	11,7	42,8	29,5
	2+	γ_7^+	578,3	745,4	11,7	42,8	29,5
	2+	γ_6^+	578,3	688,4	11,7	42,8	29,5
EDNNITLK[+14]LDR	3+	γ_{10}^{2+}	448,9	608,3	11,7	34,2	22,3
	3+	γ_9^{2+}	448,9	550,8	11,7	34,2	22,3
	3+	γ_5^{2+}	448,9	329,7	11,7	34,2	22,3
	3+	γ_4^{2+}	448,9	273,2	11,7	34,2	22,3
DGN[+12]AFNNLDR	2+	γ_7^+	574,3	849,4	11,8	43	35
	2+	γ_6^+	574,3	778,4	11,8	43	35
	2+	γ_5^+	574,3	631,3	11,8	43	35
	2+	b_4^+	574,3	370,1	11,8	43	35
NGKLNIYYR(¹³ C, ¹⁵ N)RLY	3+	γ_{11}^{2+}	528,3	734,9	11,9	39,4	26,1
	3+	γ_9^{2+}	528,3	642,4	11,9	39,4	26,1
	3+	γ_8^{2+}	528,3	585,8	11,9	39,4	26,1
	3+	γ_7^{2+}	528,3	528,8	11,9	39,4	26,1
NNVAGEALLDK	2+	γ_9^+	572,3	915,5	11,9	42,8	29,5
	2+	γ_8^+	572,3	816,5	11,9	42,8	29,5
	2+	γ_7^+	572,3	745,4	11,9	42,8	29,5
	2+	γ_6^+	572,3	688,4	11,9	42,8	29,5
TY[+12]SVQLK	2+	γ_6^+	425,7	749,4	11,9	31,7	24
	2+	γ_5^+	425,7	574,4	11,9	31,7	24
	2+	γ_4^+	425,7	487,3	11,9	31,7	24

	2+	γ_3^+	425,7	388,3	11,9	31,7	24
N[+30]NVAGEALLDK	2+	γ_9^+	587,3	915,5	11,9	42,8	29,5
	2+	γ_8^+	587,3	816,5	11,9	42,8	29,5
	2+	γ_7^+	587,3	745,4	11,9	42,8	29,5
	2+	γ_6^+	587,3	688,4	11,9	42,8	29,5
DILIASNWYFNHLK	3+	γ_5^+	578,6	658,4	12,0	43,3	30
	3+	γ_{10}^{2+}	578,6	640,3	12,0	43,3	30
	3+	γ_5^{2+}	578,6	329,7	12,0	43,3	30
	3+	b_6^+	578,6	613,4	12,0	43,3	30
DGN[+30]AFNNLDR	2+	γ_7^+	583,3	849,4	12,1	43	35
	2+	γ_6^+	583,3	778,4	12,1	43	35
	2+	γ_5^+	583,3	631,3	12,1	43	35
	2+	b_4^+	583,3	388,2	12,1	43	35
FIGITELKK	2+	γ_8^+	524,8	901,6	12,6	39,4	27,8
	2+	γ_7^+	524,8	788,5	12,6	39,4	27,8
	2+	γ_6^+	524,8	731,5	12,6	39,4	27,8
	2+	γ_5^+	524,8	618,4	12,6	39,4	27,8
FIGITELK[+14]K	2+	γ_8^+	531,8	915,6	12,8	39,4	27,8
	2+	γ_7^+	531,8	802,5	12,8	39,4	27,8
	2+	γ_6^+	531,8	745,5	12,8	39,4	27,8
	2+	γ_5^+	531,8	632,4	12,8	39,4	27,8
GIPYAPEYK	2+	γ_7^+	519,3	867,4	12,9	39	27,6
	2+	γ_6^+	519,3	770,4	12,9	39	27,6
	2+	γ_5^+	519,3	607,3	12,9	39	27,6
	2+	γ_4^+	519,3	536,3	12,9	39	27,6
AIH[+12]LVNNESEVIVHK	3+	γ_8^+	601,0	898,5	13,0	44,9	35
	3+	γ_7^+	601,0	811,5	13,0	44,9	35
	3+	γ_6^+	601,0	724,4	13,0	44,9	35
VGY[+12]NAPGIPLYKK	3+	γ_5^+	477,9	648,4	13,1	36	23,6
	3+	γ_{12}^{2+}	477,9	666,9	13,1	36	23,6
	3+	γ_{11}^{2+}	477,9	638,4	13,1	36	23,6
	3+	γ_8^{2+}	477,9	458,3	13,1	36	23,6
YQQKYQFDK(¹³ C, ¹⁵ N)	3+	γ_3^+	419,2	417,2	13,1	31,5	20,2
	3+	γ_7^{2+}	419,2	482,8	13,1	31,5	20,2
	3+	b_4^+	419,2	548,3	13,1	31,5	20,2
	3+	γ_5^+	419,2	738,4	13,1	31,5	20,2
AK[+14]WLGTVNTQFQK	3+	γ_6^+	512,3	765,4	13,2	38,5	25,5
	3+	γ_4^+	512,3	550,3	13,2	38,5	25,5
	3+	b_6^+	512,3	671,4	13,2	38,5	25,5
	3+	b_7^+	512,3	770,5	13,2	38,5	25,5
PITINNFR	2+	γ_6^+	487,8	764,4	13,4	37,1	26,4
	2+	γ_5^+	487,8	663,4	13,4	37,1	26,4
	2+	γ_4^+	487,8	550,3	13,4	37,1	26,4
	2+	γ_3^+	487,8	436,2	13,4	37,1	26,4
GLDIYYK	2+	γ_4^+	436,2	586,3	13,4	33,4	25
	2+	γ_3^+	436,2	473,2	13,4	33,4	25
	2+	γ_2^+	436,2	310,2	13,4	33,4	25
	2+	b_3^+	436,2	286,1	13,4	33,4	25
WIEVYK	2+	γ_5^+	419,2	651,4	13,4	31,7	23,9
	2+	γ_4^+	419,2	538,3	13,4	31,7	23,9
	2+	γ_3^+	419,2	409,3	13,4	31,7	23,9
	2+	γ_2^+	419,2	310,2	13,4	31,7	23,9
P[+30]ITINNFR	2+	γ_6^+	502,8	764,4	13,4	37,1	26,4
	2+	γ_5^+	502,8	663,4	13,4	37,1	26,4

	2+	γ_4^+	502,8	550,3	13,4	37,1	26,4
	2+	γ_3^+	502,8	436,2	13,4	37,1	26,4
DIKNDLYEK(^{13}C , ^{15}N)TLN	3+	γ_6^+	491,9	775,4	13,6	36,8	24,2
	3+	γ_5^+	491,9	612,3	13,6	36,8	24,2
	3+	b_5^+	491,9	586,3	13,6	36,8	24,2
SLEYQVDAIK	2+	γ_8^+	583,3	965,5	13,9	43,6	29,9
	2+	γ_7^+	583,3	836,5	13,9	43,6	29,9
	2+	γ_6^+	583,3	673,4	13,9	43,6	29,9
	2+	γ_5^+	583,3	545,3	13,9	43,6	29,9
LYVSYNNNEHIVGYPK	3+	γ_{13}^{2+}	637,3	767,9	13,9	47,9	30
	3+	γ_{12}^{2+}	637,3	724,4	13,9	47,9	30
	3+	γ_{11}^{2+}	637,3	642,8	13,9	47,9	30
	3+	γ_{14}^{2+}	637,3	817,4	13,9	47,9	30
IIDY[+12]EYKIYSGPDK	3+	γ_{13}^{2+}	572,6	801,9	14,0	42,9	30
	3+	γ_{12}^{2+}	572,6	745,4	14,0	42,9	30
	3+	γ_{11}^{2+}	572,6	687,8	14,0	42,9	30
	3+	γ_9^{2+}	572,6	535,8	14,0	42,9	30
IIVDYNLQSK[+14]	2+	γ_9^+	603,8	1093,6	14,0	44,6	30,3
	2+	γ_8^+	603,8	980,5	14,0	44,6	30,3
	2+	γ_7^+	603,8	881,4	14,0	44,6	30,3
	2+	γ_6^+	603,8	766,4	14,0	44,6	30,3
LY[+12]VSYNNNEHIVGYPK	3+	γ_{13}^{2+}	641,3	767,9	14,1	47,9	30
	3+	γ_{12}^{2+}	641,3	724,4	14,1	47,9	30
	3+	γ_{11}^{2+}	641,3	642,8	14,1	47,9	30
	3+	γ_{14}^{2+}	641,3	817,4	14,1	47,9	30
IIVDYNLQSK	2+	γ_9^+	596,8	1079,6	14,2	44,6	30,3
	2+	γ_8^+	596,8	966,5	14,2	44,6	30,3
	2+	γ_7^+	596,8	867,4	14,2	44,6	30,3
	2+	γ_6^+	596,8	752,4	14,2	44,6	30,3
LYVSYNNNEHIVGYPK[+30]	3+	γ_{13}^{2+}	647,3	767,9	14,2	47,9	30
	3+	γ_{12}^{2+}	647,3	724,4	14,2	47,9	30
	3+	γ_{11}^{2+}	647,3	642,8	14,2	47,9	30
	3+	γ_{14}^{2+}	647,3	817,4	14,2	47,9	30
IIVDYNLQSK[+12]	2+	γ_9^+	602,8	1079,6	14,2	44,6	30,3
	2+	γ_8^+	602,8	966,5	14,2	44,6	30,3
	2+	γ_7^+	602,8	867,4	14,2	44,6	30,3
	2+	γ_6^+	602,8	752,4	14,2	44,6	30,3
TIDNFLEK	2+	γ_7^+	490,3	878,5	14,3	36,9	26,5
	2+	γ_6^+	490,3	765,4	14,3	36,9	26,5
	2+	γ_5^+	490,3	650,4	14,3	36,9	26,5
	2+	γ_4^+	490,3	536,3	14,3	36,9	26,5
TIDNFLEK(^{13}C , ^{15}N)	2+	γ_7^+	494,3	886,5	14,3	36,9	26,5
	2+	γ_6^+	494,3	773,4	14,3	36,9	26,5
	2+	γ_5^+	494,3	658,4	14,3	36,9	26,5
	2+	γ_4^+	494,3	544,3	14,3	36,9	26,5
IIVDYNLQSK[+30]	2+	γ_9^+	611,8	1079,6	14,3	44,6	30,3
	2+	γ_8^+	611,8	966,5	14,3	44,6	30,3
	2+	γ_7^+	611,8	867,4	14,3	44,6	30,3
	2+	γ_6^+	611,8	752,4	14,3	44,6	30,3
LIGLC[CAM]K[+12]	2+	γ_5^+	358,2	602,3	14,4	26,8	25
	2+	γ_4^+	358,2	489,3	14,4	26,8	25
	2+	γ_2^+	358,2	319,1	14,4	26,8	25
	2+	γ_3^+	358,2	432,2	14,4	26,8	25
K[+12]QLLEFDTQSK	2+	γ_9^+	674,9	1080,6	14,4	35	30

	2+	γ_8^+	674,9	967,5	14,4	35	30
	2+	γ_7^+	674,9	854,4	14,4	35	30
	2+	γ_6^+	674,9	725,4	14,4	35	30
TIDNFLEK(¹³ C, ¹⁵ N)RYE	3+	γ_5^+	479,2	628,3	14,5	35,9	23,5
	3+	γ_5^+	479,2	732,4	14,5	35,9	23,5
	3+	γ_{10}^{2+}	479,2	667,8	14,5	35,9	23,5
	3+	γ_9^{2+}	479,2	611,3	14,5	35,9	23,5
QLLEFDTQSK[+30]	2+	γ_8^+	619,8	967,5	14,9	46,3	31
	2+	γ_7^+	619,8	854,4	14,9	46,3	31
	2+	γ_6^+	619,8	725,4	14,9	46,3	31
	2+	γ_5^+	619,8	578,3	14,9	46,3	31
QLLEFDTQSK[+12]	2+	γ_8^+	610,8	979,5	14,9	46,3	31
	2+	γ_7^+	610,8	866,4	14,9	46,3	31
	2+	γ_6^+	610,8	737,4	14,9	46,3	31
	2+	γ_5^+	610,8	590,3	14,9	46,3	31
QLLEFDTQSK	2+	γ_8^+	604,8	967,5	15,0	46,3	31
	2+	γ_7^+	604,8	854,4	15,0	46,3	31
	2+	γ_6^+	604,8	725,4	15,0	46,3	31
	2+	γ_5^+	604,8	578,3	15,0	46,3	31
QLLEFDTQSK[+12]	2+	γ_8^+	610,8	967,5	15,1	46,3	31
	2+	γ_7^+	610,8	854,4	15,1	46,3	31
	2+	γ_6^+	610,8	725,4	15,1	46,3	31
	2+	γ_5^+	610,8	578,3	15,1	46,3	31
WLGTVNTQFQK	2+	γ_9^+	661,4	1022,5	15,2	49,3	32,7
	2+	γ_8^+	661,4	965,5	15,2	49,3	32,7
	2+	γ_7^+	661,4	864,5	15,2	49,3	32,7
	2+	γ_6^+	661,4	765,4	15,2	49,3	32,7
NEDLTFIAEK	2+	γ_8^+	590,3	936,5	15,4	44,1	30,1
	2+	γ_7^+	590,3	821,5	15,4	44,1	30,1
	2+	γ_6^+	590,3	708,4	15,4	44,1	30,1
	2+	γ_5^+	590,3	607,4	15,4	44,1	30,1
LSQ[+30]VTSC[CAM]NDPNIDIDSYK	3+	γ_{10}^+	1050,0	1179,6	15,5	76,6	46,1
	3+	γ_9^+	1050,0	1064,5	15,5	76,6	46,1
	3+	γ_7^+	1050,0	853,4	15,5	76,6	46,1
	3+	γ_8^+	1050,0	967,5	15,5	76,6	46,1
NEDLTFIAEK[+14]	2+	γ_8^+	597,3	950,5	15,7	44,1	30,1
	2+	γ_7^+	597,3	835,5	15,7	44,1	30,1
	2+	γ_6^+	597,3	722,4	15,7	44,1	30,1
	2+	γ_5^+	597,3	621,4	15,7	44,1	30,1
LSQVTSC[CAM]NDPNIDIDSYK	3+	γ_{10}^+	1035,0	1179,6	15,7	76,6	46,1
	3+	γ_9^+	1035,0	1064,5	15,7	76,6	46,1
	3+	γ_8^+	1035,0	967,5	15,7	76,6	46,1
	3+	γ_7^+	1035,0	853,4	15,7	76,6	46,1
YTPNNEIDSFVK	2+	γ_{10}^+	713,9	1162,6	15,8	54,3	35
	2+	γ_8^+	713,9	951,5	15,8	54,3	35
	2+	γ_4^+	713,9	480,3	15,8	54,3	35
	2+	γ_{10}^{2+}	713,9	581,8	15,8	54,3	35
YTPNNEIDSFVK[+30]	2+	γ_{10}^+	728,9	1162,6	15,8	54,3	35
	2+	γ_8^+	728,9	951,5	15,8	54,3	35
	2+	γ_4^+	728,9	480,3	15,8	54,3	35
	2+	γ_{10}^{2+}	728,9	581,8	15,8	54,3	35
IIKTIDNFLEK(¹³ C, ¹⁵ N)RYE	3+	γ_{12}^{2+}	597,3	782,4	15,9	44,5	29,9
	3+	γ_{11}^{2+}	597,3	718,4	15,9	44,5	29,9
	3+	γ_{10}^{2+}	597,3	667,8	15,9	44,5	29,9

	3+	γ_8^{2+}	597,3	553,8	15,9	44,5	29,9
EQIADEINNLK	2+	γ_9^+	643,8	1029,6	15,9	49,1	32
	2+	γ_8^+	643,8	916,5	15,9	49,1	32
	2+	γ_7^+	643,8	845,4	15,9	49,1	32
	2+	γ_6^+	643,8	730,4	15,9	49,1	32
EQ[+30]IADEINNLK	2+	γ_9^+	658,8	1029,6	15,9	49,1	32
	2+	γ_8^+	658,8	916,5	15,9	49,1	32
	2+	γ_7^+	658,8	845,4	15,9	49,1	32
	2+	γ_6^+	658,8	730,4	15,9	49,1	32
IWIVPER	2+	γ_5^+	456,8	613,4	16,0	34,4	30
	2+	γ_4^+	456,8	500,3	16,0	34,4	30
	2+	γ_3^+	456,8	401,2	16,0	34,4	30
	2+	b_3^+	456,8	413,3	16,0	34,4	30
EQ[+12]IADEINNLK	2+	γ_9^+	649,8	1029,6	16,1	49,1	32
	2+	γ_8^+	649,8	916,5	16,1	49,1	32
	2+	γ_7^+	649,8	845,4	16,1	49,1	32
	2+	γ_6^+	649,8	730,4	16,1	49,1	32
IIK[+14]TIDNFLEK	3+	γ_4^+	449,9	536,3	16,1	33,9	25
	3+	γ_3^+	449,9	389,2	16,1	33,9	25
	3+	γ_{10}^{2+}	449,9	617,9	16,1	33,9	25
	3+	γ_9^{2+}	449,9	561,3	16,1	33,9	25
DLPDKFNAYLANK	2+	γ_9^+	754,9	1068,6	16,4	56,1	30
	2+	γ_8^+	754,9	940,5	16,4	56,1	30
	2+	γ_{12}^{2+}	754,9	697,4	16,4	56,1	30
	2+	γ_{11}^{2+}	754,9	640,8	16,4	56,1	30
VGYNAPGIPLYK	2+	γ_9^+	646,4	972,6	16,5	48,7	32,1
	2+	γ_7^+	646,4	787,5	16,5	48,7	32,1
	2+	γ_5^+	646,4	633,4	16,5	48,7	32,1
	2+	γ_4^+	646,4	520,3	16,5	48,7	32,1
VGYNAPGIPLYK[+28]K	3+	γ_8^+	483,3	943,6	16,5	36,3	30
	3+	γ_5^+	483,3	676,4	16,5	36,3	30
	3+	γ_4^+	483,3	579,4	16,5	36,3	30
	3+	γ_3^+	483,3	466,3	16,5	36,3	30
	3+	γ_5^{2+}	483,3	338,7	16,5	36,3	30
VGYNAPGIPLYK[+14]	2+	γ_9^+	653,4	986,6	16,5	48,7	32,1
	2+	γ_7^+	653,4	801,5	16,5	48,7	32,1
	2+	γ_5^+	653,4	647,4	16,5	48,7	32,1
	2+	γ_4^+	653,4	534,3	16,5	48,7	32,1
NILM[Oxi]QYIK[+12]ANSK	3+	γ_7^+	484,3	835,5	16,5	36,4	25
	3+	γ_6^+	484,3	672,4	16,5	36,4	25
	3+	γ_5^+	484,3	559,3	16,5	36,4	25
	3+	γ_4^+	484,3	419,2	16,5	36,4	25
	3+	γ_{10}^{2+}	484,3	612,3	16,5	36,4	25
P[+12]ITINNFR	2+	γ_6^+	493,8	764,4	16,6	37,1	26,4
	2+	γ_5^+	493,8	663,4	16,6	37,1	26,4
	2+	γ_4^+	493,8	550,3	16,6	37,1	26,4
	2+	γ_3^+	493,8	436,2	16,6	37,1	26,4
FIGITELK	2+	γ_7^+	460,8	773,5	16,7	34,7	25,4
	2+	γ_6^+	460,8	660,4	16,7	34,7	25,4
	2+	γ_4^+	460,8	490,3	16,7	34,7	25,4
	2+	γ_2^+	460,8	260,2	16,7	34,7	25,4
DIIDDFTESSQK[+14]TTIDK	3+	b_3^+	695,3	342,2	17,0	51,8	30
	3+	b_9^{2+}	695,3	532,2	17,0	51,8	30
	3+	b_{15}^{2+}	695,3	855,4	17,0	51,8	30

	3+	b_{17}^{2+}	695,3	969,5	17,0	51,8	30
LSQ[+12]VTSC[CAM]NDPNIDIDSYK	3+	y_{10}^+	1041,0	1179,6	17,3	76,6	46,1
	3+	y_9^+	1041,0	1064,5	17,3	76,6	46,1
	3+	y_8^+	1041,0	967,5	17,3	76,6	46,1
	3+	y_7^+	1041,0	853,4	17,3	76,6	46,1
SAMLNLIIFGPGPVLNK	3+	y_{11}^+	629,0	1154,7	17,7	47,4	32,1
	3+	y_8^+	629,0	781,5	17,7	47,4	32,1
	3+	y_8^{2+}	629,0	391,2	17,7	47,4	32,1
	3+	b_6^+	629,0	618,3	17,7	47,4	32,1
IYSGPDKEQIADEINNLK	3+	y_9^+	683,0	1029,6	17,7	50,9	30
	3+	y_7^+	683,0	845,4	17,7	50,9	30
	3+	y_6^+	683,0	730,4	17,7	50,9	30
	3+	y_4^+	683,0	488,3	17,7	50,9	30
IYSGPDK[+30]EQIADEINNLK	3+	y_9^+	693,0	1029,6	17,7	50,9	30
	3+	y_7^+	693,0	845,4	17,7	50,9	30
	3+	y_6^+	693,0	730,4	17,7	50,9	30
	3+	y_4^+	693,0	488,3	17,7	50,9	30
GNNLIWTLK	2+	y_7^+	529,8	887,5	17,8	39,7	30
	2+	y_6^+	529,8	773,5	17,8	39,7	30
	2+	y_5^+	529,8	660,4	17,8	39,7	30
	2+	y_4^+	529,8	547,3	17,8	39,7	30
IYSGPDK[+12]EQIADEINNLK	3+	y_9^+	687,0	1041,6	17,8	50,9	30
	3+	y_7^+	687,0	857,4	17,8	50,9	30
	3+	y_6^+	687,0	742,4	17,8	50,9	30
	3+	y_4^+	687,0	500,3	17,8	50,9	30
ANKWVFITITNDR($^{13}C, ^{15}N$)	3+	b_7^+	530,0	922,5	17,9	39,5	26,2
	3+	b_8^+	530,0	989,5	17,9	39,5	26,2
	3+	y_7^{2+}	530,0	842,5	17,9	39,5	26,2
	3+	y_6^+	530,0	729,4	17,9	39,5	26,2
NILMQYIK	2+	y_6^+	511,8	795,4	18,0	38,9	27,5
	2+	y_5^+	511,8	682,4	18,0	38,9	27,5
	2+	y_4^+	511,8	551,3	18,0	38,9	27,5
	2+	y_3^+	511,8	423,3	18,0	38,9	27,5
VGYNAPGIPLYK[+14]K	3+	y_6^+	478,6	775,5	18,1	36,3	30
	3+	y_5^+	478,6	662,4	18,1	36,3	30
	3+	y_6^{2+}	478,6	388,3	18,1	36,3	30
	3+	y_5^{2+}	478,6	331,7	18,1	36,3	30
IIVDYNLQSK[+12]ITLPNDR	3+	y_4^+	672,0	501,2	18,2	50,1	34,1
	3+	y_{16}^{2+}	672,0	951,0	18,2	50,1	34,1
	3+	y_{15}^{2+}	672,0	894,5	18,2	50,1	34,1
	3+	y_{13}^{2+}	672,0	787,4	18,2	50,1	34,1
LYTSYLSITFLR	2+	y_5^+	738,9	649,4	18,2	55	30
	2+	y_8^{2+}	738,9	506,8	18,2	55	30
	2+	y_7^{2+}	738,9	425,3	18,2	55	30
	2+	b_7^{2+}	738,9	414,7	18,2	55	30
IIVDYNLQSK[+14]ITLPNDR	3+	y_4^+	672,7	501,2	18,2	50,1	34,1
	3+	y_{16}^{2+}	672,7	952,0	18,2	50,1	34,1
	3+	y_{15}^{2+}	672,7	895,5	18,2	50,1	34,1
	3+	y_{13}^{2+}	672,7	788,4	18,2	50,1	34,1
NDLYEK($^{13}C, ^{15}N$)TLN	3+	y_3^+	373,2	347,2	18,4	28,1	17,7
	3+	y_8^{2+}	373,2	502,3	18,4	28,1	17,7
	3+	b_8^{3+}	373,2	329,2	18,4	28,1	17,7
	3+	y_5^+	373,2	708,3	18,4	28,1	17,7
DFWGNPLR($^{13}C, ^{15}N$)YDT	2+	y_7^+	697,3	888,4	18,5	51,6	33,8

	2+	γ_{10}^{2+}	697,3	639,8	18,5	51,6	33,8
	2+	γ_8^{2+}	697,3	473,2	18,5	51,6	33,8
	2+	b_6^{2+}	697,3	359,2	18,5	51,6	33,8
SFLVNQMINEAK	2+	γ_9^+	697,4	1046,5	18,6	52	34
	2+	γ_8^+	697,4	947,5	18,6	52	34
	2+	γ_7^+	697,4	833,4	18,6	52	34
	2+	γ_6^+	697,4	705,4	18,6	52	34
NILMQYIK(+12)ANSK	3+	γ_7^+	478,9	835,5	18,9	36,4	25
	3+	γ_5^+	478,9	559,3	18,9	36,4	25
	3+	γ_4^+	478,9	419,2	18,9	36,4	25
	3+	γ_9^{2+}	478,9	547,8	18,9	36,4	25
FQILYNSIMYGFTEIELGK	3+	γ_5^+	756,1	559,4	19,0	56,2	30
	3+	γ_{10}^{2+}	756,1	578,8	19,0	56,2	30
	3+	γ_6^{2+}	756,1	344,7	19,0	56,2	30
DIIDDFTESSQK	2+	γ_{10}^+	756,4	1170,5	19,2	56,7	36,1
	2+	γ_8^+	756,4	940,4	19,2	56,7	36,1
	2+	γ_7^+	756,4	793,4	19,2	56,7	36,1
	2+	γ_6^+	756,4	692,3	19,2	56,7	36,1
DIIDDFTESSQK(+30)	2+	γ_{10}^+	771,4	1170,5	19,2	56,7	36,1
	2+	γ_8^+	771,4	940,4	19,2	56,7	36,1
	2+	γ_7^+	771,4	793,4	19,2	56,7	36,1
	2+	γ_6^+	771,4	692,3	19,2	56,7	36,1
IYSYFPSVISK	2+	γ_9^+	652,4	1027,6	19,3	49,1	32,3
	2+	γ_8^+	652,4	940,5	19,3	49,1	32,3
	2+	γ_7^+	652,4	777,5	19,3	49,1	32,3
	2+	γ_6^+	652,4	630,4	19,3	49,1	32,3
FLRDFWGNPLR(¹³ C, ¹⁵ N)	3+	γ_5^+	477,6	566,3	19,4	35,7	23,4
	3+	γ_4^+	477,6	509,3	19,4	35,7	23,4
	3+	γ_9^{2+}	477,6	585,8	19,4	35,7	23,4
	3+	b_5^+	477,6	679,4	19,4	35,7	23,4
DIIDDFTESSQK(+12)	2+	γ_{10}^+	762,4	1170,5	19,4	56,7	36,1
	2+	γ_8^+	762,4	940,4	19,4	56,7	36,1
	2+	γ_7^+	762,4	793,4	19,4	56,7	36,1
	2+	γ_6^+	762,4	692,3	19,4	56,7	36,1
DFWGNPLR	2+	γ_6^+	502,8	742,4	19,5	37,8	27
	2+	γ_5^+	502,8	556,3	19,5	37,8	27
	2+	γ_4^+	502,8	499,3	19,5	37,8	27
	2+	γ_3^+	502,8	385,3	19,5	37,8	27
DFWGNPLR(13C,15N)	2+	γ_6^+	507,8	752,4	19,5	37,8	27
	2+	γ_5^+	507,8	566,3	19,5	37,8	27
	2+	γ_4^+	507,8	509,3	19,5	37,8	27
	2+	γ_3^+	507,8	395,3	19,5	37,8	27
S(+12)LTDLGELC[CAM]IK	2+	γ_9^+	659,3	1004,5	19,5	49,2	32,6
	2+	γ_6^+	659,3	719,4	19,5	49,2	32,6
	2+	γ_5^+	659,3	662,4	19,5	49,2	32,6
	2+	γ_4^+	659,3	533,3	19,5	49,2	32,6
SLTDLGELC[CAM]IK	2+	γ_9^+	653,3	1004,5	19,6	49,2	32,6
	2+	γ_6^+	653,3	719,4	19,6	49,2	32,6
	2+	γ_5^+	653,3	662,4	19,6	49,2	32,6
	2+	γ_4^+	653,3	533,3	19,6	49,2	32,6
ANKWVFITNDR(¹³ C, ¹⁵ N)LSS	3+	γ_9^+	625,7	1016,5	19,9	46,5	31,4
	3+	γ_8^+	625,7	915,5	19,9	46,5	31,4
	3+	γ_7^+	625,7	802,4	19,9	46,5	31,4
	3+	γ_6^+	625,7	701,3	19,9	46,5	31,4

YDTEYYLIPVASSSK	2+	γ_{10}^+	868,4	1064,6	20,0	64,4	40,1
	2+	γ_9^+	868,4	901,5	20,0	64,4	40,1
	2+	γ_8^+	868,4	788,5	20,0	64,4	40,1
	2+	γ_7^+	868,4	675,4	20,0	64,4	40,1
TASLTDLGGELC[CAM]IK	2+	γ_{10}^+	739,4	1105,6	20,1	55	35,5
	2+	γ_9^+	739,4	1004,5	20,1	55	35,5
	2+	γ_8^+	739,4	889,5	20,1	55	35,5
	2+	γ_7^+	739,4	776,4	20,1	55	35,5
IIDYEYK[+12]IYSGPDKEQIADEINNLK	4+	γ_{23}^{3+}	746,9	920,1	20,1	90	35
	4+	γ_{24}^{3+}	746,9	957,8	20,1	90	35
	4+	γ_7^+	746,9	845,4	20,1	90	35
	4+	b_{16}^{2+}	746,9	978,0	20,1	90	35
DFW[+12]GNPLR	2+	γ_6^+	508,8	742,4	20,4	37,8	27
	2+	γ_5^+	508,8	556,3	20,4	37,8	27
	2+	γ_4^+	508,8	499,3	20,4	37,8	27
	2+	γ_3^+	508,8	385,3	20,4	37,8	27
IINAIPYLGNSYSLLDK^VDNK[+12]NYFPC[CAM]R	5+	/	644,7	674,3	20,4	70	30
	5+	/	644,7	774,0	20,4	70	30
	5+	/	644,7	898,8	20,4	70	30
	5+	/	644,7	412,3	20,4	70	30
FDTNSNSVSNLLEQDPSGATTK	3+	γ_{10}^+	824,7	1033,5	20,9	70	42,5
	3+	γ_9^+	824,7	904,4	20,9	70	42,5
	3+	γ_7^+	824,7	661,4	20,9	70	42,5
	3+	γ_7^{2+}	824,7	331,2	20,9	70	42,5
FDTNSNSVSNLLEQDPSGATTK[+12]	3+	γ_{10}^+	828,7	1045,5	20,9	70	42,5
	3+	γ_9^+	828,7	916,4	20,9	70	42,5
	3+	γ_7^+	828,7	661,4	20,9	70	42,5
	3+	γ_7^{2+}	828,7	331,2	20,9	70	42,5
FDTNSNSVSNLLEQDPSGATTK[+14]	3+	γ_{10}^+	829,4	1047,5	20,9	70	42,5
	3+	γ_9^+	829,4	918,5	20,9	70	42,5
	3+	γ_7^+	829,4	675,4	20,9	70	42,5
	3+	γ_7^{2+}	829,4	338,2	20,9	70	42,5
IW[+12]IVPER	2+	γ_5^+	462,8	613,4	21,2	34,4	30
	2+	γ_4^+	462,8	500,3	21,2	34,4	30
	2+	γ_3^+	462,8	401,2	21,2	34,4	30
	2+	b_3^+	462,8	425,3	21,2	34,4	30
IFC[CAM]K[+12]ALNPK	2+	γ_8^+	551,8	989,5	21,3	41,3	28,7
	2+	γ_7^+	551,8	842,5	21,3	41,3	28,7
	2+	γ_6^+	551,8	682,4	21,3	41,3	28,7
	2+	γ_5^+	551,8	542,3	21,3	41,3	28,7
WVFITITNDR	2+	γ_8^+	632,8	979,5	21,4	47,3	31,6
	2+	γ_7^+	632,8	832,5	21,4	47,3	31,6
	2+	γ_6^+	632,8	719,4	21,4	47,3	31,6
	2+	γ_4^+	632,8	505,2	21,4	47,3	31,6
WVFITITNDR(13C,15N)	2+	γ_8^+	637,8	989,5	21,4	47,3	31,6
	2+	γ_7^+	637,8	842,5	21,4	47,3	31,6
	2+	γ_6^+	637,8	729,4	21,4	47,3	31,6
	2+	γ_4^+	637,8	515,2	21,4	47,3	31,6
FLRDFWGNPLR(¹³ C, ¹⁵ N)YDT	3+	b_6^+	604,0	699,4	21,4	44,9	30,3
	3+	γ_6^+	604,0	774,4	21,4	44,9	30,3
	3+	γ_6^{2+}	604,0	387,7	21,4	44,9	30,3
	3+	b_5^+	604,0	679,4	21,4	44,9	30,3
IY[+12]SYFPSVISK	2+	γ_9^+	658,4	1027,6	21,7	49,1	32,3
	2+	γ_8^+	658,4	940,5	21,7	49,1	32,3

	2+	γ_7^+	658,4	777,5	21,7	49,1	32,3
	2+	γ_6^+	658,4	630,4	21,7	49,1	32,3
EDNNITLK[+28]LDR	3+	γ_{10}^{2+}	453,6	615,4	21,8	34,2	22,3
	3+	γ_5^{2+}	453,6	336,7	21,8	34,2	22,3
	3+	γ_4^{2+}	453,6	280,2	21,8	34,2	22,3
IINAIPYLGNSYSLLDK	3+	γ_7^+	632,0	825,4	21,9	47,2	32
	3+	γ_6^+	632,0	738,4	21,9	47,2	32
	3+	γ_{13}^{2+}	632,0	741,9	21,9	47,2	32
	3+	γ_7^{2+}	632,0	413,2	21,9	47,2	32
SNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQK[+12]SPTTLQR	4+	γ_{15}^{2+}	921,5	937,0	22,3	80	35
	4+	γ_{12}^{2+}	921,5	709,4	22,3	80	35
	4+	γ_{13}^{2+}	921,5	790,9	22,3	80	35
	4+	γ_{16}^{2+}	921,5	993,0	22,3	80	35
SNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQK	3+	γ_8^+	962,5	1076,5	22,5	71,3	30
	3+	γ_7^+	962,5	913,5	22,5	71,3	30
	3+	γ_4^+	962,5	509,3	22,5	71,3	30
	3+	b_{16}^{2+}	962,5	848,9	22,5	71,3	30
NLDC[CAM]WVDNEEDIDVILKK	3+	γ_9^+	740,0	1072,6	22,7	55,1	37,8
	3+	γ_8^+	740,0	943,6	22,7	55,1	37,8
	3+	γ_6^+	740,0	715,5	22,7	55,1	37,8
	3+	γ_{14}^{2+}	740,0	858,5	22,7	55,1	37,8
YDTEY[+12]YLIPVASSSK	2+	γ_{10}^+	874,4	1064,6	23,2	64,4	40,1
	2+	γ_9^+	874,4	901,5	23,2	64,4	40,1
	2+	γ_8^+	874,4	788,5	23,2	64,4	40,1
	2+	γ_7^+	874,4	675,4	23,2	64,4	40,1
YFEGTKPEDFNPPSSLIEGASEYYDPNYLR	3+	γ_7^+	1166,9	940,5	25,0	86,2	30
	3+	γ_6^+	1166,9	777,4	25,0	86,2	30
	3+	γ_5^+	1166,9	662,4	25,0	86,2	30
	3+	γ_{19}^{2+}	1166,9	1086,0	25,0	86,2	30
NLDC[CAM]WVDNEEDIDVILK	3+	γ_5^+	1045,5	587,4	25,7	77,3	46,5
	3+	γ_3^+	1045,5	373,3	25,7	77,3	46,5
	3+	b_5^+	1045,5	689,3	25,7	77,3	46,5
	3+	b_6^+	1045,5	788,3	25,7	77,3	46,5
IPNLLDDTIYNDTEGFNIESK	3+	γ_8^+	804,4	923,5	26,1	59,8	41,3
	3+	γ_7^+	804,4	794,4	26,1	59,8	41,3
	3+	γ_5^+	804,4	590,3	26,1	59,8	41,3
	3+	b_9^+	804,4	995,5	26,1	59,8	41,3
VNQGAQGILFLQWVR	3+	γ_7^+	577,0	961,6	26,1	43,2	30
	3+	γ_6^+	577,0	848,5	26,1	43,2	30
	3+	γ_4^+	577,0	588,3	26,1	43,2	30
	3+	γ_3^+	577,0	460,3	26,1	43,2	30
AM[Oxi]ININIFM[Oxi]R	2+	γ_8^{2+}	627,8	518,8	26,2	46,9	30
	2+	b_8^+	627,8	933,5	26,2	46,9	30
	2+	b_6^{2+}	627,8	337,2	26,2	46,9	30
	2+	b_8^{2+}	627,8	467,3	26,2	46,9	30
ILGC[CAM]DWYFVPTDEGWTND	3+	γ_{17}^{2+}	730,0	1037,9	31,5	54,3	30
	3+	γ_{14}^{2+}	730,0	872,9	31,5	54,3	30
	3+	b_5^+	730,0	559,3	31,5	54,3	30
	3+	b_6^+	730,0	745,3	31,5	54,3	30

COMMUNICATIONS

1. Publication dans des journaux à comité de lecture

Le chapitre II de ce manuscrit détaillant la caractérisation fine de l'anatoxine tétanique va prochainement donner lieu à une publication dans le journal Vaccine.

New insights in formaldehyde-induced detoxification of the tetanus toxin: chemical modification stoichiometry and characterization of intra- and inter-molecular cross-links

*Nour Al Turihi^{ab}, Sébastien Peronin^b, Arnaud Salvador^a, Fabien Barbirato^c, Vincent
Colombie^c, Céline Rocca^c, Catherine Jourdat^c, Thierry Eynard^b, Jérôme Lemoine^a*

^a Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280 CNRS Université Lyon 1, Université de Lyon,
Villeurbanne, France

^b MTech, Sanofi Pasteur, 31/33 quai Armand Barbès, 69250 Neuville-sur-Saône, France

^c Sanofi Pasteur, 1541 av. Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'étoile, France

Correspondence: Professor Jérôme Lemoine, Institut des Sciences Analytiques,
UMR5280 CNRS Université Lyon 1, Université de Lyon, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne,
France

E-mail: jerome.lemoine@univ-lyon1.fr

Abstract

Formaldehyde is used to convert the tetanus toxin (TT, 150 kDa) into a non-toxic immunogenic toxoid (TTD) to produce a safe vaccine. The detoxification chemistry has been qualitatively studied regarding the nature and positioning of some formaldehyde-induced modifications. However, neither the stoichiometry of the chemical modifications nor intra and inter-chain cross-linking have been yet characterized, though of great interest for definitive elucidation of the detoxification mechanism as well as for future manufacturing follow-up. In order to deepen the action of formaldehyde on TT protein, a single industrial batch of TT was detoxified either with “light” formaldehyde (CH_2O) or “heavy” deuterated formaldehyde (CD_2O), then isolated by SDS-PAGE. Trypsin hydrolysate of the equimolar CH_2O - and CD_2O -treated toxin mixture was finally analyzed by nano chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) leading to a protein sequence coverage of 90% calculated from non-modified peptides. Modified peptides were easily pinpointed thanks to their characteristic doublet-like isotopic profile, which enabled to calculate the number of formaldehyde-induced chemical modification per peptide. A label-free quantification approach based on the reconstructed peak area from the first MS dimension of both the non-modified and modified forms of each peptide lead to the following findings: i) the non-modified forms show the most intense signals; among the modified peptides, those harboring methylene bridge and Schiff base are predominant, while methylol, methyl and dimethyl derivatives are of weak abundances. Furthermore, methylene-type cross-links between the light and heavy chains of TTD were unambiguously characterized for the first time, thanks to accurate mass measurements of the peptide ions (resolution 500 000 at m/z 200) and manual inspection of their fragmentation spectra. These cross-links definitely underpin why the light and heavy chains linked with a disulfide bridge do not dissociate after reducing treatment, thus TTD safety.

Keywords : Tetanus toxoid, Formaldehyde-induced modifications, NanoLC-MS/MS, Structural characterization, Label-free quantification

Abbreviations: TT : tetanus toxin, TTD : tetanus toxin detoxified with formaldehyde, TTdD : tetanus toxin detoxified with deuterated formaldehyde, nanoLC-MS/MS : nano liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, MS : mass spectrometry, SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, CH₂O : formaldehyde, CD₂O : deuterated formaldehyde, LC : light chain, HC : heavy chain, H_{CN} : N-terminus of the heavy chain, TTFC : Tetanus Toxin Fragment C, SV2 : synaptic vesicle protein, GPI : glycosylphosphatidylinositol, SNAP-25 : Synaptosomal-associated protein 25, GABA : γ -Aminobutyric acid, CNS : central nervous system, AAA : amino acid analysis, DTT : DL-dithiothreitol, IAM : iodoacetamide, ABC : ammonium bicarbonate, ACN : acetonitrile, H₂O : water, TFA : trifluoroacetic acid, FA : formic acid, MS1 : first stage of mass spectrometry, MS2 : second stage of mass spectrometry, fluorescence spectroscopy, DSF : differential scanning fluorimetry, and CD : circular dichroism, HCD : Higher-energy collisional dissociation, CID : Collision-induced dissociation.

I. Introduction

Tetanus is a toxic infection caused by bacteria *Clostridium tetani* and is still responsible for more than 56,000 human deaths in 2015. A large part of the victims (more than 19 000) are newborns who are contaminated by *Clostridium tetani* spores from soiled medical devices used to cut the umbilical cord [1]. After germination in an anaerobic wound, the bacteria releases two exotoxins including tetanospasmin, also called tetanus toxin (TT), which is the most potent neurotoxin known to date [2], [3]. In bacteria, TT is first synthesized as a single chain and non-toxic protein of 1315 amino-acids. TT then undergoes a proteolytic maturation including loss of the N-terminal methionine residue and an enzymatic cleavage by clostridial proteases [2]. Mature TT (150.6 kDa) is thus composed of an heavy (98.3 kDa) and a light chain (52.3 kDa) linked by a single disulfide bond (Cys 440 - Cys 467) [4]–[6]. Another disulfide bond is present in the heavy chain (Cys869- Cys1093) [7]. Very recently, mature TT protein structure has been resolved by X ray diffraction [7] that showed three domains : a Zn^{2+} - metalloprotease light chain [8], a C-terminus heavy chain (Tetanus Toxin Fragment C, TTFC also called H_{CC}, 51.6 kDa) possessing neuro-specific binding property (ganglioside receptors) and a N-terminus heavy chain (H_{CN}) allowing membrane translocation [8]–[13]. The toxicological and finally lethal action of TT is well understood. First, TT binds to peripheral neuronal synapses through interaction with polysialogangliosides, then is internalized and travels via the axon by retrograde transport up to the spinal cord and central nervous system (CNS). Within inhibitory neurons vesicles, TT undergoes a conformational change allowing the translocation of the light chain to the cytosol. The disulfide bridge linking the light and heavy chains of TT is reduced by thioredoxin and lead to the release of the light chain into the cytosol [19], [20]. At last, the light chain acts as a zinc endopeptidase specifically catalyzing synaptobrevin-2 hydrolysis between Gln76 -Phe77. Hence, synaptobrevin-2 can no longer complexed with SNAP-25 and

syntax-1, which finally inhibits the release of neurotransmitters (glycine, γ aminobutyric acid (GABA)) and lead to muscle spasms [9], [21], [22].

Vaccine immunization is the only effective way to protect against tetanus disease. The main component of the vaccine developed by G.Ramon in the 1930s [24] is a non-toxic and immunogenic protein named tetanus toxoid (TTD) obtained by inactivating tetanus toxin with formaldehyde [25]. Formaldehyde mainly reacts on primary amines (side chain of the lysine residue) to form a reversible methylol derivative, [26] leading to a Schiff base through dehydration. Under reducing conditions, the Schiff base is converted into methyl and dimethyl derivatives. The Schiff base can alternatively react with the side chains of vicinal amino-acid residues such as arginine, asparagine, glutamine, histidine, tryptophan, and tyrosine to form an irreversible methylene bridge [27], [28]. In the case of TTD protein, Thaysen Andersen *et al.* characterized about 50 sites that react with formaldehyde to form Schiff bases, methylol and methyl adducts [29], [30]. The presence of cross-links between TTD light and heavy chain is indirectly deduced from SDS-PAGE analysis under reducing condition [29]–[32] or amino acid analysis (AAA) [29] [30]. However, these have never been molecularly characterized and positioned on the toxoid. Hence, in-depth qualitative but also quantitative characterization of TTD would be therefore useful to precisely understand the molecular basis of the detoxification mechanism as well as for a future follow-up method of vaccine production. For this purpose, we thoroughly manually inspected and interpreted the fragmentation spectra (nanoLC-MS/MS) of the trypsin hydrolysate obtained from an equimolar mixture of TT detoxified with either CH_2O or CD_2O [27] in non-reducing condition, then purified by SDS-PAGE. Thanks to facilitated pinpointing of the chemical modifications, we were able to considerably extend the number of sites targeted by formaldehyde as well as to locate intra- and inter-chain methylene bridges. A label-free quantification based on the reconstructed peptide peak areas from the MS

experiment was finally carried out for estimating the rate of native and formaldehyde-modified forms on each reacting site. [34]. [30]–[33].

II. Experimental procedures

Chemicals and reagents

Formaldehyde (37% w/w), deuterated formaldehyde (20% w/w), ammonium bicarbonate (ABC), DL-dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAM) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). RapiGest SF was purchased from Waters (Milford, MA, USA). Trypsin/Lys-C mix was purchased from Promega (Madison, WI, USA). Pure water (H₂O), acetonitrile (ACN) and formic acid (FA) were LC/MS grade.

4-15% Criterion TGX precast gel, molecular mass protein markers (Precision Plus Protein™ Prestained Standards), 4X sample buffer, 20X reducing agent and 10X running buffer were purchased from Biorad (Hercules, CA, USA). GelCode™ Blue Stain Reagent (Coomassie blue) and trifluoroacetic acid (TFA) was ordered from Thermo Scientific (Rockford, IL, USA).

A same batch (FA632908) was used for tetanus toxin (TT), CH₂O-treated and CD₂O-treated tetanus toxin and their protein nitrogen concentration (0.13 g/L) were determined by Kjeldhal method. All the samples were produced at Sanofi Pasteur (Marcy l'Etoile, France).

SDS PAGE analysis

The SDS-PAGE was carried out under both reducing and non-reducing conditions. Samples were prepared by mixing 70 µL of TT or TTD solution, 16 µL of water, 6 µL of reducing buffer and 30 µL of sample buffer. For unreduced samples, the reducing buffer was replaced by water. Thereafter, samples were thermally denatured at 100°C for 5 minutes, loaded onto a 4-15% Tris-Glycine gel. Molecular weight markers were used for mass calibration. 80 V and 200 V were applied to the gel for 15 min and 30 min respectively. Then, proteins were stained by coomassie blue reagent and destained using water.

Samples treatment for nanoLC/MS/MS analysis

Bands corresponding to tetanus toxin, CH₂O-treated and CD₂O-treated tetanus toxins were first excised from the polyacrylamide gel and washed with several successive baths of acetonitrile and 50 mM ammonium bicarbonate buffer. Then, Protein gel bands were reduced by adding 200 µL of 10 mM DTT under stirring at 56 °C. After removing the reducing agent, samples were alkylated with 400 µL of 40mM IAM for 1 h at room temperature in the dark and washed as before. They were denatured with 200µL of 0.1% (w/v) RapiGest SF and incubated at 37°C for 10 min. Protein bands were washed, dried and digested with 20 µg/mL trypsin/lys-C for 20 h at 37°C. The addition of 5 µL of 20% (v/v) FA and 1 µL of TFA stopped digestion. Samples were incubated during 45 min at 37°C to degrade the RapiGest SF. The digested solutions were transferred into a clean 0.5-mL tube. 40 µL H₂O/ACN/FA, 75/25/0.5 (v/v/v) were added to the gel pieces and incubated for 10 min at 4°C. This extraction procedure was repeated once again with 40 µL H₂O/ACN/FA, 50/50/0.5 (v/v/v). Both extracts and digested solution were pooled. Peptide samples were stored at -20°C before nanoLC/MS/MS analysis.

Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry

The peptide mixtures resulting from the tryptic digests were analyzed on a reverse-phase liquid nano-chromatography system coupled with mass spectrometry, composed of an Ultimate 3000 liquid chromatography (Thermo Scientific, Bremen, Germany) coupled in-line with an orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Peptides were loaded onto the trapping column (PepMap100, C18, 300 µm × 5 mm, 100 Å), using µL-picked up injection, for 3 min at a flow rate of 20 µL/min with 100% H₂O/ACN/TFA, 98/2/0.05 (v/v/v) and then separated on an analytical column (Easy-Spray C18 75 µm × 500 mm, 2 µm

bead diameter column) using a gradient of solvent A H₂O/FA, 100/0.1 (v/v) and solvent B H₂O/ACN/FA, 20/80/0.1 (v/v/v) at a flow rate of 300 nL/min. The gradient was composed of a 100 min-linear gradient from 98 to 63% of solvent A, 20 min-linear gradient from 63 to 48% of solvent A and 8 min-linear gradient from 48 to 10% of solvent A.

MS(/MS) data were acquired on an Orbitrap Fusion Lumos as follows: All MS¹ spectra were acquired over m/z 200–2000 in the orbitrap 120 K resolution at 200 m/z ; automatic gain control (AGC) was set to accumulate 4×10^5 ions, with a maximum injection time of 70 ms. Data-dependent tandem MS analysis was performed using a top-speed approach (cycle time of 5 s) with multiple fragmentation methods tested. All MS² spectra were acquired in the orbitrap at a resolution of 15000 (measured at 200 Th). The normalized collision energy was set between 25 and 35 % for HCD and CID. The intensity threshold for fragmentation was set to 5000 and included charge states 2+ to 6+. A dynamic exclusion of 10 s was applied. AGC was set to 50000 with a maximum injection time set at 22 ms.

Data analysis

Data were processed using Thermo Proteome Discoverer (v 2.1) with SEQUEST for protein identification against protein database containing tetanus toxin sequence (uniprot accession number P04958). Parameters were set as follows: MS1 tolerance of 10 ppm; MS2 mass tolerance of 0.02 Da ; enzyme specificity was set as trypsin with two missed cleavages allowed; carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification; oxidation of methionine was set as variable modification. All fragmentation spectra of unmodified and formaldehyde-modified peptides were manually interpreted using Xcalibur (v 2.2) Qual Browser.

Three-dimensional structure visualization of tetanus toxin was carried out using Pymol (v 2.0.6), UCSF Chimera (v1.12) and the pdb file (5N0B) of TT structure [7]. Xlink Analyzer (v1.1) was used to calculate distances between the side chains of amino acids and to position methylene bridges on the 3D TT structure.

The accessibility of each amino acid residue was calculated from the crystal structure of tetanus toxin using a described method of Fraczekiewicz and Werner [35]. If the accessibility was more than 50%, residues were in surface below this value they were not exposed at the solvent.

III. Results

Methodology used for unequivocal identification of formaldehyde-induced modifications on TTD

The strategy previously described by Metz *et al.* for studying the formaldehyde-induced chemical modifications of synthetic peptides and protein models by mass spectrometry was here similarly deployed in the case of tetanus toxin (TT) detoxification. Here, aliquots of an industrial production batch of TT were detoxified either with formaldehyde (CH₂O) or deuterated formaldehyde (CD₂O) streamline the manual detection of modified peptides thanks to the isotopic labeling.

CH₂O-treated (TTD) and CD₂O-treated (TTDd) tetanus toxoid monomers were next isolated by SDS-PAGE in reducing condition to discard protein contaminants and toxoid oligomers. Only the bands at an apparent molecular weight of 150 kDa corresponding to linked light and heavy chains of TT were excised, then subjected to trypsin hydrolysis. An equimolar mixture of CH₂O-treated and CD₂O-treated hydrolysates was analyzed by nano-chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (nanoLC-MS/MS). Peptides affected by formaldehyde-induced chemical modification were easily distinguished from the native ones thanks to their characteristic isotopic profiles enriched with intense species at + ($n \times 2$) mass units from the monoisotopic ion, where n is the number of formaldehyde-deriving adduct incorporated in the peptide (fig.1).

Manual interpretation of fragmentation spectra of modified-peptides enabled us to identify peptide sequences, the natures and precise locations of formaldehyde-induced modifications.

Tetanus toxoid analysis by nano-LC/MS and -MS-MS

Ion chromatograms of TT and CH₂O-treated toxin were very complex due to the large number of generated peptides from the enzymatic digestion. Chromatograms were not similar because of the emergence of formaldehyde-modified species in TTD. In addition, peaks which matched to unmodified peptides were less intense in TTD than in TT. At last, Chromatograms of CH₂O-treated and CD₂O-treated toxin were almost identical, which demonstrated that toxin reacted similarly in both treatments (fig.3).

Sequence coverages were calculated for each sample without taking into account formaldehyde-induced modifications. Formaldehyde treatment didn't impact the sequence coverage since approximately 90% were obtained in both TT and TTD (fig.4). All detected peptides were validated by hand according to their MS/MS spectrum. The unidentified areas were peptides too short to be observed in nano-LC/MS/MS.

Structural characterization of formaldehyde-modified species

Exhaustive detection and positioning of formaldehyde-modified species on tetanus toxoid (TTD) is challenging as the protein has a high molecular weight (150 kDa) and includes more than 300 formaldehyde-reactive sites. Accordingly, trypsin digestion of TTD can theoretically generate many formaldehyde-modified peptides that complicate the mass spectrometric detection. Furthermore, no software is able to correctly identify and validate all the formaldehyde-induced modifications on proteins. Therefore, the methodology described in this article was used to identify the chemical nature and map the formaldehyde-induced modifications in TTD.

Using this strategy, 106 chemical modifications were unequivocally identified comprising 48 modifications +12.000 Da, 36 methylol adducts, 20 methyls and 2 dimethyls (table 1). These formaldehyde-induced modifications involved 70 amino acids residues including 39 lysines, 8 tyrosines, 13 asparagines, 2 tryptophans, 2 glutamines, 3 arginines, 1 histidine residues and the two amino acid (proline and serine) residues located in N-terminus of chains. All formaldehyde-modified peptides were observed with partial modification meaning that peptides were detected unmodified and modified variant. Surprisingly, we were able to characterize methyl and dimethyl adducts while the industrial detoxification process by formaldehyde is not carried out in reducing conditions

Peptides harboring +12.000 Da adducts were predominant and correspond to either a imidazolidinone group at the N-terminus of the protein or the conversion of the primary amine group into a Schiff base. A mass increment of +12.000 Da as compared to unmodified peptide could also matched to a methylene bridge (cross-link). The experimental findings confirmed results of others studies concerning the fragmentation pattern of methylene bridges during MS fragmentation [29], [36], [37]. Cross-link broke in the collision cell and amino acid residues that were linked by the cross-link had an incremented mass of +12.000 Da (fig.5).

+30.011 Da modifications were characterized in the TTD and ascribed to methylol adducts. Moreover, some methyls and dimethyls were observed and located only on lysine residues. These modifications were probably Schiff bases which were reduced by a reducing agent contained in solution [29]. The dimethylated lysines were produced by additional cycles of Schiff bases formation followed by reductive methylations.

The most impacted amino acid by formaldehyde was the lysine, which is consistent with other studies because of its primary amine [29], [30], [32]. Proline and serine located in N-terminus of the light and heavy chain were impacted by formaldehyde. These amino acids are located in

N-ter of chains and are therefore highly reactive [26]. Two tryptophans and one histidine were detected with +12.000 Da modifications, probably due to cross-links [29]. Furthermore, some arginines were modified as characterized by Thaysen-Andersen et al. [29]. They demonstrated that guanidinium groups of arginine residues reacted with formaldehyde to create methylol derivatives and Schiff bases. Glutamine and asparagine were modified with methylol adducts and +12.000 Da modifications. These +12.000 Da modifications could be a dehydration of the methylol derivative or a cross-link (between glutamine and lysine for example) that was broken during MS analysis. The observed (+12.000 Da) tyrosines were identified as methylene bridges (between tyrosine and lysine), which broke during MS fragmentation.

All detected amino acids as impacted by formaldehyde were located on the entire 3D structure of tetanus toxin. Results showed that formaldehyde-modified amino acid residues were located on all over the protein (fig.6), suggesting that formaldehyde had a non-specific and non-localized action.

Moreover, the average accessibility of formaldehyde-modified amino acid residues calculated according with the Fraczkiwicz and Werner method [30] was 67% (table 1). This result demonstrated that most of detected modified amino acids were exposed to the solvent, which means that formaldehyde reacted preferentially with amino acids on the surface. The active site of TT (His 232-His236) was not detected as impacted by formaldehyde. However, some modifications were located near the catalytic site.

Characterization of formaldehyde-induced intra- and inter-molecular cross-links in the tetanus toxoid

To date, inter-cross-linked peptides in the tetanus toxoid were still uncharacterized because they are probably heterogenous and present in very low abundance [29]. These modified-peptides are relatively heavy and generate very complex fragmentation spectra (MS/MS) that are difficult to interpret. In addition, methylene bridges created by formaldehyde are not specific. Finally, no software is able to correctly identify and validate this kind of modification.

The methodology was successfully performed to unambiguously identify formaldehyde-induced intra- and inter-molecular cross-links in the tetanus toxoid. Compared to other studies [29], [30] sample purifications, the use of deuterated formaldehyde to target formaldehyde-modified peptides and high-resolution analysis on the latest generation LC/MS system allowed us to be more sensitive to characterize cross-links in TTD.

NanoLC-MS/MS analysis of the trypsin-digested toxoid revealed 25 formaldehyde-induced inter-cross-linked peptides localized in the heavy chain, in the light chain and between them (fig.8). Inter-cross-linked peptides were identified at low intensity because of their heavy molecular weight and highly charged.

As expected, all identified inter-cross-linked peptides possessed +12.000 Da modified-lysines (table.2). These modified amino acids allowed to create irreversible methylene bridges inside and between proteins (intra- and inter-protein cross-links). All MS/MS were manually interpreted to perfectly identify peptide sequences. However, the accurate location of the methylene bridge was complicated because of their destruction during MS fragmentation (fig.7).

The MS fragmentation of an inter-cross-linked peptide was performed in two steps [36], [37]. It started with the breakage of the cross-link followed by a peptide backbone fragmentation. Most identified inter-cross-linked peptides had lysines and tyrosines. These amino acids were responsible to create cross-links. Even if it was difficult to perfectly localize methylene bridges in inter-cross-linked peptides, these modifications were mapped in the crystal structure of tetanus toxin to calculate their approximate distances [38]. To achieve this, accessibilities and intrinsic reactivities of amino acids constituting the inter-cross-linked peptides were taken into consideration [26]. Intrinsic reactivities of amino acids were previously assessed [26]. Accessibilities of amino acids in tetanus toxin were calculated from the crystal structure of TT according to the Fraczkiwicz and Werner method [30].

Most of characterized inter-cross-linked in the TTD had an average distance of $\approx 10 \text{ \AA}$, indicating that formaldehyde formed bridges between amino acids close in space. These results suggested that the conformations of TT and TTD were almost similar [31], [32]. The protein conformation must play a primordial role in the creation of these bridges. In addition, the light and heavy chains were sometimes very close especially at the disulfide bridge Cys440-Cys467 and thus allowed the establishment of cross-links between the two chains. Surprisingly, only one identified inter-cross-linked peptide had a very long methylene bridge of $\approx 60 \text{ \AA}$. This result could indicate a change of the protein 3D structure [30], [31].

By looking the 3D toxin structure, these data pointed out that identified methylene bridges were localized everywhere in the protein. These inter-molecular cross-links had to stabilize all the 3D protein structure. Hence, the stability of tetanus toxoid could be greater than the unmodified toxin. This result was confirmed by other studies using fluorescence spectroscopy, differential scanning fluorimetry (DSF) and circular dichroism [30]–[32].

Label-free quantification of formaldehyde-induced modifications in TTD

A MS1 label-free quantification was carried out to estimate the rate of formaldehyde-induced modifications in the tetanus toxoid (fig.9). To our knowledge, no quantification study was conducted to assess it. This quantitation method was based on precursor signal intensity of each peptide. A single raw data file of TTD digested was processed to perform the label-free quantification. Skyline (v 4.1.0) was used to extract the precursor isotope ions (M, M+1, M+2, M+3) signals for the charge states ($z=2,3,4,5,6$) of each peptide from the MS1 raw data. The software integrated all chromatographic peaks and computed the total peak areas of precursor isotope ions for each peptide. All modified peptides by formaldehyde and their unmodified variant with and without one missed cleavage were taken in consideration for the relative quantification of chemical modifications. For each peptide, the conversion rate was calculated as follows: (total peak areas of precursor isotope ions of a variant/ total peak areas of precursor isotope ions of all modified and unmodified variants) *100.

On average in the TTD sample, peptides modified by formaldehyde were impacted by about 35% including 12% due to inter-cross-links, 9% to +12.000 Da modifications, 9% to methyls and 4% to methylols derivatives. The most abundant modifications proved to be the +12.000 Da modifications and the inter-cross-links. Methyls and dimethyls were very scarce. Formaldehyde didn't appear to completely modify TT since the unmodified variants of peptides were predominant (65%).

Fig. 10 highlighted the impact of formaldehyde on peptides seen modified by nanoLC/MS/MS. Most peptides were slightly affected by formaldehyde. Peptides which were very strongly affected by formaldehyde were those modified by intra-protein cross links (e.g IIDYEYK, IIDYEYK(+12.000Da)IYSGPDKEQIADAEINNLIK or methyls (e.g SGDFIK,

SGDFIK(methyl)LYVSYNNNEHIVGYPK). As demonstrated in another study, formaldehyde-induced modifications including methyls and methylene bridges prevent trypsin from acting [29]. Moreover, peptides located in N-ter of chains were highly impacted since they possessed very reactive and accessible primary amines (e.g PITINNFR located in N-ter of the light chain).

IV. Discussions

Before vaccines were placed on the market, they undergo numerous quality controls to guarantee their safety and effectiveness. These tests cause ethical and economic issues because they are generally performed *in vivo* on laboratory animals. In recent years, much progress was carried out to limit the use of these animals. However, these *in vivo* tests remain unavoidable and only the development of a range of *in vitro* methods could reduce, replace or even refine them. These *in vitro* methods could effectively assess vaccine quality and safety and would be less costly, more accurate and faster than the tests currently in use [34].

In the case of tetanus vaccine, formaldehyde detoxification of tetanus toxin (TT) is an essential step which determines the safety and efficacy of the vaccine. Several research works were conducted on tetanus toxoid (TTD) to study the impact of formaldehyde on TTD structure [29]–[32]. These investigations were mainly performed to list criterias which could be used by future *in vitro* methods to monitor the TTD quality. Despite these different research studies, the exact detoxification mechanism is unknown because the primary TTD structure is still poorly characterized. Modifications induced by formaldehyde are heterogeneous, numerous and difficult to identify. Therefore, this study was undertaken to characterize the modifications induced by formaldehyde on tetanus toxoid using the liquid chromatography coupled with mass

spectrometry. These modifications were quantified to assess their impact on TTD and to know which ones were predominant.

The methodology used for toxoid characterization has proven its efficiency in identifying and mapping formaldehyde-induced modifications. As in previous studies [29], [30], these experimental findings highlighted the presence of +12.000 Da modifications and methylol derivatives. The detoxification medium appeared reductive since methyls and dimethyls were identified and located only on lysine residues. These chemical modifications are probably Schiff bases which were reduced by a reducing agent present in the solution. These are likely to reduce toxicity and were already observed by Thaysen Andersen et al [29]. In total, we found more than 100 modifications comprising +12.000 Da modifications, methylol adducts, methyls and dimethyls. Compared to other studies samples purifications, the use of deuterated formaldehyde to target formaldehyde-modified peptides and high-resolution analysis on a latest generation LC/MS system allowed to be very sensitive to characterize a large number of modifications in TTD [29], [30]. We identified twice more chemical modifications than other studies [29], [30].

In addition, formaldehyde-induced cross-links were characterized in TTD (5 inter-chain, 6 intra-heavy chain and 4 intra-light chain). To our knowledge, this type of modification had never been previously identified in the tetanus toxoid. These methylene bridges were created within and between the light and heavy chains during the detoxification process. They probably stabilize the protein structure and partly explain the exact detoxification mechanism of the toxin [29], [30]. Formaldehyde-induced inter-cross-links between the light and heavy chains could prevent the release of the light chain into the cytosol. Moreover, as expected, the lysine amino acid was the most impacted by formaldehyde because of its primary amine. Lysine played a crucial role in the detoxification process and was responsible for intra- and intermolecular

cross-links. This experimental result was in agreement with other studies which observed a drop in primary amines in TTD [29], [30], [32].

For the first time, modifications were mapped in the entire three-dimensional structure of the tetanus toxin. We noticed that they were distributed over the entire 3D structure. Some of them were located on the C-terminus heavy chain (AA : 865-1315), involved in the adhesion of the toxin to neuron membrane. These modifications could then prevent the toxin from binding to the nerves by hiding neuro-receptors. Although toxoid is no longer toxic, the catalytic site containing the "HELIH" motif was not impacted by formaldehyde. However, some modifications were located near the catalytic site of the toxin involved in the cleavage of synaptobrevin. The latter is comprised in the SNARE complex which participates in the release of neurotransmitters. These modifications could limit the accessibility of synaptobrevin and thus preclude its cleavage. Finally, all formaldehyde-induced modifications including cross-links could prevent tetanus toxoid from crossing the membranes of the central nervous system (CNS).

Furthermore, the three-dimensional study of TTD showed that most methylene bridges were built between amino acids close in space ($\approx 10 \text{ \AA}$). Consequently, formaldehyde seems to have few impact on the 3D structure of TTD. The protein conformation must play a primordial role in the creation of these cross-links. Using numerous analytical methods such as circular dichroism (CD), very few differences were observed between the secondary and tertiary structures of TT and TTD [31], [32]. Only the primary structure appears to be strongly impacted by formaldehyde. The three-dimensional and MS studies demonstrated that the chemistry of formaldehyde is not specific since all identified modifications were very heterogeneous (+12,000 Da, methylol adducts, methyls, dimethyls, intra- and intermolecular cross-links) and distributed over the whole protein. These experimental results pointed out that formaldehyde reacted preferentially on the most accessible and reactive amino acids.

After characterizing and mapping the chemical modifications on TTD, we quantified them to know their impact on the protein. To our knowledge, no quantification study was conducted to assess the rate of formaldehyde-induced modifications in the tetanus toxoid. Inter-cross links and +12.000 Da modifications were the most abundants (9 and 12% respectively) whereas methylols derivatives (4%), methyls (9%), dimethyls (0.06%) were very scarce. Formaldehyde didn't appear to completely modify TT since the unmodified variants of identified peptides were predominant (66%). The most accessible and reactive amino acid residues were those that reacted most with formaldehyde such as amino acids located in N-ter of chains. Further investigations have to be conducted to identify least abundant modifications which were not characterized in this study.

To conclude, tetanus toxoid is a complex mixture. The detoxification process could be explained by all the formaldehyde-induced modifications characterized in this study. We can assume that formaldehyde-induced modifications in the TTD must suppress several TT functions: (i) binding and internalization into the neuron (Cterminal of heavy chain), (ii) translocation of the light chain into the cytosol (N-terminal of heavy chain), (iii) cleavage of synaptobrevin (light chain). The alteration of one of these functions may inactivate the TT. An in-depth understanding of formaldehyde's action on toxin at the molecular level is essential for the development of new *in vitro* methods. Formaldehyde-induced modifications in tetanus toxoid could be used as criterias for future *in vitro* methods to control toxoid quality. This characterization methodology can be applied to other formaldehyde-modified proteins to map and identify formaldehyde-induced modifications.

Conflict of interest

No conflicts declared.

Funding

Sanofi Pasteur funded this study.

Author contributions

T.E, J.L, A.S are directors of this study. They were in charge on overall the project and provided a critical revision of the manuscript and helped to concept the research. N.A devised the project, conceived and performed experiments, analyzed and interpreted datas and wrote the paper. S.P. gave critical feedbacks on the entire study, helped to analyzed and interpreted datas. V.C manufactured samples and revised the paper. C.J, C.R, F.B contributed to the design of the study and to the writting of the manuscript. All authors approved the final version to be published.

Acknowledgements

This study was sponsored by Sanofi Pasteur. We thank Guillaume Bourgoïn for their precious help with the SDS PAGE and Mynel Bouhired for their assistance with mass spectrometry. We thank Laurent Thion for their helpfull discussions.

References

- [1] H. H. Kyu *et al.*, “Mortality from tetanus between 1990 and 2015: findings from the global burden of disease study 2015.,” *BMC Public Health*, vol. 17, no. 1, p. 179, Feb. 2017.
- [2] K. G. KRIEGLSTEIN, A. H. HENSCHEN, U. WELLER, and E. HABERMANN, “Limited proteolysis of tetanus toxin,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 202, no. 1, pp. 41–51, 1991.
- [3] H. Bruggemann *et al.*, “The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 3, pp. 1316–1321, Feb. 2003.
- [4] U. Eisel *et al.*, “Tetanus toxin: primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins.,” *EMBO J*, vol. 5, no. 10, pp. 2495–2502, Oct. 1986.
- [5] B. Bizzini, J. Blass, A. Turpin, and M. Raynaud, “Chemical characterization of tetanus toxin and toxoid. Amino acid composition, number of SH and S-S groups and N-terminal amino acid.,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 17, no. 1, pp. 100–105, Nov. 1970.
- [6] B. L. M. van Baar, A. G. Hulst, B. Roberts, and E. R. J. Wils, “Characterization of tetanus toxin, neat and in culture supernatant, by electrospray mass spectrometry,” *Anal. Biochem.*, vol. 301, no. 2, pp. 278–289, Feb. 2002.
- [7] G. Masuyer, J. Conrad, and P. al Stenmark, “The structure of the tetanus toxin reveals pH-mediated domain dynamics,” *EMBO Rep.*, vol. 18, no. 8, pp. 1306–1317, 2017.
- [8] M. A. Breidenbach and A. T. Brunger, “2.3 Å crystal structure of tetanus neurotoxin light chain,” *Biochemistry*, vol. 44, no. 20, pp. 7450–7457, May 2005.
- [9] A. C. Calvo, S. Oliván, R. Manzano, P. Zaragoza, J. Aguilera, and R. Osta, “Fragment {C} of {Tetanus} {Toxin}: {New} {Insights} into {Its} {Neuronal} {Signaling} {Pathway},” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 6, pp. 6883–6901, Jun. 2012.
- [10] P. Emsley *et al.*, “The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 12,

pp. 8889–8894, Mar. 2000.

- [11] C. Fotinou *et al.*, “The crystal structure of tetanus toxin {Hc} fragment complexed with a synthetic {GT}1b analogue suggests cross-linking between ganglioside receptors and the toxin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 34, pp. 32274–32281, Aug. 2001.
- [12] M. Matsuda, D. L. Lei, N. Sugimoto, K. Ozutsumi, and T. Okabe, “Isolation, purification, and characterization of fragment B, the NH₂-terminal half of the heavy chain of tetanus toxin,” *Infect. Immun.*, vol. 57, no. 11, pp. 3588–3593, Nov. 1989.
- [13] C. Chen, Z. Fu, J.-J. P. Kim, J. T. Barbieri, and M. R. Baldwin, “Gangliosides as {High} {Affinity} {Receptors} for {Tetanus} {Neurotoxin},” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 39, pp. 26569–26577, Sep. 2009.
- [14] F. L. Yeh *et al.*, “SV2 Mediates Entry of Tetanus Neurotoxin into Central Neurons,” *PLOS Pathog.*, vol. 6, no. 11, pp. 1–12, 2010.
- [15] K. Bercsenyi *et al.*, “Nidogens are therapeutic targets for the prevention of tetanus,” *Science (80-.)*, vol. 346, no. 6213, pp. 1118–1123, 2014.
- [16] “Cell entry strategy of clostridial neurotoxins. - {PubMed} - {NCBI}.” .
- [17] P. Munro, H. Kojima, J. L. Dupont, J. L. Bossu, B. Poulain, and P. Boquet, “High sensitivity of mouse neuronal cells to tetanus toxin requires a GPI-anchored protein,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 289, no. 2, pp. 623–629, Nov. 2001.
- [18] A. Rummel, S. Mahrhold, H. Bigalke, and T. Binz, “The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction,” *Mol. Microbiol.*, vol. 51, no. 3, pp. 631–643, Feb. 2004.
- [19] M. Pirazzini, D. Azarnia Tehran, O. Leka, G. Zanetti, O. Rossetto, and C. Montecucco, “On the translocation of botulinum and tetanus neurotoxins across the membrane of acidic intracellular compartments,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1858, no. 3, pp. 467–474, Mar. 2016.
- [20] G. Schiavo, E. Papini, G. Genna, and C. Montecucco, “An intact interchain disulfide bond is

- required for the neurotoxicity of tetanus toxin,” *Infect. Immun.*, vol. 58, no. 12, pp. 4136–4141, Dec. 1990.
- [21] O. Rossetto, M. Scorzeto, A. Megighian, and C. Montecucco, “Tetanus neurotoxin,” *Toxicon*, vol. 66, pp. 59–63, May 2013.
- [22] O. Rossetto, M. Seveso, P. Caccin, G. Schiavo, and C. Montecucco, “Tetanus and botulinum neurotoxins: turning bad guys into good by research.,” *Toxicon*, vol. 39, no. 1, pp. 27–41, Jan. 2001.
- [23] S. Dalal, J. Samuelson, J. Reed, A. Yakubu, B. Ncube, and R. Baggaley, “Tetanus disease and deaths in men reveal need for vaccination,” *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 94, no. 8, pp. 613–621, Aug-2016.
- [24] F. B. Rogers and R. J. Maloney, “Gaston Ramon,” *Arch. Environ. Heal. An Int. J.*, vol. 7, no. 6, pp. 723–725, Dec. 1963.
- [25] J. P. Robinson, J. B. Picklesimer, and D. Puett, “Tetanus toxin. {The} effect of chemical modifications on toxicity, immunogenicity, and conformation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 250, no. 18, pp. 7435–7442, Sep. 1975.
- [26] B. Metz *et al.*, “Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 8, pp. 6235–6243, Feb. 2004.
- [27] B. Metz *et al.*, “Identification of Formaldehyde-Induced Modifications in Proteins: Reactions with Insulin,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 17, no. 3, pp. 815–822, May 2006.
- [28] B. W. Sutherland, J. Toews, and J. Kast, “Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions,” *J Mass Spectrom*, vol. 43, no. 6, pp. 699–715, Jun. 2008.
- [29] M. Thaysen-Andersen, S. B. Jørgensen, E. S. Wilhelmsen, J. W. Petersen, and P. Højrup, “Investigation of the detoxification mechanism of formaldehyde-treated tetanus toxin,” *Vaccine*, vol. 25, no. 12, pp. 2213–2227, Mar. 2007.

- [30] C. Bayart, S. Peronin, E. Jean, J. Paladino, P. Talaga, and M. Le Borgne, “The combined use of analytical tools for exploring tetanus toxin and tetanus toxoid structures,” *J. Chromatogr. B*, vol. 1054, no. Supplement C, pp. 80–92, 2017.
- [31] H. Alsarraf *et al.*, “Biophysical comparison of diphtheria and tetanus toxins with the formaldehyde-detoxified toxoids, the main components of diphtheria and tetanus vaccines.,” *Virulence*, vol. 8, no. 8, pp. 1880–1889, Nov. 2017.
- [32] B. Metz *et al.*, “Physicochemical and immunochemical assays for monitoring consistent production of tetanus toxoid,” *Biologicals*, vol. 41, no. 4, pp. 231–237, Jul. 2013.
- [33] H. A. Behrens-Nicol, U. Bonifas, B. Kegel, K. Silberbach, B. Krämer, and K. Weisser, “In vitro determination of tetanus toxicity by an endopeptidase assay linked to a ganglioside-binding step,” *Toxicol Vitr.*, vol. 24, no. 3, pp. 988–994, Apr. 2010.
- [34] B. Metz, C. F. M. Hendriksen, W. Jiskoot, and G. F. A. Kersten, “Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems,” *Vaccine*, vol. 20, no. 19–20, pp. 2411–2430, Jun. 2002.
- [35] R. Fraczkiwicz and W. Braun, “Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules,” *J. Comput. Chem.*, vol. 19, no. 3, pp. 319–333, 1998.
- [36] S. Srinivasa, “Comparison of formaldehyde with established crosslinkers to characterize transient protein structures using mass spectrometry.” 2017.
- [37] X. Ding, “A method to characterize formaldehyde cross-linking in proteins by mass spectrometry,” 2011.
- [38] J. Kosinski, A. von Appen, A. Ori, K. Karius, C. W. Müller, and M. Beck, “Xlink Analyzer: Software for analysis and visualization of cross-linking data in the context of three-dimensional structures,” *J. Struct. Biol.*, vol. 189, no. 3, pp. 177–183, 2015.

Figures :

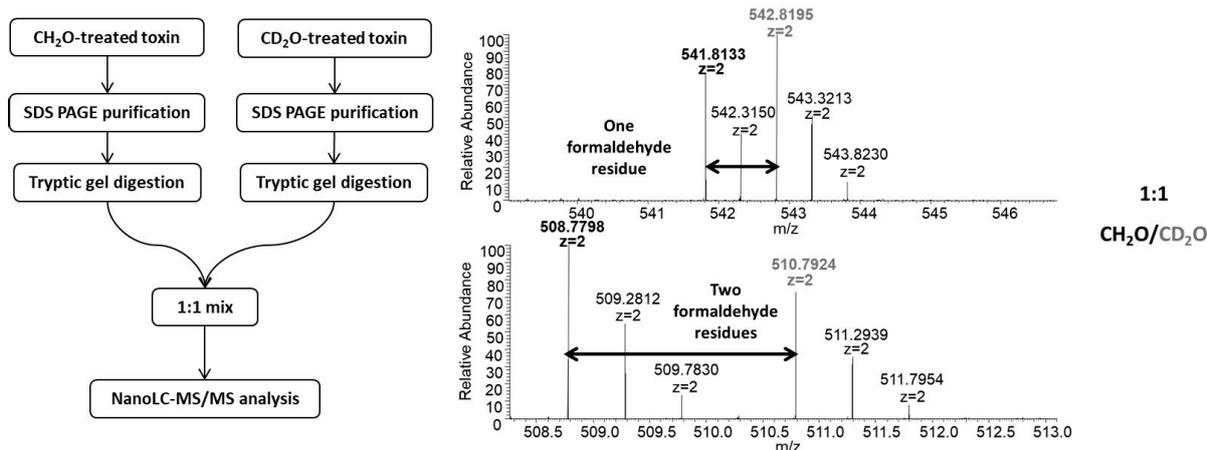


Fig. 1: Methodology applied for the identification of all formaldehyde-modified peptides.

Formaldehyde-modified peptides appear as mass spectral doublets (peptide pairs) contrary to unmodified peptides (no peptide pairs) in the mixture of equimolar amounts of digested CH₂O-treated and CD₂O-treated toxin. Peptide pairs have mass differences of $n \cdot (2 \text{ Da})$, where n is the number of formaldehyde residues incorporated in the peptide.

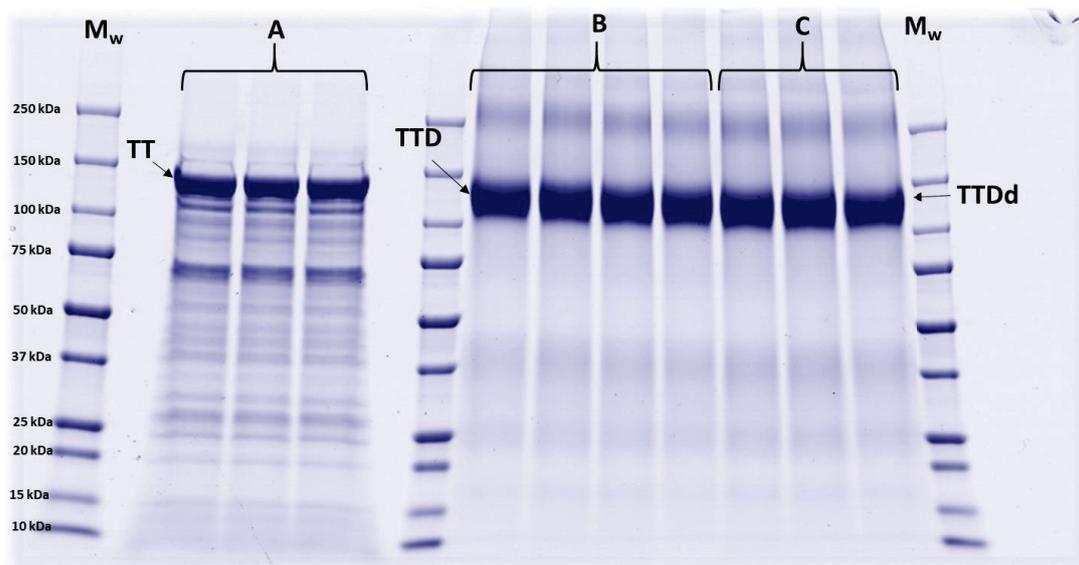


Fig. 2: Purification by SDS-PAGE of untreated toxin (A), CH₂O-treated and CD₂O-treated toxin samples under non-reducing denaturing conditions (B and C respectively). M_w indicates molecular mass markers. Both TT and TTD appear as very intense bands at 150 kDa.

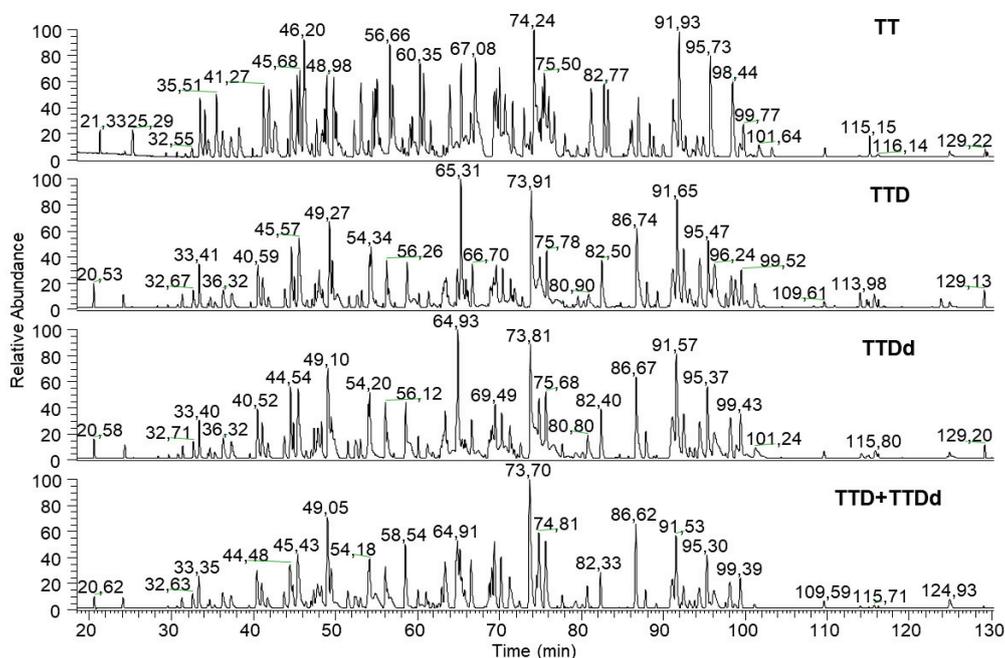


Fig. 3: Base peak chromatograms of untreated toxin (TT), CH₂O-treated (TTD), CD₂O-treated toxin (TTDd), and the mixture of equimolar amounts of digested CH₂O-treated and CD₂O-treated toxins (TTD+TTDd)

```

1      PITINNFRY SDPVNNDTII MMEPPYCKGL DIYYKAFKIT DRIWIVPERY EFGTKPEDFN PPSSLIEGAS EYDPPNYLRT
81     DSDKDRFLQT MVKLFNRIKN NVAGEALLDK IINAIPYLGK SYSLLDKFDT NSNSVSEFLL EQDPSGATTK SAMLTNLIIF
161    GPGPVLNKNE VRGIVLRVDN KNYFPCRDGF GSIQMMAFCE EYVPTFDNVI ENITSLTIGK SKYFQDPALL LMHELIHVLH
241    GLYGMQVSSH EIIPSKQEIY MQHTYPISAE ELFTFGGQDA NLISIDIKND LYEKTLDNYK AIANKLSQVT SCNDPNIDID
321    SYKQIYQQKY QFDKDSNGQY IVNEDKFKIL YNSIMYGFTE IELGKKFNK TRLSYFSMNH DPKIPNLLD DTIYNDTEGF
401    NIESKDLKSE YKQGNMRVNT NAFRNVDSGS LVSKLIGLCK KIIPPTNIRE NLYNRTASLT DLGGELCIKI KNEDLTFIAE
481    KNSFSEEPFQ DEIVSYNTRK KPLNFNYSLD KIIVDYNLQS KITLPNDRRT PVTRGIPYAP EYKSNAASTI EIHNIDDNTI
561    YQYLYAQKSP TTLQRITMTN SVDDALINST KIYSYFPSVI SKVNQGAQGI LFLQWVRDII DDFTNESSQK TTIDKISDVS
641    TIVPYIGPAL NIVKQGYEGN FIGALETTGV VLLLEYIPEI TLPVIAALSI AESSTQKEKI IKTIDNFLEK RYEKWIEVYK
721    LVKAKWLGTV NTQFQKRSYQ MYRSLEYQVD AIKKIIDYEV KIYSGPDKEQ IADEINNLRN KLEEKANKAM ININIFMRES
801    SRSFLVNQMI NEAKKQLEF DTQSKNILMQ YIKANSKFIG ITELKKLESK INKVFSTPIP FSYSKNLDGW VDNEEDIDVI
881    LKKSTILNLD INNDIISDIS GFNSSVITYP DAQLVPGING KAIHLVNNES SEVIVHKAMD IEYNDFNNE TVSFWRVVK
961    VSASHLEQYG TNEYSISSM KKHSLSIGSG WSVSLKGNL IWTLKDSAGE VRQITFRDLP DKFNAYLANK WVFITITNDR
1041   LSSANLYING VLMGSAEITG LGAIREDNNI TLKLDRCNNN NQYVSDKFR IFCKALNPKE IEKLYTSYLS ITFLRDFWGN
1121   PLRYDTEYYL IPVASSKDV QLKNITDYM LTNAPSNTNG KLNIIYRRLY NGLKFIKRY TPNNEIDSFV KSGDFIKLYV
1201   SYNNEHIVG YPKDGNFANN LDRILRVGYN AFGIPLYKRM EAVKLRDLKT YSVQLKLYDD KNASLGLVGT HNGQIGNDPN
1281   RDILIASNWX FNHLKDKILG CDWYFVPTDE GWTND

```

Fig.4: Overlapping of sequences coverages obtained for TT and TTD. Black sequences represent unidentified areas. The green (light chain) and the brown (heavy chain) amino acids indicate the sequences characterized by mass spectrometry for both TT and TTD.

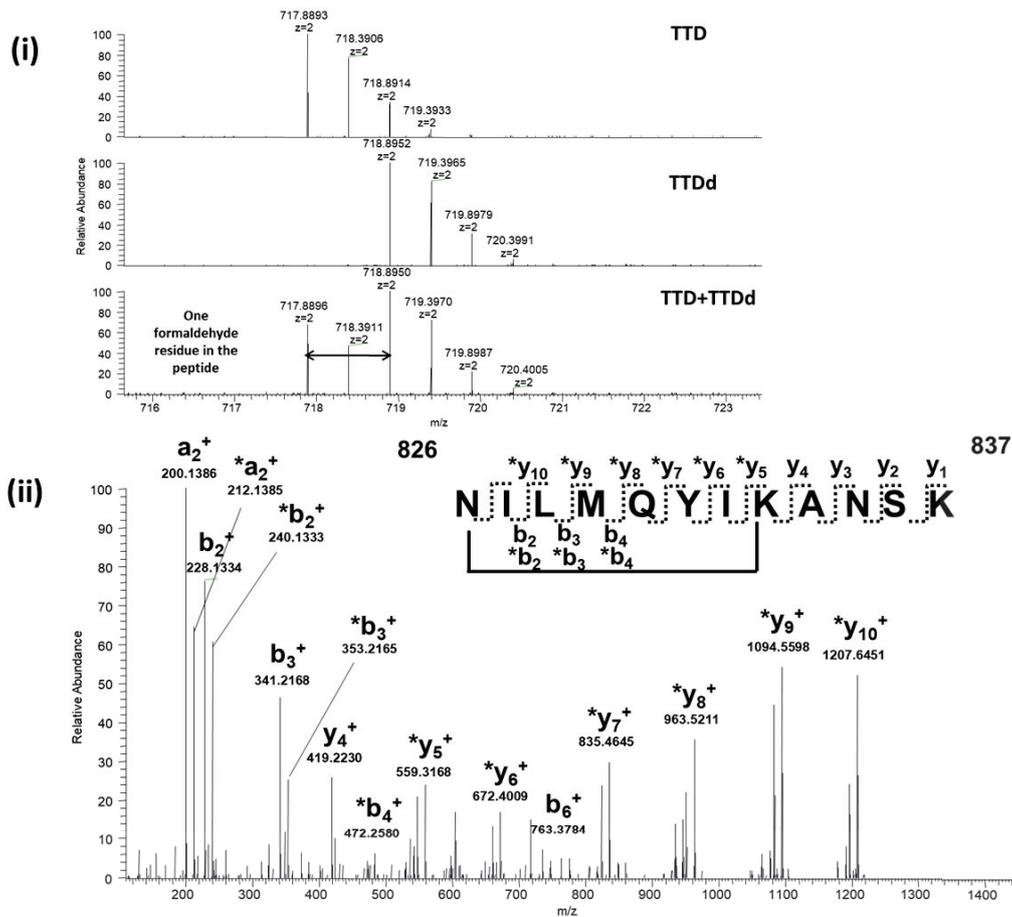


Fig.5: Example of identification of an intra-heavy chain intra-cross-linked peptide NILMQYIK(+12.00)ANSK. The mass spectra (i) shows a formaldehyde-modified peptide, a formaldehyde deuterated modified-peptide and both of these two modified peptides. (ii) indicates HCD spectra of the formaldehyde-modified peptide. One formaldehyde residue was incorporated in the peptide. The modification was a methylene bridge cleaved during MS fragmentation. The richness in b and y ions incremented by +12.00 Da (*) allowed an accurate location of the methylene bridge.

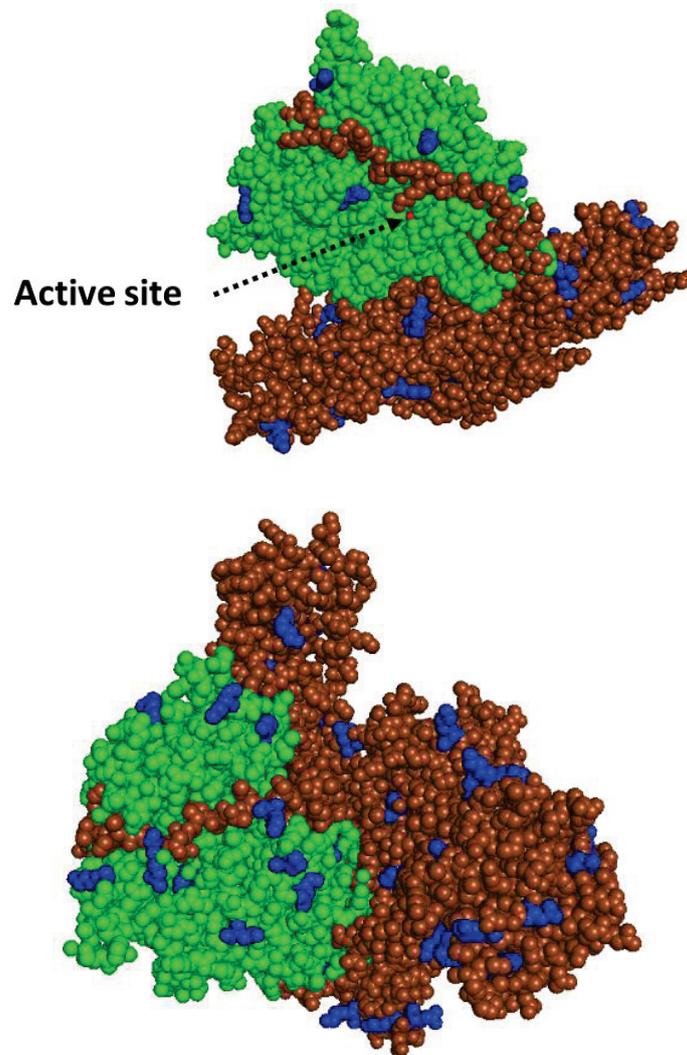


Fig 6: Space fill model of tetanus toxin. The light and heavy chains are coloured in green and brown respectively. Zn²⁺ located in the active site is in red, and all amino acids modified by formaldehyde with +12.000 Da, methylol adducts, methyls or dimethyls are in blue.

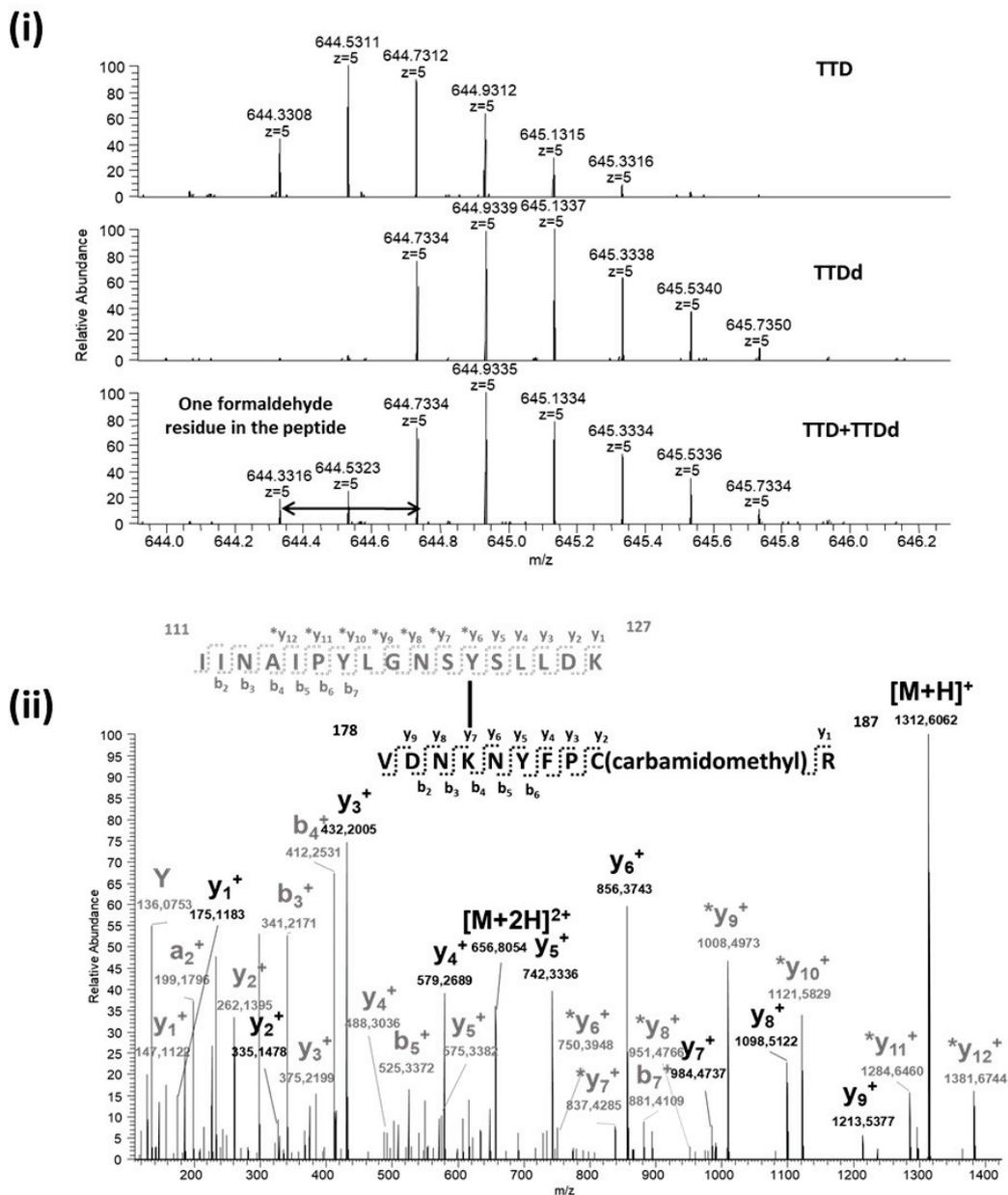


Fig.7: Identification of an intra-light chain inter-cross-linked peptide IINAIPYLGNSY(+12.00)SLLDK[^]VDNKNYFPC(carbamido)R. The mass spectra (i) shows a formaldehyde-modified peptide, a formaldehyde deuterated modified-peptide and both of these two modified peptides. HCD spectra of the formaldehyde-modified peptide. One formaldehyde residue was incorporated in the peptide. Peptides, which were linked by the methylene bridge, are in black and in grey. The richness in b and y ions incremented by +12.00 Da (*) allowed an accurate location of the methylene bridge.

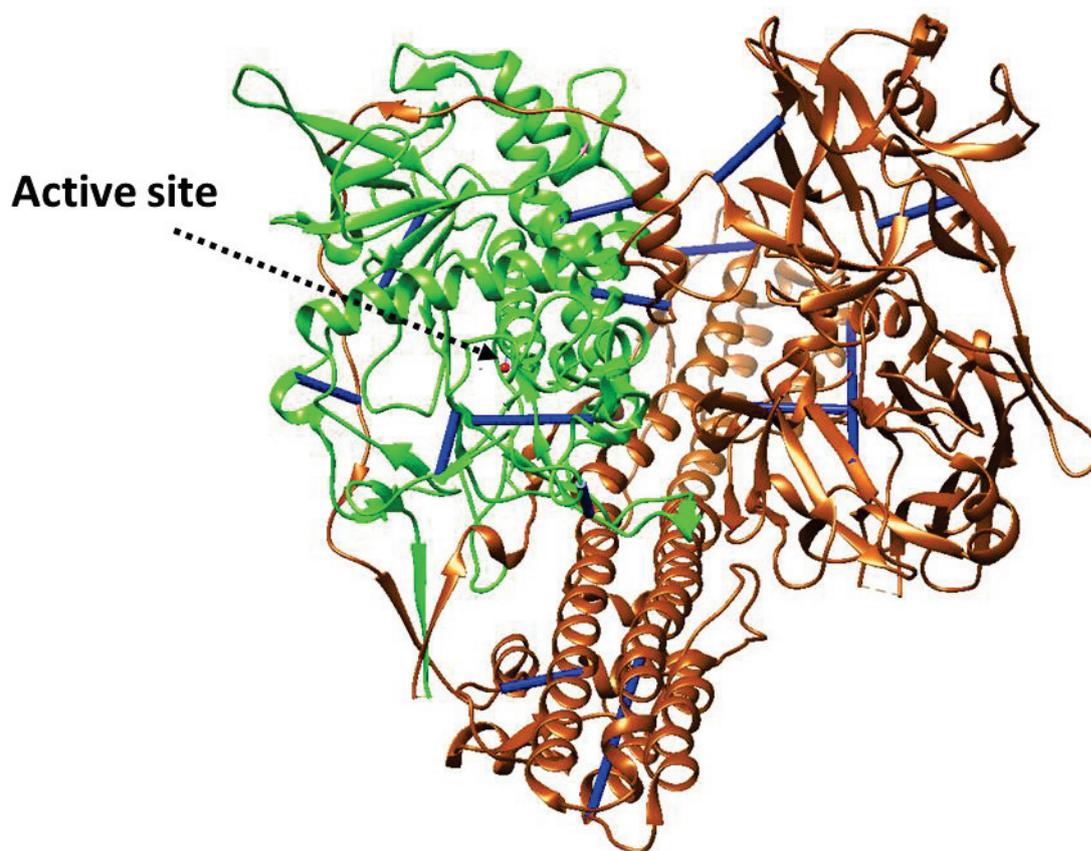


Fig. 8: Crystal structure of tetanus toxin. The light and heavy chains are coloured in green and brown respectively. Zn^{2+} located in the active site is in red and all formaldehyde-induced inter-molecular cross-links characterized are in blue.

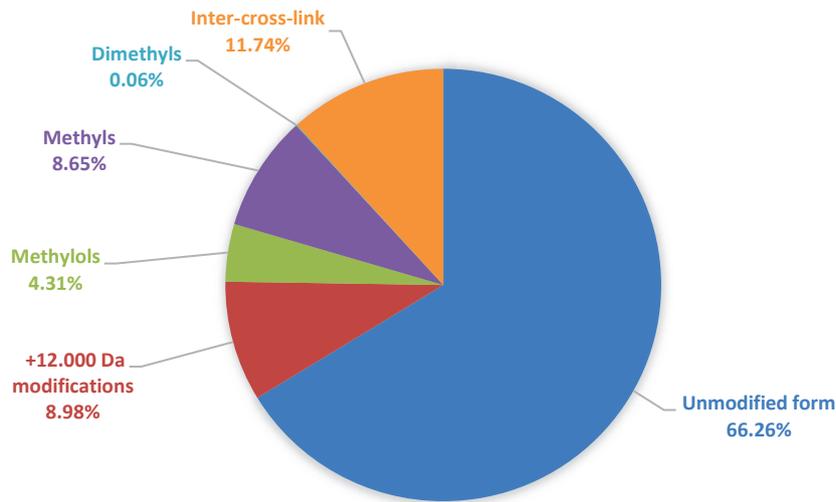


Fig.9: Impact of formaldehyde on the tetanus toxin. All modified peptides by formaldehyde and their unmodified form were taken in consideration for the relative quantification of chemical modifications.

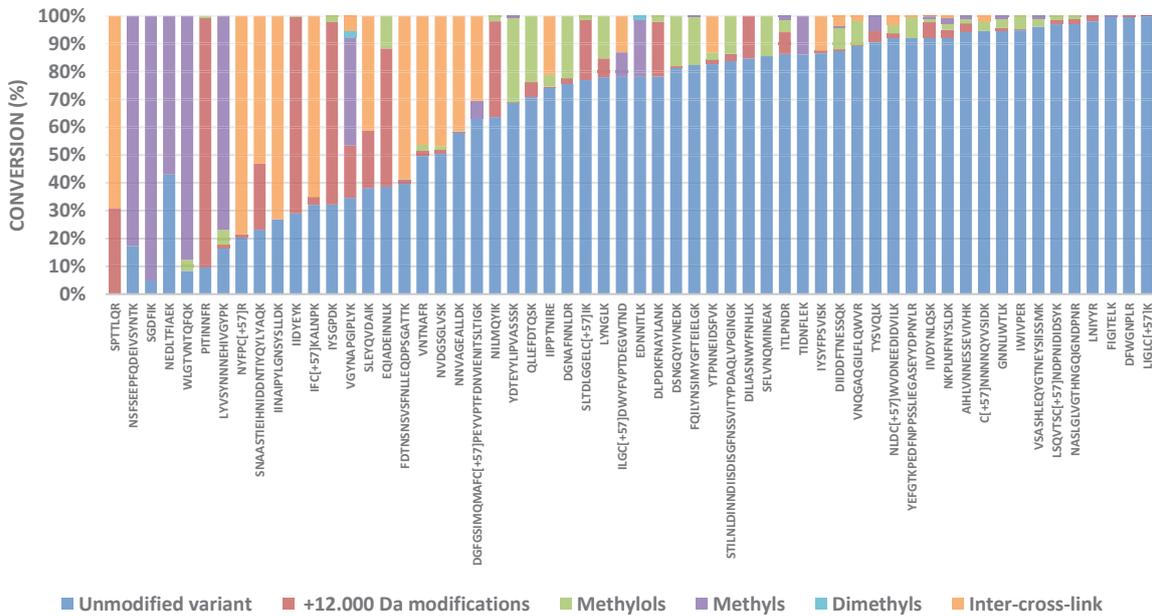


Fig. 10: List of peptides impacted by formaldehyde

Table 1. Formaldehyde-modified peptides with Schiff base or intra-cross-linked peptide (+12.00 Da), methylol adduct (+30.011 Da), methyl and dimethyl. Amino acids in bold were modified.

(2) Accessibilities of amino acid residues were calculated from the crystal structure of tetanus toxin using the Fraczekiewicz and Werner method [35]. An accessibility higher than 50% means that residues are in surface while an accessibility lower than 50% means that residues are not exposed to the solvent.

ΔM (Da)	M_{theo} (Da)	M_{exp} (Da)	Peptide sequence	Mod.	Position	Accessibility ⁽¹⁾ (%)
0,0025	1430,7921	1430,7896	¹²² VGYNAPGIPLYK ¹²³⁹	+12.000	Y ¹²²⁹	12.9
-0,0001	923,5228	923,5230	⁴³ IWIVPER ⁴⁹	+12.000	W ⁴⁴	1.7
0,0033	1203,6499	1203,6466	⁵¹² IIVDYNLQ K ⁵²¹	+12.000	K ⁵²¹	87.6
0,0026	1433,7700	1433,7674	⁸²⁶ NILMQYIKANSK ⁸³⁷	+12.000	K ⁸³³	90.9
0,0018	2982,4861	2982,4843	⁷⁵⁵ IIDYEYKIYSGPDKEQIAD E INNLK ⁷⁷⁹	+12.000	K ⁷⁶¹	73.9
0,0026	2994,4861	2994,4835	⁷⁵⁵ IIDYEYKIYSGPDKE Q IAD E INNLK ⁷⁷⁹	+12.000, +12.000	K ⁷⁶¹ , Q ⁷⁷⁰	92.6 (Q), 73.9 (K)
0,0036	3110,5811	3110,5775	⁷⁵⁴ KIIDYEYKIYSGPDKEQIAD E INNLK ⁷⁷⁹	+12.000	K ⁷⁶¹	73.9 (K)
0,0025	1522,6787	1522,6762	⁶¹⁸ DIIDDF T NESSQ K ⁶³⁰	+12.000	K ⁶³⁰	60.4
0,0036	1483,7558	1483,7522	¹²⁵⁰ TYSVQLKLYDDK ¹²⁶¹	+12.000	K ¹²⁵⁶	23.6
0,0025	2013,0894	2013,0869	⁵¹² IIVDYNLQ S KITLPNDR ⁵²⁸	+12.000	K ⁵²¹	87.6
0,0022	1347,7033	1347,7012	⁸¹⁵ KQLLEFD T Q S K ⁸²⁵	+12.000	K ⁸¹⁵	69.7
0,0021	1033,5630	1033,5610	⁸²⁶ NILMQYI K ⁸³³	+12.000	K ⁸³³	90.9
0,0023	1069,5920	1069,5898	⁹⁹⁷ GNNLIW T LK ¹⁰⁰⁵	+12.000	K ¹⁰⁰⁵	37.9
0,0013	1744,8936	1744,8923	¹²⁸² DILIASNWYFN H LK ¹²⁹⁵	+12.000	K ¹²⁹⁵	100
0,0015	985,5344	985,5330	² PIT I NNR ⁹	+12.000	P ²	96.7

0,0029	997,5344	997,5316	² PITINFR ⁹	+12.000, +12.000	P ² , N ⁷	96.7(P), 85.3 (N)
0,0038	2045,0038	2045,0000	¹²⁶² NASLGLVGTHNGQIGNDPNR ¹²⁸¹	+12.000	N ¹²⁷²	62
0,0018	832,4191	832,4174	⁴¹⁸ VNTNAFR ⁴²⁴	+12.000	N ⁴¹⁹	9.9
0,0019	1714,8453	1714,8434	⁷⁵⁵ IIDYEYKIYSGPDK ⁷⁶⁸	+12.000	K ⁷⁶¹	73.9
0,0037	1920,9369	1920,9332	¹¹⁹⁸ LYVSYNNEHIVGYPK ¹²¹³	+12.000	Y ¹¹⁹⁹	19.2
0,0012	934,5599	934,5588	⁴⁴² IPPTNIR ⁴⁴⁹	+12.000	R ⁴⁴⁹	/
-0,0024	1746,8351	1746,8376	¹¹²⁴ YDTEYYLIPVASSK ¹¹³⁸	+12.000	Y ¹¹²⁸	7.6
0,0009	714,4098	714,4090	⁴³⁵ LIGLC(carbamido)K ⁴⁴⁰	+12.000	K ⁴⁴⁰	26.3
0,0025	1063,6025	1063,6000	⁴⁴² IPPTNIRE ⁴⁵⁰	+12.000	R ⁴⁴⁹	/
0,0028	1799,9529	1799,9501	⁹²² AHLLVNNESSEVIVHK ⁹³⁷	+12.000	H ⁹²⁴	14.9
0,0017	986,5032	986,5016	⁴²⁵ NVDGGLVSK ⁴³⁴	+12.000	N ⁴²⁵	87.2
0,0038	3679,8117	3679,8079	⁵⁴⁴ SNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQKSPITLQR ⁵⁷⁵	+12.000	K ⁵⁶⁸	54.7
0,0008	2079,9418	2079,9410	³⁰⁶ LSQVTSK(carbamido)NDPNIDISYK ³²³	+12.000	Q ³⁰⁸	44.4
0,0022	867,3697	867,3676	¹⁸² NYFPC(carbamido)R ¹⁸⁷	+12.000	N ¹⁸²	51.9
0,0044	2483,1451	2483,1407	¹²⁸ FDTNSNSVSFNLLLEQDPSGATTK ¹⁵⁰	+12.000	K ¹⁵⁰	71.2
0,0026	1146,5053	1146,5028	¹²¹⁴ DGNAFNNLDR ¹²²³	+12.000	N ¹²¹⁶	63.2
-0,0057	1314,6859	1314,6916	⁵⁹² IYSYFSPVISK ⁶⁰²	+12.000	Y ⁵⁹³	6.3
0,0024	1316,6645	1316,6622	⁴⁵⁸ SLTDLGGELC(carbamido)IK ⁴⁶⁹	+12.000	S ⁴⁵⁸	/
0,0033	2058,0269	2058,0236	⁷⁶² IYSGPDKEQIADENNLK ⁷⁷⁹	+12.000	K ⁷⁶⁸	37
0,0026	1154,5931	1154,5906	¹⁰⁰ NNVAGEALLDK ¹¹⁰	+12.000	N ¹⁰⁰	25.1
0,0023	1297,6513	1297,6490	⁷⁶⁹ EQIADENNLK ⁷⁷⁹	+12.000	Q ⁷⁷⁰	92.6
0,0026	1739,9470	1739,9444	⁶⁰³ VNQAQGLFLQWVR ⁶¹⁷	+12.000	N ⁶⁰⁴	35.8
0,0052	1519,7670	1519,7618	¹⁰¹⁸ DLDPKFNAYLANK ¹⁰³⁰	+12.000	K ¹⁰²²	4.6
0,0025	1219,6084	1219,6060	⁸¹⁶ QLLEFDTQSK ⁸²⁵	+12.000	K ⁸²⁵	36.7
0,0021	1463,7408	1463,7388	⁵⁰⁰ NKPLNFNYSLDK ⁵¹¹	+12.000	K ⁵⁰¹	21.2
0,0023	2229,0622	2229,0599	⁸⁶⁶ NLDC(carbamido)WVDNEEDIDVILKK ⁸⁸³	+12.000	N ⁸⁶⁶	78
0,0024	852,4494	852,4470	¹¹⁶² LNYYR ¹¹⁶⁷	+12.000	N ¹¹⁶³	83.7
0,0026	849,4595	849,4570	¹²⁵⁰ TYSVQLK ¹²⁵⁶	+12.000	Y ¹²⁵¹	10.3
0,0052	3509,5938	3509,5886	⁵⁰ YFETKPEDFNPPSSLEGASEYYDPNYLR ⁷⁹	+12.000	K ⁵⁵	71
0,0019	1015,4875	1015,4856	¹¹¹⁶ DFWGNPLR ¹¹²³	+12.000	W ¹¹¹⁸	0.7
0,0022	1392,6157	1392,6136	³³⁵ DSNGQYIVNEDK ³⁴⁶	+12.000	K ³⁴⁶	43.2

0,0129	2751,4628	2751,4499	⁸¹⁵ KQLLEFDTQSKNILMQYIKANSK ⁸³⁷	+12.000	K ⁸¹⁵	69.7
0,0211	4294,0615	4294,0404	⁹²² AHHLVNNESEVIVHKAMDIEYNDMFNNFTVSF WLR ⁹⁵⁷	+12.000	Y ⁹⁴³	64
0,0034	2073,9279	2073,9245	³³⁰ YQFDKDSNGQYIVNEDK ³⁴⁶	+12.000	K ³³⁴	57.9
0,0032	1593,7786	1593,7754	¹¹⁷⁹ RYTPNNEIDSFVK ¹¹⁹¹	+12.000	K ¹¹⁹¹	39.3
0,0042	718,4013	718,3972	¹¹⁶⁹ LYNGLK ¹¹⁷⁴	+12.000	Y ¹¹⁷⁰	16.1
-0,0132	1304,6975	1304,7108	⁷⁴⁴ SLEYQVDAIKK ⁷⁵⁴	+12.000	Y ⁷⁴⁷	26.7
0,0057	1101,6004	1101,5948	¹⁰⁹¹ IFC(carbamido)KALNPK ¹⁰⁹⁹	+12.000	K ¹⁰⁹⁴	83.6
0,0021	4029,0581	4029,0560	⁸⁸⁴ STILNLDINNDIISGFENSSVITYPDAQLVPGING K ⁹²¹	+12.000	N ⁹⁰³	57.7
-0,0063	2015,0894	2015,0957	⁵¹² IIVDYNLQSKITLPNDR ⁵²⁸	+14.016	K ⁵²¹	87.6
-0,0118	679,3384	679,3502	¹¹⁹² SGDFIK ¹¹⁹⁷	+14.016	K ¹¹⁹⁷	26.5
-0,0136	1304,6971	1304,7108	¹²²⁷ VGYNAPGIPLYK ¹²³⁸	+14.016	K ¹²³⁸	41.5
-0,0124	1346,7652	1346,7776	⁷⁰⁰ IKTIDNFLEK ⁷¹⁰	+14.016	K ⁷⁰²	68.5
-0,0157	1533,8146	1533,8303	⁷²⁴ AKWLGTVNTQFQK ⁷³⁶	+14.016	K ⁷²⁵	23.8
-0,0123	1207,6655	1207,6778	¹²⁴⁷ DLKTYSVQLK ¹²⁵⁶	+14.016	K ¹²⁴⁹	51.9
0,0140	1205,6499	1205,6360	⁵¹² IIVDYNLQSK ⁵²¹	+14.016	K ⁵²¹	87.6
-0,0124	1148,6032	1148,6156	⁷⁰³ TIDNFLEK ⁷¹¹	+14.016	K ⁷¹⁰	11.2
-0,0048	1343,6888	1343,6936	¹⁰⁶⁶ EDNNITLKLDR ¹⁰⁷⁶	+14.016	K ¹⁰⁷³	30.8
-0,0091	2357,1052	2357,1143	⁹⁶¹ VSASHLEQYGTNEYSISSMK ⁹⁸¹	+14.016	K ⁹⁸¹	51.4
-0,0131	2485,1451	2485,1582	¹²⁸ FDTNSNSVFNLEQDPSGATTK ¹⁵⁰	+14.016	K ¹⁵⁰	71.2
-0,0117	1801,9529	1801,9646	⁹²² AIHLVNNESEVIVHK ⁹³⁷	+14.016	K ⁹³⁷	5.2
-0,0127	2444,0473	2444,0600	¹²⁹⁶ DKILGC(carbamido)DWYFVPTDEGWTD ¹³¹⁵	+14.016	K ¹²⁹⁷	100
-0,0003	3707,7404	3707,7407	¹⁸⁸⁸ DGFGSIMQMAFC(carbamido)PEYVPTFDNVNIENIT SLTIGK ²²⁰	+14.016	K ²²⁰	3.1
-0,0127	2570,2648	2570,2775	¹¹⁹² SGDFIKLYVSYNNNEHIVGYPK ¹²¹³	+14.016	K ¹¹⁹⁷	26.5
0,0101	2279,1391	2279,1290	³⁴⁷ FQILYNSIMYGFTEIELGK ³⁶⁵	+14.016	K ³⁶⁵	68.3
-0,0133	1192,5818	1192,5952	⁴⁷² NEDLTFIAEK ⁴⁸¹	+14.016	K ⁴⁸¹	59.6
-0,0117	3307,5251	3307,5368	⁴⁷² NEDLTFIAEKNSFSEPFQDEIVSYNTK ⁴⁹⁹	+14.016	K ⁴⁸¹	59.6
-0,0122	1785,9216	1785,9338	⁹⁹⁷ GNNLIWTLKDSAGEVR ¹⁰¹²	+14.016	K ¹⁰⁰⁵	37.9
-0,0151	1465,7408	1465,7560	⁵⁰⁰ NKPLNFNYSLDK ⁵¹¹	+14.016	K ⁵⁰¹	21.2
0,0013	1061,6328	1061,6316	⁸³⁸ FIGITELKK ⁸⁴⁶	+14.016	K ⁸⁴⁵	50.2

-0,0120	2082,9800	2082,9920	⁶¹⁸ DIIDDFFTNESSQKTTIDK ⁶³⁵	+14,016	K ⁶³⁰	60.4
-0,0123	2332,1681	2332,1804	¹¹²⁴ YDTEYYLIPVASSSKDVQLK ¹¹⁴³	+14,016	K ¹¹³⁸	28
-0,0081	1432,7921	1432,8002	¹²²⁷ VGYNAPGIPLYKK ¹²³⁹	+14,016	K ¹²³⁸	41.5
0,0021	1003,5450	1003,5430	² PITINFR ⁹	+30,011	P ²	96.7
0,0022	1081,6131	1081,6110	⁴⁴² IIPPTNIRE ⁴⁵⁰	+30,011	R ⁴⁴⁹	/
0,0020	1087,6025	1087,6006	⁹⁹⁷ GNNLJWTLK ¹⁰⁰⁵	+30,011	K ¹⁰⁰⁵	37.9
0,0031	1757,9576	1757,9546	⁶⁰³ VNQGAAQILFLQWVR ⁶¹⁷	+30,011	N ⁶⁰⁴	35.8
0,0018	1051,5735	1051,5718	⁸²⁶ NILMQYIK ⁸³³	+30,011	K ⁸³³	90.9
0,0024	952,5705	952,5682	⁴⁴² IIPPTNIR ⁴⁴⁹	+30,011	R ⁴⁴⁹	/
0,0024	1221,6604	1221,6580	⁵¹² IIVDYNLQSK ⁵²¹	+30,011	K ⁵²¹	87.6
0,0022	1164,5159	1164,5138	¹²¹⁴ DGNAFNNLDR ¹²²³	+30,011	N ¹²¹⁶	63.2
0,0017	850,4296	850,4280	⁴¹⁸ VNTNAFR ⁴²⁴	+30,011	N ⁴¹⁹	9.9
0,0085	1549,8252	1548,8186	⁷²⁴ AKWLGTVNTQFK ⁷³⁶	+30,011	K ⁷²⁵	23.8
0,0032	2063,0143	2063,0111	¹²⁶² NASLGLVGTNGQIGNDPNR ¹²⁸¹	+30,011	N ¹²⁷²	62
0,0023	1422,7176	1422,7154	⁸⁰³ SFLVQMINEAK ⁸¹⁴	+30,011	K ⁸¹⁴	42
0,0019	1481,7514	1481,7496	⁵⁰⁰ NKPLNFNYSLDK ⁵¹¹	+30,011	K ⁵⁰¹	21.2
0,0021	1209,7080	1209,7060	⁴⁴¹ KIIPPTNIRE ⁴⁵⁰	+30,011	R ⁴⁴⁹	/
0,0032	2097,9524	2097,9492	³⁰⁶ LSQVTSC(carbamido)NDPNIDIDSYK ³²³	+30,011	Q ³⁰⁸	44.4
0,0035	1938,9475	1938,9440	¹¹⁹⁸ LYVSYNNEHIVGYPK ¹²¹³	+30,011	K ¹²¹³	51.7
0,0021	1410,6262	1410,6242	³³⁵ DSNGQYIVNEDK ³⁴⁶	+30,011	K ³⁴⁶	43.2
0,0033	2373,1157	2373,1124	⁹⁶¹ VSASHLEQYGTNEYSISSMK ⁹⁸¹	+30,011	K ⁹⁸¹	51.4
0,0027	2247,0728	2247,0701	⁸⁶⁶ NLDC(carbamido)WVDNEEDIVILKK ⁸⁸³	+30,011	N ⁸⁶⁶	78
0,0020	1315,6619	1315,6600	⁷⁶⁹ EQIADEINNLK ⁷⁷⁹	+30,011	Q ⁷⁷⁰	92.6
0,0079	4047,0687	4047,0608	⁸⁸⁴ STILNLDINNDIISDISGFENSSVITYPDAQLVPGING K ⁹²¹	+30,011	N ⁹⁰³	57.7
0,0048	4395,1143	4395,1095	¹¹²⁴ YDTEYYLIPVASSSKDVQLKNITDYMYLTNAPS YTNGK ¹¹⁶¹	+30,011	K ¹¹³⁸	74.5
0,0095	4339,0670	4339,0575	³³⁰ YQFDKDSNGQYIVNEDKFKILYNSIMYGFTEIEL GK ³⁶⁵	+30,011	K ³³⁴	43.2
0,0029	1817,9635	1817,9606	⁹²² AHILVNNESEVIVHK ⁹³⁷	+30,011	H ⁹²⁴	14.9
0,0018	1537,7776	1537,7758	¹⁰¹⁸ DLDPKFNAYLANK ¹⁰³⁰	+30,011	K ¹⁰²²	4.6
0,0023	1237,6190	1237,6168	⁸¹⁶ QLLEFDTQSK ⁸²⁵	+30,011	K ⁸²⁵	36.7

0,0022	1455,6881	1455,6860	1180YTPNNEIDSFV K ¹¹⁹¹	+30.011	K ¹¹⁹¹	39.3
0,0019	857,4607	857,4588	522TTLPNDR ⁵²⁸	+30.011	R ⁵²⁸	39.1
0,0023	1172,6036	1172,6014	100NNVAGEALLDK ¹¹⁰	+30.011	N ¹⁰⁰	25.1
0,0071	3527,6044	3527,5973	50YEFGT K PEDFNPPSSLIEGASEYYDPNYLR ⁷⁹	+30.011	K ⁵⁵	71
0,0017	1004,5138	1004,5122	425NVDGSGLVSK ⁴³⁴	+30.011	N ⁴²⁵	87.2
0,0019	1540,6892	1540,6874	618DIIDDFTESSQ K ⁶³⁰	+30.011	K ⁶³⁰	60.4
0,0030	2076,0374	2076,0344	762YSGPD K EQIADEINL K ⁷⁷⁹	+30.011	K ⁷⁶⁸	37
0,0022	1497,6517	1497,6496	1077C(carbamido)NNNNQYV SIDK ¹⁰⁸⁸	+30.011	N ¹⁰⁷⁸	79.9
0,0037	2091,9384	2091,9347	330YQFD K KDSNGQYIV NEDK ³⁴⁶	+30.011	K ³³⁴	57.9
0,0041	736,4119	736,4078	1169LYNGL K ¹¹⁷⁴	+30.011	K ¹¹⁷⁴	41.9
0,0272	4421,1167	4421,0895	43IWIVPERYEF G T K PEDEFNPPSSLIEGASEYYDPNYL R ⁷⁹	+30,011	K ⁵⁵	71
0,0064	1365,7140	1365,7076	815 K QLLEFD TQSK ⁸²⁵	+30.011	K ⁸¹⁵	69.7
0,0144	3000,4967	3000,4823	755 I DIY EY K IYSGPD K EQIADEINL K ⁷⁷⁹	+30.011	K ⁷⁶¹	73.9
0,0081	2740,4104	2740,4023	803 S FLV Q MINE A K QLLEFD TQSK ⁸²⁵	+30.011	K ⁸¹⁵	69.7
0,0107	2408,2732	2408,2625	45 I NLYN R TASL T DLGGELC(carbamido) I K ⁴⁷¹	+30.011	N ⁴⁵¹	/
0,0113	2420,2732	2420,2619	45 I NLYN R TASL T DLGGELC(carbamido) I K ⁴⁷¹	+30.011 +12	R ⁴⁵⁵ , N ⁴⁵¹	/
0,0069	1446,7921	1446,7852	1227 V GYN A PI L Y K ¹²³⁹	+28.0312	K ¹²³⁸	41.5
-0,0081	1357,6880	1357,6961	1066 E DN N ITL K LD R ¹⁰⁷⁹	+28.0312	K ¹⁰⁷⁶	30.8
0,0157	3250,6257	3250,6100	603 V N Q A Q IL F L Q W R DIID F T N ESS Q ⁶³⁰	30,011	N ⁶⁰⁴	35.8

Table 2. Formaldehyde-modified peptides with an intermolecular cross-link.

Amino acids underlined were probably involved in the methylene bridge. Those in bold were modified.

(3) Accessibilities of amino acid residues were calculated from the crystal structure of tetanus toxin using the Fraczekiewicz and Werner method. The accessibility vary from 0 % for completely buried residues to 100% for residues in surface.

(4) Distances were calculated with the crystal structure of tetanus toxin.

Δ MI (Da)	M_{theo} (Da)	M_{exp} (Da)	Peptide	Mod.	Position and accessibility (1) (%)	Nature	Calculated methylene bridge length ⁽²⁾ (Å)
0,0033	4546,1167	4546,1134	⁵⁰ YEFGT <u>K</u> PEDENPPSSLLIEGASEYYDPNYLR ⁷⁹ ^{Δ535} GIPYAPEY <u>K</u> ⁵⁴³	+12.00	K ⁵⁵ :71	Inter-chain	≈11
0,0061	4082,1284	4082,1223	⁴⁴² IIPPTN <u>IR</u> E ⁴⁵⁰ ^{Δ576} ITMTNSVDDALINST <u>K</u> IYSYFPSVISK ⁶⁰²	+12.00 +12.00	K ⁵⁹¹ :32.8	Inter-chain	/
0,0000	4210,2234	4210,2234	⁴⁴¹ KIIPPTN <u>IR</u> E ⁴⁵⁰ ^{Δ576} ITMTNSVDDALINST <u>K</u> IYSYFPSVISK ⁶⁰²	+12.00 +12.00	K ⁵⁹¹ :32.8	Inter-chain	/
0,0033	2244,1061	2244,1028	⁵⁰⁰ N <u>K</u> PLNFNYSLDK ⁵¹¹ ^{Δ289} NDLYEK ²⁹⁴	+12.00	K ⁵⁰¹ :21.2	Inter-chain	≈10
0,0060	4767,2367	4767,2307	¹⁸⁸ DGFGSIMQMAFC(carbamido)PEYVPTFDNVIENITSLTIG <u>K</u> SK ²²² ^{Δ738} SYQMYR ⁷⁴³	+12.00	K ²²⁰ :3.1	Inter-chain	≈11
0,0042	4221,2571	4221,2529	¹⁰⁰ NNVAGEALL <u>K</u> IINAIPYLGNSYSLDK ¹²⁷ ^{Δ512} IIVDYNLQSK ³²¹	+12.00	K ¹¹⁰ :25.2	Inter-chain	≈9
0,0029	2479,2124	2479,2095	¹⁰⁷ ^{Δ41} LDRC(carbamido)NNNNQYVSIDK ¹⁰⁸⁸ ^{Δ846} <u>K</u> LESK ⁸⁵⁰	+12.00 +12.00	K ⁸⁴⁶ :94.1 K ⁸⁵⁰ :81.2	Intra-heavy chain	≈63
0,0158	4972,5092	4972,4934	⁵⁴⁴ SNAASTIEIHNDNTIYQLYAQ <u>K</u> SPTTLQR ⁵⁷⁵ ^{Δ744} SLEYQVDAIKK ⁷⁵⁴	+12.00	K ⁵⁶⁸ :54.7	Intra-heavy chain	≈9
0,0249	4844,4143	4844,3894	⁵⁴⁴ SNAASTIEIHNDNTIYQLYAQ <u>K</u> SPTTLQR ⁵⁷⁵ ^{Δ744} SLEYQVDAIKK ⁷⁵³	+12.00	K ⁵⁶⁸ :54.7	Intra-heavy chain	≈9
0,0117	3318,6626	3318,6509	¹⁰⁹ IIFC(carbamido) <u>K</u> ALNPK ¹⁰⁹⁹ ^{Δ866} NLDC(carbamido)WVDNEEDIDVILKK ⁸⁸³	+12.00	K ¹⁰⁹⁴ :23.6	Intra-heavy chain	≈15
0,0102	2234,2269	2234,2167	⁷⁴⁴ SLEYQVDAIKK ⁷⁵⁴ ^{Δ568} <u>K</u> SPTTLQR ⁵⁷⁵	+12.00	K ⁵⁶⁸ :54.7	Intra-heavy chain	≈9
0,0179	4004,0278	4004,0099	⁷⁸⁰ N <u>K</u> LEEK ⁷⁸⁵ ^{Δ603} VNQGAQGILFLQWV <u>R</u> DIIDDFITNESSQK ⁶³⁰	+12.00 +12.00	K ⁷⁸¹ :45 K ⁶³⁰ :60.4	Intra-heavy chain	≈19

0,0138	3097,4489	3097,4351	¹²⁴⁵ LRDLK ^{1249^1296} DKILGC(carbamido)DWYFYPTDEGWTDND ¹³¹⁵	+12.00, +12.00	K ¹²⁴⁹ :51.9 K ¹²⁹⁷ : 100	Intra-heavy chain	≈9
0,0103	2856,4696	2856,4799	¹²²⁷ VGYNAPGIPLYK ^{1239^1179} YTPNNEIDSFVK ¹¹⁹¹	+12.00	K ¹²³⁸ :41.5	Intra-heavy chain	≈9
0,0168	3012,5707	3012,5539	¹²²⁷ VGYNAPGIPLYK ^{1239^1178} RYTPNNEIDSFVK ¹¹⁹¹	+12.00	K ¹²³⁸ :41.5	Intra-heavy chain	≈9
0,0228	6794,3447	6794,3219	¹⁰⁰ NNVAGEALLDKIINAIPLYGNSYSLLDKFDNTNSNSVFNLLLEQDPSGATTK ¹⁵⁰	+12.00	K ¹⁸¹ : 81.5	Intra-light chain	≈12
0,0182	4341,2101	4341,1919	¹⁰⁰ NNVAGEALLDKIINAIPLYGNSYSLLDK ^{127^178} VDNKNYFPC(carbamido)R ¹⁸⁷	+12.00	K ¹⁸¹ : 81.5	Intra-light chain	≈12
0,0228	5669,7622	5669,7394	¹¹¹ IINAIPLYGNSYSLLDKFDNTNSNSVFNLLLEQDPSGATTK ^{150^178} VDNKNYFPC(carbamido)R ¹⁸⁷	+12.00	K ¹⁸¹ : 81.5	Intra-light chain	≈12
0,0127	3216,6276	3216,6149	¹¹¹ IINAIPLYGNSYSLLDK ^{127^178} VDNKNYFPC(carbamido)R ¹⁸⁷	+12.00	K ¹⁸¹ : 81.5	Intra-light chain	≈12
0,0173	3246,6382	3246,6209	¹¹¹ IINAIPLYGNSYSLLDK ^{127^178} VDNKNYFPC(carbamido)R ¹⁸⁷	+12.00, +30.01 I	K ¹⁸¹ :81.5 R ¹⁸⁷ : 34.5	Intra-light chain	≈12
0,0195	5629,7309	5629,7114	⁴¹⁸ VNTNAFRNVDSGLVSK ^{434^373} LSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESK ⁴⁰⁵	+12.00, +12.00	K ³⁸⁴ : 33.3 K ⁴³⁴ : 7.3	Intra-light chain	≈9
0,0251	5659,7415	5659,7164	⁴¹⁸ VNTNAFRNVDSGLVSK ^{434^373} LSYFSMNHDPVKIPNLLDDTIYNDTEGFNIESK ⁴⁰⁵	+12.00, +12.00, +30.01 I	K ³⁸⁴ : 33.3 K ⁴³⁴ : 7.3 N ⁴¹⁹ :9.9	Intra-light chain	≈9
0,0121	4611,2850	4611,2729	¹⁸⁸ DGFGSIMQMAFC(carbamido)PEYVPTFDNVNIENITSLTIGK ^{220^366} KFNIK ^{TR} ³⁷²	+12.00	K ³⁷⁰ : 12.7	Intra-light chain	≈13
0,0152	4483,1901	4483,1749	¹⁸⁸ DGFGSIMQMAFC(carbamido)PEYVPTFDNVNIENITSLTIGK ^{220^366} FNIK ^{TR} ³⁷²	+12.00	K ³⁷⁰ : 12.7	Intra-light chain	≈13
0,0175	5339,5509	5339,5334	¹⁸⁸ DGFGSIMQMAFC(carbamido)PEYVPTFDNVNIENITSLTIGKSK ^{222^413} GQNM ^R VNTNAFR ⁴²⁴	+12.00, +12.00	K ²²⁰ : 3.1 N ⁴¹⁹ : 9.9	Intra-light chain	≈10

2. Poster

NEW INSIGHTS IN FORMALDEHYDE-INDUCED DETOXIFICATION OF THE TETANUS TOXIN: CHEMICAL MODIFICATION STOICHIOMETRY AND CHARACTERIZATION OF INTRA- AND INTER-MOLECULAR CROSS-LINKS

Nour Al Turihj^{ab}, Sébastien Peronin^b, Arnaud Salvador^a, Fabien Barbirato^c, Vincent Colombie^c, Céline Rocca^c, Catherine Jourdat^c Thierry Eynard^b, Jérôme Lemoine^a

^aInstitut des Sciences Analytiques, UMR 5280 CNRS Université Lyon 1, Université de Lyon, Villeurbanne, France

^bSanofi Pasteur, 31/33 quai Armand Barbès, 69250 Neuville-sur-Saône, France

^cSanofi Pasteur, 1541 av. Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'étoile, France

Accepté à : 68th ASMS Conference, Atlanta, Georgia, United States, 2019, 2-6 juin

Résumé

Le médicament prophylactique qui a drastiquement réduit l'impact et la sévérité du tétanos sur les populations humaines est le vaccin antitétanique. Son principe actif appelé anatoxine tétanique résulte de l'inactivation au formaldéhyde de la toxine tétanique. Cette détoxification chimique est une étape critique qui détermine la sécurité, l'antigénicité et l'immunogénicité du vaccin. Pour une meilleure compréhension de ce processus chimique, à l'échelle moléculaire, nous avons dans un premier temps caractérisé l'anatoxine tétanique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem haute résolution (LC-MS/MS) afin d'identifier et de localiser exhaustivement l'ensemble des modifications induites par le formaldéhyde sur la structure tridimensionnelle de la protéine vaccinale. Dans un second lieu, pour un meilleur suivi qualité du procédé industriel de fabrication de l'anatoxine tétanique, nous avons développé des méthodes uniques d'expertise *in vitro* par LC-MS/MS pour réaliser la quantification relative et/ou absolue de la toxine tétanique, de l'anatoxine tétanique, ainsi que pour effectuer la quantification relative des fragments de toxine chimiquement modifiés par le formaldéhyde. Ces outils de caractérisation sont complémentaires aux méthodes de contrôles qualités existantes et contribuent actuellement à un meilleur suivi de la reproductibilité des lots de vaccins antitétaniques.

SPECIALITES : Chimie analytique, biologie

MOTS CLES : Vaccin, anatoxine tétanique, spectrométrie de masse, chromatographie liquide, caractérisation et quantification ciblée de protéines

Abstract

The prophylactic drug, which has drastically reduced the impact and severity of tetanus on human populations, is the tetanus vaccine. Its active ingredient called tetanus toxoid results from the inactivation of tetanus toxin with formaldehyde. This chemical detoxification is a critical step, which determines the safety, antigenicity and immunogenicity of the vaccine. For a better understanding of this chemical process, at the molecular level, we first characterized tetanus toxoid by liquid chromatography coupled with high-resolution tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in order to fully identify and map all the modifications induced by formaldehyde on the three-dimensional structure of the vaccine protein. In a second step, for a better quality control of the industrial process of manufacturing tetanus toxoid, we developed *in vitro* expertise methods by LC-MS/MS to perform the relative and/or absolute quantification of tetanus toxin, tetanus toxoid, and to carry out the relative quantification of the toxin fragments chemically modified with formaldehyde. These characterization tools are complementary to existing quality control methods and currently contribute to better monitoring the reproducibility of tetanus vaccine batches.

SPECIALITIES : Analytical chemistry, biology

KEYWORDS : Vaccine, tetanus toxoid, mass spectrometry, liquid chromatography, Characterization and targeted quantification of proteins

Thèse conduite à l'Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, CNRS, Université Lyon1, ENS, 5, rue de la Doua, 69100 Villeurbanne et à Sanofi Pasteur, 31-33 quai Armand Barbès, 69250 Neuville-sur-Saône