



HAL
open science

Confirmation de biomarqueurs pour le pronostic du sepsis et développement de tests rapides

Christelle Dubois

► **To cite this version:**

Christelle Dubois. Confirmation de biomarqueurs pour le pronostic du sepsis et développement de tests rapides. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS521 . tel-03548703

HAL Id: tel-03548703

<https://theses.hal.science/tel-03548703>

Submitted on 31 Jan 2022

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.

Confirmation de biomarqueurs pour le pronostic du sepsis et développement de tests rapides

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud dans le laboratoire du CEA au Service de
Pharmacologie et d'immunoanalyse

École doctorale n°571 : Sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité chimie

Thèse présentée et soutenue au CEA de Saclay, le 12 décembre 2019, par

Christelle Dubois

Composition du Jury :

Claire Smadja Professeur des universités, Université Paris-Sud (Institut Galien)	Présidente
Joëlle Vinh Directeur de recherche, CNRS (Institut Pierre-Gilles De Gennes)	Rapporteur
Franck Molina Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur
Didier Payen Professeur des universités – Praticien hospitalier, Université Paris 7	Examineur
Pierre Goossens Directeur de recherche, Institut Pasteur (Laboratoire Yersinia)	Examineur
François Becher Ingénieur-Chercheur, CEA Saclay (Service de Pharmacologie et Immunoanalyse)	Directeur de thèse
Nathalie Morel Ingénieur-Chercheur, CEA Saclay (Service de Pharmacologie et Immunoanalyse)	Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury de thèse

Je tiens à remercier Joëlle Vinh et Franck Molina pour avoir évalué mes travaux de thèse en tant que rapporteurs et membres du jury de soutenance.

Je remercie Claire Smadja pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que présidente du jury de soutenance de thèse.

Je remercie Pierre Goossens pour nos échanges et discussions lors des comités de thèse et pour avoir participé à l'évaluation finale de mes travaux de thèse.

Enfin, je remercie le professeur Didier Payen pour sa collaboration, son aide précieuse, l'éclairage clinique qu'il a apporté lors de ces trois ans de thèse et pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

A mes directeurs François Becher et Nathalie Morel

François et Nathalie, merci de m'avoir permis de mener à bien cette thèse. Je vous remercie tous les deux chaleureusement de votre patience, de vos précieux conseils et de m'avoir laissé m'épanouir de façon autonome sans jamais me laisser tomber pendant ces trois années de thèse. François, merci pour ta pédagogie, ta disponibilité et ta bonne humeur. J'ai énormément appris à tes côtés. Nathalie, merci pour ton écoute et ta présence pendant ces trois années de thèse.

A mes collègues

Je tiens à remercier Christophe Junot, responsable du SPI, François Fenaille, responsable du LEMM et Stéphanie Simon, responsable du LERI de m'avoir accueillie et de m'avoir permis de réaliser mes travaux au sein du service entre les deux laboratoires.

Je tiens également à remercier l'entreprise Bertin pour avoir financé ces trois années de recherche.

Je remercie toutes les personnes du service, tous étages confondus, car j'ai eu la chance de faire partie du peu de personnes qui ont pu côtoyer au quotidien tout le 136 !

Merci à tous mes collègues du premier étage Jessica M, Marie Z, Donatien L, Yasmina A, Kathleen R, Sandrine L, Sylvain D, Jennifer H, Fanny L, Simon B, Stéphanie O, Sandrine A, Anne-Laure D, Florence C, Patricia L, Céline C, Sophie C, Benoit C, Alexandre S et Jean-Claude T, ce fut un plaisir de manipuler tous les jours à votre étage, de partager mes pauses de 16h avec vous et d'échanger au quotidien avec vous.

Merci à tous mes collègues du deuxième étage pour votre accueil. Merci à Chloé D, Emeline R, Nihel B, Nicolas G, Stéphanie G, Jihanna A, Victoria D, Rafaël C, Diane G, Emeric D, Audrey R, Elise Y, Mélanie B et Duncan D. J'ai adoré passer du temps avec vous au labo et en dehors. Merci de m'avoir soutenu et regardé manger tous les midis quand je ne pouvais plus aller à la cantine et d'avoir écouté mes aventures et mes lubies. Ça n'aurait pas été pareil sans vous ! Merci à Dom', Hervé V, Hervé Be, Alexandra S, Antoine A, Cécile F, Karine A-P, Stéphane N, Stéphane H, Lucia O, Anita B, Vanina M, Hervé Bo, Julie D, Karla P. Je remercie bien-sûr l'équipe

des monoclonaux Marc P, Karine M-D et Quentin B pour leur aide précieuse. Je remercie également mes anciennes collègues de bureaux Céline G-H, Anne W, Blanche G avec qui j'ai passé de très bons moments. Et bien-sûr je remercie les anciennes qui sont parties mais que je n'oublie pas : Anaïs V, Edyta C et Zouriatou G. Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement Arthur V, Anne-Sophie M, Hélène C et Daniel L de m'avoir supporté tous les jours au CEA mais également à l'extérieur. Vous avez été des supers collègues mais vous êtes surtout des amis en or.

A mes proches

A tous mes amis qui ont essayé de comprendre ma thèse Léa, Marion, Virginie, Nathan, Copélia, Maud, Camille, Barthélémy, Raphaëlle, Iliia, Jules, ma coloc Fanny et tous les autres, je vous remercie pour votre soutien sans faille, votre compréhension, toutes ces années à vos côtés et notre longue amitié qui n'a jamais cessé et qui ne risque pas de s'arrêter malgré la distance.

A Loïc, je te remercie du fond du cœur pour tout. J'ai une chance immense de te connaître et de t'avoir à mes côtés.

Pour terminer, merci à toute ma famille et en particulier mes parents et ma sœur qui ont toujours tout fait pour que je réussisse, qui m'ont soutenu pendant toutes mes années d'étude, qui ont toujours pris soin de moi et qui ont bravé les kilomètres pour être présents le jour de ma soutenance de thèse. C'est grâce à vous que je suis arrivée jusque-là et je vous en serai toujours reconnaissante.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS	8
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE.....	11
I. Le sepsis	11
I.1 Qu'est-ce que le sepsis ?.....	11
I.2 Epidémiologie.....	14
I.3 La réponse de l'hôte au sepsis	15
I.4 Les conséquences sur l'organisme.....	22
I.5 La prise en charge thérapeutique	23
I.6 Le diagnostic du sepsis	24
I.7 Le pronostic du sepsis.....	26
II. Utilisation de biomarqueurs	27
II.1 Qu'est-ce qu'un biomarqueur ?.....	27
II.2 Biomarqueurs protéiques dans le sepsis	27
II.3 De la découverte à la validation des biomarqueurs protéiques	32
III. Les méthodes de quantification des biomarqueurs	35
III.1 L'immunoanalyse pour le dosage de biomarqueurs.....	35
III.2 Quantification de protéines par spectrométrie de masse	44
Objectifs de thèse	83
CHAPITRE 2 : QUANTIFICATION DES CALGRANULINES DANS LE PLASMA HUMAIN.....	85
I. Introduction : les calgranulines.....	85
II. Quantification par ELISA de S100A8/S100A9 et S100A12.....	86
II.1 Développement des ELISA anti-S100A8/S100A9 et anti-S100A12	87

II.2 Article 1 « High plasma level of S100A8/S100A9 and S100A12 at admission indicates a higher risk of death in septic shock patients ».....	109
III. Développement de deux méthodes <i>bottom-up</i> et <i>top-down</i> pour la quantification de S100A8/S100A9	125
III.1 Introduction.....	125
III.2 Article 2 « Top-down and bottom-up proteomics of circulating S100A8/S100A9 in plasma of septic shock patients ».....	126
III.3 Conclusions de l’article.....	163
IV. Discussion et perspectives	164
CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS	167
I. Introduction	167
I.1 Sélection des biomarqueurs candidats	167
I.2 La méthode SISCAPA.....	177
II. Matériel et Méthodes.....	179
III. Résultats et Discussions.....	188
III.1 Cohorte de patients atteints de choc septique	188
III.2 Peptides sélectionnés.....	189
III.3 Développement de la méthode pour la quantification multiplexe des biomarqueurs potentiels majoritaires du plasma	193
III.4 Quantification pseudo absolue de l’haptoglobine	200
III.5 Développement de la méthode pour la quantification multiplexe des biomarqueurs potentiels minoritaires du plasma.....	201
IV. Conclusions et perspectives	230
CONCLUSION GENERALE	236
Références	241

LISTE DES FIGURES

Figure 1 SRIS d'après the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference ¹	12
Figure 2 L'infection par des pathogènes et les lésions cellulaires entraînent la production de PAMPs et de DAMPs qui favorisent la réponse immunitaire. Le dommage des tissus peut être causé ou pas par l'infection.....	17
Figure 3 Reconnaissance des signaux DAMPs et PAMPs par les récepteurs PRRs.....	17
Figure 4 Les 4 familles des récepteurs PRRs	18
Figure 5 La sous-famille des récepteurs TLRs reconnaissent une large gamme de PAMPs des bactéries, champignons, virus et autres parasites, inspirée de Liew <i>et al.</i> 2005 ⁵³	18
Figure 6 Initiation de la réponse pro-inflammatoire.....	20
Figure 7 Initiation des réponses simultanées pro- et anti-inflammatoires	21
Figure 8 Modélisation de l'équilibre entre pro- et anti-inflammatoires, inspirée de Hotchkiss <i>et al.</i> 2013 ⁶⁴	21
Figure 9 Facteurs affectant le rendement des hémocultures, adaptée de Sankar <i>et al.</i> 2013 ⁸⁴	25
Figure 10 Articles publiés sur les biomarqueurs du sepsis d'après une recherche dans la base de données PubMed de " <i>sepsis AND biomarkers</i> " de 1999 et 2018.....	30
Figure 11 Recherche de biomarqueurs, adaptée de Geyer <i>et al.</i> 2017 ¹³⁹	33
Figure 12 Représentation schématique d'un anticorps.....	37
Figure 13 Production des anticorps monoclonaux d'après les travaux de Köhler et Milstein ¹⁵³	38
Figure 14 Représentation schématique de l'interaction antigène anticorps	39
Figure 15 Test ELISA sandwich	41
Figure 16 ELISA indirect	42
Figure 17 Description d'un spectromètre de masse.....	45
Figure 18 Vue d'ensemble de la méthode LC-SRM-MS, adaptée de Angel <i>et al.</i> 2012 ¹⁷⁴	47
Figure 19 Représentation schématique d'un Q-exactive.....	47
Figure 20 Représentation schématique des modes SRM et PRM, d'après Shi <i>et al.</i> 2016 ¹⁸⁰	48
Figure 21 Comparaison des performances SRM et PRM, adaptée de Shi <i>et al.</i> 2016 ¹⁸⁰	49
Figure 22 Le mode d'acquisition SWATH DIA: isolation de peptides appartenant à une plage de masse donnée et fragmentation des peptides simultanément ¹⁹¹	52
Figure 23 Comparaison des performances SRM, PRM et DIA, adaptée de Shi <i>et al.</i> 2016 ¹⁸⁰	53
Figure 24 Description schématique de l'approche bottom-up, inspirée de Chait <i>et al.</i> 2006 ¹⁷¹	54
Figure 25 Fréquence normalisée des sites de coupure de la trypsine pour les 45 paires d'acides aminés les plus courantes, d'après Rodriguez <i>et al.</i> 2008 ¹⁹⁶	54
Figure 26 La gamme dynamique de concentrations de protéines du plasma et les 3 principales catégories de protéines. D'après Surinova <i>et al.</i> 2011 ¹⁴²	57
Figure 27 Différentes stratégies de préparation d'échantillons pour la détection de protéines à différentes concentrations. D'après Gillette <i>et al.</i> 2013 ²¹¹	58
Figure 28 Schéma de la méthode SISCAPA pour la quantification de peptides	60

Figure 29 Principe général d'une expérience de quantification QconCAT, adaptée de Pratt <i>et al.</i> 2006 ²⁴⁵	66
Figure 30 Les différentes stratégies de quantification absolue des protéines	67
Figure 31 Comparaison des peptides AQUA, du concatèmère QconCAT et des étalons PSAQ pour la quantification de SEA et TSST-1 dans les échantillons d'urine. A : ajout des étalons à différentes étapes du processus d'analyse. B : comparaison des trois méthodes pour le titrage de SEA. C : comparaison des trois méthodes pour le titrage de TSST-1. D'après Brun <i>et al.</i> 2009 ²²¹	68
Figure 32 Définition du terme "protéoforme", d'après Smith <i>et al.</i> 2013 ¹⁶⁹	74
Figure 33 Illustration des modifications les plus fréquentes, adaptée de Pagel <i>et al.</i> 2015 ²⁶⁶	75
Figure 34 L'approche "top-down" fournit des informations sur les phénotypes, adaptée de Savaryn <i>et al.</i> 2013 ²⁹⁵	80
Figure 35 Alignement des séquences en acides aminés des protéines S100A8 humaine et murine (Uniprot)	88
Figure 36 Alignement des séquences en acides aminés des protéines S100A9 humaine et murine (Uniprot)	89
Figure 37 Protocole d'immunisation des souris pour l'obtention d'anticorps monoclonaux.....	90
Figure 38 Test ELISA indirect pour l'évaluation des réponses immunitaires des souris. Les différents épitopes de la protéine recombinante sont représentés par les différentes formes. L'AChE est représentée par le cercle marron.	93
Figure 39 Analyse SDS-PAGE dans des conditions réductrice et non-réductrice des protéines recombinantes S100A8, S100A9 et S100A12.....	96
Figure 40 Réponse immunitaire des souris immunisées lors de la première campagne d'immunisations avec les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 et sélectionnées pour la production des anticorps	97
Figure 41 Analyse SDS-PAGE de six anticorps monoclonaux anti-S100A12 en conditions réductrice et non-réductrice.....	100
Figure 42 Stratégie d'immunisation pour la seconde campagne d'immunisation des souris pour l'obtention d'anticorps anti-S100A9.....	102
Figure 43 Réponse immunitaire des souris immunisées lors de la seconde campagne d'immunisations avec la protéine S100A9, S100A9 couplée à la protéine porteuse KLH, S100A9 avec ajout d'anti-CD25 et les adjuvants AF ou alun. Les souris sélectionnées sont encadrées en noir.	104
Figure 44 Courbe standard de S100A8/S100A9 recombinant dilué en tampon caséine de 250 pg/mL à 80 ng/mL (régression non linéaire utilisant une saturation de liaison à deux sites -liaison totale et non-spécifique- avec $R^2=0,9943$)	107
Figure 45 Courbe standard de S100A12 recombinante diluée dans un tampon caséine de 250 pg/ml à 40 ng/ml (modèle linéaire avec $R^2=0,9956$).....	107
Figure 46 Courbe standard de S100A8/S100A9 recombinant dilué en tampon caséine de 250 pg/mL à 80 ng/mL (régression non linéaire utilisant une saturation de liaison à deux sites -liaison totale et non-spécifique- avec $R^2=0,9912$)	108
Figure 47 Comparaison des concentrations mesurées avec les deux ELISA anti-S100A8/S100A9 pour les 49 plasmas de patients atteints d'un choc septique	109

Figure 48 Courbes ROC des scores SOFA et des niveaux plasmatiques de calgranulines mesurés chez les 49 patients atteints d'un choc septique	124
Figure 49 Principe de la méthode SPIE-IA. 1) Immobilisation de l'analyte par l'anticorps coaté sur les microplaques. 2) Réticulation de l'analyte avec l'anticorps. 3) Dissociation du complexe anticorps/analyte (libération de l'épitope). 4) Révélation à l'aide du même anticorps utilisé en traceur. Issu de Volland <i>et al.</i> ⁴⁴⁰	185
Figure 50 Chromatogramme des ions extraits des dix peptides quantotypiques des six protéines à doser dans le plasma humain.....	196
Figure 51 Dosage des 6 protéines fortement concentrées dans les 49 plasmas de patients atteints d'un choc septique.....	199
Figure 52 Evaluation de la linéarité de la méthode de quantification de l'haptoglobine	200
Figure 53 Quantification de l'haptoglobine par IDA dans les 49 plasmas de patients atteints d'un choc septique avec la moyenne des concentrations individuelles des peptides HP-1 , HP-2 et HP-4.....	201
Figure 54 Réponse immunitaire des souris immunisées avec les peptides de amphreguline et angiopoietine-1 et sélectionnées pour la production des anticorps.....	204
Figure 55 Réponse immunitaire des souris immunisées avec les peptides de angiopoietine-2 et CD74 et sélectionnées pour la production des anticorps.....	205
Figure 56 Réponse immunitaire des souris immunisées avec les peptides de granuline et HLAG5 et sélectionnées pour la production des anticorps.....	206
Figure 57 Réponse immunitaire des souris immunisées avec les peptides de HMGB1 et NGAL et sélectionnées pour la production des anticorps.....	207
Figure 58 Réponse immunitaire des souris immunisées avec les peptides de procalcitonine (PCT) et sRAGE et sélectionnées pour la production des anticorps.....	208
Figure 59 Analyse SDS-PAGE de trois anticorps anti-peptide sRAGE en conditions réductrice ® et non-réductrice (NR).....	211
Figure 60 Exemple de gammes de deux peptides SIL (GRAN-2 et PCT-1) en tampon pour comparaison entre chaînes UHPLC et capillaire-LC.....	221
Figure 61 Gamme de calibration de 0,1 ng/mL à 100 ng/mL obtenue en plasma digéré dilué au 1/10 (pondération 1/x)	226
Figure 62 Quantification relative des six protéines faiblement concentrées dans les 49 plasmas de patients atteints d'un choc septique	229
Figure 63 Suivi de l'approche SISCAPA.....	231

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Tableau de calcul du score SOFA (4). VA : ventilation assistée. PAM : pression artérielle moyenne. Amines : dose en γ /kg/mn	13
Tableau 2 Comparaison des différentes méthodes de préparation d'échantillons en termes de sensibilité et de fidélité pour la quantification protéines plasmatiques, adaptée de Hüttenhain <i>et al.</i> ²²⁷	62
Tableau 3 Récapitulatif des réactifs pour les marquages chimiques des protéines et des peptides	64
Tableau 4 Liste d'expériences minimales pour la validation de dosage de quantification de protéines par LC-MS/MS, adaptée de Grant <i>et al.</i> ²⁵⁰	69
Tableau 5 Première campagne d'immunisation pour l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques des protéines S100A8, S100A9 et S100A12	89
Tableau 6 Deuxième campagne d'immunisations pour l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifique de la protéine S100A9.....	89
Tableau 7 Tableau récapitulatif des 3 protéines S100A8, S100A9 et S100A12 avec leur séquence en acides aminés et leur poids moléculaire. Les cystéines sont surlignées en bleu.	96
Tableau 8 Résultats des deux criblages des hybridomes pour l'obtention d'anticorps spécifiques de S100A8, S100A9 et S100A12.....	98
Tableau 9 Résumé des résultats des anticorps anti-S100A8 purifiés.....	98
Tableau 10 Résumé des résultats des anticorps purifiés anti-S100A9.....	99
Tableau 11 Résumé des résultats des anticorps purifiés anti-S100A12.....	99
Tableau 12 Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps anti-S100A12 avec un échantillon de plasma humain dilué au 1/100. Avec SS : Signal Spécifique, SN : Signal Non-spécifique, biot : anticorps biotinylé (traceur).....	101
Tableau 13 Concentrations des anticorps purifiés anti-S100A9	105
Tableau 14 Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps anti-S100A9 avec un échantillon de plasma humain dilué au 1/100 et l'hétérodimère S100A8/S100A9 à 1 ng/mL. Avec SS : Signal Spécifique, SN : Signal Non-spécifique.	106
Tableau 15 Caractéristiques déterminées par les courbes ROC des scores SOFA et des calgranulines ...	124
Tableau 16 Récapitulatif des concentrations endogènes plasmatiques des biomarqueurs potentiels.....	177
Tableau 17 Peptides sélectionnés pour la méthode multiplexe des protéines fortement concentrées	180
Tableau 18 Peptides sélectionnés pour la méthode SISCAPA	181
Tableau 19 Caractéristiques de la cohorte des patients atteints d'un choc septique. Les données sont exprimées en valeur médiane et interquartile (test de Mann-Whitney).	189
Tableau 20 Paramètres MS pour la détection PRM des peptides des biomarqueurs candidats fortement concentrées.....	191
Tableau 21 Paramètres MS pour la détection PRM des peptides des biomarqueurs candidats faiblement concentrées.....	192
Tableau 22 Répétabilité et reproductibilité de la méthode pour la détection PRM des peptides des six biomarqueurs candidats fortement concentrés, par analyse répétée d'un pool de plasmas de patients ayant subi un choc septique (5 replicats/jour sur 3 jours)	195

Tableau 23 Estimation du biais de la digestion des peptides.....	196
Tableau 24 Couplages de la BSA avec SMC et des peptides avec la BSA-SMC.....	203
Tableau 25 Résultats des criblages des hybridomes pour l'obtention d'anticorps spécifiques des protéines AMPH, ANG1, ANG2, CD74, GRAN, HLAG5, HMGB1, NGAL, PCT et sRAGE	209
Tableau 26 Résumé des résultats des anticorps anti-peptides purifiés.....	210
Tableau 27 Résultats de l'analyse par SPIE-IA des 25 anticorps anti-peptide.....	212
Tableau 28 Rendement d'immunoprécipitation des anticorps anti-peptide en tampon (n=2)	213
Tableau 29 Récapitulatif des anticorps utilisables pour la méthode SISCAPA	214
Tableau 30 Ratio moyen des aires des peptides endogène/SIL pour les protéines NGAL, HLAG5 et GRAN pour les deux conditions de précipitation des protéines du plasma au méthanol et à l'éthanol et sans précipitation (n=2).....	217
Tableau 31 Comparaison des conditions de précipitation des protéines du plasma avant digestion.....	217
Tableau 32 Comparaison des aires moyennes des peptides SIL pour différents tampons de dilutions (EIA et PBST) d'un pool de plasmas digéré (n=2).....	218
Tableau 33 Comparaison des aires moyennes des peptides SIL pour différentes dilutions d'un pool de plasmas digéré (n=2)	219
Tableau 34 Comparaison des aires moyennes des peptides SIL pour différentes conditions d'élutions acides (n=2)	220
Tableau 35 Comparaison des aires des peptides SIL après IP en tampon et en plasma digéré avec UHPLC et capillaire-LC (n=2).....	222
Tableau 36 Comparaison des aires moyennes des peptides SIL avec et sans filtration (n=2)	223
Tableau 37 Comparaison de deux sources ESI avec un mélange de peptides SIL (n=3)	224
Tableau 38 Rendement d'immunoprécipitation des anticorps anti-peptide déterminé par ajout de peptides SIL et light (n=2)	225
Tableau 39 Répétabilité et reproductibilité de la méthode SISCAPA développée, par analyse répétée d'un pool de plasmas de patients ayant subi un choc septique (4 replicats/jour sur 3 jours).....	227
Tableau 40 Caractéristiques déterminées par les courbes ROC du score SOFA et des cinq biomarqueurs discriminant les survivants des non-survivants	233
Tableau 41 Récapitulatif des cinq biomarqueurs discriminant les survivants des non-survivants	234
Tableau 42 Combinaison de biomarqueurs	235

LISTE DES ABREVIATIONS

ACCP/SCCM *American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine*

AChE *acétylcholinestérase*

ADN *Acide DésoxyriboNucléique*

ADP *Adenosine Diphosphate*

AF *adjuvant de Freund*

AGP *glycoprotéine alpha-1-acide*

alun *hydroxyde d'aluminium*

ANG-1 *angiopoïétine-1*

ANG-2 *angiopoïétine-2*

AQUA *Absolute QUAntification of proteins*

ARN *Acide RiboNucléique*

ATP *Adenosine TriPhosphate*

AUC *Area Under the Curve*

BSA *sérum-albumine bovine*

CAS *anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobines de souris Ig(G+M)*

CID *collision-induced dissociation*

CLR *C-type Lectin Receptor*

CRP *Protéine C-réactive*

CV *coefficient de variation*

DAMP *Danger Associated Molecular Patterns*

DDA *Data Dependent Acquisition*

DIA *Data Independent Acquisition*

DMF *diméthylformamide*

DO_{414 nm} *densité optique à 414 nm*

DOC *désoxycholate de sodium*

DTT *dithiothréitol*

E. coli *Escherichia coli*

ELISA *Enzyme-Liked Immunosorbent Assay*

ESI *ionisation par electrospray*

HAMA *Human Anti-Mouse Antibodies*

HAT *Hypoxanthine aminoptérine thymidine*

HCD *Higher-energy Collision Dissociation*

HGRPT *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase*

HILIC *Chromatographie d'interaction hydrophile*

HLA-G *human leukocyte antigen-G*

HMGB1 *high-mobility group box 1*

HR/AM *High Resolution/Accurate Mass*

HR-MRM *MRM Haute Résolution*

HRP *Horse-Radish Peroxidase*

HSP *Heat Shock Protein*

IAA *iodoacétamide*

Ig *Immunoglobuline*

IL-6 *Interleukin-6*

IS-PRM *Internal Standard Triggered-Parallel Reaction Monitoring*

iTRAQ *isobaric Tag for relative and absolute quantitation*

KLH *Keyhole Limpet Haemocyanin*

LBP *protéine de liaison du LPS*

LOD *Limit of Detection*

LOQ *Limit of Quantification*

LPS *lipopolysaccharide*

MALDI *Matrix Assisted Laser Desorption*

MRM *Multiple Reaction Monitoring*

MS *Spectrométrie de masse*

MS/MS *Spectrométrie tandem*

NEM *N-ethylmaléimide*

NGAL *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*

NLR *Nod-Like Receptor*

PAMP *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PCR *Réaction en chaîne de la polymérase*

PCT *Procalcitonine*

PEG *Polyéthylène glycol*

PRM *Parallel Reaction Monitoring*

PRR *Pathogen Recognition Receptor*

PSAQ *Protein Standard Absolute Quantification*

PTM *modifications post-traductionnelle*

QCAT *Quantification conCATamer*

QPrEST *Quantitative Protein Epitope Signature Tags*

qSOFA *quick Sequential Organ Failure Assessment*

RAGE *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*

RLR *RIG-I-Like Receptor*

ROC *Receiver Operating Characteristic*

ROS *espèces réactive de l'oxygène*

SAA *amyloïde sérique A*

SCX *Chromatographie d'échange de cations*

SDS *dodécylsulfate de sodium*

SDS-PAGE *électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium*

SEC *Chromatographie d'exclusion stérique*

SIL *Stable Isotope Labeled*

SILAC *Stable isotope labelling by amino acids in cell culture*

SIM *single ion monitoring*

SISCAPA *Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies*

SMC *6-Maleimidohexanoic acid N-hydroxysuccinimide ester*

SMCC *N-succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl)-cyclohexane-1-carboxylate*

SOFA *Sequential Organ Failure Assessment*

sRAGE *récepteur soluble pour les produits finis de glycation*
SRIS *Syndrome de réponse inflammatoire systémique*
SRM *Selected Reaction Monitoring*
sTREM-1 *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 soluble*
SWATH-MS *Sequential Window Acquisition of all Theoretical Fragment Ion Mass Spectra*
TFE *2,2,2,-trifluoroethanol*
TLCK *Na-tosyl-L-lysine chlorométhyl cétone hydrochloride*
TLR *Toll-Like Receptor*
TMT *Tandem mass tag*
UE *Unités Ellman*
VIH *Virus de l'Immunodéficience Humaine*
VWF *facteur de von Willebrand*

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

I. Le sepsis

I.1 Qu'est-ce que le sepsis ?

I.1.1 Les définitions antérieures

Le concept de sepsis sans le nommer ainsi est apparu très tôt dans l'histoire. Durant l'Antiquité, il a été associé à la pourriture, la décomposition ou encore la putréfaction. Depuis la Grèce Antique, la médecine a évolué et de nombreux scientifiques et médecins se sont réunis afin de donner des définitions et critères les plus exactes pour caractériser le sepsis.

En **1991**, la conférence de consensus de l'*American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) s'est tenue dans le but de convenir d'un ensemble de définitions pouvant s'appliquer aux patients atteints de sepsis¹. Ces définitions ont déterminé les critères correspondant aux syndromes septiques et ont permis de stratifier les patients selon leur gravité. Ces définitions initiales mettaient l'accent sur le point de vue alors prédominant selon lequel le sepsis résultait du **syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS)** d'un hôte à l'infection. Le SRIS est défini selon quatre variables : la température, le rythme cardiaque, le rythme respiratoire et le nombre de globules blancs. La présence d'au moins deux critères supérieurs ou inférieurs à la limite fixée parmi les quatre critères cités (Figure 1) définit alors un SRIS. Le **sepsis** correspond au SRIS associé à un processus infectieux. Le **sepsis sévère** est défini par un sepsis associé à l'apparition d'une défaillance d'organe. Enfin, toujours à la suite du consensus de 1991, on parle de **choc septique** lorsque l'hypotension provoquée par un sepsis est persistante malgré une réanimation liquidienne adéquate.

**SRIS (Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique)
= 2 critères sur 4**

- Température > 38 °C ou < 36 °C
- Rythme cardiaque > 90 battements/min
- Rythme respiratoire > 20 respirations/min ou $\text{paCO}_2 < 32 \text{ mmHg (4,3 kPa)}$
- Nombre de globules blancs > 12 000 / mm^3 ou < 4000 / mm^3 ou présence de plus de 10% de formes immatures

Figure 1 SRIS d'après the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference ¹

Cependant, les critères du SRIS ont montré leurs limites. Premièrement, ils sont trop généralistes et faiblement spécifiques. Plus de 90% des patients admis dans les unités de soins intensifs rentrent dans les critères d'un SRIS². Le SRIS peut être causé par de nombreux processus cliniques non infectieux, tels que les traumatismes sévères, les brûlures, la pancréatite aiguë, l'ischémie. D'autre part, certains patients (les personnes âgées et celles prenant des médicaments ayant des effets sur le rythme cardiaque, respiratoires ou sur la température corporelle) peuvent ne pas remplir les critères pour un SRIS mais ont bien un sepsis³.

En **2001**, une deuxième conférence de consensus internationale sur les définitions du sepsis s'est réunie afin d'améliorer les anciennes définitions de 1991, notamment les critères du SRIS⁴. Les définitions de sepsis, sepsis grave et choc septique proposées par Bone *et al.* en 1991⁵ ont été maintenues. Pour le SRIS, les experts ont proposé un système basé sur des paramètres cliniques : les antécédents, la nature et l'ampleur de l'infection, les facteurs de risques ainsi que la réponse thérapeutique ; et également sur des marqueurs biologiques caractérisant la réponse de l'hôte à l'infection. Cependant, les critères du SRIS restent toujours trop sensibles et peu spécifiques. En effet, d'après Vincent *et al.*³ la définition du SRIS est toujours trop sensible. La définition ne permet pas de faire la différence entre une réponse pathologique de l'hôte qui produit une dysfonction d'organes et une réponse normale et bénéfique de l'hôte.

I.1.2 Définition 2016 : Sepsis 3

En **2016**, un troisième et dernier consensus en date a eu lieu afin de redéfinir le sepsis⁶. Ainsi, le **sepsis** est maintenant défini comme une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital et causé par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection. Il n'y a plus de distinction sepsis / sepsis grave. Les dysfonctions d'organes peuvent être mises en évidence par le score clinique **SOFA** (*Sequential Organ Failure Assessment*). Une mortalité de plus de 10% est caractérisée par une augmentation du score

SOFA d'au moins 2 points. Ce score s'appuie sur six sous-scores, un pour chaque système, respiratoire, neurologique, cardiovasculaire, hépatique, rénal et la coagulation. Chaque sous-score est défini par les variables suivantes : PaO₂/FiO₂ (respiratoire) qui se calcule à partir de la pression partielle en oxygène artérielle (PaO₂ en mmHg) et la fraction inspirée en oxygène (FiO₂ en mmHg), plaquettes x 10³ (coagulation), bilirubine (hépatique), hypotension (cardiovasculaire), score de Glasgow qui est un indicateur de l'état de conscience (neurologique) et la créatine (rénal). Le score SOFA peut être utilisé en routine en réanimation, et se calcule *via* le tableau suivant (Tableau 1).

Tableau 1 Tableau de calcul du score SOFA (4). VA : ventilation assistée. PAM : pression artérielle moyenne. Amines : dose en Y/kg/mn

Calcul du score SOFA	0 point	1 point	2 points	3 points	4 points
PaO ₂ /FiO ₂	> 400	301-400	201-300	101-200 et VA	≤ 100 et VA
Plaquettes x10 ³ /m	> 150	101-150	51-100	21-50	≤ 20
Bilirubine, mg/L (mmol/L)	<12 (<20)	12-19 (20-32)	20-59 (33-101-	60-119 (102-204)	> 120 (> 204)
Hypotension	PAM ≥ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopamine ≤ 5 ou dobutamine (toute dose)	Dopamine > 5 ou adrénaline ≤ 0,1 ou noradré ≤ 0,1	Dopamine > 15 ou adrénaline > 0,1 ou noradré > 0,1
Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Créatinine, mg/L (μmol/L) ou diurèse	< 12 (< 110)	12-19 (110-170)	20-34 (171-299)	35-49 (300-440) ou < 500 mL/j	> 50 (> 440) ou < 200 mL/j

Le **choc septique** est considéré comme un sous-groupe du sepsis avec des anomalies circulatoires et métaboliques importantes. Le choc septique possède un niveau de gravité plus important corrélé à un taux de mortalité plus élevé. Il est défini par l'association d'un sepsis, d'une nécessité d'administrer un vasopresseur afin de maintenir la pression artérielle à 65 mmHg ou plus et d'une lactémie supérieure à 2 mmol/L (18 mg/dL) malgré un remplissage vasculaire adéquat. Cette combinaison est associée à une mortalité d'environ 40%.

En dehors des services de réanimation, le *quick SOFA (qSOFA)* peut être utilisé⁷. Comme son nom l'indique, ce score est plus rapide à calculer mais moins précis. Un score d'au moins 2 points permet d'identifier un patient ayant un risque de mortalité par sepsis d'au moins 10%. Les critères sont : un rythme respiratoire à 22 /min ou plus, une détérioration du degré de lucidité ou une pression systolique (pression artérielle lors de la phase de contraction du cœur) à 100 mmHg ou moins (une pression systolique considérée comme normale est comprise entre 120 et 129 mmHg⁸).

Ces définitions et scores peuvent permettre une détection rapide des patients à risque de sepsis et donc une prise en charge plus rapide. De plus, elles permettent de supprimer la confusion entre sepsis et sepsis grave.

I.2 Epidémiologie

Le sepsis a été reconnu en 2016 par l'Organisation Mondiale de la Santé comme problème majeur de santé publique. C'est en effet une des principales causes d'admission dans les services de soins intensifs, avec environ 30% des patients⁹.

I.2.1 Etiologie

Le sepsis est lié à un processus infectieux. Les sites infectés sont variables. Les infections des poumons représentent la majorité des causes de sepsis¹⁰. La deuxième cause est constituée par les infections abdominales, suivie par les infections urinaires¹¹. L'origine des infections septiques peut être diverses, dans l'ordre décroissant : bactérienne, fongique puis enfin virale¹². Cependant, un large pourcentage des examens bactériologiques de patients septiques est négatif^{13,14}. Il est généralement accepté que les cultures n'ont pas la sensibilité nécessaire pour détecter toutes les bactéries infectieuses^{15,16}.

I.2.2 Incidence

L'incidence permet de dénombrer le nombre de nouveaux cas d'une pathologie sur une période donnée. Ce facteur permet d'évaluer la fréquence et la vitesse d'apparition d'une maladie.

Les études à travers le monde indiquent que l'incidence du sepsis est très importante et en constante augmentation depuis de nombreuses années¹⁷. En France, l'étude EPISEPSIS menée dans les services de réanimation français et portant sur différentes cohortes de patients, montre que le taux d'incidence du sepsis sévères a été évalué à **95 cas pour 100 000 habitants**¹⁸. L'incidence du choc septique a été évaluée à 10% des admissions en service de réanimation¹⁹. Aux Etats-Unis, entre 1979 et 2000, l'incidence du sepsis est passé de 8,7% à 13% entre 2004 et 2009^{12,20}. En Australie et en Nouvelle Zélande, les formes les plus graves des syndromes septiques représentaient 11% des cas d'admissions en service de réanimation entre 2000 et 2012²¹. De plus, la meilleure connaissance de la physiopathologie a déjà contribué à une augmentation du nombre de patients diagnostiqués²². Cette montée est également probablement due au vieillissement de la population. En effet, plusieurs études corrélaient l'âge à l'incidence du sepsis^{23,24}. Mais les causes sont multiples comme par exemple l'augmentation des maladies chroniques. Ces maladies sont maintenant traitées de façon plus agressive, ce qui signifie que les gens sont plus vulnérables aux infections²⁵. Par exemple, les traitements comme

les immunosuppresseurs sont plus utilisés, comme la chimiothérapie pour les patients atteints de cancer ; ces patients courent généralement un risque plus élevé de contracter une infection.

I.2.3 Mortalité

Le sepsis a été qualifié de désastre caché de santé publique²⁶. Le nombre de morts liés aux sepsis est évalué à environ **6 millions par an** à travers le monde, soit un décès toutes les 5,2 secondes²⁷. Malgré l'évolution des thérapies et à l'avancée de la médecine moderne, le taux de mortalité du sepsis reste très élevé. Si on se réfère aux anciennes définitions, la mortalité est d'environ 10% pour le sepsis, 20% pour le sepsis grave et plus de 40% pour le choc septique^{21,28}. En France, la mortalité à 28 jours pour le choc septique est estimée de 30 à 40% et proche de 50-60% globalement²⁸. La plupart des études mesurent la mortalité à 28 jours, cependant en regardant plus loin, les patients septiques présentent un taux de mortalité à long terme supérieur. En effet, des patients qui survivent au sepsis ont deux fois plus de risques de mourir au cours des cinq années suivantes que les autres patients hospitalisés²⁹.

I.2.4 Coût

Les coûts liés au sepsis sont très élevés. Le coût moyen d'hospitalisation de patients septiques est deux fois plus important comparé aux autres patients de réanimation³⁰. D'après une étude effectuée à l'hôpital français Henri Mondor entre 1997 et 1998, les coûts étaient estimés entre **26 256 € et 35 185 €** pour les patients septiques reçus en soins intensifs³¹. Cependant, les coûts pour la société vont bien au-delà du seul séjour à l'hôpital et des vies perdues. Les coûts initiaux d'hospitalisation représentent environ 30% du coût total et sont liés à la gravité et à la durée du séjour en hôpital alors que la perte de productivité et les autres coûts médicaux indirects consécutifs à l'hospitalisation représentent la majeure partie du coût total³². Parmi ceux qui survivent, on constate une détérioration de la qualité de vie, l'augmentation de nouvelles hospitalisations et également une augmentation de la mortalité.

I.3 La réponse de l'hôte au sepsis

Le sepsis est donc reconnu comme un problème majeur de santé publique. Cependant, la complexité du sepsis est importante, il faut donc comprendre comment une infection peut mener à un sepsis.

Si un agent pathogène arrive à franchir les barrières physiques et chimiques que sont la peau et les muqueuses, il est alors reconnu par l'organisme et ce dernier va alors induire une réaction inflammatoire locale au niveau du site d'infection. Il s'agit d'une réponse innée, plus tard complétée par une réponse adaptative, plus spécifique du pathogène colonisateur.

I.3.1 Les PAMPs et DAMPs

Le sepsis peut se développer à la suite de la reconnaissance de l'agent pathogène par l'organisme³³. La phase de reconnaissance de l'agent pathogène par l'hôte constitue la première étape essentielle à la mise en place de la défense de l'organisme. Cette reconnaissance se fait par des structures moléculaires du pathogène appelées **PAMPs** (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Ces motifs, non présents chez l'hôte, sont communs à une grande majorité des bactéries, virus ou champignons. Ils sont très conservés car essentiels à la survie de ces micro-organismes. Parmi les PAMPs les plus connus : la flagelline qui permet aux bactéries de se mouvoir, ou encore le LPS qui est le composant principal de la paroi des bactéries à Gram négatif. Un sous-groupe, nommé *vita*-PAMP est associé uniquement aux micro-organismes vivants³⁴. Les *vita*-PAMPs sont détectés en combinaison avec des PAMPs classiques tels que le LPS et l'ADN, qui sont partagés entre des microorganismes vivants et morts. La détection de PAMPs en l'absence de *vita*-PAMPs signifie la présence de microbes morts. Alors que la détection de *vita*-PAMP et de PAMP signifie la présence de microbes vivants et médie une réponse immunitaire accrue non justifiée pour les microorganismes morts³⁵. Deux *vita*-PAMP, l'ARN messenger bactérien dans le contexte d'une réponse à des bactéries Gram-négatives vivantes³⁶, et le monophosphate de diadénosine cyclique dans le contexte d'une réponse aux bactéries Gram positives vivantes³⁷ ont été identifiés jusqu'ici.

Parallèlement au concept de PAMP, Polly Matzinger a proposé le « modèle du danger » qui explique que les tissus endommagés libèrent des molécules intracellulaires qui activent le système immunitaire, et ce, même sans infection³⁸. Ainsi, en cas d'atteinte des tissus, dans le cas d'une infection ou non, des molécules appelées les **DAMPs** (*Danger Associated Molecular Patterns*) sont libérées et permettent tout comme les PAMPs d'activer le système immunitaire (Figure 2). Ces molécules endogènes secrétées par les cellules endommagées peuvent être passivement libérées au moment de la mort cellulaire ou alors activement délivrées dans des conditions de stress cellulaire³⁹. Depuis l'introduction du « modèle de danger », plusieurs DAMPs ont été identifiés et leur nombre est toujours en augmentation⁴⁰. **HMGB1** (*High-Mobility Group Box 1*) est l'une des premières DAMPs identifiée et caractérisée. Dans le noyau cellulaire, HMGB1 permet la condensation de l'ADN, la formation de nucléosomes et la liaison des facteurs de transcription⁴¹. Lorsqu'elle est libérée dans le milieu extracellulaire, activement par stimulation du système immunitaire ou passivement par lésion cellulaire, elle actionne alors le recrutement de cytokines⁴². Les protéines HSP (*Heat Shock Protein*), les histones, les ADN et ARN, les S100s, l'acide urique font également partis de la liste des DAMPs présumés pour leur rôle dans l'inflammation⁴³. Plusieurs protéines de la famille des **S100s** ont été identifiées comme étant des DAMPs, notamment, S100A7, S100A8, S100A9, S100A12 et S100A15^{44,45}. Les calgranulines, S100A8, S100A9 et S100A12, protéines exprimées dans les cellules myéloïdes, comme les neutrophiles,

monocytes et cellules dendritiques⁴⁴, ont été associés à des troubles inflammatoires aigus et chroniques^{46,47,48}.

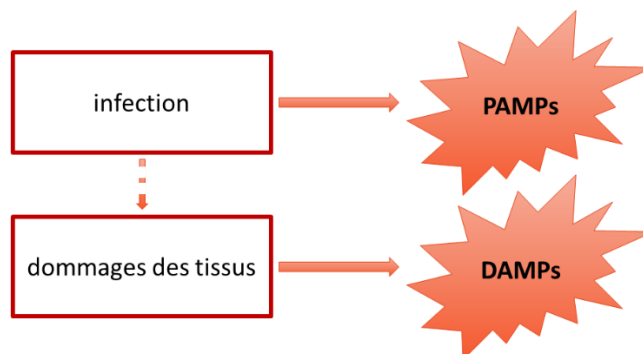


Figure 2 L'infection par des pathogènes et les lésions cellulaires entraînent la production de PAMPs et de DAMPs qui favorisent la réponse immunitaire. Le dommage des tissus peut être causé ou pas par l'infection.

I.3.2 Les récepteurs PRRs

L'identification des PAMPs et des DAMPs se fait au moyen des **récepteurs PRRs** (*Pathogen Recognition Receptors*) (Figure 3)⁴⁹. Ces récepteurs permettent d'activer le système immunitaire. Les interactions entre PAMPs et PRRs vont conduire à l'internalisation, à la destruction de l'agent pathogène, à la libération de molécules de stress et au déclenchement d'un signal de danger. Les PRRs sont exprimés par des cellules du système immunitaire : les mastocytes, macrophages et cellules dendritiques tissulaires.

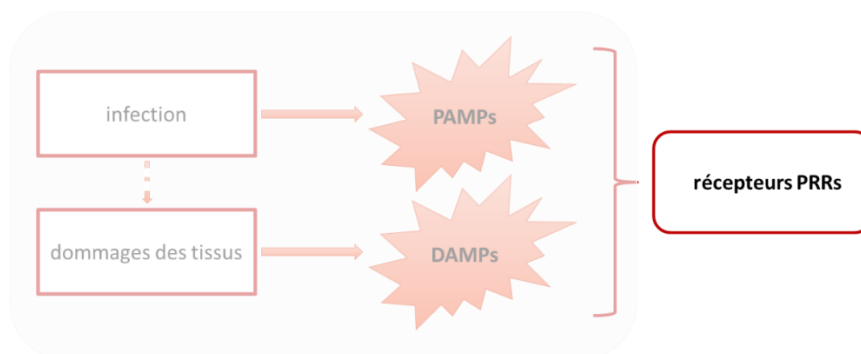


Figure 3 Reconnaissance des signaux DAMPs et PAMPs par les récepteurs PRRs

Les PRRs sont composés de quatre familles de récepteurs qui ont toutes la capacité de reconnaître les PAMPs et les DAMPs : les **TLRs** (*Toll-Like Receptors*), les **NLRs** (*Nod-Like Receptors*), les **CLRs** (*C-type Lectin Receptors*) et les **RLRs** (*RIG-I-Like Receptors*) (Figure 4). Chaque PRR possède ses fonctionnalités propres de localisation, de reconnaissance et d'activation du système immunitaire.

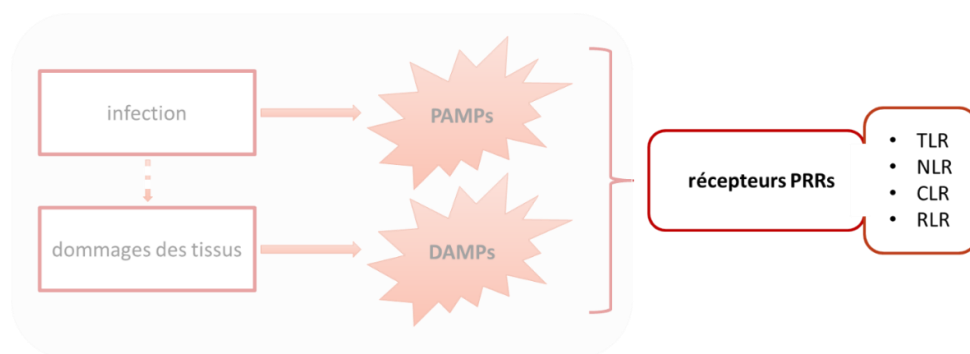


Figure 4 Les 4 familles des récepteurs PRRs

1.3.2.a Les récepteurs TLRs (Toll-Like Receptors)

La famille des **TLRs** représentent un groupe important de PRR et sont des récepteurs transmembranaires de type I qui reconnaissent les PAMPs⁵⁰. Ils sont localisés au niveau de la membrane cytoplasmique ou au niveau de la membrane nucléaire. Ils peuvent donc détecter des pathogènes extra-cellulaires et intra-cellulaires. Ils constituent la majorité des récepteurs de l'immunité. Ils jouent un rôle central dans l'initiation du sepsis, ils détectent de façon précoce l'agent pathogène puis engagent la réponse immunitaire adaptative. Ils peuvent ainsi, une fois activés par les alarmines, transmettre un signal de danger interne^{51,52}. Chez l'homme, dix TLRs permettent de reconnaître les PAMPs. Ils peuvent reconnaître des molécules de la paroi bactérienne, de la paroi fongique et des acides nucléiques viraux et bactériens⁵³. Les différents TLRs qui composent cette famille ont évolué de façon à reconnaître spécifiquement différentes cibles (Figure 5).

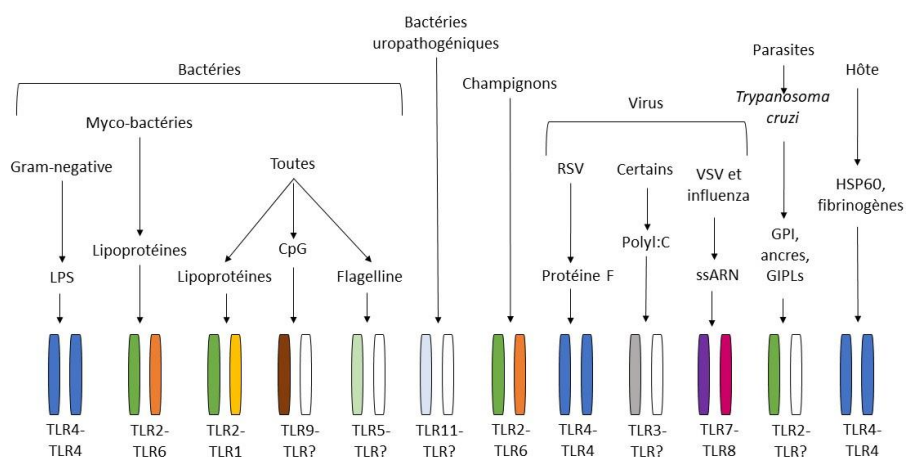


Figure 5 La sous-famille des récepteurs TLRs reconnaissent une large gamme de PAMPs des bactéries, champignons, virus et autres parasites, inspirée de Liew *et al.* 2005⁵³

Lors de leur activation, les TLRs s'homo- ou s'hétéro-dimérisent afin d'initier la signalisation intracellulaire⁵³. Les bactéries peuvent être détectées par cinq récepteurs TLRs différents qui se

dimérisent entre eux (Figure 5), par exemple les lipopolysaccharides (LPS) sont reconnus avec l'homodimérisation de TLR4-TLR4 et les lipoprotéines par l'hétérodimérisation de TLR2-TLR6. Les champignons sont également détectés par la dimérisation de TLR2-TLR6⁵³. Cinq TLRs sont impliqués dans les réponses antivirales. Enfin, pour les réponses antiparasites, un dimère formé avec TLR2 permet la détection de certains parasites. Ce répertoire signifie qu'une grande majorité d'agents pathogènes qui infectent l'humain peuvent être détectés par les TLRs.

1.3.2.b Les récepteurs NLRs (Nod-Like Receptors)

Les récepteurs **NLRs** (*Nod-Like Receptors*) sont une famille de 23 protéines situées dans le cytoplasme qui reconnaissent presque exclusivement des composants bactériens⁵⁴. Ils sont exprimés par la plupart des cellules du système immunitaire mais également par des cellules non immunes comme les cellules épithéliales. Les microorganismes qui envahissent le cytosol sont principalement reconnus par les NLR.

1.4.2.c Les récepteurs CLR (C-type Lectin Receptors) et les récepteurs RLRs (RIG-I-Like Receptors)

Les récepteurs **CLRs** (*C-like Lectin Receptors*) constituent une large famille de protéines connues pour la reconnaissance immunitaire des pathogènes de type fongique. Récemment, d'autres rôles ont été mis en évidence, notamment dans la défense antimicrobienne, l'homéostasie immunitaire et l'auto-immunité⁵⁵. Ces récepteurs reconnaissent également les cellules mortes et induisent une réponse pro-inflammatoire suite à l'identification de molécules libérées par ces cellules⁵⁶.

Les récepteurs **RLRs** (*RIG-I-Like Receptors*) sont situés dans le cytosol et ont la capacité de reconnaître les ARN viraux.

1.3.3 Réponse inflammatoire

Après reconnaissance des PAMPs et DAMPS par les PRRs, la réponse du système immunitaire se déclenche de façon à éliminer le pathogène. L'activation des PRR entraîne la libération de nombreux médiateurs de l'inflammation : cytokines, chimiokines, radicaux oxygènes et monoxyde d'azote (Figure 6).

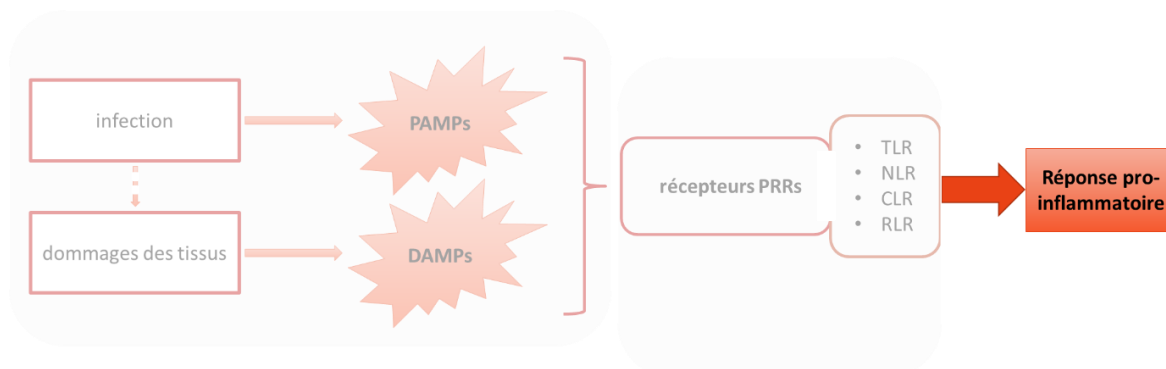


Figure 6 Initiation de la réponse pro-inflammatoire

Les **cytokines** sont synthétisées par certaines cellules du système immunitaire (lymphocytes et macrophages) et aussi par des cellules non immunes comme les cellules épithéliales. Elles agissent sur d'autres cellules immunitaires pour en réguler l'activité. Les plus connues sont les interleukines, les interférons ou encore les facteurs de nécrose des tumeurs.

Les **chimiokines** sont une famille de cytokine possédant des activités chimiotactiques vis-à-vis des différentes populations de leucocytes⁵⁷. Elles sont indispensables au recrutement des leucocytes circulants vers les sites inflammatoires⁵⁸.

L'ensemble de ces molécules va initier la réponse immunitaire innée, c'est-à-dire non spécifique, et déclencher le recrutement des cellules compétentes au niveau du site inflammatoire. Les **neutrophiles** circulants sont recrutés. Leur rôle principal est de phagocytter une cellule étrangère ou infectée. Le recrutement des neutrophiles est très rapidement suivi par le recrutement et l'activation de monocytes, macrophages et cellules dendritiques. Les **macrophages** permettent le nettoyage de corps nécrotiques et corps apoptotiques. Les **cellules dendritiques** permettent le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative : ils phagocytent les agents pathogènes puis migrent vers les organes lymphoïdes, où ils activent les **lymphocytes T et B**. L'ensemble de ces cellules libère également des cytokines pro-inflammatoires et participe à l'amplification de l'état inflammatoire. De plus, certaines cytokines jouent un rôle particulier car elles peuvent auto-entretenir leur production, conduisant à un phénomène inflammatoire qui s'amplifie de manière autonome. Un véritable « **orage cytokinique** » peut alors se déclencher⁵⁹. En effet, la théorie prédominante du sepsis pendant de nombreuses années était qu'il représentait une réponse inflammatoire incontrôlée, cela a donc conduit au concept d'« orage cytokinique ».

1.3.4 Processus anti-inflammatoires

Le sepsis est une rupture de l'homéostasie due à des réponses pro- et anti- inflammatoires importantes. Traditionnellement, la réponse immunitaire de l'hôte était considérée comme étant caractérisée par une phase hyper-inflammatoire initiale qui évolue vers une phase anti-inflammatoire⁶⁰. Cependant, des

études récentes ont conduit à considérer le sepsis comme le déclenchement simultané des réponses pro- et anti-inflammatoires plutôt que consécutives^{61,62,63} (Figure 7).

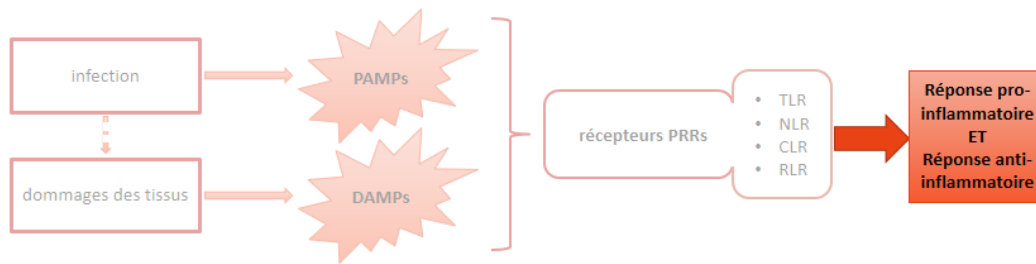


Figure 7 Initiation des réponses simultanées pro- et anti-inflammatoires

Deux théories expliquent les décès dus à cet équilibre des réponses pro et anti-inflammatoires (Figure 8)⁶⁴. Dans les deux théories, les patients survivent au sepsis s'il y a restauration des immunités inné et adaptative et les décès précoces sont dus à une réaction hyper-inflammatoire. Dans la première théorie, les morts plus tardives sont dues à l'incapacité du patient à éliminer les infections primaires et l'apparition d'infections secondaires, ce qui est dû à un état d'immunosuppression marqué. Dans la deuxième théorie, les morts plus tardives sont dues à l'activation persistante de l'immunité innée.

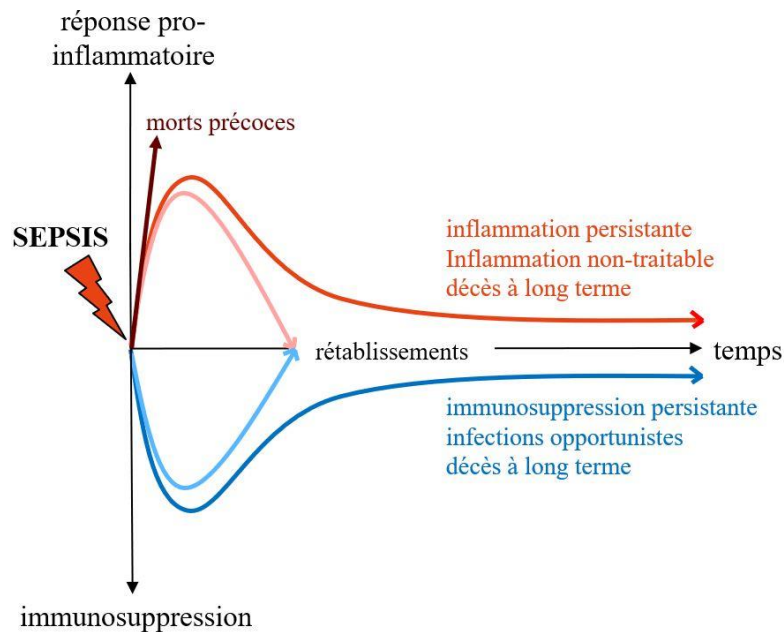


Figure 8 Modélisation de l'équilibre entre pro- et anti-inflammatoires, inspirée de Hotchkiss *et al.* 2013⁶⁴

I.4 Les conséquences sur l'organisme

I.4.1 La coagulation

La réponse de l'hôte induite par le sepsis s'accompagne souvent d'une coagulation intravasculaire disséminée. Elle est caractérisée par l'activation généralisée de la coagulation, qui entraîne la formation intravasculaire de fibrine (protéine du plasma sanguin qui contribue à la formation de caillots) et, en fin de compte, l'occlusion thrombotique des petits et moyens vaisseaux sanguins⁶⁵. **L'occlusion des vaisseaux** se fait aux environs du foyer infectieux afin d'empêcher la propagation des pathogènes dans le reste de l'organisme. Cependant, cette coagulation intravasculaire peut compromettre la perfusion des tissus et aggraver les défaillances d'organes⁶⁶.

I.4.2 L'hypotension

Le monoxyde d'azote relargué par l'orage cytokinique est un agent vasodilatateur, qui entraîne une vasodilatation et une perméabilité accrue des vaisseaux sanguins, ce qui cause une **hypovolémie** (diminution de la masse sanguine). De plus, le monoxyde d'azote va causer une **vasoplégie** (perte du tonus des parois) des vaisseaux sanguins. La combinaison de l'hypovolémie et de la vasoplégie va entraîner une **hypotension** réfractaire au remplissage vasculaire⁶⁷. Une hypotension est considérée comme telle lorsque la pression artérielle systolique est inférieure à 100 mmHg.

I.4.3 Lésions tissulaires

Cette baisse de tension entraîne une **hypoxie**, c'est-à-dire une diminution de la quantité d'oxygène utilisable par les cellules de l'organisme. Cette baisse d'oxygène conduit à l'apparition de lésions tissulaires et à la libération de DAMPs.

I.5.4 Défaillances d'organes

Une réponse immunitaire dérégulée et exacerbée dans laquelle l'équilibre entre la réaction pro-inflammatoire et la réaction anti-inflammatoire est perdue est considérée comme la clé du développement d'une défaillance d'organes. Le processus de défaillances d'organes est multifactoriel et demeure à ce jour incomplètement compris. La diminution de la perfusion tissulaire et l'hypoxie en sont les facteurs dominants.

Le poumon est généralement le premier organe à être touché, on parle de **dysfonction respiratoire**. L'atteinte peut aller d'un dysfonctionnement léger à une lésion pulmonaire aiguë. Les atteintes pulmonaires sont décrites par des dommages alvéolaires qui causent l'hypoxie accompagnée

d'infiltrations pulmonaires. Dans les formes les plus sévères, un syndrome de détresse respiratoire aiguë apparaît avec une mortalité atteignant les 40%⁶⁸. Peu après le poumon, le muscle du cœur, le **myocarde** est le deuxième organe le plus souvent affecté. La production élevée de monoxyde d'azote est la cause la plus probable⁶⁹. De plus, le cerveau est souvent atteint lors d'un sepsis, on parle d'**atteinte encéphalique**. La physiopathologie de cette atteinte est multifactorielle : une perturbation de la barrière hémato-encéphalique, une diminution de la perfusion cérébrale et une augmentation du processus neuro-inflammatoire⁷⁰. La **dysfonction hépatique** est également fréquente car le foie joue un rôle central dans le sepsis, il intervient dans la régulation des défenses immunitaires. Il a une place cruciale dans la clairance bactérienne, la production de protéines ou de cytokines et l'adaptation métabolique à l'inflammation⁷¹. Cependant, le foie est la cible de lésions liées au sepsis et la dysfonction hépatique engendre une altération du pronostic vital. L'atteinte des reins est appelée **insuffisance rénale aiguë**. Elle est due à la production de cytokines pro-inflammatoires et la réduction du taux de volume de liquide filtré^{72,73}.

1.5 La prise en charge thérapeutique

Un comité consensuel de 55 experts internationaux s'est réuni et des recommandations pour la prise en charge du sepsis ont été définies à l'issue de ce comité dans le *Surviving Sepsis Campaign* publié en 2017⁷⁴. Le sepsis et le choc septique sont des urgences médicales et la réanimation doit être effectuée le plus rapidement possible. Dans les premières heures suivant l'arrivée du patient, les **prélèvements pour les cultures bactériennes** et, l'administration **d'antibiotiques à large spectre** sont effectués. Les cultures microbiologiques doivent être effectuées avant de commencer un traitement antimicrobien. Cependant, **l'administration d'antimicrobiens** doit être initiée dès que possible après diagnostic du sepsis et choc septique. La rapidité d'administration est essentielle car chaque heure de retard est associée à une augmentation mesurable du risque de mortalité^{75,76,77}. Les **foyers infectieux** soupçonnés doivent être contrôlés dès que possible après une réanimation initiale réussie. Initialement, un traitement à large spectre est mis en place au niveau de la source présumée du sepsis⁷⁸. Par la suite, le traitement est ajusté selon le pathogène détecté. Cette réévaluation permet de limiter le développement de résistances aux antibiotiques, de réduire la toxicité et le coût.

Une des premières recommandations concerne une **réanimation liquidienne** précoce, car elle est cruciale pour la stabilisation du débit sanguin tissulaire et donc décisive pour la protection de dysfonctions des organes. Selon les recommandations de la *Surviving Sepsis Campaign*⁷⁹, les cristalloïdes constituent le liquide de remplissage de premier choix, l'utilisation de colloïdes est également possible. Plusieurs paramètres permettent d'évaluer les besoins hémodynamiques des patients septiques : la fréquence cardiaque, la pression artérielle moyenne et l'urine, mesurées par des systèmes non invasifs.

Si l'hypotension persiste, un support par **substances vasoactives**, qu'on appelle vasopresseurs, peut être mis en place. Les vasopresseurs sont administrés afin d'assurer le maintien d'une pression artérielle moyenne supérieure à 65 mmHg, permettant ainsi de garder une perfusion tissulaire suffisante afin de protéger les organes. En cas d'atteintes respiratoires une **ventilation mécanique** est mise en place.

L'hémofiltration est une thérapie extracorporelle pour traiter les patients septiques. Cette méthode consiste à extraire le sang du patient par l'intermédiaire d'un cathéter. Après extraction, le sang du patient est acheminé sous pression à travers un système de filtration qui élimine les toxines et les médiateurs de l'inflammation dans le but d'atténuer la réponse pro-inflammatoire excessive⁸⁰. Le sang est ensuite renvoyé au patient par l'intermédiaire d'un cathéter.

Ainsi, la prise en charge thérapeutique est essentiellement symptomatique et permet de réduire considérablement la mortalité associée au sepsis et choc septique, néanmoins cette mortalité reste élevée.

I.6 Le diagnostic du sepsis

I.6.1 Diagnostic clinique

Le sepsis n'étant pas une maladie spécifique mais plutôt un syndrome englobant une réponse multiforme de l'hôte à un pathogène infectieux, les diverses manifestations du sepsis rendent le diagnostic difficile. A l'heure actuelle, le sepsis peut être identifié par de nombreux signes et symptômes cliniques chez un patient soupçonné d'infection. Les caractéristiques d'un syndrome septique comprennent la **fièvre** ou **l'hypothermie**, la **tachycardie**, la **tachypnée** (augmentation du rythme respiratoire) et la **leucocytose** (augmentation anormale du nombre de globules blancs dans le sang)⁸¹. Cependant, ces signes cliniques ne sont **pas spécifiques**. L'ajout de signes cliniques correspondant à une **défaillance d'organes** peut aider le diagnostic du sepsis. Le dysfonctionnement des organes comprend généralement l'hypotension, le syndrome de détresse respiratoire aiguë, l'altération de l'état mental, les lésions rénales aiguës, l'occlusion intestinale, le dysfonctionnement hépatique, la coagulation, le dysfonctionnement surrénalien et le syndrome euthyroïdien malade (diminution en hormone thyroïdienne malgré une thyroïde fonctionnelle)⁸².

I.6.2 Diagnostic microbiologique

L'identification des micro-organismes par culture d'échantillons appropriés dans le contexte de suspicion clinique demeure la méthode recommandée pour diagnostiquer l'infection. Un premier prélèvement est donc effectué rapidement pour confirmer le diagnostic clinique établi. Les échantillons de **cultures microbiologiques** doivent être prélevés avant l'administration d'antibiotiques chez les patients suspects de sepsis, car la thérapie antimicrobienne peut altérer les résultats de culture, ce qui

rend plus difficile l'identification des agents pathogènes. Par conséquent, l'analyse microbiologique doit être entreprise le plus tôt possible pour éviter de retarder le début de la thérapie antimicrobienne. Des échantillons de chaque foyer d'infection suspecté doivent être prélevés pour des tests microbiologiques : sang, liquide céphalorachidien, urine, plaies, sécrétions respiratoires et autres fluides corporels⁸³. Cependant, les techniques microbiologiques basées sur la culture donnent des résultats entre 48 et 96 heures. Ces délais ne sont pas compatibles avec l'urgence de traiter le patient, c'est pourquoi il est fréquent que l'antibiothérapie administrée soit à large spectre puis réévaluée après résultats des tests. Si on prend l'exemple des hémocultures, elles peuvent avoir quelques inconvénients. Leur rendement est bas et dépend de plusieurs facteurs comme la contamination par d'autres bactéries, l'utilisation d'antibiotiques, le volume de sang prélevé (Figure 9)⁸⁴. Le résultat des hémocultures est en effet souvent négatif et lorsqu'ils sont positifs, ils sont parfois difficiles à interpréter⁸⁵. Il est important de faire la distinction entre une véritable bactériémie et un résultat faussement positif. De plus, le sepsis pourrait être lié à des agents toxiques produits par des agents pathogènes plutôt qu'aux agents pathogènes eux-mêmes.

Bactériémie intermittente
Petit nombre d'unités détectables pour les colonies
Propriétés bactéricides des composants sanguins
Volume de sang prélevé (optimum 20 mL)
Utilisation concomitante d'antibiotiques
Nombre d'échantillons de sang mis en culture
Calendrier des cultures de sang
Durée d'incubation
Milieux de culture et système de collecte utilisés

Figure 9 Facteurs affectant le rendement des hémocultures, adaptée de Sankar *et al.* 2013⁸⁴

Ces dernières années, de nouvelles techniques ont été développées, basée sur la détection moléculaire de pathogènes par amplification génétique comme la **PCR** (réaction en chaîne de la polymérase) en temps réel, technique qui permet de diminuer ces délais (< 4 h)⁸⁶. La PCR est basée sur l'amplification de séquences cibles spécifiques du génome bactérien afin d'identifier les pathogènes. Avec un temps d'identification inférieur à 4 h, cela permet donc de réduire l'utilisation d'antibiothérapie à large spectre.

L'utilisation de la technologie **MALDI-TOF MS** (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) permet l'identification des micro-organismes en comparant les profils protéiques⁸⁷. Le MALDI-TOF MS est une approche précise et rapide dont la performance dépend largement de la pureté et de la quantité d'un micro-organisme⁸⁸. Par conséquent, des procédures d'enrichissement et de purification bactérienne sont requises pour les hémocultures positives, qui contiennent des concentrations élevées de matériel non microbien qui peuvent interférer avec

l'identification MALDI-TOF MS⁸⁸. Une identification correcte par MALDI-TOF MS de 97% pour les bactéries à Gram négatif et 64% pour les Gram positif a été rapporté après une sous-culture de moins de 6 h⁸⁹.

1.7 Le pronostic du sepsis

Malgré de nouvelles définitions du sepsis, les symptômes et signes cliniques sont très variables, ce qui rend difficile le diagnostic et l'évaluation de la gravité. La prédiction du pronostic peut aider à améliorer le ciblage et la prise en charge des patients. Il est important d'identifier le plus rapidement possible les patients qui courent un risque plus élevé de décès afin de mieux définir la stratégie de thérapie. En effet, puisque les ressources mobilisées pour soigner ces patients sont très élevées en termes de ressources humaines, matérielles, biologiques et thérapeutique, le rapport coût/bénéfice devient un point clé pour mieux sélectionner les patients qui bénéficieront des thérapies les plus poussées afin de mieux rationaliser les ressources nécessaires à l'amélioration des patients. La prédiction du pronostic est une tâche difficile qui a reçu beaucoup d'attention au cours des 20 dernières années, soit plus de 22 000 publications sur le sujet sur PubMed.

Le score SOFA peut fournir une information pronostique potentiellement utile sur la survie des patients septiques⁹⁰. En effet, d'après certaines publications, un score SOFA plus élevé est associé à une probabilité accrue de mortalité⁹¹. Cependant, le SOFA n'est pas destiné à être utilisé comme un outil de prise en charge du patient⁶. Lors de la redéfinition du sepsis en 2016, le groupe de travail international d'experts a recommandé d'utiliser le qSOFA au lieu du SRIS pour classer les patients présentant un risque élevé de décès⁹². Ce groupe d'experts a déclaré qu'un score qSOFA de 2 ou plus est associé à un risque de mortalité plus élevé. Jian *et al.* ont évalué la valeur pronostique du qSOFA et du SRIS pour prédire la mortalité dans huit études portant sur un total de 52 849 patients⁹³. Cette étude a montré que le qSOFA et SRIS ≥ 2 sont fortement associés à la mortalité chez les patients atteints d'infections. Toutefois, le qSOFA s'est montré plus spécifique et le SRIS plus sensible. Ainsi, une sensibilité plus basse du qSOFA signifie que certains patients qui courent un risque de décès plus élevé peuvent être pris en charge de manière inadaptée comme patients non grave. Cependant, le qSOFA a montré des divergences, comme dans l'étude d'Askim *et al.*⁹⁴ qui montre une très faible sensibilité à la prédiction de la mortalité à 7 jours à et à 30 jours.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de moyen fiable pour attribuer des profils de risque ou prédire la mortalité des patients⁹⁵. De nombreux biomarqueurs pronostiques sont étudiés afin de pouvoir prédire au mieux la chance de survie des patients septiques et ainsi pouvoir être utilisés de façon routinière dans le milieu hospitalier.

II. Utilisation de biomarqueurs

La mortalité élevée due au sepsis peut être considérée comme une indication de diagnostic et/ou pronostic insuffisant. Il existe un réel besoin de nouveaux outils d'aide à la décision. Dans d'autres pathologies, des biomarqueurs ont déjà été identifiés et sont utilisés en milieu clinique, dont la cardiologie avec le dosage de la troponine T pour détecter une atteinte cardiaque et diagnostiquer un infarctus du myocarde, la médecine vasculaire avec l'analyse des D-dimères chez les patients soupçonnés d'embolie pulmonaire, le diagnostic ou la confirmation de la maladie d'Alzheimer avec la quantification des protéines β -amyloïde et tau⁹⁶ et dans les cancers où de nombreuses protéines sont associées à un certain nombre de cancers comme le dosage dans le serum de la protéine α -fetoprotein pour l'évaluation du stade du cancer des testicules ou CA19-9 dans le suivi du cancer du pancréas⁹⁷.

II.1 Qu'est-ce qu'un biomarqueur ?

Selon la définition établie lors d'un atelier conduit sous la responsabilité du *National Institute of Health* en 2001, un **biomarqueur** désigne un paramètre objectivement mesurable (c'est-à-dire avec une précision et une reproductibilité suffisante) et évaluée comme indicateur de processus physiologiques normaux ou pathologiques, ou comme rapporteur de la réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique⁹⁸. Le biomarqueur idéal a une **sensibilité** (capacité à donner un résultat positif quand l'hypothèse est vérifiée) et une **spécificité** (capacité à donner un résultat négatif quand l'hypothèse n'est pas vérifiée) élevées, peut être identifié par une technologie **facile** d'utilisation ou automatisée à **court délai d'exécution** et à **faible coût**.

En milieu clinique, un biomarqueur est utile à la prise de décision. Ils peuvent être de différents types, parmi les plus étudiés : les **biomarqueurs diagnostiques** permettent le diagnostic d'une pathologie et les **biomarqueurs pronostiques** permettent de prédire l'évolution de l'état du patient et le niveau de risque de mortalité. Ils peuvent également être utilisés pour la caractérisation et la surveillance des maladies, pour l'élaboration de thérapies individualisées, pour la prévision et le traitement des effets indésirables des médicaments, pour l'identification des types cellulaires, et pour les études pharmacodynamiques⁹⁹.

Il existe différents types de biomarqueurs moléculaires qui sont l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), les ARN (Acide RiboNucléique), les métabolites et les protéines. Seuls les biomarqueurs protéiques pour le diagnostic ou le pronostic du sepsis seront décrits dans le paragraphe suivant.

II.2 Biomarqueurs protéiques dans le sepsis

Les signes cliniques du sepsis ne sont pas spécifiques et comprennent des symptômes généraux. En raison de la complexité physiopathologique et de la grande variabilité des symptômes, la reconnaissance

clinique et l'évaluation de la gravité demeurent difficiles¹⁰⁰. Les mécanismes exacts et les variables qui déterminent les pronostics liés aux sepsis ne sont toujours pas clairs. La clé d'un traitement réussi repose sur **une détection et un pronostic précoces** des patients. Les biomarqueurs peuvent aider à adapter les traitements et à prédire le devenir clinique des patients¹⁰¹. Les niveaux plasmatiques de deux biomarqueurs, la **protéine C-réactive (CRP)** et la **procalcitonine (PCT)** sont actuellement dosées et utilisés en clinique pour le diagnostic et le pronostic du sepsis¹⁰².

II.2.1 La protéine C-réactive (CRP)

La **CRP**, historiquement identifiée dans le sérum de patients présentant une inflammation aiguë¹⁰³, est synthétisée principalement dans le foie par les hépatocytes en réponse à des dommages tissulaires, inflammatoires et/ou des stimuli infectieux¹⁰⁴. Il s'agit d'une protéine de la phase aiguë qui est principalement induite par l'action de la cytokine interleukine-6 lors d'un processus inflammatoire/infectieux¹⁰⁵. Il a été montré *in vivo* chez les souris, que la CRP les protégeait contre une infection bactérienne par diverses espèces de bactéries, mais avait également un effet protecteur dans diverses affections inflammatoires¹⁰⁶. Lors d'un processus inflammatoire, la CRP possède des effets ambivalents, pro- et anti-inflammatoires. *In vitro*, la CRP entraîne une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires et une diminution de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Cependant, d'autres fonctions pro-inflammatoires de la CRP ont été reconnus, comme l'activation et l'amélioration de la phagocytose¹⁰⁶. Néanmoins, les propriétés biologiques précises de la CRP restent encore sujet à controverse et il est probable que la fonction de la CRP dépende du contexte et qu'elle puisse, selon les circonstances, augmenter ou atténuer les réponses inflammatoires¹⁰⁶. Chez une personne saine, la concentration circulante est de 10 mg/L. Il y a une augmentation de la CRP circulante entre 4 et 6 h en réponse à des stimuli inflammatoires. Ce niveau double toutes les 8 h, avec un pic entre 36 et 50 h qui peut atteindre 350-400 mg/L^{107,108}. La CRP est un des biomarqueurs les plus utilisés. En effet, certaines études ont montré qu'un taux élevé de CRP dans le plasma était corrélé avec une augmentation du risque de dysfonction d'organes et/ou de mort chez les patients septiques^{109,110}. Cependant, l'augmentation de la CRP n'est pas spécifique, puisqu'elle peut être observée après une chirurgie, un traumatisme¹⁰⁸, ou chez des patients victimes de brûlures^{111,112}. Le statut pronostique de la CRP est depuis quelques années remis en cause et d'autres études montrent qu'il n'y a aucune différence significative de concentrations de la CRP entre les survivants et les non-survivants septiques^{113,114}.

II.2.2 La procalcitonine (PCT)

La **PCT** est une protéine précurseur de l'hormone thyroïdienne calcitonine. Des concentrations élevées de PCT dans le sérum des patients septiques ont été décrites pour la première fois en 1993¹¹⁵. Chez les patients en bonne santé, les taux de PCT sont mesurés à < 1 ng/mL, alors qu'ils peuvent atteindre 4-45

ng/mL chez les patients en état de choc septique¹¹⁶. En présence d'une infection, les médiateurs pro-inflammatoires et les toxines bactériennes induisent une augmentation de la production et une libération non régulée de la PCT de tous les tissus parenchymateux¹¹⁷. Lors d'un sepsis, la PCT intacte est libérée dans la circulation sanguine. Les fonctions biologiques de la PCT ne sont pas totalement élucidées. Suite à une infection, le niveau de PCT augmente rapidement dans les premières heures avec un pic à 36 heures¹¹⁸. Un très grand nombre d'études se sont intéressées à l'apport de la PCT dans le diagnostic du sepsis^{119,120}. Les performances de la PCT sont : une sensibilité et une spécificité de 71% et une aire sous la courbe ROC de 0,78¹²⁰. Un certain nombre d'études ont montré que la PCT ne permettait pas de diagnostiquer le sepsis¹²¹. Une élévation non spécifique du taux de PCT en l'absence d'infection bactérienne peut survenir dans des situations de stress, comme un traumatisme ou après un acte chirurgical¹²². Le syndrome de Kawasaki¹²³, maladie auto-immune et syndromes paranéoplasiques peuvent également être associés à des taux élevés de PCT¹²⁴. Même si l'efficacité diagnostique de la PCT a surpassé celle de la CRP, la PCT seule ne semble pas être un bon marqueur diagnostique du sepsis.

La valeur pronostique de la PCT a également été évaluée et suggère qu'elle est un marqueur plus prédictif de la mortalité à 30 jours comparée à la CRP¹²⁵. Cependant, pour les personnes plus gravement malades présentant un choc septique, aucune différence entre survivant et non-survivants n'a pu être trouvée¹²⁶. De la même façon que la CRP, le statut de biomarqueur pour le sepsis de la PCT est également remis en cause.

II.2.3 Combinaison de biomarqueurs

Une recherche dans la base de données PubMed montre que les biomarqueurs dans le sepsis est un sujet de recherche très étudié (Figure 10). Sur les 20 dernières années, des centaines d'études ont porté sur le besoin d'un biomarqueur pour diagnostiquer et pronostiquer rapidement et efficacement les patients atteints du sepsis. Cependant, l'utilisation d'un unique biomarqueur comme *gold standard* ne semble pas possible car jusqu'à présent aucun biomarqueur ne peut à lui seul répondre à ce besoin d'une manière spécifique et sensible. En effet, au vu de la complexité du sepsis, un biomarqueur unique ne pourrait rendre compte de toutes les formes de sepsis¹²⁷. Le sepsis n'est pas une maladie unique mais plutôt un processus hétérogène et complexe qui impacte globalement le patient avec des intensités variables. Le sepsis active un certain nombre de voies pro-inflammatoires et anti-inflammatoires qui peuvent varier selon le pathogène responsable et l'hôte⁸². La recherche s'oriente donc vers des **combinaisons de biomarqueurs** qui permettraient de rendre compte des différents aspects du sepsis affectant les patients et auraient l'avantage théorique d'améliorer la précision du diagnostic et du pronostic. Ainsi, si chaque biomarqueur testé se comporte indépendamment comme prédicteur du sepsis, tester plusieurs biomarqueurs simultanément permet d'améliorer à la fois la sensibilité et la spécificité. Ainsi, plusieurs études ont évalué l'apport d'une combinaison de biomarqueurs pour le diagnostic de sepsis comme

Dolin *et al.*¹²⁸ qui proposent une combinaison de trois biomarqueurs : la PCT, l'interleukine-6 (IL-6) et le *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 soluble* (sTREM-1) pour diagnostiquer le sepsis avant les premiers symptômes. L'association de l'IL-6, de la PCT et du sTREM-1 semble compléter les déficiences que présentent les marqueurs individuels. L'IL-6 est une cytokine habituellement associée à la phase précoce de l'inflammation. La PCT a une bonne spécificité pour l'origine bactérienne de l'infection qui cause les symptômes du sepsis. Enfin, sTREM-1 sert d'indicateur spécifique du déploiement des leucocytes myéloïdes en réponse à une infection bactérienne et semble efficace pour prédire la gravité du sepsis¹²⁹. Cette combinaison permettrait de confirmer que les taux circulants de molécules inflammatoires mais aussi que le processus chimiotactique antimicrobien a déjà commencé, peu importe si le patient présente des symptômes. Taneja *et al.*¹³⁰ ont combiné des biomarqueurs afin de connaître le stade du patient au cours de la maladie, c'est-à-dire la phase précoce, la phase de « pointe » et la phase de convalescence avec des phases subdivisées entre. Pour cela, ils se sont basés sur le paradigme selon lequel le sepsis peut être décrit biochimiquement comme une interaction entre processus pro et anti-inflammatoires et ont sélectionné les six biomarqueurs suivants : IL-6, nCD64, IL-1ra, PCT, MCP1 et G-CSF. La combinaison des biomarqueurs a permis d'obtenir une aire sous la courbe de 0,81 tandis que les biomarqueurs seuls ont des aires sous la courbe comprise entre 0,42 et 0,77 et le score SOFA 0,54 pour le diagnostic du sepsis. Cette combinaison a également permis de donner un aperçu du sepsis et de sa progression. Ainsi, l'idée de stratification des patients septiques en catégories selon le stade de la maladie peut fournir des possibilités d'intervention plus ciblée.

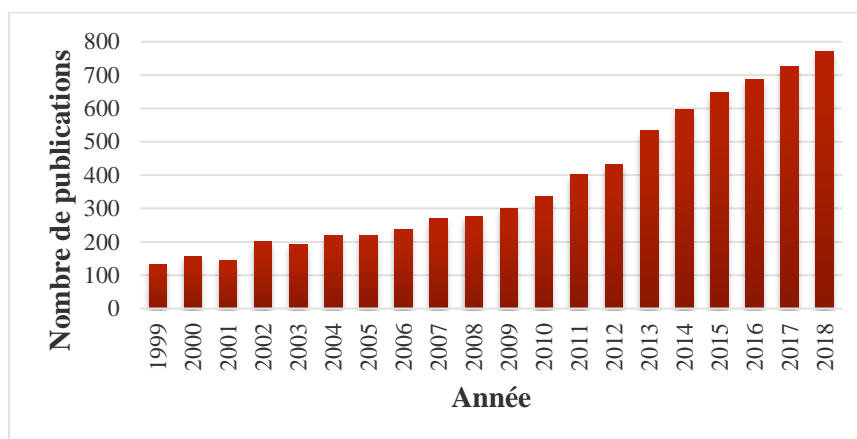


Figure 10 Articles publiés sur les biomarqueurs du sepsis d'après une recherche dans la base de données PubMed de "sepsis AND biomarkers" de 1999 et 2018

II.2.4 Biomarqueurs candidats

Il est toujours difficile de bien diagnostiquer et pronostiquer la mortalité liée au sepsis et au choc septique. En effet, la CRP est utilisée depuis de nombreuses années mais possède une spécificité contestée, de la même façon la PCT, proposée comme marqueur plus spécifique que la CRP, est elle-même contestée. On recherche donc continuellement de meilleurs biomarqueurs comme indiqué dans le

paragraphe précédent avec l'idée de combiner les biomarqueurs pour augmenter le pouvoir diagnostic/pronostic. Comme le montre la Figure 10, de nombreuses études proposent des biomarqueurs candidats pour le sepsis, beaucoup plus que dans d'autres pathologies. Cette grande différence dans le nombre de biomarqueurs est due à la physiopathologie complexe du sepsis. De plus, le grand nombre de types de cellules, de tissus et d'organes touchés augmentent le nombre de biomarqueurs candidats potentiels, comparé à d'autres pathologies qui ne touchent que des organes individuels ou plus localisées. De nombreuses études présentent des **listes de biomarqueurs candidats** qui sont produites grâce aux avancées techniques en génomique, transcriptomique et protéomique. Ainsi, des biomarqueurs potentiels ont été caractérisés en protéomique par spectrométrie de masse dans le plasma humain de patients atteints de sepsis avec différents pronostics ou stades, ou *in vitro* après stimulation par le LPS. Par exemple, Qian *et al.*¹³¹ ont étudié pour la première fois en 2005 les modifications des protéines plasmatiques humaines après injection de LPS. Un certain nombre de médiateurs de la réponse inflammatoire, comme la protéine de liaison du LPS (LBP), la CRP, l'amyloïde sérique A (SAA), se sont révélés être régulés à la hausse. Puis, en 2006, Shen *et al.*¹³² se sont intéressés à 25 plasmas de patients septiques, ils ont immunodéplété le plasma de certaines protéines majoritaires et ont montré une augmentation de sept protéines dont la CRP et une diminution de trois protéines dans les plasmas de patients septiques par rapport aux patients SRIS. Paiva *et al.*¹³³ ont utilisé en 2010 les techniques protéomiques de spectrométrie de masse pour identifier et analyser les différences d'expression des protéines de sérums prélevés sur des patients à tous les stades du sepsis, selon l'ancienne définition, c'est-à-dire, sepsis, sepsis grave et choc septique. Quatorze protéines, dont la SAA, ont montré des différences de niveaux selon les stades du sepsis. L'urine a également été étudiée en raison des lésions rénales que le sepsis peut causer. En 2013, Su *et al.*¹³⁴ ont surveillé les niveaux urinaires des protéines chez les patients atteints du SRIS et du sepsis et ont montré une différence notamment pour l'haptoglobine. Plus récemment, Malmström *et al.*¹³⁵ se sont intéressés aux protéines relarguées par les neutrophiles lors du sepsis par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour caractériser et quantifier le protéome des neutrophiles dans des conditions saines et pathologiques. Grâce à cette approche, ils ont identifié 20 biomarqueurs candidats, dont 8 sont régulés à la hausse et 12 à la baisse, dont l'haptoglobine, la glycoprotéine alpha-1-acide (AGP), la granuline et NGAL.

D'autre part, quelques articles de revues ont listé des biomarqueurs potentiels du sepsis. Un premier article de Kojic *et al.*¹²¹, a compilé une liste de 17 biomarqueurs diagnostiques et pronostiques, reflétant la nature hétérogène du sepsis en classant les biomarqueurs en : biomarqueurs de l'inflammation, récepteurs de surface cellulaire et leurs formes solubles, biomarqueurs du dysfonctionnement tissulaire et de la défaillance d'organes, et autres biomarqueurs. Parmi ces biomarqueurs, la liste inclut notamment sRAGE et angiopoietine-1 et -2. Dans un second article, Pierrakos *et al.*¹³⁶ ont analysé 3 370 études évaluant au total 178 biomarqueurs à différents niveaux de validation dont HMGB1, le récepteur soluble pour les produits finis de glycation (sRAGE), angiopoietine-1 et -2, le facteur de von Willebrand, la

SAA, la CRP, la LBP, la PCT et HLAG-5¹³⁶. Les biomarqueurs ont été classés selon la physiopathologie du sepsis: cytokines, marqueurs cellulaires, récepteurs, marqueurs liés à la coagulation, liés aux lésions endothéliales vasculaires, liés à la vasodilatation, liés à la dysfonction d'organes, liés à la phase aiguë et autres. Sur ces 178 biomarqueurs, 34 ont été identifiés et évalués pour être utilisés spécifiquement dans le diagnostic du sepsis avec seulement 5 d'entre eux possédant une spécificité supérieure à 90%. Sur les biomarqueurs testés pour le pronostic, aucun ne présentait une sensibilité et une spécificité suffisantes (> 90%) pour prédire quels patients avaient plus de risque de mourir. L'article conclut qu'aucun biomarqueur unique n'est suffisamment spécifique ou sensible et, comme indiqué au paragraphe précédent, qu'une combinaison pourrait être plus efficace. Cependant, ces résultats ont pu être impactés par les cohortes utilisées (la taille et caractéristiques de la cohorte, sélection des patients, ...) et les biais potentiels dans les méthodes de dosage (spécificité, niveau de validation, ...). Néanmoins, cet article est le seul qui compile l'ensemble des données sur les biomarqueurs du sepsis aussi bien en diagnostic que pronostic. Ces biomarqueurs pourraient être réévalués sur la base de cohortes de patients pertinentes pour le diagnostic ou le pronostic, impliquant également des méthodes de dosage parfaitement caractérisées et validées. Ces éléments sont essentiels pour confirmer et valider les biomarqueurs qui seront présentés à la suite.

II.3 De la découverte à la validation des biomarqueurs protéiques

Malgré un intérêt et un investissement accrus, peu de nouveaux biomarqueurs sont utilisés dans la pratique clinique et leur taux d'introduction est en baisse¹³⁷. Anderson *et al.*¹³⁷ ont rapporté qu'entre 1993 et 2009 le taux moyen d'approbation par la FDA de nouveaux tests de biomarqueurs protéiques était d'environ 1 par an, soit un taux bien en deçà de ce qui est nécessaire pour répondre aux besoins médicaux. Depuis la découverte d'un biomarqueur jusqu'à son utilisation en clinique, un travail incluant la médecine, la biologie, les sciences analytiques, les outils statistiques est nécessaire. Rifai *et al.*¹³⁸ ont décrit un processus en six composantes avec la découverte, la qualification, la vérification, l'optimisation des essais de recherche, la validation clinique et la commercialisation. Geyer *et al.*¹³⁹ proposent une stratégie triangulaire : la découverte, la vérification et la validation, qui sera développée ci-dessous (Figure 11).

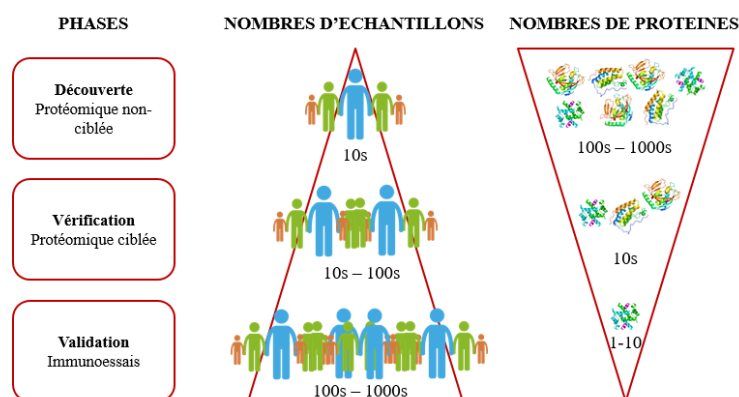


Figure 11 Recherche de biomarqueurs, adaptée de Geyer *et al.* 2017¹³⁹

II.3.1 La découverte

La découverte permet d'identifier les biomarqueurs candidats *via* des approches majoritairement sans *a priori*¹⁴⁰. Deux techniques sont généralement utilisées pour cette première phase : l'électrophorèse bidimensionnelle et la spectrométrie de masse. L'électrophorèse bidimensionnelle était déjà utilisée dans les années 1990, cependant ces études n'ont généralement identifié que quelques douzaines de protéines¹³⁹. La spectrométrie de masse est devenue la méthode de choix dans les approches de découverte de biomarqueurs en raison de sa capacité à analyser les mélanges complexes de protéines dans les liquides et tissus biologiques. Le profilage du protéome à base de sérum ou de plasma peut se faire à l'aide de l'acquisition dépendante des données (DDA pour *Data Dependent Acquisition*) ou de l'acquisition indépendante des données (DIA pour *Data Independent Acquisition*)¹⁴¹. Ces méthodes seront abordées dans la prochaine partie du manuscrit. A partir d'un petit nombre d'échantillons cliniques (à partir d'une dizaine) représentant deux populations distinctes (sains et malades, ou survivants et non-survivants), il est possible de réaliser des empreintes protéiques globales de chacun des groupes et de les comparer afin de mettre en évidence des profils protéiques distincts à étudier plus finement¹⁴². Des listes de protéines comme vues précédemment avec les études de Qian *et al.*¹³¹, Shen *et al.*¹³², Paiva *et al.*¹³³ et Su *et al.*¹³⁴ présentent généralement entre vingt et plusieurs centaines de candidats¹³⁸. Généralement le nombre d'échantillons analysés ne dépasse pas 20 à 30 et seulement quelques études dépassaient 500^{139,143,144}. Ces listes de protéines impactées constituent donc des biomarqueurs potentiels à vérifier.

II.3.2 La vérification

La vérification est la deuxième étape qui permet de prouver la pertinence des biomarqueurs candidats qui ont émergé lors de la phase de découverte et d'exclure les faux candidats. Cette deuxième phase doit permettre de quantifier de façon absolue et précise les protéines sélectionnées. La quantification absolue

et précise des biomarqueurs candidats nécessite des méthodes analytiques validées. Un nombre restreint de protéines (généralement < 10) ayant montré une différence entre les états sain et pathologique (ou survivants et non-survivants) lors de la phase de découverte est testé dans une cohorte plus importante et idéalement indépendante, de plusieurs dizaines à centaines d'échantillons¹³⁹. Le nombre d'échantillons cliniques est plus important que lors de la phase de découverte afin d'obtenir une analyse statistique significative. Généralement, les immunoessais avec les ELISA (*Enzyme-Liked Immunosorbent Assay*) et la protéomique ciblée par spectrométrie de masse sont utilisés pour la vérification des biomarqueurs candidats¹³⁹. De plus, les méthodes ciblées peuvent être combinées avec l'immuno-enrichissement de protéines ou de peptides par des anticorps. La quantification absolue et précise des biomarqueurs candidats nécessite des étalons internes, généralement des versions isotopiques lourdes des peptides surveillés pour les méthodes ciblées. Les ELISA, les méthodes ciblées et les approches de quantification seront présentées dans la prochaine partie du manuscrit. Les biomarqueurs candidats doivent répondre à des critères de **spécificité** et de **sensibilité**. De plus, la vérification peut également se faire grâce aux **courbes ROC** (*Receiver Operating Characteristic*). Ce sont des courbes qui permettent de choisir le seuil en fonction des sensibilités et spécificités que l'on veut privilégier. L'aire sous la courbe (AUC : *Area Under the Curve*) ROC est équivalente à la probabilité pour le biomarqueur d'avoir une valeur plus élevée pour un malade (ou non-survivant) que pour un non-malade (ou survivant) et évalue donc son pouvoir discriminant. Un biomarqueur est considéré comme excellent s'il tend vers une spécificité et sensibilité proches de 100% et donc une aire sous la courbe proche de 1.

II.3.3 La validation

La troisième phase est la **validation** des biomarqueurs, qui vise à n'évaluer que les candidats les plus prometteurs qui ont déjà été vérifiés. La validation des biomarqueurs candidats se fait sur un nombre d'échantillons encore plus important que l'étape précédente, avec des cohortes comptant parfois des milliers d'échantillons provenant de plusieurs centres. La méthode utilisée doit toujours permettre une quantification absolue des protéines. Les ELISA sont généralement préférés, bien qu'ils soient coûteux et longs à développer, ils permettent une sensibilité et un débit élevés, indispensables à cette étape. Ainsi, des cohortes de milliers d'échantillons peuvent être testées grâce aux immunoessais, si l'on s'intéresse seulement à quelques biomarqueurs (entre 1 et 10)¹³⁹. La spectrométrie de masse constitue également une alternative attrayante aux immunoessais mais exige des technologies sensibles et haut débit.

II.3.4 Limites du processus

Malgré les nombreux efforts pour trouver des biomarqueurs plus spécifiques et sensibles, seuls quelques biomarqueurs ont été mis sur le marché mais avec une faible diffusion en conditions cliniques. La

stratégie découverte, vérification et validation nécessite trois technologies différentes, la protéomique non-ciblée, la protéomique ciblée et le développement d'immunoessais. Ainsi, de nombreuses études présentent des listes de biomarqueurs candidats plutôt que des biomarqueurs réellement validés^{135,136}.

En effet, Geyer *et al.* ont recensé en 2017, 381 publications traitant la recherche de biomarqueurs plasmatiques humains avec la spectrométrie de masse¹³⁹. Sur les 381 publications, moins de la moitié des études présentaient une validation quelconque des résultats primaires et dans un quart des cas, il s'agissait d'immunoessais effectués avec les mêmes échantillons plutôt qu'avec une cohorte indépendante. Seulement 36 articles ont utilisé la protéomique ciblée pour valider les biomarqueurs potentiels. Compte tenu du besoin évident de biomarqueurs plasmatiques dans le milieu médical, on peut se demander pourquoi si peu de biomarqueurs sont découverts et validés, et pourquoi si peu de biomarqueurs sont mis sur le marché. Les raisons sont multiples, comme : (i) l'absence de méthodes analytiques bien validées; (ii) l'absence de procédures opérationnelles normalisées appropriées pour le prélèvement et le stockage des échantillons ; (iii) le manque de cohortes de patients bien caractérisées ; et (iv) les faibles spécificité et sensibilité des protéines individuelles¹⁴⁵.

III. Les méthodes de quantification des biomarqueurs

Comme il a été vu précédemment, la mise en place en clinique des biomarqueurs est un processus multi-étapes de découverte, vérification et validation qui se basent sur deux technologies : les immunoessais et la spectrométrie de masse. L'aspect multiplexe sera abordé étant donné les besoins pour la vérification d'un grand nombre de biomarqueurs. Ces deux méthodes seront présentées dans ce chapitre.

III.1 L'immunoanalyse pour le dosage de biomarqueurs

Dans un premier temps, un rappel sur les anticorps et antigènes sera exposé, puis les immunodosages seront détaillés ainsi que leurs avantages et inconvénients dans la quantification des biomarqueurs. Enfin, nous verrons comment les immunoessais peuvent être multiplexés.

Le caractère antigénique de toute substance étrangère à l'organisme permet la caractérisation et la quantification de cette dernière par des méthodes d'immunoanalyse. En effet, cette propriété universelle et spécifique à chaque composé, dont les biomarqueurs protéiques, à déclencher une réponse immunitaire et la production d'anticorps spécifiques de l'antigène par l'organisme permet la mise en place et la réussite des méthodes immunoanalytiques pour le dosage des biomarqueurs. Les immunodosages regroupent l'ensemble des méthodes analytiques mettant en jeu la réaction antigène-anticorps¹⁴⁶. Apparus dans les années 60 avec le dosage de l'insuline par Yalow et Berson¹⁴⁷, les immunodosages ont été développés en tant qu'outils de recherche et de diagnostic dans de nombreux domaines de la biologie et de la médecine. Ces méthodes de dosages se sont rapidement développées

grâce à leur sensibilité, pouvant atteindre le pg/mL¹⁴⁸ (picomolaire, attomole), et leur spécificité qui rendent possibles des dosages d'antigènes très faiblement concentrés dans des matrices complexes.

III.1.1 Anticorps et antigènes

III.1.1.a Les anticorps

III.1.1.a.i) Définition, structure et isotypes

Emil von Behring et Shibasaburo Kitasato mettent en évidence en 1890 la présence d'une substance de neutralisation dans le sang qui permet de contrer les infections tétaniques et diphtériques¹⁴⁹. Cette substance, appelée plus tard **anticorps** ou **immunoglobuline (Ig)**, est produite par l'organisme en réaction à l'introduction d'un agent reconnu comme étranger, l'**antigène**. Les anticorps sont produits par des lymphocytes B différenciés : les **plasmocytes**. Les anticorps se lient spécifiquement à l'antigène et permettent ainsi sa prise en charge par le système immunitaire afin de l'éliminer. Les anticorps sont des glycoprotéines formées de quatre chaînes polypeptidiques : deux **chaînes lourdes** et deux **chaînes légères**, reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures (Figure 12). La masse moléculaire de la chaîne lourde est d'environ 50 kDa et celle de la chaîne légère 25 kDa, un anticorps a donc une masse moléculaire d'environ 150 kDa. Les chaînes lourdes et légères sont constituées de deux domaines : un **domaine variable** et un **domaine constant**. Les domaines variables, situés aux extrémités N-terminales des deux « bras » d'un anticorps (Figure 12) sont impliqués dans la reconnaissance de l'antigène. Un anticorps possède deux sites de liaison à l'antigène, un à chaque extrémité des deux bras. Les domaines constants ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'antigène mais ont des fonctions effectrices. Ils interviennent notamment dans l'activation du système immunitaire par la voie du complément et interagissent avec des récepteurs des cellules de l'immunité. Les anticorps humains sont subdivisés en classes ou **isotypes** (IgG, IgM, IgA, IgD et IgE) selon la structure des domaines constants des chaînes lourde (γ , μ , α , δ et ϵ , respectivement). Chaque chaîne lourde est associée à une chaîne légère de classe κ ou λ . Les IgM et les IgD sont les premières immunoglobulines produites en réponse à la présence d'un antigène, puis les IgG, IgA et IgE sont produites plus tardivement. Les IgA peuvent se trouver sous forme monomérique dans la circulation sanguine (sous-classe IgA1) ou sous forme dimérique avec une chaîne de liaison peptidique J dans les sécrétions muqueuses (sous-classe IgA2)¹⁵⁰. De la même façon, les IgM forment un complexe principalement pentamérique qui contient également une chaîne de liaison polypeptidique J qui assemble le pentamère en reliant les résidus cystéine dans la région C-terminale de deux monomères IgM voisins¹⁵¹.

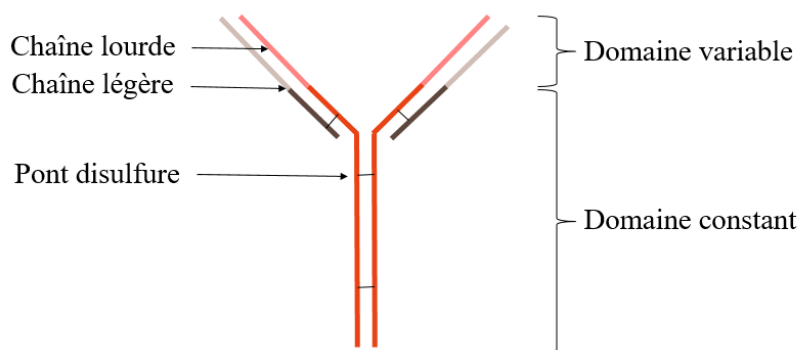


Figure 12 Représentation schématique d'un anticorps

III.1.1.a.ii) Anticorps polyclonaux

Chaque anticorps est fabriqué par un clone unique de lymphocytes B. Au terme de leur maturation les lymphocytes, transformés en plasmocytes, produisent les immunoglobulines dans le milieu extracellulaire. Les **anticorps polyclonaux** sont des anticorps issus de plusieurs clones de lymphocytes B différents et sont généralement dirigés contre plusieurs épitopes d'un antigène donné. Ils sont donc hétérogènes et possèdent une spécificité étendue. Les anticorps polyclonaux sont récupérés dans le sérum de l'individu ou l'animal immunisé. Le mode de production de ces anticorps n'assure pas une reproductibilité rigoureuse d'un lot à l'autre puisqu'ils dépendent de la réponse immunitaire de l'individu ou l'animal à un moment donné. De plus, on estime que dans un sérum, seulement une faible proportion des anticorps, de l'ordre de 1%, sont des anticorps dirigés contre l'antigène d'intérêt utilisé pour l'immunisation. Leur production est rapide mais peut poser des problèmes de sensibilité, de spécificité et de reproductibilité.

III.1.1.a.iii) Anticorps monoclonaux

En 1950, Mac Farlane Burnet a proposé la théorie de la sélection clonale selon laquelle chaque lymphocyte B n'exprime qu'un seul type d'anticorps¹⁵². Les **anticorps monoclonaux** sont issus d'un même clone de lymphocyte B, et reconnaissent un même épitope d'un antigène. La production de ces anticorps *in vitro* est très difficile à cause de la faible durée de vie des plasmocytes. Grâce aux travaux de **Georges Köhler** et **César Milstein** en 1975 sur l'hybridation cellulaire, la production illimitée d'anticorps monoclonaux *in vitro* à partir de lignées cellulaires hybrides stables est rendue possible¹⁵³. Cette technique repose sur des cellules hybrides ou hybridomes, résultant de la fusion entre des lymphocytes B murins et un myélome de la même espèce grâce à l'addition de polyéthylène glycol (PEG) qui induit la fusion membranaire (Figure 13). Les cellules de myélomes de souris ont la propriété de se multiplier *in vitro* en donnant des clones immortels, à la différence des lymphocytes. En réalisant une fusion entre une cellule myélomateuse et un lymphocyte B d'une souris immunisée, on obtient un hybridome qui possède la spécificité du lymphocyte B et la malignité du myélome, c'est-à-dire sa capacité à se multiplier indéfiniment et rapidement. Afin d'éliminer les cellules myélomateuses non fusionnées, on utilisera un milieu de culture sélectif HAT (milieu de culture hypoxanthine aminoptérine

thymidine). Dans ce milieu sélectif, les plasmocytes non fusionnés meurent rapidement, car ces cellules myéломateuses déficientes pour l'enzyme hypoxanthine - guanine - phosphoribosyl - transférase (HGRPT) sont incapables de survivre dans ce milieu. Chaque clone cellulaire hybride, une fois isolé, produit le même anticorps d'intérêt qui est donc qualifié de monoclonal.

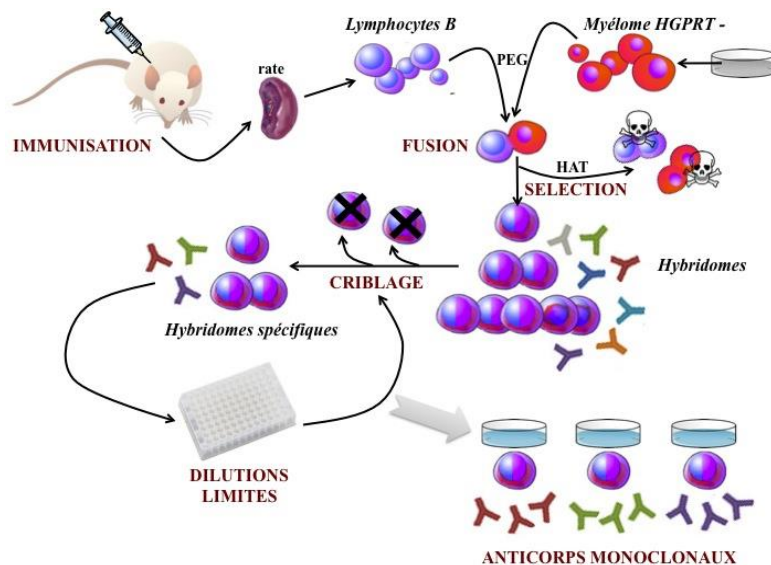


Figure 13 Production des anticorps monoclonaux d'après les travaux de Köhler et Milstein¹⁵³

III.1.1.b Liaison à l'antigène

La première fonction de l'anticorps est de se lier à un antigène puis de participer à la réponse immunitaire humorale en éliminant les agents étrangers. La réaction anticorps-antigène est à la base de tous les immunodosages. Un anticorps a la capacité de reconnaître et de se lier spécifiquement à un antigène par l'interaction de son **paratope** avec un des sites à la surface de l'antigène appelé l'**épitope** (Figure 14). Le paratope d'un anticorps est la partie qui assure la fonction de reconnaissance de l'antigène. Chaque paratope reconnaît de façon spécifique un épitope d'un antigène. Le paratope se trouve aux extrémités des « bras » dans la région variable. Un épitope moyen est constitué d'environ 15 résidus¹⁵⁴. Les antigènes présentent généralement de nombreux épitopes et peuvent donc être reconnus par plusieurs anticorps différents.

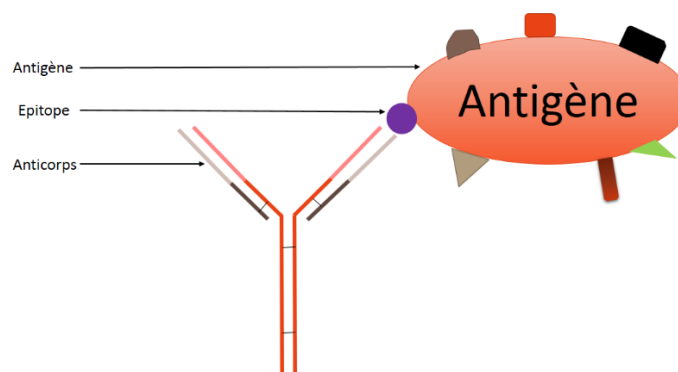
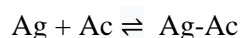


Figure 14 Représentation schématique de l'interaction antigène anticorps

L'interaction paratope/épitope met en jeu des liaisons non-covalentes : interaction ioniques, interactions de Van der Waals, liaisons hydrogènes et interaction hydrophobes¹⁵⁵. De multiples liaisons entre l'antigène et l'anticorps assurent une interaction forte et stable. L'énergie de ces liaisons varie entre 4 et 30 kJ/mol et l'énergie totale de liaison entre un anticorps et un antigène varie entre 34 et 65 kJ/mol. Du fait de la nature non-covalente des liaisons, ces interactions sont par conséquent réversibles. Le complexe antigène-anticorps sera stable si le nombre de liaisons qui interviennent est suffisant pour assurer une énergie de liaison élevée. A l'échelle macroscopique, ces interactions peuvent être décrites simplement :



où Ag représente l'antigène, Ac l'anticorps et Ag-Ac le complexe antigène-anticorps formé. Il est admis que cet équilibre obéit à la loi d'action de masse dans laquelle les concentrations de ses constituants sont liées entre elles par la relation suivante :

$$Kd = [Ag][Ac]/[Ag-Ac]$$

Où Kd est la constante de dissociation à l'équilibre du complexe antigène-anticorps. Cette grandeur caractérise l'**affinité**, c'est-à-dire la force de l'interaction de l'anticorps pour son antigène. Plus l'affinité est grande et plus la constante de dissociation est faible et plus la sensibilité de l'immunodosage correspondant sera meilleure. En effet, le dosage d'un antigène résulte de la formation du complexe antigène-anticorps. Or, d'après la loi d'action de masse, qui régit cette formation, les complexes antigène-anticorps ne se formeront efficacement que si la concentration des réactifs mis en jeu (antigènes et anticorps) est supérieure ou égale à la valeur de la constante de dissociation du complexe.

La **spécificité**, au même titre que l'affinité est une caractéristique essentielle de l'interaction antigène-anticorps. Un anticorps idéal serait capable de former un complexe antigène-anticorps avec un unique antigène. Cependant, on sait que des réactions croisées non-spécifiques sont possibles. Ainsi, pour pouvoir qualifier et valider un immunodosage, il faudra démontrer que les anticorps utilisés ne

reconnaissent qu'un seul antigène présent dans l'échantillon étudié et permettent donc le dosage sélectif de cet analyte.

III.1.2 Les dosages immuno-enzymatiques

III.1.2.a Marqueurs enzymatiques

Les immunodosages sont basés sur la formation et la mesure de complexes antigène-anticorps avec l'utilisation d'un **traceur**. Il s'agit d'une entité liée chimiquement à l'antigène ou l'anticorps et qui permet de délivrer un signal quantitativement mesurable lors de la formation du complexe. Les **traceurs enzymatiques** qui utilisent une enzyme comme marqueur seront développés dans cette partie. Les immunodosages utilisant une enzyme comme traceur sont appelés **dosage immuno-enzymatique**. Dans ces dosages, le traceur enzymatique est couplé de façon covalente à l'antigène ou à l'anticorps, permettant ainsi de quantifier la formation du complexe antigène-anticorps. La quantification est possible par la mise en œuvre de la réaction enzymatique en présence du substrat approprié dont la transformation par la réaction enzymatique induit un signal quantitativement mesurable et proportionnel à la concentration de l'enzyme. Ainsi, l'addition du substrat approprié à l'enzyme à la dernière étape de l'immunodosage permet la formation d'un produit coloré en présence de l'enzyme dont l'absorbance peut être mesurée par un spectrophotomètre. Les enzymes les plus couramment utilisées sont, la peroxydase de raifort (**HRP** pour *Horse-Radish Peroxidase*) et la phosphate alcaline.

III.1.2.b Principe

- D'abord décrite par Engvall et Perlmann, la technique **ELISA** est une des techniques les plus utilisées pour la détection de molécules et le diagnostic d'une maladie¹⁵⁶. L'ELISA peut être utilisé pour évaluer la présence d'un antigène dans un échantillon au travers d'une réaction colorée produite par l'action d'une enzyme conjuguée à un anticorps ou à un antigène. Le test ELISA est classiquement réalisé sur des plaques de polystyrène de 96 ou 384 puits dans lesquels l'antigène ou l'anticorps est lié par adsorption passive¹⁵⁷. Les ELISA peuvent être regroupés sous quatre catégories : les ELISA direct, indirect, sandwich et compétitif. Nous décrirons les ELISA sandwich et les ELISA indirects.
 - L'**ELISA sandwich** nécessite deux anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène (Figure 15). La première étape consiste à fixer sur le support, **l'anticorps de capture** par adsorption passive. Après saturation des sites non occupés avec de la BSA ou de la caséine, l'échantillon à analyser est déposé dans une deuxième étape et va ainsi se fixer sur les sites spécifiques des anticorps. Dans une troisième étape, on ajoute un deuxième anticorps spécifique conjugué à une enzyme, appelé « **l'anticorps traceur** ». L'antigène se trouve ainsi pris en sandwich entre les deux

anticorps spécifiques. Pour que l'anticorps traceur puisse se lier à l'antigène lié à l'anticorps de capture, il est nécessaire que les deux anticorps réagissent contre des épitopes différents. Enfin dans une quatrième et dernière étape, l'ajout d'une solution révélatrice contenant du substrat de l'enzyme permet la réaction colorée et l'intensité de cette coloration mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre est proportionnelle à la quantité d'antigène fixée sur la phase mobile.

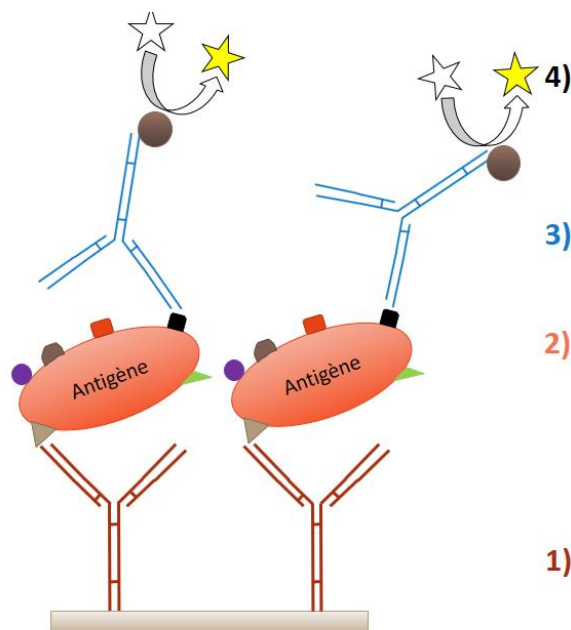


Figure 15 Test ELISA sandwich

Les ELISA sandwich font partis des tests immunologiques les plus sensibles avec une limite de sensibilité pouvant atteindre quelques pg/mL. A titre d'exemple, la toxine epsilon de *Clostridium perfringens* est détectée avec des limites de détection d'au moins 10 à 300 pg/mL dans des matrices complexes¹⁴⁸.

- L'**ELISA indirect** (Figure 16) est couramment utilisée pour doser des anticorps dans un échantillon. Dans ce cas, l'antigène est fixé sur le support. Dans une deuxième étape, l'échantillon contenant l'anticorps à détecter est déposé et se lie à l'antigène. Dans une troisième, on fixe l'anticorps secondaire couplé à une enzyme est ajouté. Enfin, l'ajout du substrat de l'enzyme permet la réaction colorée. L'application la plus connue est le dépistage de la réponse au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) par la détection d'anticorps anti-VIH dans le sérum sanguin. De plus, l'ELISA indirect est l'un des tests immunologiques les mieux validés et les plus couramment utilisés dans le diagnostic des allergies¹⁵⁸.

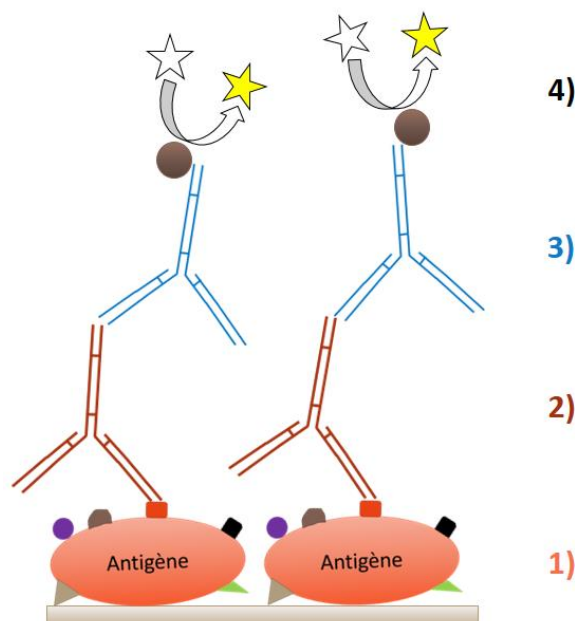


Figure 16 ELISA indirect

III.1.2.c Les avantages et inconvénients des immuno-dosages

III.1.2.c.i) Les avantages

Le dosage ELISA est la méthode de choix pour la quantification de biomarqueurs. En effet, cette méthode nécessite peu de **volume** d'échantillons et peut être réalisé sur des échantillons complexes non purifiés. L'échantillon est généralement simplement dilué en tampon avant d'être analysé. En plus de la **facilité d'utilisation**, les **temps d'exécution** sont courts, en général moins de 2 h, et sont en accord avec une utilisation clinique. La **sensibilité** des ELISA est également très avantageuse avec des limites de détection de l'ordre du pg/mL (picomolaire, attomole)¹⁴⁸. Enfin, le **coût** d'analyse est faible et le **haut débit** possible sur plaque 96 ou 384 rend possible l'utilisation des tests ELISA de façon régulière. Ainsi, les tests ELISA, qui ont une large gamme d'application notamment en clinique où ils sont utilisés dans tous les laboratoires de biochimie clinique pour des tests urgents et de routine. Par exemple, des taux élevés d'oestrogènes sont associés à un risque accru de cancer du sein chez les femmes ménopausées et actuellement, les taux d'oestrogènes et les métabolites d'oestrogènes dans les urines sont mesurés par ELISA en raison de l'efficacité du traitement des échantillons et du coût d'analyse^{159,160}. L'allergie alimentaire touche 1-3% des adultes et 4-6% des enfants. De nombreux ELISA ont été développés et sont utilisés dans l'industrie alimentaire pour la détection et la quantification d'allergènes non déclarés ou « cachés » dans la nourriture avec des temps d'exécution d'environ 30 min¹⁶¹. Des ELISA sont utilisés pour la détection et la quantification de protéines d'œufs, protéines de cacahuètes, gluten, protéines de soja, caséine et autres protéines de lait, protéines d'amandes et protéines de noisettes¹⁶¹.

III.1.2.c.ii) Les inconvénients

Malgré une forte sensibilité et une facilité de mise en œuvre, les ELISA peuvent souffrir de quelques défauts. Ils peuvent présenter notamment un problème de réactivité avec des **interférents**. La plupart des interférences dans les immunoessais sont dus à une réaction croisée avec des épitopes proches de ceux de la cible à détecter, à un effet matrice, ou à la présence d'anticorps hétérophiles.

Les anticorps hétérophiles humains anti-immunoglobuline d'animaux sont des anticorps généralement de faible affinité dirigés contre des immunoglobulines animales spécifiques. Les plus courants sont les anticorps HAMA (*Human Anti-Mouse Antibodies*) dirigés contre les anticorps de souris. Dans les échantillons sanguins, ces anticorps causent des interférences positives ou négatives en se fixant sur les anticorps utilisés dans les immunoessais. Cette interférence peut cependant être levée ou minimisée par l'ajout d'anticorps murins dans l'échantillon.

III.1.3 Le multiplexage des immunoessais

Dans certaines pathologies, il est possible de diagnostiquer la maladie avec précision avec un seul analyte, comme pour le VIH. Cependant, la surveillance de maladies multifactorielles plus complexes comme les cancers ou le sepsis nécessitent l'analyse de plusieurs biomarqueurs. Par conséquent, la validation de nouveaux biomarqueurs et leur dosage multiplexé par des immunoessais offre la possibilité de mesurer simultanément plusieurs protéines dans un même échantillon, ce qui réduit les coûts, le temps d'analyse et le volume d'échantillon. Pour ces raisons, les immunoessais multiplexes peuvent jouer un rôle de premier plan dans la validation et la quantification de biomarqueurs.

Des **biopuces à anticorps** peuvent être utilisées pour la détection et la quantification de peptides et de protéines. Des anticorps spécifiques de cibles peptidiques ou protéiques sont déposés sur la surface des biopuces. Une centaine d'anticorps différents peuvent être déposés. Les cibles contenues dans l'échantillon sont capturées et détectées grâce à un deuxième anticorps marqué¹⁶². Ce type de biopuces basé sur un test de type sandwich permet d'effectuer des détections et quantifications multiplexes.

Dans la technologie Luminex™, des **microbilles** de différentes couleurs (jusqu'à 100 couleurs différentes) sont utilisées afin d'être identifiées et analysées. Les microbilles sont fixées de façon covalentes à des anticorps permettant de détecter les antigènes d'intérêt. L'identification des antigènes fixés est assurée par l'excitation d'un fluorochrome couplé à l'anticorps de révélation¹⁶². Des technologies comme Luminex™ ou Bio-PlexPro™ sont utilisées par exemple pour la détection d'allergies, de maladies autoimmunes ou des maladies infectieuses^{163,164}. Actuellement, le format d'immunoessai sur billes en suspension constitue la technologie dominante pour l'analyse des protéines en multiplexe approuvée par la FDA en milieu clinique¹⁶⁵. Néanmoins, bien que ces immunoessais aient une capacité de multiplexage théorique élevée (jusqu'à 100-plex), la réactivité croisée des anticorps de

capture et/ou de détection peut compromettre la fiabilité de la lecture. La réactivité croisée des essais multiplexés augmente de façon quadratique avec le nombre de cibles¹⁶⁶. Ainsi, développer un immunoessai multiplexe nécessite d'effectuer des tests de **réactivités croisées** de l'ensemble des tests contre chacun des antigènes cibles afin de s'assurer qu'il n'y a pas ou peu de réactivité croisée.

Ainsi, les immunoessais multiplexes permettent de quantifier un panel de biomarqueurs. Cependant, de tels dispositifs nécessitent un développement long, notamment pour la production des anticorps et une validation importante.

III.2 Quantification de protéines par spectrométrie de masse

La **spectrométrie de masse (MS)** est également un outil de choix pour l'analyse des biomarqueurs protéiques. Elle peut fournir des informations qualitatives et quantitatives sur les protéines dans les échantillons biologiques. La MS permet d'une part de générer des profils protéiques ou peptidiques complexes pouvant être comparés entre différents échantillons pour la découverte de potentiels biomarqueurs. D'autre part, elle peut aussi être appliquée à l'analyse spécifique de protéines cibles d'intérêt¹⁶⁷. Elle permet une quantification absolue de ces protéines en milieu biologique avec la sensibilité, la sélectivité, la justesse et la précision nécessaire¹⁶⁸. Malgré l'avantage des immunoessais en termes de coût et de sensibilité, la mise au point de méthodes MS est généralement plus courte que le développement d'un ELISA qui demande la production de nouveaux anticorps. Enfin, la MS a la capacité de fournir des informations structurales sur une protéine et ses protéoformes, terme introduit par Smith *et al.* en 2013¹⁶⁹ afin de décrire toutes les différentes formes moléculaires dans lesquelles le produit protéique d'un seul gène peut se trouver. En effet, la quantification des protéoformes particulières peut être hautement informative pour de nombreux processus biologiques et pathologiques¹⁷⁰ et donc être source de biomarqueurs potentiels.

Après un bref rappel du principe général de la MS, nous détaillerons au travers d'exemples les approches protéomiques quantitatives, notamment les différents instruments et modes d'acquisition, les méthodes de préparation d'échantillons et les particularités des quantifications relatives et absolues. Enfin, nous illustrerons les apports de la spectrométrie de masse quantitative dans le domaine des biomarqueurs, notamment l'aspect multiplexe et la caractérisation des protéoformes.

III.2.1 Principe général

La **MS** est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par la mesure du **rapport masse sur charge de l'ion** (m/z où m est la masse moléculaire de l'ion et z la charge de l'ion). Le principe réside dans le transfert en phase gazeuse des molécules et leur ionisation. Le spectromètre de masse se compose d'une **source d'ionisation** suivie d'un ou plusieurs **analyseurs** qui permettent la séparation des ions selon leur rapport m/z , d'un **détecteur** qui compte les ions analysés et

amplifie le signal, et enfin d'un système qui **traite le signal** et permet une représentation de son intensité en fonction du rapport m/z (Figure 17).

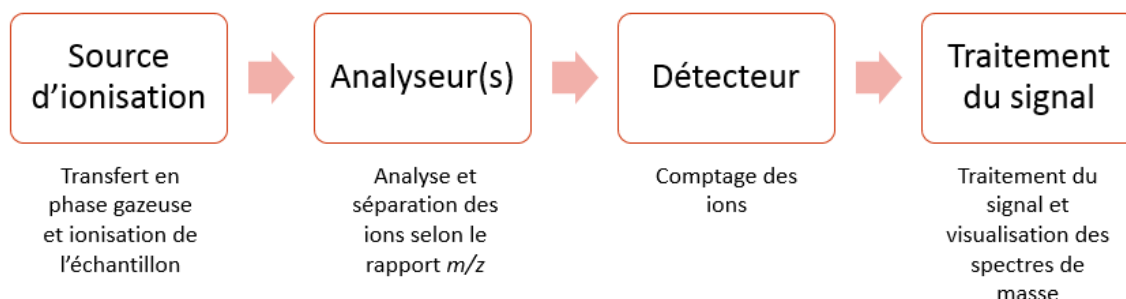


Figure 17 Description d'un spectromètre de masse

- Il existe différents types de sources d'ionisation selon la nature du composé à analyser et la matrice dans laquelle il se trouve. Pour les composés non volatiles comme les protéines, les sources principales sont le MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption*) et l'ionisation par électrospray (ESI). Pour la source ESI, les analytes, présents en phase liquide, sont transférés en phase gazeuse et ionisés par électronebulisation. Brièvement, une tension est appliquée à la pointe d'un capillaire ce qui crée une dispersion du liquide sous forme de microgouttelettes chargées. Le solvant contenu dans ces gouttelettes s'évapore laissant de plus en plus de charge à leur surface. Les microgouttelettes deviennent instables au moment où les forces de cohésions des microgouttelettes sont inférieures à la répulsion des charges (limite de Rayleigh). Ce processus est répété jusqu'à obtenir un ion en phase gazeuse.
- Il existe plusieurs types d'analyseurs avec des résolutions croissantes, comme par exemple : quadripôle, piège à ions, temps de vol (TOF) et Orbitrap. Lorsque plusieurs analyseurs sont couplés séquentiellement, on parle de spectrométrie tandem (**MS/MS**).
- Les détecteurs à transformée de Fourier de type Orbitrap convertissent le courant formé par la fréquence d'oscillation des ions en rapport m/z . Ce signal est ensuite converti et représenté par son intensité en fonction du rapport m/z .

La MS est appliquée à l'analyse des protéines par deux techniques principales, soit par la détection des peptides issus d'une digestion enzymatique : le *bottom-up*, soit par l'analyse des protéines intactes : le *top-down*¹⁷¹. L'approche *bottom-up* est largement utilisée pour quantifier les protéines car elle est généralement plus sensible que la méthode *top-down*¹⁷¹. L'ionisation des peptides par les sources ESI génère un ou deux états de charges, contrairement aux protéines de masses moléculaires de plusieurs dizaines de kDa qui présentent des spectres de masse complexes liés aux nombreux états de charges et à la présence de modifications post-traductionnelles conduisant à une dispersion du signal. La majorité des peptides possèdent alors un rapport m/z compris entre 300 et 1400 et sont facilement analysables par

les spectromètres de masse conventionnels¹⁷² tel que les quadripôles ou les Orbitraps. Ainsi, dans les approches *bottom-up*, les analytes ne sont plus les protéines mais les peptides issus de la digestion des protéines d'intérêt à l'aide d'une enzyme protéolytique comme la trypsine. La quantification est alors réalisée au niveau des peptides **protéotypiques**, c'est-à-dire uniques à une protéine, et « rapporteurs » de la protéine. Lors de la vérification de biomarqueurs, les méthodes de MS dites ciblées, par opposition aux méthodes de *discovery* à large spectre, sont focalisées sur la mesure de ces peptides rapporteurs pour apporter un gain de sensibilité et de précision. Ces méthodes ciblées sont présentées ci-dessous.

III.2.2 Modes d'acquisition et instruments pour la quantification des protéines

La quantification de protéines est cruciale pour la découverte et la vérification de biomarqueurs potentiels. Les méthodes appliquées à la vérification des biomarqueurs, objet de cette thèse, seront détaillées. Trois approches ont été développées dans ce but : la méthode **SRM** (*Selected Reaction Monitoring*) ou **MRM** (*Multiple Reaction Monitoring*), la méthode **PRM** (*Parallel Reaction Monitoring*) et très récemment l'approche **DIA** (pour *Data Independent Acquisition*). La méthode SRM/MRM est une approche protéomique ciblée classique réalisée sur un spectromètre de masse basse résolution de type triple quadripôle. Plus récemment, les spectromètres de masse hybrides haute résolution comme le Q-exactive et le Q-TOF ont été développés et utilisés en mode ciblé PRM. Enfin, la quantification DIA récemment introduite sera présentée, même si non-ciblée, car elle permettra à terme de pallier les limites des méthodes ciblées. Ces différentes approches seront développées dans les paragraphes suivant.

III.2.2.a Le mode SRM et MRM

La quantification ciblée permet de mesurer quelques protéines d'intérêt avec une grande sensibilité, reproductibilité et précision. Les peptides issus des protéines digérées par une protéase sont séparés par la chromatographie liquide et les fractions sont analysées par le spectromètre de masse. Ce dernier mesure et transmet le rapport m/z des ions peptidiques spécifiques des protéines d'intérêt¹⁷³. La méthode **SRM** appelée aussi **MRM** est la méthode historique de l'analyse ciblée. Les analyses avec la méthode SRM ou MRM se font à l'aide d'un système de type triple quadripôle (QQQ). Le quadripôle est un analyseur constitué de quatre électrodes qui sont soumises, de façon opposée, deux à deux, au même potentiel. En appliquant cette différence de potentiel entre chaque paire d'électrodes, il se crée un champ électrique quadripolaire. Les ions peptidiques sont sélectionnés dans le premier quadripôle (Q1) en fonction de leur rapport m/z , fragmentés dans le deuxième quadripôle (Q2) par collision CID (*collision-induced dissociation*), puis les fragments sont guidés vers le troisième quadripôle (Q3) qui permet la sélection des ions fils avant la détection (Figure 18). La double sélection ion parent / ion fils, nommée transition permet une analyse spécifique et permet de réduire considérablement le bruit de fond, ce qui améliore le rapport signal/bruit¹⁷⁴.

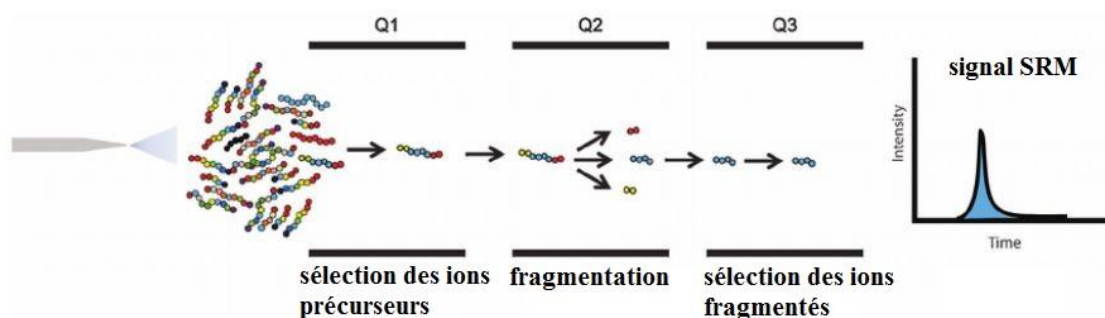


Figure 18 Vue d'ensemble de la méthode LC-SRM-MS, adaptée de Angel *et al.* 2012¹⁷⁴

Malgré la spécificité, la sensibilité et la reproductibilité élevées des mesures SRM¹⁷⁵, la sélection en deux étapes sur un instrument à basse résolution n'entraîne pas l'élimination complète d'ions parasites de rapport m/z proches qui peuvent entraver la quantification précise et spécifique des protéines¹⁷⁶. Pour tenter de s'en affranchir, au moins trois transitions par peptide doivent être suivies ainsi que le ratio entre ces transitions. De plus, les analyses SRM nécessitent le développement d'un ensemble prédéfini et validé de peptides et de fragments peptidiques. Il faut choisir à priori les peptides et les fragments, et donc les transitions optimales à suivre.

III.2.2.b Le mode PRM et HR-MRM

Depuis 2012, les spectromètres de masse haute résolution de type **Q-exactive** (Figure 19) se sont imposés comme une alternative crédible aux triples quadripôles^{177,178}. Il s'agit d'un spectromètre de masse hybride combinant un **quadripôle** et un **Orbitrap**. L'avantage majeur de la haute résolution par rapport à la basse résolution est la capacité de différencier des analytes de rapport m/z très similaires mais non identiques.

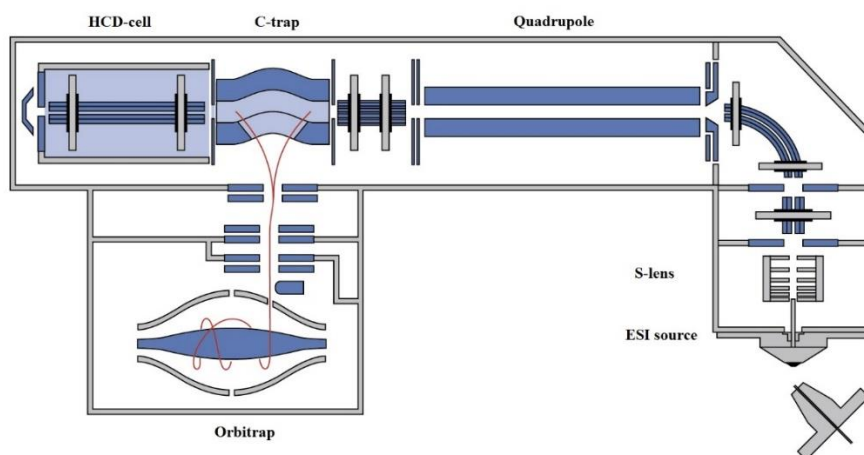


Figure 19 Représentation schématique d'un Q-exactive

Le Q-exactive est notamment composé d'un **quadripôle** pour la sélection des ions fils ou précurseur couplé à un **Orbitrap**, via la C-trap, pour une détection à haute résolution et grande précision de mesure

de masse (*High Resolution/Accurate Mass HR/AM*). Il permet d'atteindre une précision de masse < 5 ppm. Une **cellule de collision HCD** (*Higher-energy Collision Dissociation*)¹⁷⁹, à plus haute énergie de dissociation que la fragmentation CID, permet l'excitation de l'ion, conduisant à sa **fragmentation**. Les fragmentations HCD ont lieu dans une cellule de collision distincte de la C-Trap. Les ions entrent en collision avec des molécules de gaz neutre (azote par défaut) dans la cellule, entraînant la rotation, puis l'étirement et finalement la rupture des liaisons, aboutissant à la création des ions fragments. Les ions une fois fragmentés, sont renvoyés dans la C-Trap avant d'être injectés dans l'Orbitrap.

Le Q-exactive en mode ciblé peut être utilisé selon deux modes : le mode **SIM** (*single ion monitoring*) et le mode **PRM**. Pour le mode SIM, les ions précurseurs, après sélection dans le quadripôle, sont stockés dans la C-trap puis sont envoyés intact dans l'Orbitrap¹⁷⁸. En mode **PRM**, après sélection des ions précurseurs dans le quadripôle, les ions sont stockés dans la C-trap, puis fragmentés dans une cellule HCD, enfin tous les ions fragments sont analysés en parallèle (Figure 20). L'ensemble des ions fragments est détecté à haute résolution, ce qui contribue à une détection plus spécifique par rapport au mode SRM/MRM. Le choix des transitions se fait post-acquisition, ce qui simplifie également la mise au point de la méthode. Le Q-exactive combine les avantages des instruments triple quadripôles avec une sélection des précurseurs d'intérêt et des Orbitraps avec la mesure HR/AM.

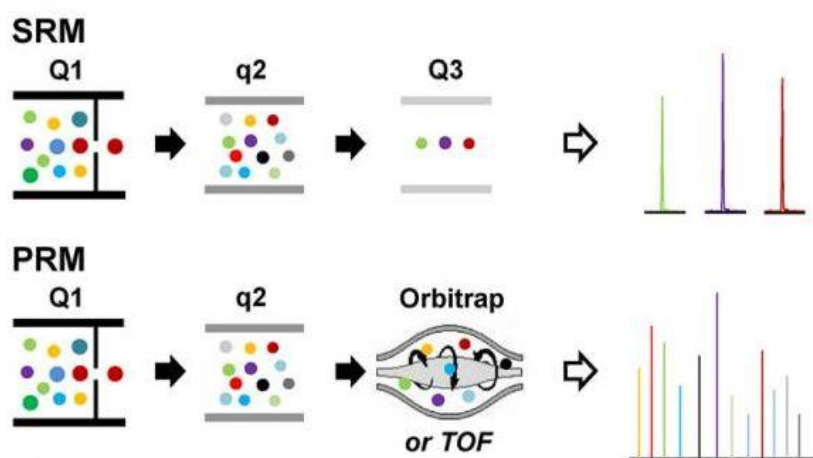


Figure 20 Représentation schématique des modes SRM et PRM, d'après Shi *et al.* 2016¹⁸⁰

Plusieurs études ont comparé les performances du SRM et PRM pour la quantification de biomarqueurs. Dans la Figure 21, les longueurs des rayons indiquent l'amplitude des performances analytiques¹⁸⁰. D'après Shi *et al.*¹⁸⁰, les méthodes PRM possèdent des capacités de multiplexage et une reproductibilité similaires à celles du SRM, mais avec une spécificité plus élevée en raison de l'utilisation d'un analyseur de masse HR/AM. Peterson *et al.*¹⁷⁷ ont montré que le mode PRM permettait d'obtenir des données quantitatives sur une gamme dynamique plus large qu'en SRM en présence de matrice complexe (levure). De même, Gallien *et al.*¹⁷⁸ ont montré que la méthode PRM appliquée à des échantillons d'urine présentait des performances similaires ou supérieures en termes de sélectivité, de gamme dynamique et de sensibilité comparée à la SRM. La méthode SRM subissait des interférences pour des peptides alors

que ces interférences sont absentes en PRM. Alors qu'en tampon¹⁷⁷, la gamme dynamique de quantification de SRM et PRM est équivalente, les études tendent à montrer que plus la matrice est complexe, plus l'apport de la haute résolution est important en termes de gamme dynamique de quantification car elle permet d'éliminer les interférences.

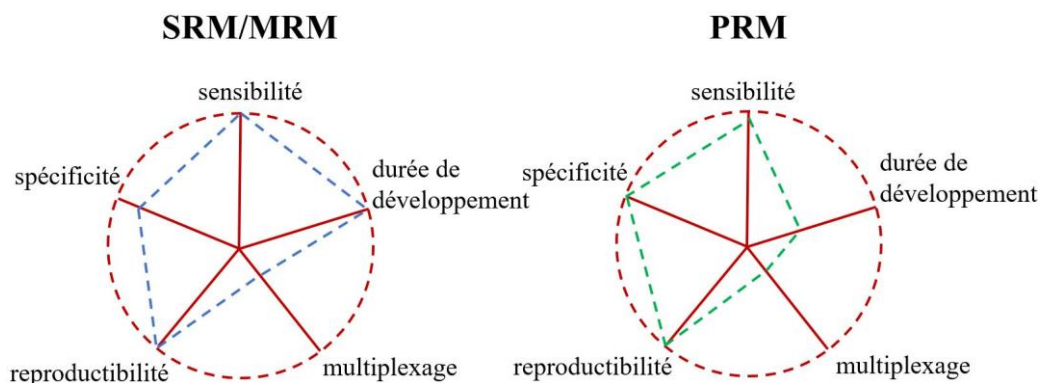


Figure 21 Comparaison des performances SRM et PRM, adaptée de Shi *et al.* 2016¹⁸⁰

Un autre appareil à haute résolution de type hybride avec analyseur à temps de (**Q-TOF**) permet de travailler en mode ciblé MRM Haute Résolution (**HR-MRM**). En 2015, une première étude menée par Schilling *et al.*¹⁸¹ sur un Q-TOF a permis d'évaluer le mode HR-MRM. Ils ont pu analyser jusqu'à 500 peptides en une analyse dans des échantillons biologiques complexes comme des lysats de levures et des lysats de cellules d'*E.coli*. Ils ont obtenu une plage dynamique globale de 3 à 3,5 ordres de grandeur dans ces échantillons complexes avec des performances similaires à des essais sur triples quadripôles pour la limite de détection (LOD pour *Limit of Detection*) et la limite de quantification (LOQ pour *Limit of Quantification*). En 2018, Nguyen *et al.*¹⁸² ont comparé les capacités d'un triple quadripôle basse résolution en mode MRM, d'un Q-exactive haute résolution en mode PRM et d'un Q-TOF haute résolution en mode MRM-HR pour la quantification absolue d'un anticorps monoclonal thérapeutique dans le sérum et le plasma. Ils ont confirmé que la sensibilité des méthodes en haute résolution était significativement plus élevée que la méthode en basse résolution dans les échantillons de sérum et de plasma après une préparation d'échantillons simplifiée.

III.2.2.c Les modes DDA et DIA

Les données acquises en mode ciblé (SRM/MRM ou PRM/MRM-HR) ne permettent d'avoir des informations que sur les peptides sélectionnés a priori. Ainsi, si une nouvelle protéine veut être ajoutée à l'acquisition des données, une nouvelle méthode doit être développée et un nouvel essai de l'échantillon ou de la cohorte doit être effectué. Ces inconvénients ont conduit au développement d'un mode d'acquisition indépendant des données, appelé **DIA**, par opposition aux méthodes **DDA** (pour *Data Dependent Acquisition*). La méthode DIA combine les avantages des méthodes ciblées et non-ciblées (méthode DDA). La méthode d'acquisition dépendante des données, appelée DDA permet de

réaliser une analyse protéomique sans *a priori* et est essentiellement utilisée pour la phase de découverte de biomarqueurs potentiels. Ce chapitre traite essentiellement des méthodes utilisées pour la vérification des biomarqueurs, néanmoins il est nécessaire de présenter le mode DDA parallèlement au mode DIA.

III.2.2.c.i) Approche DDA

La méthode **DDA** peut être découpée en deux étapes cycliques. Dans un premier temps, un *full scan-MS*, c'est-à-dire un balayage des ions transmis à l'analyseur, est réalisé et les *N* ions les plus intenses (*N* généralement entre 10 et 20) sont, dans un second temps, fragmentés et analysés (analyse MS/MS). Ces étapes sont répétées tout au long de l'analyse de l'échantillon. La performance du spectromètre de masse dépend de la rapidité de l'instrument à enchaîner ces étapes. Ainsi, les rapports *m/z* et les spectres MS et MS/MS sont comparés aux banques de données et permettent ainsi d'identifier chaque peptide de façon non ambiguë¹⁸³. Les appareils les plus utilisés pour le mode DDA sont le plus souvent constitués d'un premier analyseur de type quadripôle ou trappe linéaire et d'un second analyseur haute résolution de type Orbitrap ou TOF. La vitesse d'acquisition est cruciale afin d'augmenter le nombre de fragmentations et donc le nombre de peptides identifiés. Ainsi, Kelstrup *et al.*¹⁸⁴ ont comparé les capacités du Q-exactive HF-X à son prédécesseur le Q-exactive HF. Ils ont montré une augmentation de la vitesse d'acquisition de 78% du Q-exactive HF-X par rapport à son prédécesseur et donc une amélioration du nombre global de peptides et de protéines identifiés avec un taux d'identification > 1200 peptides par minute.

L'analyse DDA a plusieurs limitations dont la principale est la sélection des 10-20 ions les plus abondants ce qui biaise l'analyse vers les protéines les plus abondantes. De plus, les peptides sélectionnés dépendent des conditions d'ionisation et des effets matrices, ce qui crée une variabilité de la sélection selon l'échantillon analysé et limite les applications quantitatives du mode DDA, or ces dernières sont essentielles pour la vérification de biomarqueurs potentiels. C'est pourquoi une nouvelle méthode d'acquisition a été développée : l'analyse DIA.

III.2.2.c.ii) Approche DIA

Contrairement au mode DDA, la fragmentation des peptides se fait sans sélection préalable du précurseur avec le mode d'acquisition **DIA**, ce qui entraîne une faible perte d'informations¹⁸⁵. Le principe de l'analyse DIA, terme générique, introduit en 2003 par Purvine *et al.*¹⁸⁶, est l'acquisition systématique de spectres MS/MS quel que soit le contenu du scan de surveillance. Dans la famille des méthodes DIA, la technique DIA-**SWATH** (*Sequential Window Acquisition of all Theoretical Fragment Ion Mass Spectra*), marque déposée de SCIEX, développée par Gillet *et al.*¹⁸⁵ est une variante spécifique de l'analyse DIA. Cette variante consiste à isoler dans Q1 tous les ions peptidiques à l'intérieur d'une fenêtre définie, puis les ions sont fragmentés ensemble dans la cellule de collision et le mélange hautement complexe de tous les ions produits est analysé par un analyseur de masse HR/AM Orbitrap ou TOF. Des plages de rapport *m/z* de précurseurs sont fixées (par exemple 25 Da) sur une large gamme

de m/z puis des spectres MS/MS sont acquis de façon consécutive, où tous les ions inclus dans ces fenêtres sont fragmentés (Figure 22). La taille des plages d'isolement impacte directement la performance de la méthode car, plus elles sont larges plus le temps de cycle sera court, ce qui permet l'augmentation du temps d'accumulation des ions. Cependant, plus les plages sont larges, plus le nombre d'ions fragmentés est important, plus les spectres de fragmentation sont complexes. Les données générées par l'analyse DIA sont très informatives, complexes mais quantitatives¹⁸⁷. De plus, elles peuvent être utilisées pour des analyses « ciblées » post-acquisition. Cependant, l'analyse de ce type de données est beaucoup plus fastidieuse et difficile à effectuer que celles générées par les méthodes ciblées, et nécessite la création de banque de données et des logiciels dédiés. Les bibliothèques spectrales sont acquises en DDA et sont généralement spécifiques aux travaux effectués et donc longues et laborieuses à construire. C'est pourquoi Kang *et al.*¹⁸⁸ ont développé en 2017 SWATH-ID pour permettre l'identification et la quantification des peptides avec la création d'une bibliothèque spectrale interne améliorée, ce qui élimine le besoin d'exécuter des analyses DDA supplémentaires. Ainsi, il est possible de quantifier un grand nombre de protéines dans des milieux complexes grâce à l'analyse DIA. Liu *et al.*¹⁸⁹ ont quantifié 342 protéines plasmatiques (1904 peptides) de deux paires de jumelles monozygotes et dizygotes sur 232 échantillons de plasmas prélevés sur plusieurs années afin d'évaluer les caractères de l'héritabilité et de l'environnement. Les concentrations des protéines plasmatiques ont été estimées à six ordres de grandeur, atteignant pour certaines protéines plusieurs ng/mL. De plus, les données SWATH-MS ont été comparées aux mesures SRM obtenues par IDA et étaient généralement bien corrélées avec une moyenne de $R=0,85$ (corrélation de Pearson). Ainsi, les approches DIA apparaissent comme une perspective pour la quantification des protéines à large spectre dans des échantillons complexes. Cependant, le traitement des données générées reste encore un travail difficile. Il existe des plateformes logicielles, comme ABSciex PeakView, Biognosys Spectronaut, OpenSWATH, Thermo Pinpoint et Waters Protein Lynx Global Server, qui prennent en charge l'interprétation des données DIA. Il est également possible d'utiliser la plateforme logicielle Skyline, outil familier pour beaucoup, pour l'interprétation des données DIA¹⁹⁰, où une bibliothèque spectrale est générée par DDA et les chromatogrammes sont extraits des données DIA pour tous les peptides de la bibliothèque.

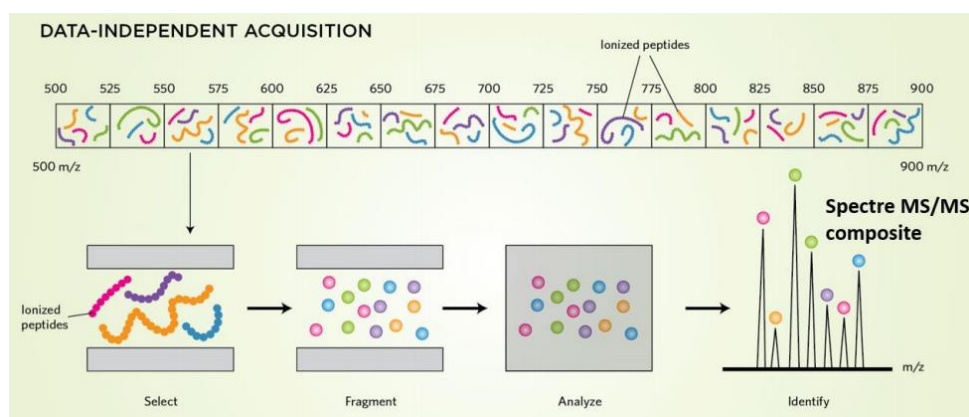


Figure 22 Le mode d'acquisition SWATH DIA: isolation de peptides appartenant à une plage de masse donnée et fragmentation des peptides simultanément¹⁹¹

III.2.2.d Comparaison des modes d'acquisition

Hoffman *et al.*¹⁹² ont examiné l'impact des différentes méthodes d'acquisition : DDA, DIA, MRM et PRM sur la quantification de peptides desthiobiotinylés de kinases de faible abondance dans un mélange complexe (modèles cellulaires). La quantification PRM a obtenu une meilleure reproductibilité qui peut s'expliquer par la réduction du bruit et des interférences en comparaison à l'analyse MRM. La quantification MRM a démontré une sensibilité supérieure pour les peptides courts et doublement chargés. L'analyse DIA a permis de réduire les données manquantes dans l'ensemble de données et a augmenté le nombre d'identifications de kinases quantifiables en comparaison à l'approche DDA, mais la quantification était plus variable que les approches ciblées MRM et PRM. Les approches DDA et DIA ont permis d'identifier de nombreuses kinases mais qui ont été éliminées au cours de l'analyse par manque d'observations pour la quantification ou l'analyse statistique. Ainsi, l'étude conclut sur le fait que l'approche DIA améliore la sensibilité de la quantification par rapport à l'approche DDA. Par rapport aux méthodes SRM/MRM et PRM qui ne se concentrent que sur un plus petit nombre de peptides cibles prédéfinis, la quantification ciblée basée sur l'approche DIA a une sensibilité, une spécificité et une reproductibilité légèrement inférieures en raison (Figure 23) : du temps d'accumulation beaucoup plus court pour chaque peptide, d'une fenêtre d'isolation des précurseurs plus large, ainsi que de l'absence de standards internes dédiés à chaque peptide quantifié (puisque sans a priori) pour corriger les variations d'une série de mesures¹⁸⁵.

Ainsi, en raison de son large éventail impartial de sélection et de fragmentation des précurseurs ioniques, la quantification ciblée basée sur la DIA pourrait potentiellement conduire à un changement de modèle en protéomique ciblée, pouvant permettre une quantification à l'échelle protéomique dans des échantillons complexes avec une bonne reproductibilité et une grande précision.

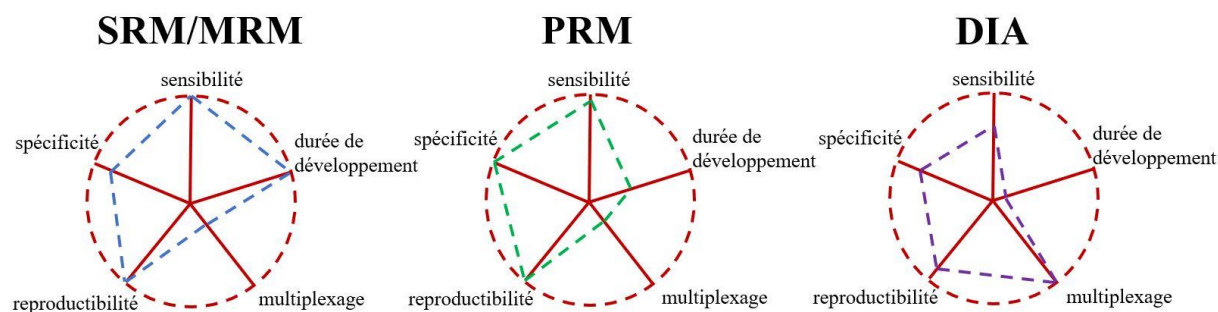


Figure 23 Comparaison des performances SRM, PRM et DIA, adaptée de Shi *et al.* 2016¹⁸⁰

III.2.3 Préparations d'échantillon pour les protéines plasmatiques

Afin de permettre une quantification par MS des protéines en milieu biologique avec la sensibilité, la sélectivité, la justesse et la précision nécessaire, des stratégies de préparations d'échantillons sont nécessaires en amont. Différentes méthodes sont possibles et dépendent de la concentration de la protéine cible et également de la complexité de la matrice. Nous détaillerons ici la digestion des protéines par différentes enzymes puis les différentes stratégies de préparation d'échantillons qui précèdent l'analyse par *bottom-up*.

II.2.3.a L'approche *bottom-up* et la digestion trypsique

Les approches *bottom-up* nécessitent une étape de digestion enzymatique des protéines de l'échantillon étudié. Les protéines sont clivées enzymatiquement en peptides de tailles réduites. Les peptides générés sont définis comme protéotypiques lorsqu'ils sont spécifiques de la protéine à doser¹⁹³. Ils sont alors sélectionnés afin d'être analysés par MS et ainsi permettre de doser la protéine d'intérêt. La procédure classique de préparation est la suivante (Figure 24) : les protéines sont tout d'abord dénaturées afin d'altérer leurs structures secondaire et tertiaire. Une enzyme est ensuite utilisée afin de cliver les liaisons peptidiques à des sites de coupures spécifiques. Ainsi, un mélange de peptides est généré et peut être analysé par LC-MS/MS.

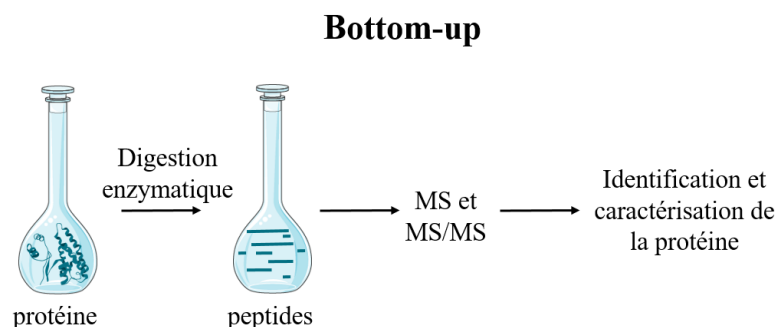


Figure 24 Description schématique de l'approche bottom-up, inspirée de Chait *et al.* 2006¹⁷¹

L'enzyme la plus fréquemment utilisée est la **trypsine**. La trypsine est une protéase qui clive les protéines après les acides aminés lysine et arginine. Dans de nombreux protéomes, les résidus arginine et lysine sont présents chacun à environ 5% des acides aminés, faisant un fragment tryptique d'environ 10-15 résidus d'acides aminés¹⁹⁴. Elle reste l'enzyme la plus utilisée du fait de sa bonne spécificité, sa disponibilité et le fait qu'elle génère des peptides de taille relativement homogène¹⁹⁵. De plus, la plupart des produits d'un digestat tryptique ont au moins deux sites protonables (le groupe amino N- α et le résidu basique C-terminal) et produisent des ions $[M+2H]^{2+}$, ce qui améliore l'obtention des produits de fragmentation en phase gazeuse¹⁹⁴. L'immense préférence pour la trypsine en protéomique se reflète dans le nombre de données disponibles sur les peptides tryptiques. Ainsi, dans la base de données *Global Proteome Machine Database*, 96% des données sont issues de la trypsine et seulement 4% sont issues des autres protéases¹⁹⁵. Bien que la trypsine possède une grande spécificité, le rendement de clivage est dépendant de l'acide aminé qui suit la lysine ou l'arginine¹⁹⁶ (Figure 25). Par exemple, la fréquence de digestion est plus faible en présence d'un acide glutamique ou aspartique, ce qui a pour conséquence un nombre de non-clivages plus important¹⁹⁶

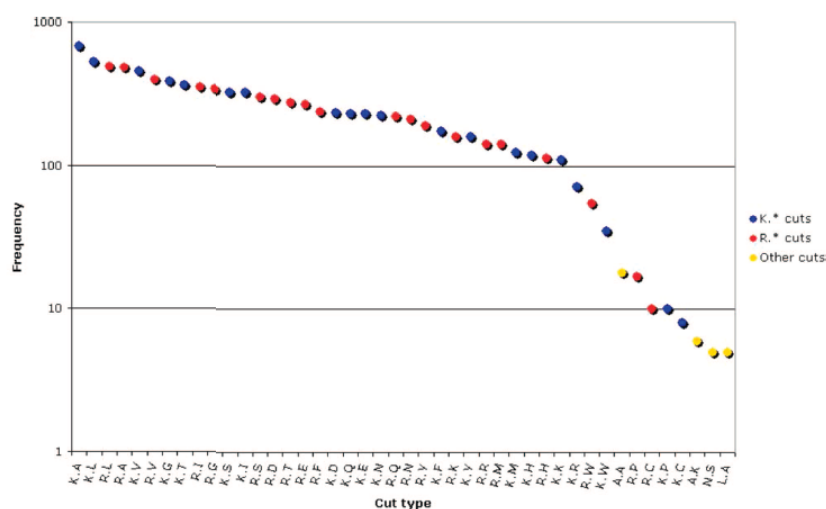


Figure 25 Fréquence normalisée des sites de coupure de la trypsine pour les 45 paires d'acides aminés les plus courantes, d'après Rodriguez *et al.* 2008¹⁹⁶

II.2.3.b Les autres enzymes pour la digestion de protéines

Même si la trypsine fournit des peptides adaptés à la MS et permet la plus grande couverture de séquence, d'autres enzymes peuvent également être utilisées pour accéder à l'analyse de parties de séquences protéiques particulières où la distribution des sites de clivages ne permet pas d'obtenir des peptides bien adaptés à l'analyse MS (taille entre 8 et 25 acides aminés, soit environ 1,4 kDa¹⁹⁷). Par exemple, les peptides tryptiques peuvent être trop petits (< 5-6 acides aminés) et donc généralement non identifiés par la MS¹⁹⁸. Ces séquences peuvent contenir des informations importantes telles que des modifications post-traductionnelles (PTM) ou des mutations qu'il peut être intéressant de doser comme biomarqueur d'une pathologie. Ainsi, d'autres enzymes ont été décrites et sont utilisées pour compléter les séquences protéiques de la trypsine : la clostripaïne, l'endopeptidase Asp-N, la chymotrypsine, l'endopeptidase Glu-C, l'endopeptidase Lys-C et l'endopeptidase Lys-N. La clostripaïne clive en C-terminale des R, l'Asp-N en N-terminale des D, la chymotrypsine en C-terminale des F, Y, L, W et M, la Glu-C en C-terminale des D et E, la Lys-C en C-terminale des K et la Lys-N en N-terminale des K. Chaque enzyme possède un avantage selon la situation. Par exemple, les peptides dérivés de l'extrémité C des protéines générés par la trypsine sont mal détectés en MS. Par conséquent pour identifier les peptides C-terminaux, les protéases tels que la Lys-N¹⁹⁹ est idéale pour générer de tels peptides chargés positivement qui sont compatibles avec la LC-MS/MS. De la même façon, Lys-C/N et Arg-C clivent spécifiquement après une lysine ou arginine, respectivement ; ces enzymes peuvent typiquement donner accès à des séquences riches en R ou K. Il est ainsi possible de combiner les résultats de plusieurs enzymes. Trevisiol *et al.*²⁰⁰ ont combiné la trypsine, la Lys-C et la Glu-C pour digérer un mélange équimolaire de 48 protéines humaines. La couverture protéique la plus élevée (62,5%) a été obtenue avec la trypsine, alors que 57,9% et 41,5% ont été obtenues avec la Lys-C et la Glu-C, respectivement. En fusionnant toutes les informations obtenues pour les trois enzymes, la couverture globale passe à 81,1%.

Il est également possible de combiner expérimentalement deux enzymes, comme Lebert *et al.*²⁰¹ qui ont utilisé un mélange trypsine et Lys-C pour la digestion de sérum humain dans lequel est ajouté un standard dit universel de protéines appelé DIGESTIF afin d'évaluer la qualité du traitement de l'échantillon biologique (digestion et performance du système LC-MS). Ainsi, ils ont démontré que l'utilisation d'un mélange trypsine et Lys-C était plus performant que la trypsine seule. Les peptides du standard étaient mieux détectés avec le mélange des deux protéases, avec une augmentation de leurs abondances entre 1,2 et 22,4 fois plus élevées qu'avec la digestion par la trypsine seule.

II.2.3.c Digestion des protéines pour l'approche middle-down

L'approche *middle-down* implique une digestion des protéines comme en *bottom-up*, mais vise à générer de plus gros peptides dont la taille se rapproche de celle de petites protéines intactes. Cette méthode peut notamment permettre d'analyser de grandes portions de protéines portant un ensemble de PTM

pertinentes. L'approche *middle-down* présente aussi les avantages de diminuer la complexité des échantillons digérés puisque moins de peptides sont formés qu'en digestion trypsique et d'obtenir une meilleure couverture protéique. Le défi de cette méthode est de trouver des agents clivants capables de produire des peptides dans la plage de masse souhaitée (de 3 à 15 kDa) avec une spécificité élevée. Certaines protéases spécifiques comme Lys-C, Glu-C, Asp-N et Lys-N sont censées produire, comparées à la trypsine, une proportion supérieure de peptides de tailles moyennes²⁰². Cristobal *et al.*²⁰² ont montré que la médiane des peptides issus d'une digestion d'un lysat cellulaire avec Glu-C et Asp-N était d'environ 1,9 kDa, soit une augmentation d'environ 25% comparativement à la trypsine (1,4 kDa). Bien que cette augmentation soit significative, l'idéal est de générer des peptides > 3 kDa. C'est pourquoi d'autres enzymes comme la Sap9²⁰³ ont été explorées car elle génère des peptides de 3.2 kDa en moyenne avec un nombre significatif de peptides dans la gamme de masse de 3 à 7 kDa. Cette protéase est utilisée dans l'identification d'anticorps monoclonaux et permet l'étude de PTM²⁰⁴. D'autres moyens de générer des peptides en utilisant une digestion non enzymatique ont été explorés avec des agents chimiques clivants comme l'acide formique qui génère des peptides de tailles similaires à la digestion par l'Asp-N et Glu-C²⁰².

Les PTM des histones, constituants de base de la chromatine, ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur fonction essentielle dans la régulation génomique eucaryote. Les histones sont des protéines très basiques comprenant de nombreuses arginines et lysines, l'utilisation de la trypsine conduit donc à l'obtention de trop petits peptides. Il est alors possible d'utiliser la Glu-C ou l'Asp-N. L'étude des PTM de l'histone 4 par une approche *middle-down* avec une digestion par la Glu-C a été effectuée par Holt *et al.*²⁰⁵ et la quantification des PTM a été montrée hautement reproductible.

II.2.3.d La gamme dynamique des protéines du plasma

De nombreuses matrices biologiques différentes comme le sang ou l'urine peuvent être prélevées et utilisées pour les analyses et la recherche clinique. Néanmoins, le sang et son composant liquide (le **plasma**, ou après coagulation, le sérum) sont les échantillons cliniques les plus largement prédominants pour les analyses de routine et représentent les sources d'investigation clinique les plus informatives¹⁴². En effet, au cours de sa circulation dans l'ensemble des organes, le sang voit sa composition se modifier, et refléter l'état physiologique global de l'individu. Les molécules qui composent ce biofluide ont donc un potentiel diagnostique/pronostique important, particulièrement pour une utilisation en routine¹³⁷. Les protéines du sang fournissent donc une image générale de l'état actuel du patient. Par conséquent, les protéines du plasma occupent une place importante dans le domaine des biomarqueurs. L'aspect hautement informatif du plasma est donc un des grands défis à relever. On estime qu'il y a plus de 20 000 protéines différentes dans le plasma humain²⁰⁶. La grande variation de concentrations des différents composants appelée la **gamme dynamique** de concentration varie jusqu'à 12 ordres de grandeur²⁰⁷ (Figure 26). Un petit nombre de composants constitue la majeure partie de la concentration

protéique totale du plasma. L'albumine seule comprend généralement plus de la moitié de la concentration protéique totale, et les 12 composants les plus abondants en représentent 95%^{208,209}. Ces protéines abondantes dominent donc dans l'analyse protéique du plasma et entravent la détection des composés de plus faible abondance²¹⁰. Des stratégies de préparation d'échantillon sont donc nécessaires pour l'étude du plasma.

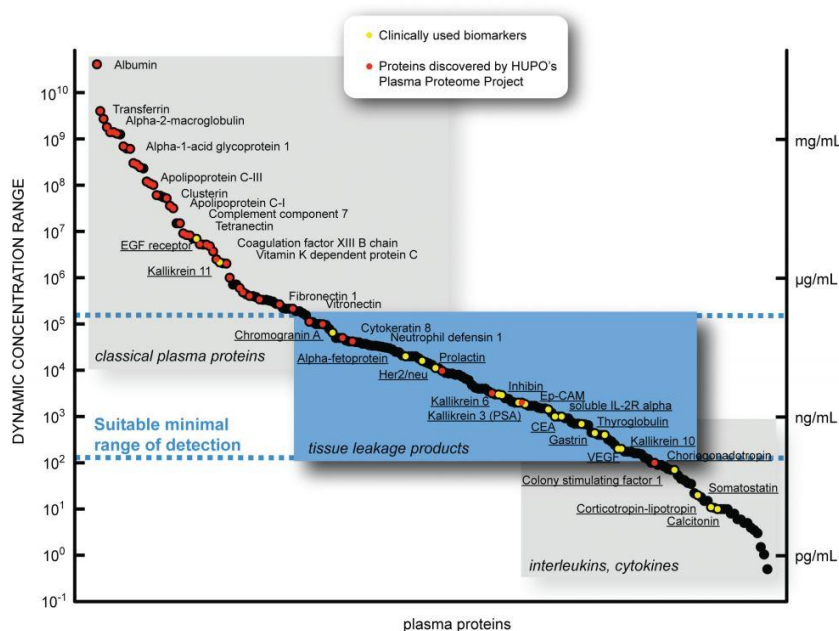


Figure 26 La gamme dynamique de concentrations de protéines du plasma et les 3 principales catégories de protéines. D'après Surinova *et al.* 2011¹⁴²

II.2.3.e Préparation d'échantillons pour la quantification ciblée des protéines

Pour contourner la difficulté de la large gamme dynamique de concentration du plasma, les méthodes de **préparation d'échantillons** sont cruciales. La méthode de préparation d'échantillon est sélectionnée en fonction de la complexité de la matrice à étudier et des concentrations des protéines d'intérêt. Plus les protéines d'intérêt sont concentrées dans la matrice, plus la préparation d'échantillon est simple. Différentes stratégies sont possibles pour atteindre la sensibilité de détection souhaitée dans les matrices complexes (Figure 27) :

- une simple digestion
- une élimination des constituants solubles du plasma par précipitation des protéines
- une déplétion des protéines les plus abondantes à l'aide de colonne de déplétion
- un fractionnement
- l'utilisation d'anticorps anti-protéine ou anti-peptide.

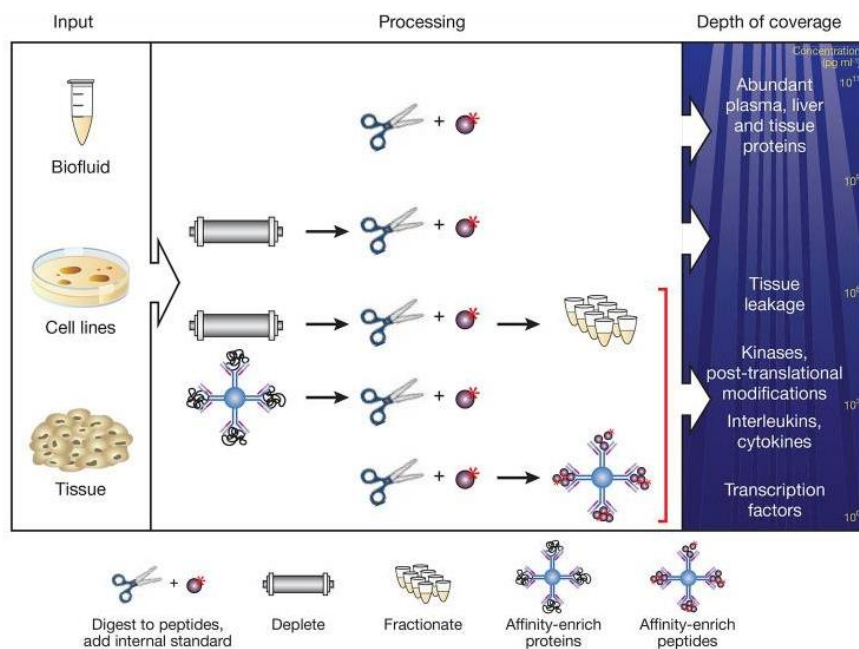


Figure 27 Différentes stratégies de préparation d'échantillons pour la détection de protéines à différentes concentrations. D'après Gillette *et al.* 2013²¹¹

- La dénaturation des protéines du plasma par **précipitation** permet une préparation d'échantillon assez simple pour quantifier les protéines fortement concentrées du plasma. La précipitation permet à la fois de **dénaturer** les protéines pour un meilleur rendement de digestion et également de diminuer l'effet matrice en éliminant les peptides solubles, les petites molécules comme les métabolites et certains lipides²¹². En effet, les solvants organiques utilisés pour la précipitation provoquent un dépliage partiel ou une altération de la structure secondaire de la protéine, devenant ainsi insoluble²¹³. De plus, les solvants organiques volatils peuvent facilement être éliminés des échantillons. Ces améliorations ont été rapportées par Ouyang *et al.*²¹² qui ont obtenu un gain de sensibilité d'un facteur 15 par simple précipitation des protéines du plasma par le méthanol, suivi par une digestion du pellet de protéines, en comparaison à une digestion directe du plasma. La dénaturation des protéines permet d'améliorer le rendement de la digestion trypsique. Ainsi, Proc *et al.*²¹³ ont comparé les protocoles de dénaturation (dénaturant chimiques, solvants et chaleur) avant digestion du plasma à l'aide de méthode de quantification absolue de peptides trypsiques de 45 protéines plasmatiques d'abondances modérées à élevées.

Ils ont démontré que deux surfactant SDS (dodécylsulfate de sodium) et DOC (désoxycholate de sodium) produisaient une augmentation du rendement global des peptides trypsiques en comparaison à l'urée. Cependant, le SDS n'est pas compatible avec la MS, alors que le DOC peut facilement être retiré des échantillons par précipitation acide. De plus, ils ont montré qu'une précipitation au méthanol et au TFE (2,2,2,-trifluoroéthanol) produisait des profils de digestion trypsique similaires à ceux obtenus avec le DOC. Cependant, la combinaison de la dénaturation

chimique et de la dénaturation par solvant n'a pas amélioré de façon significative l'efficacité de la digestion. Enfin, la chaleur, souvent utilisée comme condition de forte dénaturation car elle facilite le dépliage des protéines a permis l'amélioration de l'efficacité du protocole de digestion seulement avec l'urée. Enfin, selon les auteurs, les conditions optimales de digestion sont dépendantes de chaque protéine et même si un protocole usuel peut être envisagé, il n'est pas possible qu'il permette la digestion maximale de l'intégralité des protéines d'une matrice complexe.

- La **déplétion** des protéines majoritaires permet de réduire la complexité de la matrice. Il est possible de déléter l'albumine ou plus de **protéines majoritaires**. Des kits commerciaux vendus par Thermo Fisher pour déléter l'albumine, 7, 12 ou 14 protéines majoritaires sont disponibles et utilisent des techniques d'immunoaffinité. Cependant, la déplétion des protéines majoritaires s'accompagne de la déplétion d'autres protéines. Cette perte d'autres protéines peut être due à des liaisons entre les protéines non-ciblées et celles ciblées par la déplétion, des séquences protéiques similaires qui peuvent être reconnues par les anticorps fixés sur les colonnes de déplétion ou à des interactions non spécifiques avec le support²¹⁴. En effet, l'albumine est connue pour se lier à des protéines, des petites molécules et des peptides. Par exemple, Gundry *et al.*²¹⁵ ont identifié 35 protéines associées à l'albumine dans la fraction enrichie en albumine et les abondances de ces protéines sont connues pour être élevées et faibles.
- Le **fractionnement de l'échantillon** avant²¹⁶ ou plus généralement après digestion enzymatique est possible. Une cartouche d'**extraction en phase solide ou une colonne de chromatographie** peuvent être utilisées pour fractionner l'échantillon à l'aide d'élutions successives faisant intervenir des solvants de forces éluantes croissantes séparant ainsi les composés de l'échantillon²¹⁷. Il existe plusieurs types de cartouches : C18 (phase inverse), HILIC (Chromatographie d'interaction hydrophile), SEC (Chromatographie d'exclusion stérique) et SCX (Chromatographie d'échange de cations). Plus le fractionnement est important, plus l'extrait sera simplifié. Cependant, un trop grand nombre de fractions augmente alors le temps d'analyse.
- L'**immuno-enrichissement ou immunoprécipitation** permet un enrichissement d'un composé par des anticorps. L'enrichissement peut se faire au niveau de la protéine ou au niveau des peptides. Il s'agit en général des méthodes les plus sensibles. L'immuno-enrichissement permet d'avoir des limites de quantification inférieure proche du pg/mL^{218,219} dans des fluides biologiques. L'immunoprécipitation au niveau de la protéine peut être multiplexée et la capture peut être normalisée avec une version marquée aux isotopes stables de la protéine comme Dupré *et al.*²²⁰ qui ont obtenu des limites de quantification de 1 ng/mL pour trois toxines dans les biofluides humains et des matrices alimentaires. Les auteurs ont utilisé la stratégie PSAQ (*Protein Standard Absolute Quantification*), basée sur des étalons de protéines entières marquées aux C¹³, N¹⁵, afin de normaliser les étapes d'immunoprécipitation et de digestion. En

effet, même si l'immunoprécipitation offre un enrichissement efficace des protéines ciblées, des rendements variables peuvent être observés selon les matrices étudiées. Pour chaque protéine cible, l'ajout d'un analogue PSAQ dans la matrice complexe permet une quantification robuste^{221,222}. Ainsi, pour chaque toxine, les auteurs ont validé les performances analytiques de la méthode, incluant la répétabilité et la linéarité avec des CV < 20%, illustrant une normalisation efficace. L'utilisation de l'immunoprécipitation peut également servir à la quantification de biomarqueurs potentiels portant des PTM comme pour la quantification de deux protéoformes de l'antigène prostatique spécifique²²³. L'immunoprécipitation peut également se faire au niveau du peptide. Anderson *et al.*²²⁴ ont développé en 2004 la méthode **Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA)**, soit étalons internes peptidiques marqués aux isotopes stables et capture par des anticorps anti-peptide. La méthode SISCAPA combine quatre éléments (Figure 28) : (1) la digestion des protéines d'un échantillon en peptides, (2) l'ajout de peptides étalons internes marqués aux isotopes stables, (3) l'enrichissement des peptides faiblement concentrés par immunocapture *via* des anticorps anti-peptide immobilisés, (4) la séparation par LC et la quantification par MS/MS.

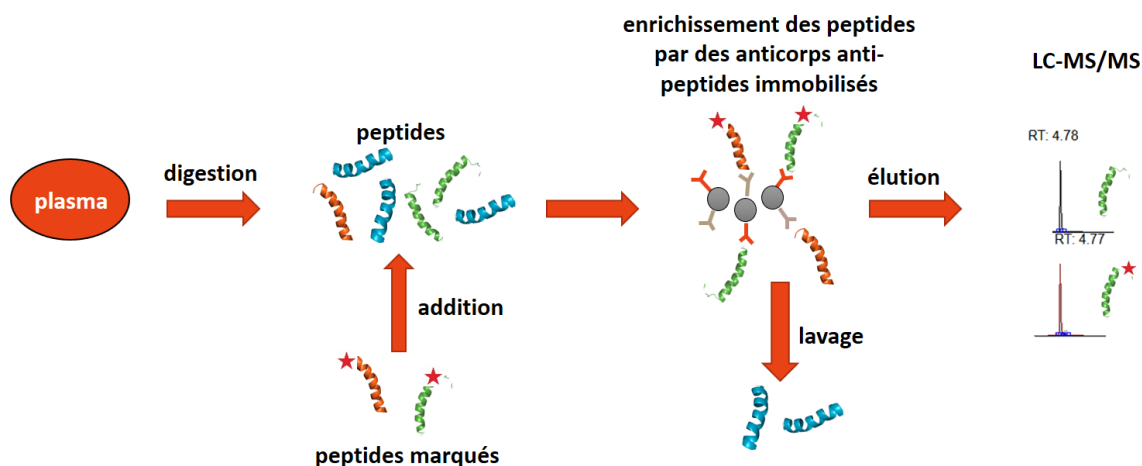


Figure 28 Schéma de la méthode SISCAPA pour la quantification de peptides

Pour une protéine cible présente à de faibles concentrations dans un échantillon biologique, l'enrichissement par une approche SISCAPA permet de concentrer efficacement les peptides cibles, réduisant la complexité de l'échantillon et améliorant la performance analytique de l'analyse. La sensibilité de la méthode est donc primordiale. Whiteaker *et al.*²¹⁸ ont atteint des sensibilités inférieures au ng/mL pour 10 μ L de plasma avec un multiplexage de neuf. Ils ont obtenu une sensibilité de 0.01 fmol/ μ L (0.9 ng/mL) pour la protéine osteopontine par exemple. Toujours avec un multiplexage moyen (8-plex) Kuhn *et al.*²²⁵ ont obtenu des limites de détection allant jusqu'à 0.02 fmol/ μ L (0.2 ng/mL) pour la protéine S100B. Ippoliti *et al.*²²⁶ avec un plus

haut multiplexage (>100) ont obtenu des sensibilités similaires avec une limite de détection moyenne pour leurs 110 peptides de 0,072 fmol/mL pour 10 µL de plasma.

De plus, un des avantages non négligeables de la méthode SISCAPA est le multiplexage. En effet, lors de son développement en 2004 par Anderson *et al.*²²⁴ la méthode dosait quatre protéines (quatre peptides) du plasma. Ippoliti *et al.*²²⁶ ont décrit le développement d'une nouvelle méthode automatisée pour augmenter les niveaux de multiplexage en SISCAPA à plus de 150 peptides pour l'analyse de biomarqueurs candidats des maladies cardiovasculaires.

Enfin, l'utilisation de peptides synthétiques marqués aux isotopes stables présente l'avantage que de tels peptides peuvent être fabriqués commercialement à un coût raisonnable. Aussi, ils sont plus facilement obtenus que des protéines entières, du fait de leur taille et leur linéarité. De plus, ils permettent la normalisation de l'étape d'immunoprécipitation, en supposant que les anticorps se comportent de façon similaire envers les peptides marqués et non-marqués, ce qui semble plus probable que dans le cas des protéines. En effet, les protéines marquées PSAQ ne possèdent pas forcément la même conformation et les mêmes PTM que la protéine native, comme observé par Dupré *et al.*²²⁰ pour la protéine ricine glycosylée.

Cependant, l'inconvénient majeur du SISCAPA par rapport à un immuno-enrichissement avec une protéine marquée PSAQ est la non normalisation de l'étape de digestion. Or, il s'agit d'une des étapes les plus variables et un seul protocole ne peut pas permettre une digestion maximale de toutes les protéines ciblées²¹³.

En résumé, afin de pouvoir atteindre les limites de quantification nécessaires à l'étude des protéines les plus faiblement concentrées, il est parfois nécessaire de réaliser une préparation d'échantillon plus ou moins complexe. Le Tableau 2 résume les différentes stratégies de méthodes de préparation d'échantillon pour la quantification de protéines du plasma pour la vérification de biomarqueurs ainsi que leur sensibilité²²⁷. La sensibilité augmente du µg/mL pour les échantillons traités par une simple digestion jusqu'à < ng/mL pour les échantillons immuno-extraits, bien que divers facteurs confondants tels que les variations dans l'instrumentation utilisée dans les différentes études contribuent sans doute à des différences.

Tableau 2 Comparaison des différentes méthodes de préparation d'échantillons en termes de sensibilité et de fidélité pour la quantification protéines plasmatiques, adapté de Hüttenhain *et al.* 2009²²⁷

Préparation d'échantillon	Sensibilité (LOQ, ng/mL)	Fidélité (CV)	Référence
SRM en plasma	1 µg/mL	4,6 – 19,7%	Kuzyk <i>et al.</i> 2009 ²²⁸
Déplétion des protéines majoritaires et SRM	25 ng/mL	8,5 – 19,1%	Keshishian <i>et al.</i> 2007 ²²⁹
Déplétion des 12 protéines majoritaires, fractionnement par SCX et SRM	2,5 ng/mL	2,6 – 14,2%	Keshishian <i>et al.</i> 2007 ²²⁹
Immunoprécipitation de protéine et SRM	2 ng/mL	<1 - 26%	Nicol <i>et al.</i> 2008 ²³⁰
SISCAPA et SRM	1-10 ng/mL	9,4 - 20,5%	Kuhn <i>et al.</i> 2009 ²³¹
Immunoprécipitation de la protéine et SRM	0.5 ng/mL	15.7%	Chen <i>et al.</i> 2015 ²²³
Déplétion des 14 protéines majoritaires, digestion, fractionnement par high-pH RPLC	<0.05 ng/mL	~10%	Shi <i>et al.</i> 2016 ¹⁸⁰

II.2.4 Quantifications relative et absolue

Les méthodes MS sont soumises à différentes variabilités et complexités potentielles de la préparation d'échantillon. Malgré cela, de méthodes quantitatives pour l'identification et la vérification de nouveaux biomarqueurs sont nécessaires. Les approches quantitatives par spectrométrie de masse peuvent être scindées en deux : la **quantification relative** qui permet de comparer les abondances et la **quantification absolue** qui permet d'obtenir une concentration précise. La quantification relative est essentiellement utilisée pour la phase de découverte des biomarqueurs alors que la quantification absolue est utilisée pour la phase de vérification. Les différentes approches de quantification relative seront brièvement présentées. Nous nous focaliserons ensuite sur la quantification absolue.

II.2.4.a La quantification relative

La quantification relative est généralement utilisée pour la découverte de biomarqueurs et se fait essentiellement par des approches *bottom-up* et une acquisition en mode DDA ou DIA. Les approches

de quantification relative seront donc brièvement présentées. On distingue des approches *label free* ou par ajout de peptides avec un incrément de masse.

Les approches **sans marquage** ou *label free* peuvent être utilisées pour des raisons de coûts et pratiques²³². En effet, ces méthodes permettent une quantification relative sans utilisation de molécules marquées. Les avantages des méthodes sans marquage sont leur relative facilité de mise en œuvre en comparaison aux méthodes de marquages isotopiques et la possibilité de comparer un nombre non limité d'échantillons. Cependant, l'inconvénient majeur de telles méthodes est qu'aucune étape depuis la préparation d'échantillon jusqu'à l'analyse n'est normalisée ce qui diminue grandement sa précision. Ainsi, les méthodes de quantification par marquage isotopique, c'est-à-dire l'ajout de d'isotopes stables, permettent la normalisation d'un certain nombre d'étapes selon son étape d'incorporation.

Les méthodes de quantification relative par **marquage isotopique** utilisent l'approche de la **dilution par isotopes stables**. Une molécule est marquée à l'aide d'isotopes stables de certains atomes (**SIL** : *Stable Isotope Labeled*), les plus courants étant ¹³C, ¹⁵N, ²H et ¹⁸O, qui possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques que les ¹²C, ¹⁴N, ¹H et ¹⁶O. De cette manière, à part le deutérium qui induit un décalage en temps de rétention²³³, les temps de rétention et les fragmentations sont les mêmes, la seule variation pouvant permettre la distinction étant la différence de masse, et permettent une comparaison quantitative. Il existe plusieurs stratégies pour le marquage isotopique : le **marquage isotopique SILAC** (*stable isotope labelling by amino acids in cell culture*) et le **marquage chimique**. La méthode **SILAC** consiste à incorporer *in vivo* des acides aminés spécifiques dans toutes les protéines des cellules. Cette méthode, développée en 2002 par l'équipe de Matthias Mann²³⁴, consiste à mettre en culture des lignées cellulaires d'intérêt et de contrôles, dans deux conditions différentes : l'une avec un milieu de culture contenant des acides aminés normaux (isotopes légers), l'autre dépourvu d'un acide aminé essentiel standard, mais complété par une forme non radioactive, isotopiquement marqué (¹³C, ¹⁵N et ²H). L'avantage du marquage SILAC est qu'il permet de combiner les échantillons lourds et légers le plus tôt possible afin de minimiser les biais causés par la manipulation parallèle des échantillons. L'un des inconvénients du marquage SILAC est le nombre limité d'états cellulaires qui peuvent être comparés. En 2010, la même équipe étend cette application aux tissus, nommée **super-SILAC**²³⁵ car il s'agit d'un sur-ensemble de lignées cellulaires SILAC représentant précisément le tissu. Dans cette approche, un mélange de plusieurs lignées cellulaires marquées SILAC du même organisme est utilisé comme standard interne et ajouté au broyat cellulaire permettant ainsi la quantification d'échantillons de tissus ne pouvant pas être cultivés et marqués.

L'avantage des méthodes aux **marquages chimiques ou enzymatiques** par rapport au SILAC est qu'elles ne nécessitent pas de cultiver les cellules dans des milieux différents, elles sont donc plus économiques et conviennent à toutes sortes d'échantillons. Les protéines et les peptides peuvent être marqués *via* différentes réactions enzymatiques ou chimiques (Tableau 3).

Tableau 3 Récapitulatif des réactifs pour les marquages chimiques des protéines et des peptides

Nom	Site de marquage
¹⁸ O	Groupement carboxyl terminal
ICAT	Thiol
cICAT	Thiol
ITRAQ	Amine primaire
TMT	Amine primaire
DML	Amine primaire

Dans l'optique de surmonter les limitations de complexification des spectres ou la présence de résidus cystéine, les **marquages isobariques** ont été développés. Deux marquages fonctionnant sur le même principe ont été développés : **TMT** (*tandem mass tag*) en 2003 par Thompson *et al.*²³⁶ et **iTRAQ** (*isobaric Tag for relative and absolute quantitation*) en 2004 par Ross *et al.*²³⁷. Dans ces approches, les peptides sont marqués au niveau des amines primaires (N-terminal des peptides et des lysines) avec un réactif spécifique après la digestion enzymatique. Le marquage chimique permet de garder la masse du peptide constante de telle sorte qu'il n'y ait pas de différenciation possible dans le spectre MS1, ce qui permet d'éviter de complexifier les spectres. Les marquages peuvent seulement être différenciés après fragmentation sur les spectres MS/MS. Le marquage iTRAQ peut être multiplexé jusqu'à huit et le TMT jusqu'à dix.

Ainsi, ces différentes méthodes de marquage majoritairement utilisées avec des approches *bottom-up* sont utilisées au niveau des peptides alors que le marquage SILAC permet une meilleure fidélité que les autres marquages car l'étape de digestion est normalisée. Ces méthodes utilisées généralement pour les étapes de découverte des biomarqueurs peuvent avoir un intérêt pour comparer deux populations mais ne permettent pas de déterminer la concentration des protéines d'intérêt. D'autre part, ces approches sont le plus souvent limitées en termes d'échantillons analysables.

II.2.4.b La quantification absolue

La quantification relative décrite précédemment permet de connaître l'abondance relative des protéines d'une condition par rapport à une autre mais ne permet pas d'avoir accès à une **quantification absolue**, c'est-à-dire de donner une quantité exacte et précise des protéines d'intérêt contenues dans un échantillon. Une quantification absolue inclut l'utilisation de protéines ou peptides marqués isotopiquement ajoutés en quantité connue pour chaque protéine cible. Elle nécessite également une méthode d'analyse robuste (cf III.2.2 Modes d'acquisition et instruments pour la quantification des protéines). La quantification absolue s'intéresse donc généralement à la mesure d'un ensemble limité de

protéines. Ainsi, la quantification absolue sera utilisée dans le cadre de la vérification de biomarqueurs potentiels.

II.2.4.b.i) Etalonnage interne

Un **étalonnage interne** consiste à introduire dans l'échantillon à analyser un étalon en quantité connue. L'étalon doit avoir des caractéristiques physico-chimiques similaires de l'analyte d'intérêt. Il est possible de l'introduire à différents stades de l'analyse. S'il s'agit d'un peptide marqué, on parlera de peptides **AQUA** (*Absolute QUAntification of proteins*) et de **QconCAT** (*Quantification conCATamer*) et s'il s'agit d'une protéine marquée, on parlera de **PSAQ** (*Protein Standard Absolute Quantification*).

Un choix des peptides représentatif de la protéine doit être effectué. Les peptides sélectionnés pour la quantification des protéines doivent être **quantotypiques**²³⁸, c'est-à-dire qu'ils représentent fidèlement la quantité totale de la protéine. Pour cela ils doivent répondre à plusieurs critères :

- ils doivent être uniques à la protéine (ou **protéotypiques**),
- remplir des critères de tailles (environ une dizaine d'acides aminés),
- pas contenir de méthionine, cystéine et tryptophane (oxydation), glutamine en N-terminale (formation d'un pyro-glu ; cyclisation)
- pas être trop hydrophobes ou hydrophiles
- pas contenir de PTM²³⁹⁻²⁴¹.

La méthode **AQUA** introduite en 1996 par Barr *et al.*²⁴² puis en 2003 par Gerber *et al.*²⁴³ consiste à introduire au mélange des peptides protéotypiques marqués avec du ¹³C et/ou ¹⁵N au niveau de la lysine ou de l'arginine en C-terminale, analogues aux peptides endogènes après digestion enzymatique. Les avantages de l'utilisation des peptides AQUA sont qu'ils possèdent les mêmes temps de rétention et s'ionisent de la même façon que les peptides endogènes associés. De plus, la simplicité d'obtention des peptides marqués et leur coût modéré font de cette approche une des plus utilisées pour la quantification absolue. Cependant, cette méthode permet de s'affranchir des biais après la digestion mais pas de ceux de l'étape de digestion ou précédant cette étape.

La méthode **QconCAT** (ou QCAT) a été introduite en 2005 par Beynon *et al.*²⁴⁴. Elle consiste à concaténer, c'est-à-dire à relier différents peptides isotopiquement marqués (peptides AQUA) et à produire ainsi une protéine chimérique lourde (Figure 29). Cette protéine est alors introduite avant la digestion pour libérer les peptides AQUA marqués, permettant ainsi de corriger les biais de l'étape de digestion. Cependant, cette protéine étant différente de celles étudiées, elle peut se comporter différemment lors de la digestion. En effet, le rendement de digestion dépend de la séquence entière d'une protéine et de sa conformation. Ainsi, le rendement de digestion ne peut pas être corrigé avec certitude par cette approche. De plus, les protéines artificielles ont une forte tendance à s'agrèger en tant que corps d'inclusion²²¹.

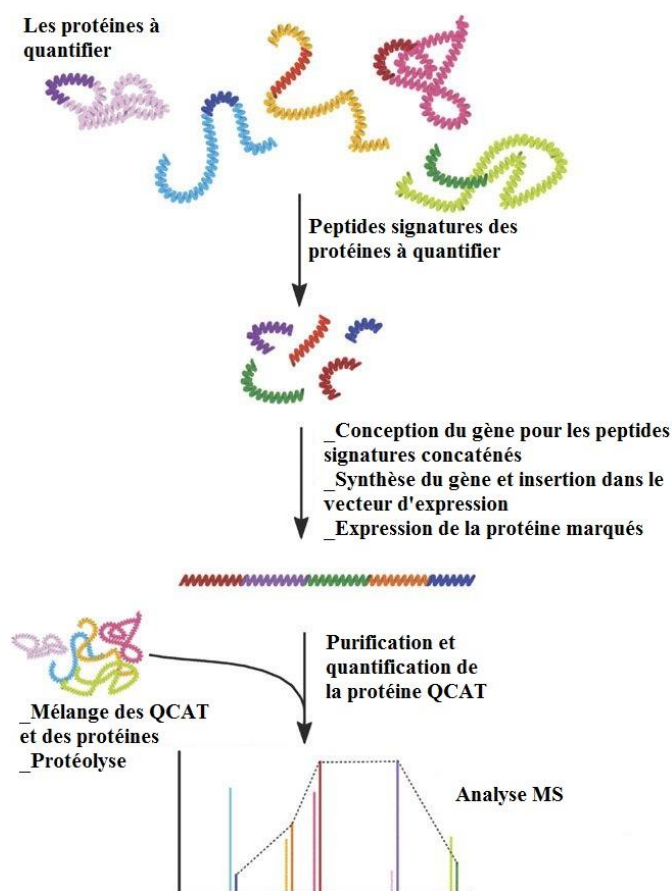


Figure 29 Principe général d'une expérience de quantification QconCAT, adaptée de Pratt *et al.* 2006²⁴⁵

Les étalons protéiques de types **PSAQ** introduit en 2007 par Brun *et al.*²²¹ sont des protéines recombinantes marquées *in vitro*, dont les séquences correspondent à celles des protéines ciblées, introduites directement dans les échantillons à analyser réduisant alors tout biais au niveau des étapes de digestion et/ou de purification. Ce type de quantification est cependant assez coûteux du fait de la difficulté à synthétiser des protéines entières et marquées.

La méthode **QPrEST** (*Quantitative Protein Epitope Signature Tags*) est une méthode qui incorpore une séquence d'environ une centaine d'acides aminés de la protéine cible choisie avec au minimum deux peptides tryptiques isotopiquement marqués au ¹³C et ¹⁵N sur la lysine ou l'arginine²⁴⁶. Les séquences PrEST sont fusionnées à un marqueur 6x histidine permettant la purification et à un marqueur de solubilité dérivé du domaine de liaison de l'albumine de la protéine streptococcique G. Cette méthode permet notamment la quantification de protéines non solubles.

Les différents étalons diffèrent par leur nature (peptides, protéines) mais surtout par leur introduction dans l'échantillon (Figure 30). La protéine PSAQ est ajoutée avant la préparation d'échantillon, la protéine QconCAT est introduite avant la digestion, enfin le peptide AQUA est introduit avant l'analyse LC-MS/MS.

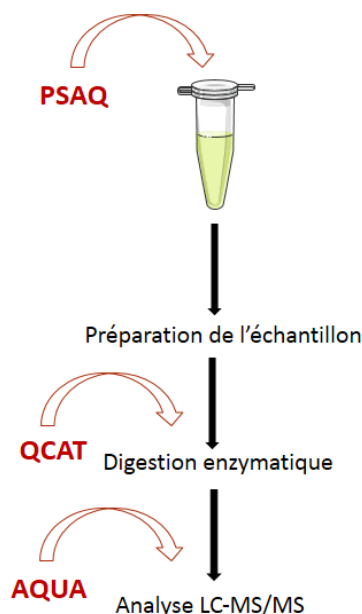


Figure 30 Les différentes stratégies de quantification absolue des protéines

La quantification peut alors être réalisée directement par comparaison du signal généré par les peptides endogènes et des peptides étalons marqués dont la quantité est connue.

II.2.4.b.ii) Etalonnage externe

Un **étalonnage externe** consiste à effectuer une gamme de calibration à l'aide d'un étalon (non marqué aux isotopes stables) ajouté dans une matrice similaire à l'échantillon à analyser mais qui ne contient pas l'analyte, qu'on peut appeler matrice mime ou matrice blanche. En effet, la matrice utilisée doit mimer les effets matrice d'intérêt. De plus, la gamme de calibration doit entourer les valeurs supposées de concentration de l'analyte dans l'échantillon. Il faut ajouter en plus de l'étalon, un étalon interne pour normaliser le signal en MS, comme des peptides SIL ou protéines SIL, même si le rendement de digestion est déjà pris en compte par la protéine de calibration externe. Cette méthode de calibration est facile à mettre en œuvre. Cependant, il est parfois difficile d'obtenir une matrice mime et le calibrant externe utilisé peut avoir une conformation différente de l'analyte endogène et peut donc induire des biais dans la préparation d'échantillon. De plus, il est important de vérifier la quantité réelle de l'étalon. Les problèmes rencontrés avec un étalonnage externe peuvent venir des différences de conformations, ce qui peut induire des biais lors de la préparation d'échantillon comme la stabilité de la protéine, les différents rendements de précipitation, immuno-enrichissement et effets matrices, qui peuvent amener à des concentrations inexacts²⁴⁷.

II.2.4.b.iii) Comparaison des méthodes d'étalonnage

Plusieurs études ont comparé les performances des différentes méthodes d'étalonnage. Brun *et al.*²²¹ ont comparé les méthodes AQUA, QconCAT et PSAQ pour la quantification des toxines superantigéniques de *Staphylococcus aureus* SEA et TSST-1 (Figure 31). Ils ont montré que la précision de quantification

était influencée par l'efficacité de la digestion par la trypsine. La méthode QconCAT a conduit à une sous-estimation des toxines d'un facteur supérieur à 2. Comme les toxines sont réputées résistantes aux protéases²⁴⁸ et les concaténés QconCAT plus sensibles à la digestion par la trypsine²⁴⁴, la méthode QconCAT conduit à une sous-estimation liée aux taux différents de digestion entre les toxines et les protéines QconCAT. Les étalons AQUA, ajoutés avant l'analyse LC-MS, ont également conduit à une sous-estimation des quantités de toxines. Ceci est dû à l'ajout de ces étalons à des stades avancés du processus analytique. Enfin, d'après les auteurs, la technique PSAQ, a permis de normaliser les étapes de digestion et donc de donner une estimation précise des toxines SEA et TSST-1.

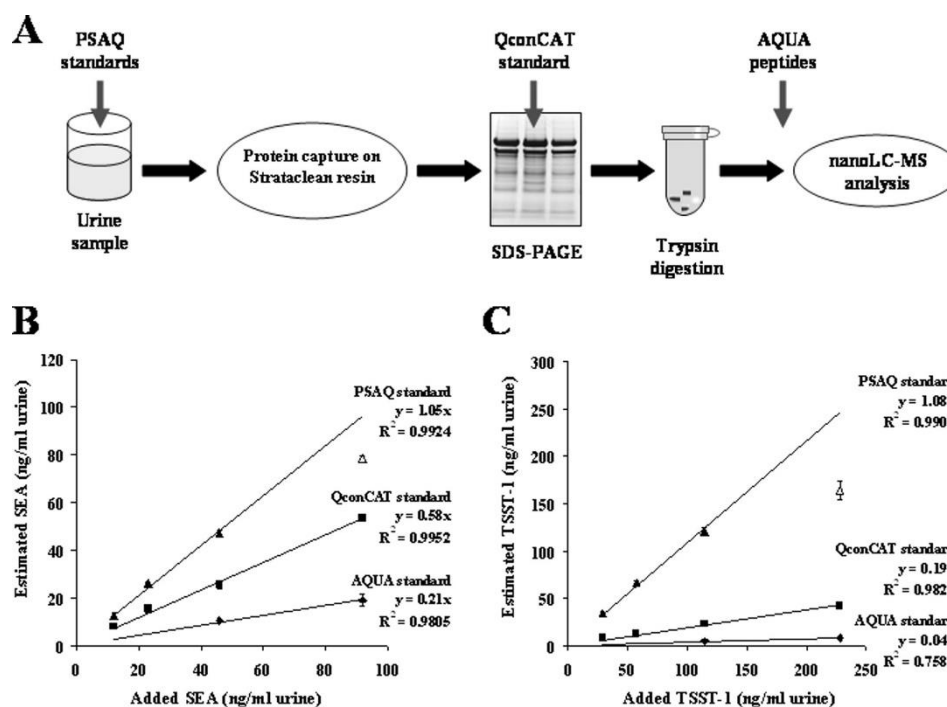


Figure 31 Comparaison des peptides AQUA, du concatémère QconCAT et des étalons PSAQ pour la quantification de SEA et TSST-1 dans les échantillons d'urine. A : ajout des étalons à différentes étapes du processus d'analyse. B : comparaison des trois méthodes pour le titrage de SEA. C : comparaison des trois méthodes pour le titrage de TSST-1. D'après Brun *et al.* 2009²²¹

Oeckl *et al.*²⁴⁹ ont comparé les performances analytiques de peptides AQUA, des QPrESTs et du PSAQ dans des échantillons de liquides céphalo rachidien humains pour doser la protéine alpha-synucléine. Toutes les approches ont donné des résultats précis avec des valeurs de CV (coefficient de variation) < 15 %. Les techniques PSAQ et QPrEST ont montré de bonnes exactitudes comparables (écart ≤ 15%), tandis que les peptides AQUA ont donné des écarts allant jusqu'à 54% suivant les peptides. Ainsi, d'après les auteurs, pour la quantification de l'alpha-synucléine, les QPrESTs sont une alternative au PSAQ en termes de précision et d'exactitude, bien que les peptides AQUA puissent donner des résultats précis lorsque les peptides sont bien sélectionnés.

II.2.4.c Validation des méthodes de quantification absolue

Afin de pouvoir utiliser les méthodes de dosage de biomarqueurs dans les laboratoires cliniques, il est important de caractériser et **valider** les méthodes de quantification LC-MS/MS des biomarqueurs protéiques et peptidiques dans les fluides biologiques.

La plupart des dosages de protéines basés sur la LC-MS/MS se basent sur la dénaturation et la digestion enzymatique des protéines de l'échantillon par *bottom-up*. Ces étapes de préparation d'échantillon permettant ainsi de cibler les peptides d'intérêt. L'ajout de standards marqués internes permet de corriger les effets matrice, la variabilité de la digestion (s'il s'agit d'un standard protéique). Ces méthodes sont en effet bien adaptées au dosage de biomarqueurs, cependant un manque de validation de ces méthodes peut nuire à leur réussite. La validation d'une méthode comprend des expériences qui évaluent les principales performances analytiques, qui impliquent notamment la reproductibilité, la répétabilité, la linéarité, la limite de quantification, les interférences et la stabilité. Afin de répondre à ce problème, Grant *et al.*²⁵⁰ ont présenté une liste minimale d'expériences qui permettent d'évaluer la qualité des méthodes de quantification absolue pour de potentiels biomarqueurs (Tableau 4).

Tableau 4 Liste d'expériences minimales pour la validation de dosage de quantification de protéines par LC-MS/MS, adapté de Grant *et al.* 2014²⁵⁰

Expérience	Description	Détermination
Reproductibilité et répétabilité	Les pools de plasmas sains et malades sont analysés 5 fois sur 5 jours	CV _{intra} et CV _{inter} ≤ 20%
Stabilité du peptide	Les peptides SIL sont ajoutés avant et après la digestion dans les deux pools de plasmas sains et malades	Biais, CV ≤ 20%
Linéarité	Les pools de plasmas sains et malades sont mélangés aux 3:1, 1:1 et 1:3	Biais, CV ≤ 20%
Limite inférieure de quantification	Le pool de plasmas sains est dilué avec une matrice de mime	Biais, CV ≤ 25%
Interférences	Des interférents pertinents sont ajoutés au pool de plasmas sains	Biais, CV ≤ 20 %
Stabilité	Les pools de plasmas sains et malades sont soumis à un stress avant et après préparation de l'échantillon	Biais, CV ≤ 20%

La **répétabilité** reflète la précision des mesures effectuées dans un laps de temps relativement court dans des conditions expérimentales identiques, c'est-à-dire en utilisant la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure et les mêmes conditions de fonctionnement, le même

emplacement, les mêmes réactifs, et la même procédure d'étalonnage²⁵¹. La **reproductibilité** reflète la précision de la mesure en prenant en compte la variabilité résultant de tous les paramètres expérimentaux de l'étude y compris les sites, les opérateurs, les lots de réactifs, les étalonnages et jours²⁵¹. Pour des raisons pratiques, la reproductibilité est le plus souvent évaluée seulement sur plusieurs jours. Pour évaluer la **stabilité des peptides**, les peptides SIL sont ajoutés avant la digestion et les concentrations de protéines sont comparées avec un ajout des peptides SIL après la digestion. La majorité des études ajoutent des peptides SIL après digestion. Cependant, l'influence de la formation/dégradation des peptides protéolytiques par rapport au peptide SIL et son biais d'analyse doivent être déterminés. Pour évaluer la **linéarité**, Grant *et al.*²⁵⁰ proposent un mélange en cinq points de pool sains et malades avant la préparation des échantillons.

De plus, dans l'objectif d'établir des seuils de concentrations discriminantes pour les dosages de biomarqueurs il faut parvenir à une quantification précise et harmonisée des protéines entre les laboratoires cliniques. La question de savoir si des méthodes de quantification sont capables de produire des résultats reproductibles est abordée par les **études interlaboratoires**, où des échantillons de compositions connues sont analysés en aveugle dans différents laboratoires indépendants. Dans ce contexte, Abbatiello *et al.*²⁵² ont évalué les performances d'une méthode MRM multiplexée ciblant 125 peptides, soit 34 protéines du plasma humain dans 11 laboratoires. Des échantillons de plasmas enrichis en peptides de concentrations « inconnues » ont été analysés dans les 11 laboratoires et le CV médian interlaboratoire < 20%. Pour des échantillons de plasmas enrichis en protéines de concentrations « inconnues », le CV médian interlaboratoire était de 45% avec utilisation de peptides SIL et 36% avec utilisation de protéines SIL. Ainsi, l'utilisation de protéines SIL a permis d'améliorer la variabilité car elles normalisent les étapes de réduction, alkylation, digestion et les autres étapes de manipulation des échantillons. Kuhn *et al.*²²⁵ ont évalué la performance interlaboratoire d'une méthode SISCAPA (8-plex) dans trois laboratoires indépendants. Les CV médiane intra- et interlaboratoires étaient de 11% et <14%, respectivement, pour tout le processus de dosage, y compris la digestion enzymatique du plasma. Ils ont également montré que l'utilisation d'une protéine SIL au lieu de peptides SIL a permis d'améliorer la précision des essais interlaboratoires. Collins *et al.*²⁵³ ont évalué la reproductibilité de la détection et de la quantification de peptides et de protéines par SWATH-MS à travers 11 laboratoires. Ils ont pu démontrer une bonne reproductibilité de l'approche SWATH avec des CV intra-journalier, inter-journalier et interlaboratoire respectivement de 8,3%, 11,9% et 22,0%.

Il faut disposer de méthodes précises mais également d'étalons certifiés ou de référence, dont la concentration est parfaitement établie. L'institut National de Métrologie (LNE) s'intéresse particulièrement à cet aspect et Clouet-Foraison *et al.*²⁵⁴ ont observé un biais systématique lors de la quantification d'un biomarqueur rétrospectif de la concentration glycémique : l'hémoglobine glyquée HbA1c, avec des lots différents de calibrateurs peptidiques. Les auteurs suggèrent que cette différence dans les matériaux d'étalonnage est la cause des différences obtenues et soulignent l'importance

d'évaluer les concentrations des étalons pour une quantification précise de l'HbA1c. Bargnoux *et al.*²⁵⁵ ont également montré que des biais étaient obtenus à cause des différences de calibrateurs pour le dosage de la cystatine-C, biomarqueur utilisé notamment pour la prévision du risque cardiovasculaire, à travers une évaluation multicentrique.

II.2.5 Apports de la spectrométrie de masse

La MS est un outil analytique de choix pour l'analyse et la quantification des biomarqueurs si les méthodes sont bien validées. Cette technique apporte des capacités de large gamme dynamique qui permet la détection de protéines aux abondances variées, de spécificité, de multiplexage et de caractérisation des protéoformes. Nous développerons dans ce chapitre les atouts de multiplexage et de caractérisation des protéoformes. Le multiplexage est en effet nécessaire à la vérification de biomarqueurs candidats. La détection et la caractérisation des différents protéoformes n'est possible que par MS.

III.2.5.a Le multiplexage

Les **analyses multiplexées** de plusieurs protéines peuvent être effectuées par MS sans affecter la spécificité de la détection et de la quantification. Ainsi, les caractéristiques de la MS notamment en termes de multiplexage en font un des outils de premier plan pour la vérification des listes de biomarqueurs protéiques.

Il est possible de multiplexer les analyses MS. Par exemple, Captur *et al.*²⁵⁶ ont ainsi développé une méthode multiplexée LC-MRM pour cibler et vérifier 26 biomarqueurs plasmatiques de la cardiomyopathie hypertrophique, maladie cardiaque héréditaire la plus courante. Sur les 26 biomarqueurs potentiels, six ont pu être confirmés.

Le niveau de multiplexage peut être augmenté à quelques centaines de protéines. Les méthodes PRM et SRM/MRM possèdent des capacités de multiplexages similaires. Burgess *et al.*²⁵⁷ ont développé une méthode MRM 800-plex comprenant 2400 transitions pour surveiller 400 paires de peptides non-marqués et marqués avec un gradient de 180 min. Avec des multiplexages aussi élevés, il n'est possible d'acquérir le signal des peptides cibles qu'autour de leur temps d'élution afin de conserver des temps de cycle raisonnables. Dans la pratique, les dérives inévitables dans les temps d'élution imposent de suivre les peptides sur de larges fenêtres afin d'assurer la bonne détection des peptides cibles. Afin de résoudre la variabilité des temps de rétention au cours des différentes injections, Rougemont *et al.*²⁵⁸ ont développé une méthode appelée **SCOUT-MRM** dans laquelle l'utilisation de 19 peptides connus appelés « scouts », répartis le long du chromatogramme, déclenchent l'acquisition d'un groupe de peptides. Cette méthode a permis de quantifier 782 peptides avec 2346 transitions ciblant 445 protéines sur un gradient de 120 min.

Pour le multiplexage en PRM, Gallien *et al.*²⁵⁹ ont développé une méthode pour la quantification de 600 peptides en 66 minutes avec la même idée de résoudre le problème des temps de rétention variables avec une méthode appelée **IS-PRM** (pour *Internal Standard Triggered-Parallel Reaction Monitoring*). Dans cette méthode, le peptide SIL déclenche l'acquisition du peptide endogène et il y a alternance entre deux modes PRM : un mode « veille » rapide et basse résolution et un mode « quantitatif ». En mode veille, seuls les peptides SIL sont surveillés en continu dans leur fenêtre de surveillance dynamique. Dans ce mode, la vitesse est favorisée par rapport à la qualité des données. Le mode quantitatif est utilisé pour mesurer les SIL et les peptides endogènes lorsqu'ils éluent réellement en utilisant des paramètres d'acquisition permettant une bonne qualité des données. Ainsi, la détection d'un peptide SIL déclenche le passage du mode veille au mode quantitatif pour mesurer la paire de peptides SIL et endogènes correspondante sur une fenêtre temporelle restreinte.

Afin d'augmenter la sensibilité, nous avons vu que **l'immuno-enrichissement** était la méthode la plus pertinente. Il est également possible de multiplexer l'immunoprécipitation avant l'analyse MS multiplexée afin de cibler des biomarqueurs potentiels ayant des faibles abondances. Zhang *et al.*²⁶⁰ ont développé une méthode sensible, robuste et multiplexe d'immuno-LC-PRM pour la quantification simultanée de six marqueurs immunitaires dans les tissus cancéreux. Dans la méthode développée par Zhang *et al.*²⁶⁰, l'immunoprécipitation se fait sur les protéines. Avec la méthode SISCAPA, l'immunoprécipitation a lieu sur les peptides. Ippoliti *et al.*²²⁶ ont multiplexé l'immunoprécipitation de 172 peptides pour mesurer les biomarqueurs candidats dans le plasma de patients ayant subi un infarctus du myocarde.

La quantification absolue des biomarqueurs cliniques par MS peut être remise en question en raison d'un relativement faible débit d'échantillons, c'est-à-dire, une séparation chromatographique pouvant aller jusqu'à 120 min en nano-LC. Pour résoudre ce problème, Jiang *et al.*²⁶¹ ont rajouté un degré de multiplexage aux analyses et ont mis au point une nouvelle stratégie de quantification à **haut débit d'échantillons** basée sur le marquage triplex DML et 8-plex de l'iTRAQ, en réalisant un débit d'échantillons pouvant atteindre 24 (3x8) en une seule analyse MRM. Comme cette méthode n'entraîne qu'une différence de poids moléculaire et aucune différence chromatographique entre tous les échantillons de marquage, la complexité des chromatogrammes est grandement simplifiée. Ainsi, cette méthode a été appliquée pour quantifier et vérifier trois biomarqueurs potentiels liés au carcinome hépatocellulaire dans des 63 échantillons de sérum qui ont pu être analysés quantitativement en seulement trois expériences.

Enfin, à un niveau plus élevé de multiplexage, des **méthodes super-multiplexées** sont également en cours de développement par Zolg *et al.*²⁶² avec plus de > 330 000 peptides tryptiques synthétiques couvrant essentiellement toutes les protéines humaines canoniques annotées dans Swissprot. Des peptides avec les principales PTM ont également été synthétisés. Les peptides, regroupés par groupe de

1000 ont été analysées en LC-MS/MS afin d'obtenir des spectres de référence pour l'identification et la quantification des peptides et protéines humains.

Pour résumé, il est possible de multiplexer les méthodes MS sur plusieurs niveaux : les analyses MS en ciblant plusieurs peptides en une seule analyse, la préparation d'échantillons en immunoprécipitant plusieurs protéines ou peptides et le débit d'échantillons en analysant plusieurs échantillons lors d'une même analyse.

III.2.5.b La quantification des protéoformes

La quantification des biomarqueurs potentiels se fait généralement sur les formes totales de la protéine *via* les peptides quantotypiques²³⁸. Cependant, la quantification de protéoformes particulières peut être hautement informative car elles sont cruciales pour de nombreux processus biologiques et pathologiques¹⁷⁰ et donc être source de biomarqueurs potentiels.

III.2.5.b.i) Les protéoformes

Grâce au projet « *Human Genome Project* », le génome humain est désormais connu. Chez l'humain, il existe environ 20 300 gènes et non 100 000 estimés précédemment²⁶³. Cependant, les séquences théoriques ne suffisent pas, la grande diversité du protéome se situe au niveau de la variation des protéines plutôt qu'en raison d'un grand nombre de gènes distincts²⁶⁴. De nombreux évènements créent des molécules protéiques distinctes qui modulent une grande diversité de processus biologiques. Ces évènements peuvent être des modifications au niveau de (Figure 32):

- l'acide désoxyribonucléique (ADN), par variations alléliques : polymorphisme nucléotide, mutations de la séquence nucléotidique
- l'acide ribonucléique (ARN), par épissage alternatif
- des protéines, par PTM.

Un terme a été introduit par Smith *et al.* en 2013¹⁶⁹ afin de désigner toutes les différentes formes moléculaires dans lesquelles le produit protéique d'un seul gène peut se trouver : les **protéoformes**.

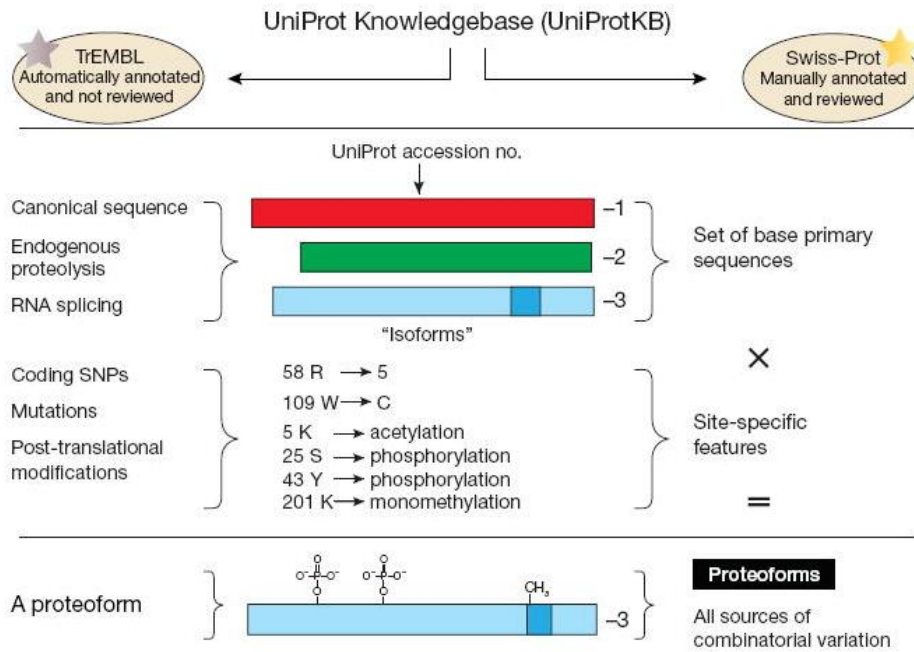


Figure 32 Définition du terme "protéoforme", d'après Smith *et al.* 2013¹⁶⁹

Les cellules ont besoin d'une grande diversité biochimique pour remplir la vaste gamme de fonctions biologiques. Cette diversité est alimentée en grande partie par la grande variété de protéoformes. Par exemple, les différentes combinaisons de PTM sur les histones agissent pour réguler la transcription des gènes²⁶⁵.

Les PTM les plus fréquentes sont la phosphorylation, l'ubiquitination, l'acétylation de lysine, la glycosylation et la méthylation de lysine²⁶⁶ (Figure 33). D'autres PTM comme la succinylation, la SUMOylation et la citrullination commencent à être étudiées et ajoutées dans les bases de données.

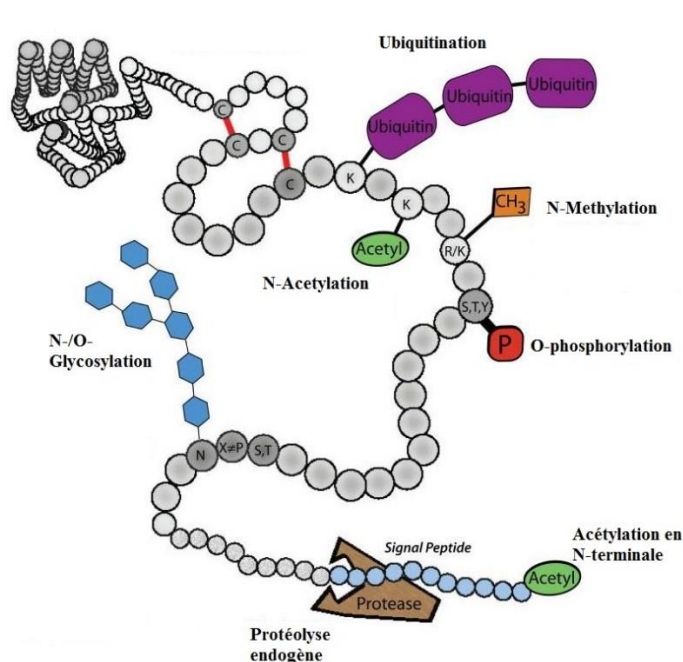


Figure 33 Illustration des modifications les plus fréquentes, adaptée de Pagel *et al.* 2015²⁶⁶

La **phosphorylation** est une PTM réversible. Elle se caractérise par l'ajout d'un groupement phosphate principalement sur les résidus de sérine, thréonine ou tyrosine et est l'une des PTM les plus importantes et les mieux étudiées. Pour un sous-ensemble important de protéines, la phosphorylation est étroitement associée à l'activité des protéines et la régulation de leur fonction par des changements de conformation de la protéine phosphorylée. La phosphorylation protéique est un processus dynamique qui est médiée par des kinases et des phosphatases. Le transfert d'un groupement phosphate se fait *via* l'ATP (Adenosine TriPhosphate) qui est convertit en ADP (Adenosine Diphosphate) par des kinases et la déphosphorylation par l'intermédiaire de phosphatases. Lee *et al.*²⁶⁷ se sont intéressés à la dysfonction mitochondriale dans le sepsis et ont proposé un modèle dans lequel l'inflammation entraînait des changements dans l'état de phosphorylation de protéines mitochondriales, y compris la phosphorylation de la protéine Tyr304 qui provoquait une réduction du potentiel de la membrane mitochondriale et donc un déficit énergétique, qui pourrait entraîner une défaillance des organes et la mort chez les patients septiques.

La **glycosylation** des protéines est reconnue comme l'une des principales PTM avec des effets significatifs sur le repliement, la conformation, la distribution, la stabilité et l'activité des protéines. La glycosylation englobe l'ajout de sucres sur les protéines sur diverses liaisons comme N-, O-, C- ou encore la glypiation (ajout d'un groupement glycosyl-phosphatidylinositol) et la phosphoglycosylation. De Haan *et al.*²⁶⁸ se sont intéressés à la glycosylation des immunoglobulines G car ces immunoglobulines sont impliquées dans la réponse immunitaire adaptative contre les infections à méningocoques et ses fonctions effectrices sont fortement influencées par la structure glycanique des régions Fc. Ils ont alors montré par LC-MS (détection des glycopeptides tryptiques) la corrélation entre

l'augmentation des glycosylations des immunoglobulines G avec le risque de décès des jeunes patients septiques à méningocoques.

L'**ubiquitination** est l'ajout de l'ubiquitine, une protéine de 79 acides aminés (8 kDa), *via* la lysine des protéines et la glycine C-terminale de l'ubiquitine. Les protéines peuvent être mono- ou poly-ubiquitinées. Après une première mono-ubiquitination sur une protéine, la formation d'un polymère d'ubiquitine est possible²⁶⁹. La mono-ubiquitination d'une protéine est impliquée notamment dans la signalisation cellulaire, la réparation de l'ADN, le marquage épigénétique de la chromatine ou la régulation de la localisation de certaines protéines. La poly-ubiquitination peut permettre la dégradation de la protéine ubiquitinée par le protéasome.

L'**oxydation** des protéines peut avoir lieu sur une grande variété d'acides aminés dont certains sont plus sensibles que d'autres à l'oxydation. Les résidus les plus sensibles à l'oxydation sont ceux contenant du soufre, à savoir la cystéine et la méthionine²⁷⁰. L'oxydation peut avoir des effets biologiques par perte de fonction et peut être utile comme biomarqueurs du stress oxydatif. La méthionine est souvent présente à la surface des protéines et a été suggérée dans les années 1980 comme piègeur d'oxydants afin de protéger d'autres résidus dans la protéine des dommages oxydatifs²⁷¹. La méthionine oxydée peut également jouer un rôle dans la régulation redox de l'activité enzymatique de certaines protéines. En effet, l'oxydation des deux méthionines de la calmoduline, une protéine régulatrice du calcium, causerait des changements structuraux, modifiant son interaction avec les protéines cibles²⁷². L'oxydation de la fonction thiol des cystéines peut produire des ponts disulfures intramoléculaire, des ponts disulfures avec des composés de faibles poids moléculaires, des S-nitrosothiols ou de l'acide sulfénique (ajout d'un atome d'oxygène)²⁷⁰. De plus, la cystéine peut être oxydée de façon irréversible de la forme thiol en acides sulfonique et sulfonique par addition de deux et trois atomes d'oxygène respectivement. L'oxydation des protéines par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peut avoir des effets biologiques importants. L'effet le plus courant de l'oxydation est la perte d'activité de la protéine²⁷⁰ et cela est plus probable si le résidu affecté se trouve à l'intérieur ou à proximité des sites de liaison. Si l'oxydation de la protéine est forte, cela peut provoquer le déploiement partiel de la protéine et donc l'exposition des régions hydrophobes²⁷³, ce qui tend à l'agrégation et à l'accumulation des protéines. Abdulmahdi *et al.*²⁷⁴ ont montré dans un modèle de souris sepsis induit par LPS que la production de ROS dans les cellules rénales était augmentée avec la gravité du sepsis et que l'oxydation de la protéine HMGB1 était également augmentée (test thiol et LC-MS/MS). D'après les auteurs, l'oxydation de HMGB1 entraînerait une capacité plus importante de la protéine à stimuler la libération pro-inflammatoire de cytokines et chimiokines.

La **S-nitrosylation** est la liaison covalente d'un groupe oxyde nitrique (-NO) au groupement thiol d'une cystéine d'une protéine pour former un S-nitrosothiol (SNO). Il s'agit d'une réaction d'oxydoréduction réversible. Cette PTM peut réguler un large éventail de fonctions protéiques, similaire à la

phosphorylation²⁷⁵. Dans certaines pathologies comme les maladies neurodégénératives, la S-nitrosylation des protéines est engendrée par le stress nitrosatif et oxydatif²⁷⁶. Ces protéines S-nitrosylées aberrantes peuvent déclencher des processus de destruction cellulaire, favorisant la neurodégénération dans plusieurs états pathologiques²⁷⁷. Par exemple, la parkine, impliquée dans la dégradation des protéines lors d'un stress du réticulum endoplasmique peut être S-nitrosylée entraînant une perturbation de son activité et un dysfonctionnement de la dégradation des protéines, ce qui entraîne l'accumulation et l'agrégation de protéines neurotoxiques²⁷⁷. Tout groupe thiol libre est théoriquement capable d'être S-nitrosylé et le sera si suffisamment de NO est ajouté au système mais dans la pratique, les niveaux physiologiques et physiopathologique de NO ne permettent la modification que de seulement certains groupes thiols²⁷⁸. Cette spécificité est déterminée en partie par leur proximité immédiate de la source de production de NO. Les niveaux de NO dans le sepsis sont critiques et d'un intérêt particulier car le NO régule la fonction vasculaire et permet la dilatation des vaisseaux sanguins. Ainsi, une production excessive de NO entraîne une hypotension sévère et peut être un marqueur de choc²⁷⁹. De plus, le NO est un radical libre et a des effets antimicrobiens²⁸⁰. Compte tenu des effets connus du NO sur la fonction vasculaire et le système immunitaire, il est possible que ce dernier puisse induire des modifications sur les protéines fonction de la gravité et/ou du pronostic du patient septique.

La **méthylation** consiste à ajouter un ou plusieurs groupement(s) méthyle sur les chaînes latérales d'au moins neuf acides aminés courants : la cystéine, la lysine, la méthionine, l'histidine, l'asparagine, l'acide aspartique ou glutamique, l'arginine, la glutamine et les groupes NH₂ et COOH terminaux, bien que la lysine et l'arginine soient les principaux acides aminés impliqués. Le groupement méthyle est l'un des plus petits PTM et contribue relativement peu au volume stérique des chaînes latérales modifiées. Une lysine peut être méthylée jusqu'à trois fois et une arginine jusqu'à deux fois. De plus, la charge globale des lysines et arginines méthylées n'est pas modifiée²⁸¹. L'ajout de groupements méthyles augmente l'hydrophobicité des protéines modifiées tout en diminuant leur capacité à former des liaisons hydrogènes²⁸². La méthylation est impliquée dans des processus biologiques tels que : les interactions protéine-protéine, la localisation cellulaire, la transduction du signal, la régulation de la transcription des gènes *via* la modification des histones. Tendl *et al.*²⁸³ et Dhas *et al.*²⁸⁴ ont montré que la méthylation de l'ADN pouvait être un biomarqueur diagnostique chez les nouveau-nés septiques.

La **N-acétylation** consiste en l'ajout d'un groupement CO-CH₃ sur l'amine en N-terminale. L'acétylation est également possible sur les lysines. La N-acétylation est l'une des modifications les plus courantes et se produit conjointement sur environ 84 % des protéines humaines²⁸⁵. Un groupement acétyle est transféré de l'acétyl-CoA au groupement amine des résidus N-terminaux des protéines par un mécanisme irréversible. En effet, aucune enzyme permettant une désacétylation de l'amine N-terminale n'a été encore découverte. Cependant, l'acétylation des lysines est un mécanisme réversible. Les deux mécanismes n'impliquent pas les mêmes enzymes²⁸⁶. Le groupement acétyle neutralise la charge positive de l'extrémité N-terminale et affecte donc les propriétés électrostatiques des protéines

et donc leur fonction²⁸⁶. En comparaison aux autres PTMs, le rôle physiologique de la N-acétylation est relativement mal connu. L'opinion prédominante de la N-acétylation est que cette modification protège les protéines de la dégradation. Cependant, la N-acétylation peut impacter la stabilité des protéines. Il a été montré que certains résidus N-acétylés pouvaient agir comme un signal de dégradation, cible de l'ubiquitine ligase Doa10²⁸⁷. De plus, la N-acétylation peut jouer un rôle sur le repliement des protéines. En effet, il a été observé que la N-acétylation permettait l'obtention d'une forme oligomère de l'alpha-synucléine avec une structure hélicoïdale partielle de alpha et donc la formation d'un tétramère résistant à l'aggrégation²⁸⁸. La protéine HMGB1 contenue à l'intérieur du noyau est non acétylé, HMGB1 présent dans le cytosol peut être acétylé, tandis que le HMGB1 libéré après nécrose des cellules est non acétylé, et enfin le HMGB1 activement sécrété par les cellules immunitaires est acétylé^{289,290}. Par conséquent, les PTM de HMGB1 sont des signatures qui fournissent des informations clés sur les activités de HMGB1 et son mécanisme de libération. Le HMGB1 non acétylé est donc corrélé à la libération passive des tissus endommagés tandis que le HMGB1 acétylé est lié à la sécrétion active par les cellules inflammatoires.

La **protéolyse endogène** est une PTM irréversible qui consiste en la troncation d'une protéine par des protéases qui hydrolysent les liaisons peptidiques. En conditions physiologiques, les liaisons peptidiques sont stables et par conséquent, les cellules ont besoin de protéases pour cliver ces liaisons. Il existe plus de 11 000 protéases qui peuvent être séparées en plusieurs groupes en fonction du type de protéolyse. La protéolyse dégradante est essentielle pour l'élimination des sous-unités protéiques non assemblées, les protéines mal repliées et pour maintenir les concentrations protéiques aux concentrations homéostatiques. Les protéases jouent également un rôle de commutateur moléculaire dans la biologie cellulaire, notamment en clivant les peptides signaux et en activant les zymogènes qui sont des précurseurs inactifs d'enzymes qui nécessitent un clivage pour activer leur fonction.

Les recherches sur les protéoformes et les voies biologiques pertinentes créent de nouvelles possibilités de cibles thérapeutiques et de biomarqueurs précoces. En effet, afin de déterminer le rôle fonctionnel des protéoformes dans les systèmes biologiques, il est nécessaire de comparer quantitativement leur abondance dans différentes conditions physiologiques. Néanmoins, cela reste un défi en raison de plusieurs obstacles. Le premier obstacle provient de la **matrice complexe** des échantillons, comme le plasma, où sont présents les protéines mais également d'autres molécules comme des lipides, des métabolites. Le deuxième obstacle est la **faible abondance** des protéoformes et la forte interférence des protéines majoritaires. Il est donc généralement nécessaire d'effectuer une préparation d'échantillons plus ou moins complexe afin de détecter les protéoformes faiblement abondants. Cependant, le traitement de l'échantillon biologique ne doit pas dégrader les PTM (phosphorylation) ou en induire de nouvelles (oxydation). Enfin, le troisième obstacle provient de la **diversité et de la complexité des protéoformes**. Afin de résoudre ces obstacles, deux technologies différentes existent pour étudier ces protéoformes en MS avec chacune leurs forces et faiblesses : le *bottom-up* et plus récemment le *top-*

down que nous détaillerons ci-dessous. En effet, l'approche *top-down* permet de s'affranchir de l'étape de digestion nécessaire au *bottom-up* qui induit un risque de perte d'informations sur les PTM. Avec le *bottom-up* il n'est possible d'avoir à priori qu'une vue partielle de la protéine et donc qu'une vue partielle des PTM et de leur lien entre elles.

III.2.5.b.ii) Quantification par *bottom-up*

L'approche *bottom-up* est la méthode protéomique traditionnelle pour la détection des protéines. Les méthodes de quantification par *bottom-up* appliquées aux protéoformes reposent sur l'analyse des peptides résultant d'une digestion enzymatique et possédant les modifications d'intérêt. Pour une attribution sans équivoque d'un site de modification, la fragmentation MS2 est nécessaire afin de vérifier que le décalage de masse détecté au niveau de l'ion précurseur est également observé pour les ions fragments portant le résidu acide aminé modifié. Les méthodes ciblées PRM permettent une sensibilité et spécificité suffisantes pour identifier les PTM. Ainsi, Barthélemy *et al.*²⁹¹ ont développé une méthode PRM pour identifier les sites de phosphorylation des protéines tau dans les cerveaux et liquides céphalorachidiens de patients avec et sans maladie d'Alzheimer. Ils ont pu détecter 29 sites distincts de tau phosphorylée pour la protéine tau complète à partir de lysat de cerveau humain et 12 sites sur la protéine tau du liquide céphalorachidien. Ils ont ainsi pu comparer les variations de sites de phosphorylation grâce à la capacité de multiplexage ciblée de l'approche *bottom-up* PRM et envisager l'utilisation des protéoformes tau phosphorylée comme biomarqueurs prometteurs pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer et le suivi des réponses thérapeutiques.

Bien que les approches *bottom-up* soient les plus sensibles, la quantification des protéoformes, souvent peu abondants, reste un défi. Des procédures d'enrichissement permettent d'augmenter l'abondance relative des peptides porteurs de PTM. Les phosphopeptides peuvent être enrichis par affinité au dioxyde de titane (TiO₂) ou par chromatographie d'affinité des ions métalliques immobilisés (IMAC pour *immobilized metal ion affinity chromatography*)²⁹². Une immunoprécipitation de la protéine totale est également possible pour quantifier les protéoformes comme par exemple pour la quantification de protéoformes de l'antigène prostatique spécifique²²³.

Les approches *bottom-up* sont extrêmement sensibles et permettent un haut multiplexage. Cependant, la digestion enzymatique peut entraîner la perte d'informations sur les PTM et il n'est donc pas possible de caractériser complètement les protéoformes endogènes sur toute leur longueur²⁹³. De plus, l'étape de digestion peut être variable et incomplète, ce qui peut introduire des erreurs dans la méthode de quantification des protéoformes. Afin de diminuer en partie les biais induits par la digestion Razavi *et al.*²⁹⁴ ont développé un protocole automatisé pour la digestion trypsique multiplexée d'échantillons de plasmas humains avant d'utiliser l'approche SISCAPA également automatisée. Ainsi, ils ont obtenu pour les 5 peptides mesurés dans 6 fois sur 6 jours à partir d'un pool de plasmas des CV < 5%.

Cependant, l'approche *bottom-up* induit un risque de perte d'informations sur les différents PTM possibles, c'est pourquoi l'approche *top-down* peut être intéressante pour étudier les protéoformes.

III.2.5.b.iii) Quantification par *top-down*

L'approche *top-down* permet d'étudier les protéines intactes sans protéolyse. Les protéines entières sont introduites en phase gazeuse par la source d'ionisation, analysées puis directement fragmentées. Un des intérêts majeurs de cette méthode est qu'elle permet de caractériser les **protéoformes** d'une protéine sans ambiguïté²⁹⁵. En effet, avec une analyse *bottom-up*, on peut remarquer une augmentation de peptides modifiés par une méthylation et phosphorylation, mais on ne connaît pas la séquence exacte des protéoformes. Ou encore, un protéoforme avec acétylation en N-terminale et une phosphorylation près de l'extrémité C-terminale sera digéré en plusieurs peptides, séparant ces deux modifications et rendant impossible de savoir si elles sont colocalisées ou non sur le protéoforme. Avec l'approche *top-down*, il n'y a pas d'ambiguïté sur la séquence des différents protéoformes comme illustré en Figure 34.

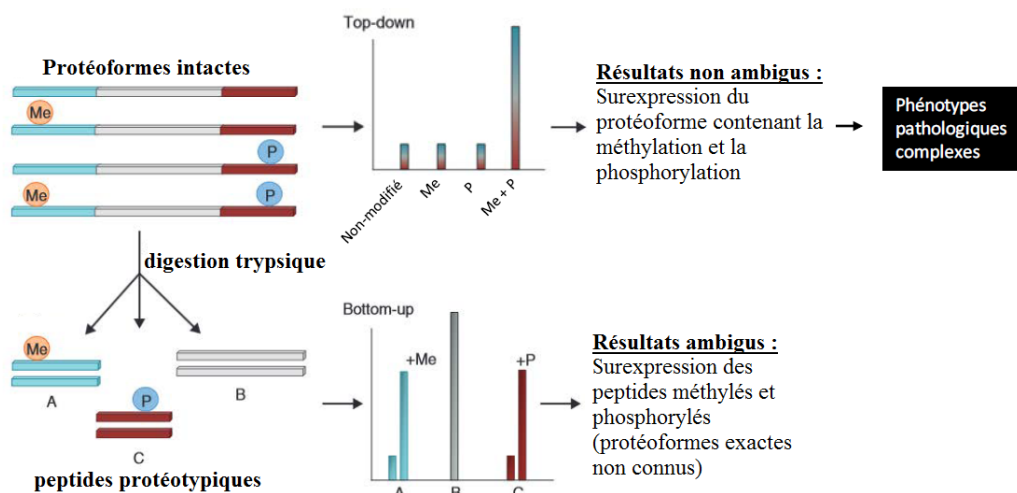


Figure 34 L'approche "top-down" fournit des informations sur les phénotypes, adaptée de Savaryn *et al.* 2013²⁹⁵

L'approche *top-down* est surtout utilisée pour les protéines majoritaires car leur ionisation et leur détection sont moins efficaces que pour les peptides^{296,297}. En effet, lors de l'ionisation ESI, de telles entités vont porter un nombre important d'états de charges conduisant à une dispersion du signal. Cependant, des progrès récents ont démontré que le *top-down* pour l'analyse d'échantillons complexe était possible, comme dans les lysats cellulaires humains^{298,299}. L'une des raisons pour laquelle les échantillons complexes restent encore un défi en *top-down* est que le rapport signal/bruit des protéines décroît de façon exponentielle à mesure que le poids moléculaire augmente^{300,301}. De plus, une résolution plus élevée est nécessaire pour résoudre les pics isotopiques des protéines intactes fortement chargées. Par conséquent, un temps d'acquisition plus long pour chaque balayage MS1 et MS2 est nécessaire pour obtenir une résolution et un rapport signal/bruit suffisants pour analyser les protéines intactes et leurs fragments. A noter qu'il semble néanmoins possible d'utiliser un triple quadripôle afin de quantifier en *top-down* des protéines intactes. En effet, Wang *et al.*³⁰² ont développé une méthode *top-down* pour

quantifier directement les protéines intactes à l'aide d'un triple quadripôle par MRM. Bien que les limites de dosage en urine et plasma des standards protéiques se situent à des concentrations assez élevées (entre 0.5 et 50 µg/mL), cette méthode peut tout de même permettre de quantifier des protéoformes fortement concentrés.

Afin d'analyser des protéines de matrices complexes comme le plasma humain, une **préparation d'échantillon** supplémentaire peut être nécessaire étant donné la détection moins efficace en termes de sensibilité du *top-down*, telle que l'immunoprécipitation. Elle est généralement effectuée afin d'enrichir la protéine d'intérêt avant l'analyse. Ntai *et al.*³⁰³ ont développé une méthode combinant l'immunoprécipitation pour enrichir les protéoformes issus des mutations du gène KRAS et l'approche *top-down* pour l'analyse des protéines intactes afin de mesurer directement les protéoformes KRAS.

Deux options sont possibles pour le **traitement du signal**, une première approche basée sur la **déconvolution MS** et une deuxième sur l'**approche XIC**. Lanshoeft *et al.*³⁰⁴ ont proposé de comparer ces deux approches pour l'analyse quantitative d'immunoglobuline G1 humain. Dans un premier temps, 18 états de charge ont été sélectionnés pour être déconvolués (déconvolution MS). Une linéarité acceptable a été observée avec cette méthode mais l'exactitude obtenue sur les faibles concentrations de QC n'est pas suffisante. Dans un second temps, plusieurs états de charge individuels ont été extraits (approche XIC). Contrairement à la déconvolution MS, des données précises et exactes ont été obtenues sur tous les échantillons de QC. De plus, le nombre d'états de charge (de 3 à 18) pour l'approche XIC n'a pas eu d'impact sur l'exactitude et la précision des essais.

Contrairement aux approches *bottom-up*, le choix d'étalons internes est limité aux protéines SIL, comme les PSAQ pour une quantification absolue. Cependant, quelques **stratégies d'étalonnage** peuvent être utilisées pour quantifier de manière relative les protéines en *top-down* comme les marquages chimiques et métaboliques **DML**, **SILAC**, **TMT**, les stratégies de **label-free** sont essentiellement utilisées³⁰⁵. Liu *et al.*³⁰⁶ ont développé une stratégie à haut débit pour la quantification globale d'échantillons complexes de protéoformes intactes par marquage DML. Ainsi, ils ont pu quantifier 2 283 protéoformes intactes provenant de protéomes de levures dans des conditions anaérobies et aérobies, avec 24 protéoformes étant régulées significativement suivant ces conditions. Dans le marquage SILAC, le rapport d'intensité MS1 des deux formes isotopiques fournit la quantification relative de la protéine entre les échantillons. Cependant, l'utilisation du SILAC pose plusieurs défis majeurs, notamment car la présence de deux ensembles d'enveloppes isotopiques pour une forme protéique donnée complique l'analyse des spectres et des données. Dans le marquage isobarique TMT, chaque échantillon est marqué par une étiquette séparée avec une masse d'ions rapporteur unique. L'intensité de ces ions TMT dans les spectres de fragmentation fournit une mesure de l'abondance des protéines. Dans le **label-free**, technique basée sur l'extraction du signal, les réactifs *tag* ne sont pas nécessaires, de sorte qu'ils peuvent être appliqués à des échantillons non cultivés comme les échantillons cliniques. Davis *et al.*³⁰⁷ ont développé une

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

approche *label-free* pour caractériser et quantifier des protéoformes extraits de cerveau de quatre souches de souris. Ainsi, sur 593 protéoformes, ils ont pu étudier les changements significatifs d'abondance de ces protéoformes en fonction des souches de souris.

La quantification par l'approche *top-down* est un outil avantageux pour la quantification des protéoformes. Contrairement aux approches *bottom-up* indirectes, la spectrométrie *top-down* permet non seulement de mesurer directement la protéine d'intérêt et également la présence de PTM. Cependant, elle nécessite un gain de sensibilité car elle est actuellement limitée aux protéines majoritaires et souvent limitée à une taille de 30 kDa³⁰⁸.

Objectifs de thèse

Les unités de soins intensifs soignent les patients atteints d'affections mettant leur vie en danger et la majorité de ces patients sont des patients qui ont développé un sepsis ou un choc septique. La mortalité à 28 jours atteint plus de 40% pour les patients atteints de choc septique. A un taux de mortalité élevé s'ajoute la complexité du sepsis, car le sepsis n'est pas une maladie spécifique mais plutôt une réponse multiforme induisant des processus pro- et anti- inflammatoires dont le diagnostic et surtout le pronostic restent encore compliqués. C'est pourquoi le sepsis a été reconnu par l'Organisation Mondiale de la Santé comme problème majeur de santé publique. Puisque les ressources mobilisées pour soigner ces patients sont très élevées en termes de ressources humaines, matérielles, biologiques et thérapeutiques, le rapport coût/bénéfice devient un point clé pour mieux sélectionner les patients qui bénéficieront d'une stratégie thérapeutique. La prédiction précoce de l'issue demeure cruciale pour les patients présentant un risque élevé de décès afin de mieux rationaliser les ressources nécessaires à l'amélioration de l'état de santé du patient. De plus, la sélection de patients dont le pronostic est bon éviterait l'exposition à des thérapies inadéquates qui pourraient être nocives. La prévision du devenir du patient a reçu beaucoup d'attention au cours des dernières années, notamment avec la création et l'utilisation de systèmes de cotation basés sur des éléments cliniques (par exemple score SOFA) et des analyses de routine (par exemple dosage de PCT, CRP, ...). Cependant, le lien entre le taux de mortalité et ces scores et marqueurs n'est pas clairement établi et a montré des divergences d'une étude à une autre. L'identification de biomarqueurs pour un pronostic précoce du sepsis et l'élaboration de méthodes robustes pour leur quantification auraient un impact majeur sur le système de soins de santé. Parmi les différentes sources de biomarqueurs, les protéines sont un choix pertinent car elles reflètent le fonctionnement biologique.

De nombreuses protéines circulantes ont déjà été mesurées dans le sérum ou plasma de patients et évaluées comme biomarqueurs potentiels du pronostic. Des listes de biomarqueurs ont ainsi été générées, notamment en protéomique non-ciblée par comparaison des niveaux protéiques de deux populations différentes. Cependant, dans ces listes de biomarqueurs, une majorité des biomarqueurs potentiels n'ont pas été vérifiés. De plus, actuellement aucun biomarqueur utilisé seul ne répond aux critères de performance requis, car au vu de la complexité du sepsis, un seul biomarqueur peut difficilement refléter l'ensemble des composantes du sepsis. Il est donc sans doute nécessaire de combiner les biomarqueurs représentant les différents processus du sepsis. Enfin, pour certains biomarqueurs potentiels, des résultats divergents ont été obtenus selon les études. Ainsi, un autre point clé à considérer est de démontrer que le test mesure réellement la molécule ciblée, une protéoforme de cette molécule ou son activité car cela contribue aux écarts entre les résultats lorsque différentes méthodes sont utilisées pour la même cible.

Ainsi, il est essentiel de disposer de méthodes analytiques à la fois précises et spécifiques pour uniformiser le dosage et vérifier la pertinence des biomarqueurs potentiels. Afin de confirmer un grand nombre de biomarqueurs potentiels reflétant un maximum de processus liés au sepsis, il est nécessaire de développer des méthodes multiplexes permettant de combiner ces différents biomarqueurs. Pour répondre à cet objectif, nous avons développé, lors de cette thèse, une approche multidisciplinaire combinant spectrométrie de masse, immunoanalyse et données cliniques. D'une part la spectrométrie de masse, par sa spécificité, notamment avec les analyseurs à haute résolution et sa capacité de multiplexage permet le développement d'essais multiplexés pour l'identification et la quantification de centaines de biomarqueurs candidats en une seule analyse. Les progrès de la protéomique *bottom-up* et surtout *top-down* et les différentes méthodes d'analyses en spectrométrie de masse permettent également une caractérisation minutieuse des différents protéoformes, qui peuvent être une source non négligeable de biomarqueurs candidats. D'autre part, les immunoessais, par leur sensibilité et leur rapidité permettent quant à eux la mise en œuvre des dosages des biomarqueurs pertinents dans les laboratoires de chimie clinique et/ou les unités de soins intensifs.

Premièrement, mon travail a porté sur la quantification des biomarqueurs candidats de la famille des calgranulines, membres des DAMPs : le complexe S100A8/S100A9 et la protéine S100A12. Deux tests ELISA basés sur le dosage du complexe S100A8/S100A9 et la protéine S100A12 ont été développés, validés et utilisés pour évaluer leur valeur en tant que marqueurs précoces du pronostic vital sur une cohorte de 49 patients atteints d'un choc septique. De plus, le développement de méthodes *bottom-up* et *top-down* ont permis de mieux caractériser les formes circulantes majoritaires du complexe S100A8/S100A9 et ses protéoformes, et évaluer leur pertinence pour le pronostic vital. Ce travail constitue le Chapitre 2 de ma thèse, et a donné lieu à l'écriture de deux publications.

Deuxièmement, je me suis également intéressée à la pertinence d'autres biomarqueurs protéiques candidats de concentrations plasmatiques variés représentant différents aspects de la physiopathologie du sepsis. Deux méthodes de quantification par spectrométrie de masse ont été développées, impliquant ou non une étape d'immuno-enrichissement. Une première méthode multiplexée pour les biomarqueurs candidats majoritaires du plasma a été développée et validée pour six protéines. Pour dix protéines plus faiblement concentrées, une deuxième méthode multiplexée SISCAPA a été développée et validée. Pour cela, des anticorps dirigés contre les peptides signatures des biomarqueurs, générés lors de l'étape de digestion enzymatique, ont été produits pour immuno-concentrer les peptides afin d'augmenter la sensibilité de détection. Ces deux méthodes ont été appliquées sur une cohorte de 49 patients atteints de choc septique afin d'identifier les biomarqueurs les plus pertinents. Ces résultats seront présentés et discutés dans le Chapitre 3 de mon manuscrit de thèse.

CHAPITRE 2 : QUANTIFICATION DES CALGRANULINES DANS LE PLASMA HUMAIN

I. Introduction : les calgranulines

La “**théorie du danger**” est un ensemble de postulats proposé par Polly Matzinger³⁸. Dans cette théorie, les constituants de l’individu peuvent déclencher une réponse immunitaire s’ils sont dangereux (ex. stress cellulaire) et certains constituants du non-soi peuvent être tolérés s’ils ne sont pas dangereux (ex. bactéries fœtales)^{38,309}. Ainsi une réponse immunitaire est déclenchée ou pas par la présence ou l’absence de danger, et non par le caractère exogène ou endogène de toute entité. Les **DAMPs** sont des molécules de l’hôte qui sont libérées par les cellules lorsqu’elles sont endommagées ou à la suite de réactions de stress cellulaire. Les membres de cette famille de protéines se sont avérés être des acteurs précoces dans le développement des processus inflammatoires. La protéine HMGB1 (High-Mobility Group Box 1), les histones, l’ADN ou l’ARN sont des exemples de DAMPs les plus fréquents^{42,51}. Au cours des dernières années, la famille des protéines **S100** a récemment gagné beaucoup d’intérêt en tant que DAMPs. Les S100 regroupent une famille d’une vingtaine de protéines à faibles poids moléculaire (10-14 kDa)³¹⁰. Les protéines S100 ont été découvertes pour la première fois au milieu des années 60³¹¹ dans des fractions cérébrales bovines sous forme de protéines partiellement solubles dans du sulfate d’ammonium saturé à 100%, ce qui explique leur désignation comme protéines S100. Un sous-groupe des S100, les **calgranulines (S100A8, S100A9 et S100A12)** ont été associées à des troubles inflammatoires aigus ou chronique et divers cancers^{46,47,48}. S100A8, S100A9 et S100A12 sont des protéines de liaison au Ca^{2+} qui sont principalement exprimées dans les cellules myéloïdes, comme les neutrophiles, les monocytes et les cellules dendritiques⁴⁴.

La protéine S100A8 humaine se compose de 93 acides aminés d’un poids moléculaire de 10,8 kDa et la protéine S100A9 humaine contient 113 acides aminés pour un poids moléculaire de 13,2 kDa. S100A8 et S100A9 possèdent une grande diversité structurale. Des complexes intracellulaires composés de ces deux protéines ont été décrits dans les neutrophiles et monocytes, où S100A8 et S100A9 représentent environ 45% du cytosol³¹². Dans ces cellules, S100A8 et S100A9 s’associent de façon non covalente, sous forme hétérodimérique ou hétérotétramérique³¹³⁻³¹⁵. La sécrétion de S100A8 et S100A9 par les cellules myéloïdes vers l’espace extracellulaire peut se faire de façon active ou passive. La libération passive peut être le résultat de lésions tissulaires ou de nécrose cellulaire³¹⁶. La libération active est dépendante du cation Ca^{2+} ⁽³¹⁷⁾. Leurs libérations, active ou passive, favorisent l’inflammation par l’activation des récepteur TLR-4³¹⁸.

La protéine humaine S100A12 contient 91 acides aminés pour un poids moléculaire de 10,4 kDa. L'expression génique constitutive de S100A12 dans les tissus humains est presque entièrement limitée aux granulocytes³¹⁹. Elle est exprimée dans le cytoplasme des neutrophiles où elle représente 5% des protéines cytosoliques³²⁰. S100A12 est également présente dans les monocytes et les lymphocytes³²⁰. S100A12 est sécrétée dans le compartiment extracellulaire³²¹. La libération de S100A12 des granulocytes en réponse au stress cellulaire se transforme en un signal de danger, qui partage les caractéristiques des cytokines et des chimiokines³²². La protéine S100A12 humaine est nettement surexprimée dans les conditions inflammatoires et des concentrations élevées de S100A12 se retrouvent dans divers compartiments inflammatoires^{323,324}. Des concentrations sériques élevées de S100A12 ont également été observées dans des infections bactériennes graves³²⁵. La protéine cible extracellulaire la plus connue de S100A12 est RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts)³²⁶. La stimulation du domaine extracellulaire de RAGE par S100A12 active les cascades de signaux intracellulaires induisant la sécrétion de cytokines et par conséquent des effets pro-inflammatoires³²⁷.

Dans le contexte du sepsis et du choc septique, plusieurs études ont montré l'intérêt des calgranulines séparément³²⁸⁻³³⁰. Van Zoelan *et al.*³²⁹ ont montré que les patients septiques présentaient des concentrations élevées de S100A8/S100A9 dans les premières 24 h et au troisième jour, mais aussi que l'injection de lipopolysaccharides (LPS) chez des patients sains entraînait une libération systémique de S100A8/S100A9. Gao *et al.*³²⁸ ont décrit une augmentation du niveau sérique de l'hétérocomplexe S100A8/S100A9 corrélée avec la gravité du sepsis et ont montré un niveau significativement plus élevé chez les non-survivants que chez les survivants à 28 jours. Une surexpression des gènes de S100A8 et S100A9 a été rapportée par Vogl *et al.*³¹⁸ chez des souris soumises à des injections de LPS ou à la ligature et ponction cœcales, et chez les patients atteints d'un choc septique par Payen *et al.*³³¹. Payen *et al.*³³¹ ont également montré la surexpression du gène de la protéine S100A12 chez ces mêmes patients en choc septique. Achouiti *et al.*³³⁰ ont montré que dans les cas de sepsis grave, S100A12 était libérée de façon systémique, quelle que soit la source primaire de l'infection. Les concentrations plasmatiques des trois calgranulines sont donc augmentées chez les patients septiques comparés aux contrôles mais semblent également plus élevées chez les non-survivants en comparaison aux survivants pour S100A8/S100A9³²⁸. Les calgranulines ont donc un potentiel intérêt à être étudiées ensemble pour le diagnostic et surtout le pronostic du sepsis et du choc septique.

II. Quantification par ELISA de S100A8/S100A9 et S100A12

Afin d'évaluer l'intérêt des calgranulines pour le pronostic du sepsis et du choc septique il est important de développer des tests bien caractérisés et validés qui permettent de détecter et de quantifier ces cibles. Ces développements sont apparus nécessaires compte tenu de la variabilité des anticorps utilisés dans la

littérature, qui étaient monoclonaux ou polyclonaux, obtenus à partir de souris ou de lapins, avec des informations limitées sur la reproductibilité et la répétabilité des dosages et surtout les difficultés connues à obtenir des résultats similaires en fonction des ELISA utilisés. Il nous est donc paru important de produire et caractériser nos propres anticorps monoclonaux et développer des ELISA.

II.1 Développement des ELISA anti-S100A8/S100A9 et anti-S100A12

II.1.1 Matériels et Méthodes

II.1.1.a Réactifs et tampons utilisés

Des souris de type Balb/c ont été élevées à l'unité de soins du CEA (Gif-sur-Yvette, France). Le standard hétérodimérique humain non-covalent S100A8/S100A9 provient de R&D Systems (référence 8226-S8-050) (Minneapolis, MN, USA). La sérum-albumine bovine (BSA), le Tween 20, l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG), l'ester N-hydroxysuccinimide de biotine (NHS-LC-biotine) et la streptavidine proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Des anticorps polyclonaux IgG et IgM anti-souris de chèvre proviennent de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). La solution de substrat ELISA Ultra tétraméthylbenzidine (TMB) vient de Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, IL, USA). Le conjugué streptavidine poly-péroxydase de raifort (HRP) provient de chez Pierce (Rockford, IL, USA). Pour les immunoessais, les plaques de microtitration à 96 puits (Maxisorp) sont de Nunc (Roskilde, Danemark). Tous les autres produits chimiques proviennent de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) ou à VWR chemicals (Fontenay-sous-Bois, France). Pour le test ELISA d'Ikemoto *et al.*³³², nous avons utilisé les anticorps anti-S100A8/S100A9 2B9 et 3D2. Selon les immunoessais, les réactifs sont dilués dans deux tampons différents. Le premier, le tampon EIA est composé de phosphate 0,1 M pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,1% de sérum-albumine bovine (BSA) et 0,01% d'azide de sodium, sauf pour la dilution de la streptavidine-poly-HRP, qui est diluée dans un tampon EIA sans azide de sodium. Le deuxième est un tampon caséine contenant 0,1 M de tampon phosphate pH 7,4, 0,15 M NaCl et 0,1% de caséine. Les plaques sont lavées en tampon de lavage contenant du phosphate 0,01 M pH 7,4 et 0,05 % de Tween 20. Le lavage et la lecture des plaques de microtitration sont réalisés à l'aide d'un laveur automatique de plaques (Bio Tek ELX405, Winooski, VT, USA) et d'un lecteur Multiskan Ex Thermo, respectivement.

II.1.1.b Expression et purification des protéines S100A8, S100A9 et S100A12

Les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 ont été produites et purifiées au laboratoire. Ces protéines recombinantes ont été utilisées pour les immunisations et les immunoessais. Les séquences d'ADN synthétique codant pour les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 ainsi qu'une étiquette polyhistidine en C-terminale proviennent de chez GeneCust (Dudelange, Luxembourg). Chaque fragment d'ADN a été inséré dans le vecteur d'expression pET22b(+) (Novagen, Allemagne) pour une expression dans

Escherichia coli (*E. coli*). Les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) transformées avec les vecteurs S100A12-pET22b, S100A8-pET22b et S100A9-pET22b ont été cultivées dans un milieu de culture Luria-Bertani supplémenté de 100 µg/mL d'ampicilline jusqu'à obtenir une densité optique de 0,6 à 600 nm. Les cultures d'expression des protéines ont été ensuite induites par l'ajout de 1 mM d'IPTG puis cultivées à 37 °C pendant 4 h. Après centrifugation des milieux de culture, les bactéries ont été lysées en tampon A (tampon phosphate de potassium 50 mM, 300 mM NaCl) par sonication (1 min à 14 W) et le lysat bactérien a été centrifugé à 14 000 g pendant 20 min à 4°C. Les protéines S100A12, S100A8 et S100A9 ont ensuite été purifiées grâce à l'étiquette polyhistidine sur gel d'affinité chargé de nickel tel que décrit par le fabricant (Sephacrose Fast Flow, Pharmacia). La concentration en protéines a été déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm avec un spectrophotomètre Nanodrop ND1000 (Labtech). La pureté a été évaluée par SDS-PAGE (système Phast, GE Healthcare).

II.1.1.c Production des anticorps monoclonaux

II.1.1.c.i) Immunisation des souris

Des souris Balb/c âgées de 10 semaines ont été immunisées séparément avec chaque immunogène et un adjuvant. Les immunogènes utilisés sont les protéines recombinantes purifiées : S100A8, S100A9, S100A12 et S100A9 couplée à la protéine porteuse KLH (*Keyhole Limpet Haemocyanin*) afin d'induire une meilleure réponse immunitaire. Les adjuvants utilisés sont l'hydroxyde d'aluminium (alun) ou l'adjuvant de Freund (AF). De plus, dans certains cas, un anticorps anti-CD25 a été injecté aux souris préalablement à l'immunisation afin d'inhiber l'action des lymphocytes T régulateur et ainsi casser la tolérance. En effet, les protéines S100A8 et S100A9 ont de fortes homologues de séquences avec celles murines (homologies de séquences : 55,9% pour S100A8 et 55,2% pour S100A9) et peuvent donc déclencher une réponse immunitaire insuffisante (Figure 35 et Figure 36). La protéine S100A12 n'est pas présente chez la souris.

```

P05109 S10A8_HUMAN      1      MLTELEKALNSIIDVYHKYSLIKGNFHAVYRDDLKLETECPQYIRKKGADVWFKELDI      60
P27005 S10A8_MOUSE      1      MPSELEKALSNLIDVYHNYQGNHHLKNDYKNDYKNDYKNDYKNDYKNDYKNDYKNDYKNDY
* :*****.:*****:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
P05109 S10A8_HUMAN      61      NTDGAVNFQEFLLLVIKMGVAHKKSHKEESHKE                                93
P27005 S10A8_MOUSE      61      NSDNAINFEEFLAMVIKVGVAHKKSHKE----                                89
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

Figure 35 Alignement des séquences en acides aminés des protéines S100A8 humaine et murine (Uniprot)

CHAPITRE 2 : QUANTIFICATION DES CALGRANULINES DANS LE PLASMA HUMAIN

```

P06702 S10A9_HUMAN      1  -MTCKMSQLERNIETIINTFHQYSVKLGHDPDTLNQGEFKELVRKDLQNFLKKNKNEKVI      59
P31725 S10A9_MOUSE      1  MANKAPSQMERSITTIIDTFHQYSRKEGHPDTLSKKEFRQMVEAQLATFMKKEKRNEALI      60
      . **:*:* **:*:*:*:*:* * *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
P06702 S10A9_HUMAN      60  EHIMEDLDTNADKQLSFEEFIMLMARLTWASHEKMHEGDE-GPGHHHKPGLGEGTP      114
P31725 S10A9_MOUSE      61  NDIMEDLDTNODNQLSFEECMMLMAKLI FACHEKLHENNPRGHGSHGKGCCK---      113
      :.*:*:*:* *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

Figure 36 Alignement des séquences en acides aminés des protéines S100A9 humaine et murine (Uniprot)

Une première campagne d’immunisation de quatre souris par immunogène a été effectuée pour les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 (Tableau 5).

Tableau 5 Première campagne d’immunisation pour l’obtention d’anticorps monoclonaux spécifiques des protéines S100A8, S100A9 et S100A12

protéine	nombre de souris	adjuvant	couplage à une protéine porteuse
S100A8	4	alun	aucun
S100A9	4	alun	aucun
S100A12	4	alun	aucun

Une seconde campagne d’immunisation a été effectuée pour S100A9 avec un total de 16 souris pour tester différentes conditions d’immunisations en termes d’adjuvants, de couplage à la protéine porteuse KLH et de traitement avec un anticorps anti-CD25 (Tableau 6).

Tableau 6 Deuxième campagne d’immunisations pour l’obtention d’anticorps monoclonaux spécifique de la protéine S100A9

protéine	nombre de souris	adjuvant	couplage	anti-CD25
S100A9	3	alun	aucun	aucun
	3	AF	aucun	aucun
	3	alun	KLH	aucun
	2	AF	KLH	aucun
	2	alun	aucun	oui
	3	AF	aucun	oui

Quatre injections intrapéritonéales de 50 µg de protéine avec adjuvant ont été réalisées sur chaque souris. Les injections ont été espacées de trois semaines. Afin de suivre la réponse immunitaire des souris, un prélèvement sanguin a été effectué le jour de la première injection (saignée pré-immune) qui servira de contrôle puis deux semaines après chaque injection (saignée). Les animaux ont ensuite été laissés au repos pendant deux mois après le dernier rappel. Sur les quatre souris, les deux souris ayant les meilleures réponses immunitaires ont été sélectionnées afin de recevoir trois jours de suite un « boost » de 50 µg de protéine par injection intra-veineuse avant de les sacrifier et prélever leur rate (Figure 37).

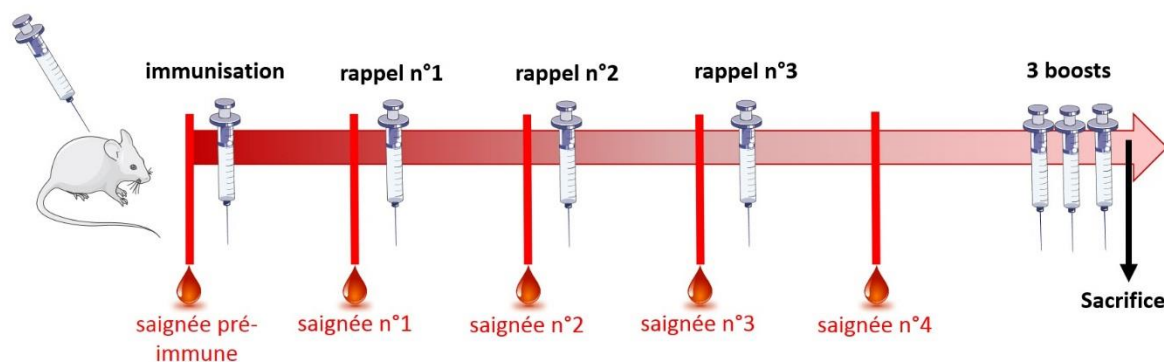


Figure 37 Protocole d'immunisation des souris pour l'obtention d'anticorps monoclonaux

II.1.1.c.ii) Obtention des hybridomes par fusion entre lymphocytes B et myélomes

Les fusions pour l'obtention des hybridomes ont été réalisées selon la technique décrite par Köhler et Milstein¹⁵³. Les deux souris sélectionnées pour leurs meilleures réponses immunitaires ont été sacrifiées deux jours après le dernier *boost* afin de prélever leur rate. En effet, la rate est riche en lymphocytes B, cellules qui sécrètent les anticorps. Les lymphocytes B ont été mélangées à des cellules de myélome murin (NS1) dans des proportions 3:1. Après centrifugation, le culot cellulaire a été remis en suspension dans du polyéthylène glycol 1500 (PEG, Sigma) qui permet la fusion membranaire. Les cellules ont été lavées et reprises en milieu Hypoxanthine-Aminoptérine-Thyamidine (HAT, Gibco, Life Technologies). Dans ce milieu sélectif, seules les cellules issues d'une hybridation entre les splénocytes et les NS1, appelées hybridomes, sont capables de proliférer. La suspension cellulaire a été distribuée dans des microplaques de cultures 96 puits et incubées à 37 °C sous 7% de CO₂. Après 7 à 10 jours, la présence d'anticorps spécifiques des protéines S100A8, S100A9 ou S100A12 dans le surnageant de culture a été mesurée à l'aide d'un test immuno-enzymatique, correspondant au premier criblage. Une centaine d'hybridomes, ceux avec les intensités de signal les plus fortes, ont été présélectionnés et testés après une culture de 24 h à différentes dilutions. Environ 20 hybridomes pour lesquels on obtient les signaux les plus élevés ont été conservés et ont ensuite été clonés par la méthode de « dilution limite » afin d'obtenir un clone cellulaire sécrétant un anticorps unique (anticorps monoclonal).

L'isotype de l'anticorps monoclonal a été déterminé en utilisant le kit « Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping » (ThermoScientific) selon le protocole fourni par le fabricant.

II.1.1.c.iii) Purification des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux ont été produits *in vitro* en milieu RPMI contenant 10% de SVF « *low IgG* ». La purification de ces anticorps monoclonaux a été faite par chromatographie d'affinité en utilisant un appareil ÄktaExpress (GE Healthcare) et des colonnes d'affinité HiTrap Protein G HP (GE Healthcare).

Les colonnes ont d'abord été équilibrées avec du tampon phosphate de potassium 20 mM à pH 7,4, pH optimal auquel les protéines G peuvent se lier avec une haute affinité et une haute spécificité à la région constante Fc des anticorps. Les surnageants de culture contenant les anticorps monoclonaux ont alors été injectés dans les colonnes, ces derniers se liant donc aux protéines G des colonnes. Enfin, l'éluion des anticorps d'intérêt a été faite avec du tampon glycine 0,1 M à pH 2,5. L'appareil collecte les fractions en fonction de l'absorbance à 280 nm. Les anticorps recueillis ont ensuite été tamponnés grâce à du tampon phosphate de potassium 1 M à pH 7,4.

Les fractions d'anticorps ont ensuite été rassemblées et dialysées une nuit à 4 °C en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4 à l'aide d'une membrane semi-perméable (Spectra/Porr Molecular porous membrane tubing MWCO 12-14 kD).

Après dialyse, la concentration des anticorps monoclonaux a été mesurée à l'aide du Nanodrop ND1000 (Labtech) à 280 nm.

La pureté des anticorps a ensuite été évaluée par SDS-PAGE avec le système 2100 Bioanalyzer (Agilent) qui permet d'effectuer des gels de séparation en conditions réductrice et non-réductrice sur puces selon le protocole fourni par le fabricant.

II.1.1.d Dosages immunométriques

II.1.1.d.i) Les traceurs

- **Couplage des protéines avec l'acétylcholinestérase**

Pour la sélection des hybridomes sécréteurs d'anticorps par ELISA, les immunogènes ont été couplés à l'acétylcholinestérase (AChE) à l'aide du réactif hétérobifonctionnel N-succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl)-cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) comme décrit par Grassi *et al.*³³³ pour être utilisés comme traceurs.

- **Mesure de l'activité enzymatique**

L'activité enzymatique de l'AChE a été mesurée par la méthode d'Ellman³³⁴. Le réactif d'Ellman est composé d'un mélange d'acétylthiocholine iodide (Sigma Aldrich) à $7,5 \cdot 10^{-4}$ M et d'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB oxydé) à $2,5 \cdot 10^{-4}$ M dans du tampon phosphate de potassium 100 mM pH 7,4. Lors de l'hydrolyse l'acétylthiocholine par l'AChE, la thiocholine réagit avec le DTNB en donnant un produit de couleur jaune qui absorbe à 414 nm. L'activité enzymatique est exprimée en Unités Ellman (UE). Une UE est la quantité d'AChE induisant une augmentation de l'absorbance à 414 nm d'une unité en 1 min dans 1 mL de substrat (réactif d'Ellman) pour un trajet optique de 1 cm à 25°C³³⁴.

- **Couplage des anticorps monoclonaux avec la biotine**

Les anticorps monoclonaux ont été couplés à la biotine de façon covalente pour être utilisés comme traceurs dans les essais immunoenzymatiques. Pour cela, 100 µg d'anticorps dans un volume de 400 µL de tampon borate 0,1 M pH 9,0 ont été incubés avec 13,3 nmol de NHS-LC-biotine (Sigma) dissoute dans du diméthylformamide (DMF) anhydre pendant 30 min à température ambiante. La réaction a ensuite été arrêtée en ajoutant 100 µL de tampon Tris-HCl 1 M pH 8,0. Enfin, après 15 min à température ambiante, 500 µL de tampon EIA ont été ajoutés pour obtenir une concentration finale de 100 µg/mL et cette préparation a été conservée à -20 °C jusqu'à utilisation.

II.1.1.d.ii) ELISA pour l'évaluation des réponses immunitaires

Les saignées (sérums) ont été testées par ELISA. Pour cela des plaques de microtitration 96 puits ont été coatées par adsorption passive avec des anticorps polyclonaux de chèvre anti-immunoglobines de souris Ig(G+M) (CAS) (Jackson ImmunoResearch) : 100 µL d'une solution de CAS à 10 µg/mL en tampon phosphate 50 mM à pH 7,4 ont été déposés et incubés sur la nuit à température ambiante. La plaque a ensuite été vidée et 300 µL de tampon EIA ont été déposés afin de saturer et conserver les plaques jusqu'à utilisation (avant utilisation la plaque est vidée et lavée trois fois). Les saignées ont été diluées en tampon EIA au 1/100, au 1/1 000, au 1/10 000, et 1/100 000, et 100 µL ont été déposées sur les plaques coatées avec les anticorps CAS. Après une incubation d'une nuit à 4°C, les plaques ont été vidées et lavées trois fois, puis 100 µL d'une solution contenant la protéine (S100A8, S100A9 ou S100A12) couplée à l'AChE à 1 UE ont été ajoutés et incubés 2 h à température ambiante sous agitation. Après trois lavages, 200 µL du réactif d'Ellman ont été ajoutés. L'absorbance à 414 nm a été mesurée après 30 min de réaction à température ambiante et sous agitation (Figure 38).

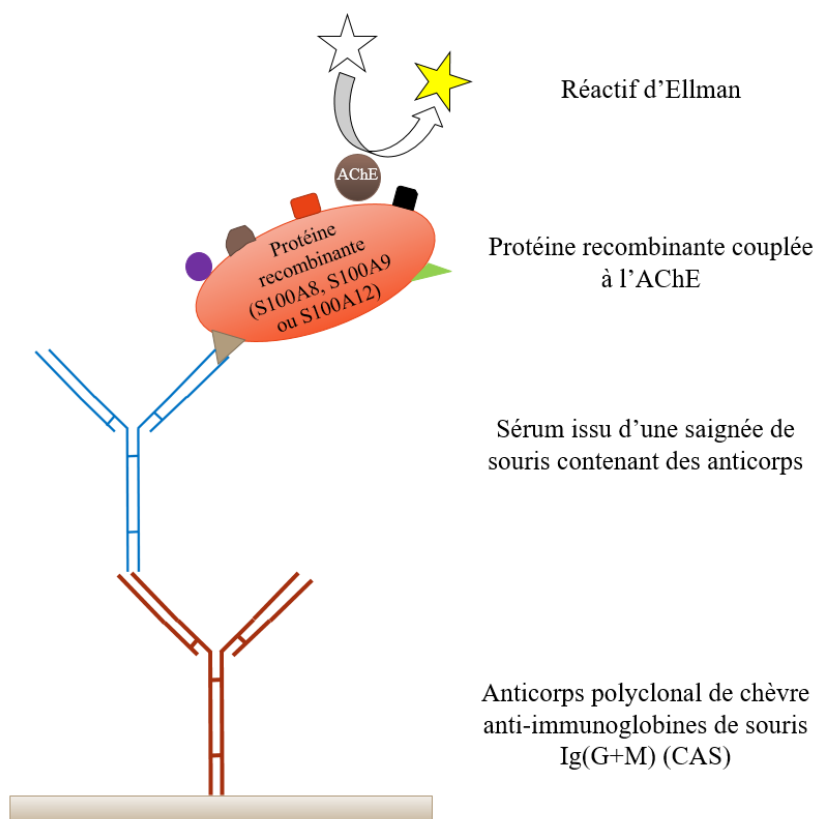


Figure 38 Test ELISA indirect pour l'évaluation des réponses immunitaires des souris. Les différents épitopes de la protéine recombinante sont représentés par les différentes formes. L'AChE est représentée par le cercle marron.

II.1.1.d.iii) ELISA pour le criblage des hybridomes

Le test de criblage est le même que celui utilisé pour l'évaluation des réponses immunitaires (cf II.1.1.d.ii) ELISA pour l'évaluation des réponses immunitaires, Figure 38) mais le sérum des saignées est remplacé par le surnageant de culture d'hybridomes. Les 100 puits avec les densités optiques à 414 nm ($DO_{414\text{ nm}}$) les plus fortes ont été sélectionnés et les hybridomes correspondant à ces puits ont été remis en culture pendant 24 h et leurs surnageants ont été testés à différentes dilutions (pur, 1/10, 1/100) dans du tampon EIA. Les 20 puits avec les signaux les plus élevés ont été sélectionnés pour le second criblage.

De plus, dans le cas de la seconde fusion S100A9, nous avons criblé les puits sélectionnés avec du plasma humain. Pour cela, 50 μL de surnageant de culture d'hybridomes sont déposés dans des plaques coatées avec du CAS. Après 2 h d'incubation et trois lavages, 50 μL de plasma humain dilué au 1/50 en tampon EIA + 10% de solution Erlich (liquide d'ascite riche en immunoglobulines de souris) ont été déposés et incubés sur la nuit à température ambiante. La solution Erlich a été utilisée pour saturer les paratopes du CAS. Les puits ont ensuite été vidés et lavés trois fois, puis 50 μL d'anticorps S100A8-3 (fixant l'hétérodimère S100A8/S100A9 présent dans le plasma humain) à 100 ng/mL en tampon EIA supplémenté de solution d'Erlich à 10% ont été déposés et incubés 2 h. Après trois lavages des puits, dépôt et incubation pendant 30 min de la streptavidine couplée à l'AChE, puis trois nouveaux lavages,

les plaques ont été révélées par ajout de 200 µL de réactif d'Ellman. L'absorbance à 414 nm est mesurée après 30 min de réaction.

II.1.1.d.iv) Analyse combinatoire pour la sélection des meilleurs couples d'anticorps monoclonaux

Afin de sélectionner les meilleures paires d'anticorps monoclonaux, une analyse combinatoire a été effectuée en utilisant chaque anticorps comme anticorps de capture ou anticorps traceur. L'immobilisation des anticorps sur des microplaques 96 puits a été effectuée sur la nuit à température ambiante après avoir distribué 100 µL/puits de l'anticorps à une concentration de 5 µg/mL en tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Les plaques ont ensuite été saturées en tampon EIA et stockées à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Avant utilisation, les plaques saturées ont été lavées trois fois avant d'ajouter 100 µL/puits de protéines (S100A8, S100A9, S100A12 ou l'hétérodimère S100A8/S100A9) ou 100 µL/puits de plasma humain. Après une incubation de 2 h à température ambiante, les plaques ont été lavées cinq fois. Ensuite, 100 µL/puits d'anticorps biotinylés ont été ajoutés. Après une réaction de 2 h à température ambiante, la plaque a été lavée trois fois. Ensuite, 100 µL/puits de streptavidine couplée à l'ACHé à 2 UE/mL ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation à température ambiante, six lavages sont effectués. Enfin, l'activité de l'ACHé a été mesurée par la méthode colorimétrique d'Ellman à 414 nm après 30 min.

II.1.1.d.v) ELISA anti-S100A8/S100A9 et anti-S100A12

L'immobilisation des anticorps monoclonaux anti-S100A8 (respectivement anti-S100A12) dans des microplaques de 96 puits a été effectuée pendant la nuit à température ambiante après avoir distribué 100 µL/puits de l'anticorps à une concentration de 5 µg/mL dans du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,4. Les plaques ont ensuite été saturées de tampon caséine et conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation. Avant utilisation, les plaques saturées ont été lavées cinq fois. Le plasma humain est dilué 1 000 fois (respectivement 100 fois pour S100A12) dans un tampon de caséine et 100 µL/puits ont été distribués en duplicat dans les plaques. Après une incubation d'une heure à température ambiante, les plaques ont été lavées cinq fois. Ensuite, 100 µL des anticorps biotinylés anti-S100A9 (respectivement S100A12) à 100 ng/mL ont été ajoutés. Après une incubation d'une heure à température ambiante, les plaques ont été lavées cinq fois et 100 µL/puits de solution de streptavidine poly-HRP à 12,5 ng/mL ont été ajoutés. Après une incubation de 30 min à température ambiante, suivie de six lavages, 100 µL/puits de solution de substrat Ultra TMB-ELISA ont été ajoutés. Après une réaction de 30 min à température ambiante et dans l'obscurité, 100 µL/puits de 1 M de H₂SO₄ ont été ajoutés. L'absorbance a ensuite été mesurée à 450 nm par rapport à une longueur d'onde de référence de 620 nm.

II.1.1.d.vi) ELISA 2B9-3D2 anti-S100A8/S100A9

L'ELISA anti-S100A8/S100A9 développé au laboratoire a été comparé à l'ELISA anti-S100A8/S100A9 utilisant les anticorps (2B9 et 3D2) décrit par Ikemoto *et al.*³³². Des concentrations de

0,166 et 0,834 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ont été utilisées pour les anticorps monoclonaux de capture (2B9) et traceur (3D2). Le reste de la procédure est similaire à notre test ELISA anti-S100A8/S100A9.

II.1.1.i Validation des ELISA

Afin de valider les tests ELISA, des courbes de standard ont été effectuées avec l'hétérodimère recombinant non-covalent S100A8/S100A9 commercial (R&D Systems) et la protéine recombinante S100A12 produite au laboratoire. L'hétérodimère S100A8/S100A9 a été ajouté dans du tampon caséine à des concentrations allant de 250 pg/mL à 80 ng/mL . La protéine S100A12 a été ajoutée dans du tampon caséine à des concentrations allant de 250 pg/mL à 40 ng/mL .

Des plasmas de patients en choc septique ont été mélangés et utilisés pour évaluer la répétabilité et la reproductibilité des tests ELISA. Six réplicats de mélange de plasmas dilués (tampon caséine) au 1/100 pour l'ELISA anti-S100A12 et au 1/1 000 pour les ELISA anti-S100A8/S100A9 ont été analysés sur trois jours afin de déterminer les CV intra- et inter-essais.

La limite de détection a été calculée comme la concentration de l'hétérodimère recombinant S100A8/S100A9 ou de la protéine recombinante S100A12 correspondant à la moyenne de 6 mesures du tampon caséine + 3 écarts types (confiance de 99,9%) et a été déterminée à partir de la courbe standard. La limite de quantification a été calculée comme la concentration de protéine recombinante correspondant à la moyenne de 6 mesures du tampon caséine + 10 écarts-types (confiance de 99,9%).

II.1.2 Résultats et Discussion

II.1.2.a Production des protéines recombinantes

Les séquences en acides aminés et les poids moléculaires des trois protéines S100A8, S100A9 et S100A12 sont données dans le Tableau 7. Les cystéines des protéines S100A8 et S100A9 sont surlignées en bleu.

Tableau 7 Tableau récapitulatif des 3 protéines S100A8, S100A9 et S100A12 avec leur séquence en acides aminés et leur poids moléculaire. Les cystéines sont surlignées en bleu.

Protéine	Séquence	Poids (kDa)
S100A8	MLTELEKALNSIIDVYHKYSLIKGNFHAVYRDDLLKLLLETECPQ YIRKKGADVWFKELDINTDGA VNFQEFLILVIKMGVAAHKKSH EESHKE	10,835
S100A9	MTCKMSQLERNIETIINTFHQYSVKLGHPDTLNQGEFKELVRKD LQNFLKKNKNEKVEIHIMEDLDTNADKQLSFEEFIMLMARLT WASHEKMHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP	13,242
S100A12	MTKLEEHLEGIVNIFHQYSVRKGFDTLSKGELKQLLTKELAN TIKNIKDKAVIDEIFQGLDANQDEQVDFQEFISLVAIALKAAHY HTHKE	10,575

Avant d'être injectées aux souris pour immunisation, la pureté des protéines d'intérêt a été contrôlée par SDS-PAGE afin de s'assurer que le minimum de protéine contaminante soit injecté et minimiser ainsi des réponses immunitaires contre des contaminants. L'analyse SDS-PAGE de S100A12 (Figure 39) indique la présence d'une seule bande majoritaire proche du poids moléculaire théorique (Tableau 7) et un taux de pureté de la protéine S100A12 supérieur à 95%. Pour les protéines S100A8 et S100A9, on observe en condition réductrice une seule bande correspondant à la masse attendue d'un monomère et en condition non-réductrice deux bandes correspondant à la masse d'un monomère et d'un dimère. A la différence de S100A12, les protéines S100A8 et S100A9 possèdent dans leur séquence d'acides aminés une cystéine (Tableau 7, cystéines surlignées en bleu) pouvant faire un pont disulfure inter-chaîne.

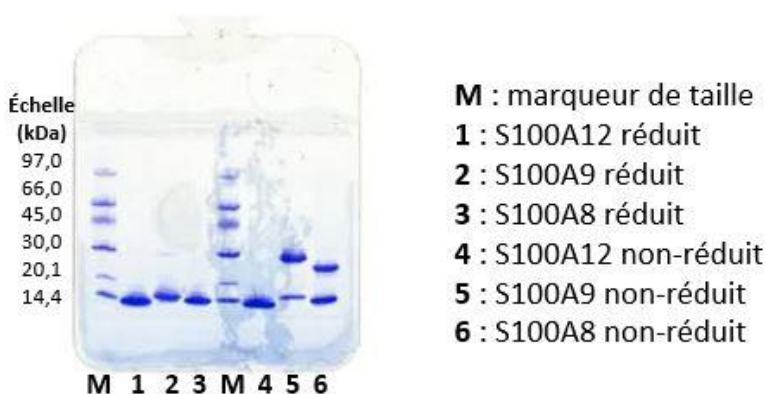


Figure 39 Analyse SDS-PAGE dans des conditions réductrice et non-réductrice des protéines recombinantes S100A8, S100A9 et S100A12

II.1.2.b Obtention des anticorps monoclonaux

II.1.2.b.i) Réponses immunitaires des souris immunisées

Les résultats obtenus pour les deux souris sur quatre répondant le mieux contre les immunogènes sont présentés dans la Figure 40. En abscisse sont reportées les dilutions des saignées du 1/100 au 1/10 000. L'intensité du signal exprimée en unité d'absorbance à 414 nm est reportée en ordonnée. L'évolution du signal donne une courbe en cloche. Aux premières dilutions, on observe un signal réduit dû à un effet matrice. A des dilutions de sérum plus élevées, le signal augmente dû à la levée de l'effet matrice puis diminue au fur et à mesure de la dilution des immunoglobulines. Les souris sélectionnées sont celles qui ont les signaux les plus forts aux plus fortes dilutions.

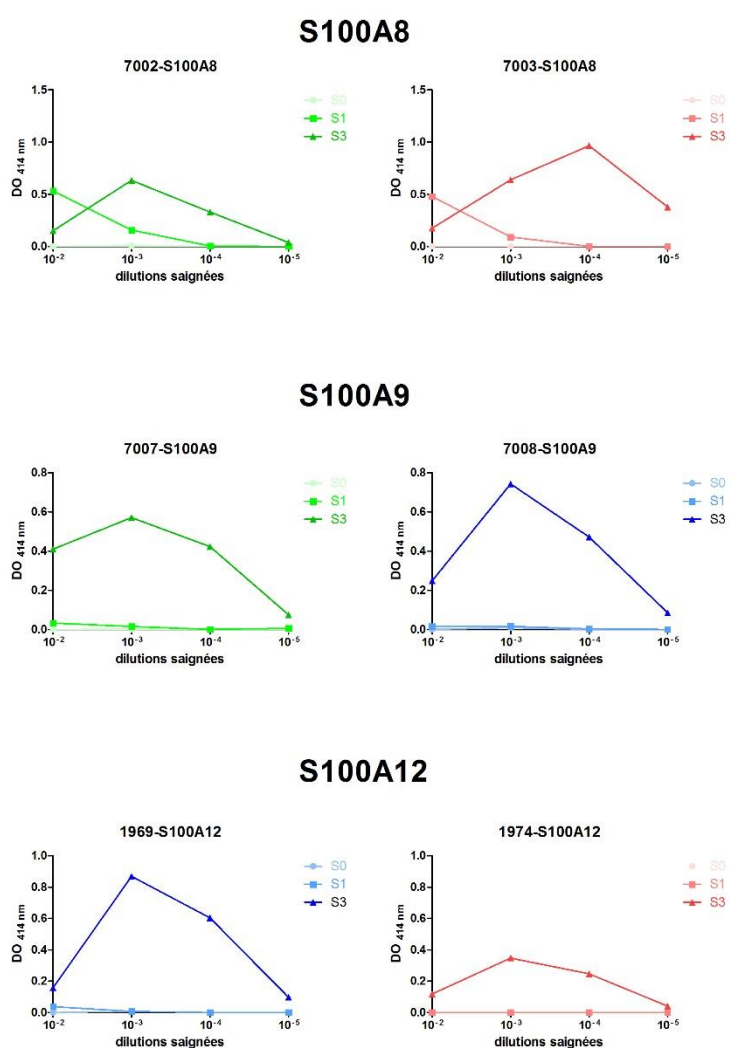


Figure 40 Réponse immunitaire des souris immunisées lors de la première campagne d'immunisations avec les protéines S100A8, S100A9 et S100A12 et sélectionnées pour la production des anticorps

II.1.2.b.ii) Criblages des hybridomes

Le nombre d'hybridomes sélectionnés à l'issue des deux criblages sont reportés dans le Tableau 8. On peut noter que peu d'hybridomes, 7 et 38, sont positifs pour les protéines S100A8 et S100A9, respectivement, et par conséquent peu d'anticorps différents ont été produits. Cette faible réponse peut s'expliquer par les fortes homologues de séquence entre les protéines humaines et murines (environ 55% pour les deux protéines). De plus, si on compare avec la protéine S100A12 qui n'est pas présente chez la souris, le nombre d'hybridomes, 101, positifs est bien plus important.

Tableau 8 Résultats des deux criblages des hybridomes pour l'obtention d'anticorps spécifiques de S100A8, S100A9 et S100A12

Protéine	Nombre total d'hybridomes	1 ^{er} criblage (nbre d'hybridomes positifs)	2 ^{ème} criblage (nbre d'hybridomes)	Nbre d'anticorps monoclonaux
S100A8	108	7	4	4
S100A9	441	38	6	6
S100A12	811	101	20	18

II.1.2.b.iii) Anticorps monoclonaux anti-S100A8, anti-S100A9 et anti-S100A12 purifiés

L'absorbance à 280 nm de chaque solution d'anticorps purifiés a été mesurée afin de déterminer leur concentration ; les données sur chaque anticorps monoclonal sont donnés dans les tableaux suivants (S100A8 : Tableau 9, S100A9 : Tableau 10 et S100A12 : Tableau 11). Les quatre et six anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines S100A8 et S100A9, respectivement, sont tous des IgG. Pour S100A12, deux anticorps monoclonaux (23 et 28) sont des IgM, leur purification n'a pas été réalisée car ces anticorps sont généralement sources de signaux non-spécifiques.

Tableau 9 Résumé des résultats des anticorps anti-S100A8 purifiés

Nom	Quantité (µg)	Concentration (mg/mL)	Isotype
1	2718	1,97	γ1κ
2	675	0,54	γ1κ
3	620	0,47	γ1κ
4	1433	1,12	γ1κ

Tableau 10 Résumé des résultats des anticorps purifiés anti-S100A9

Nom	Quantité (µg)	Concentration (mg/mL)	Isotype
11	1078	1,26	γ1κ
13	1850	1,48	γ1κ
14	1481	1,61	γ1κ
15	1496	1,16	γ1κ
16	1283	0,91	γ1κ
17	1724	1,24	γ1κ

Tableau 11 Résumé des résultats des anticorps purifiés anti-S100A12

Nom	Quantité (µg)	Concentration (mg/mL)	Isotype
21	1318	1,03	γ1κ
22	508	0,53	γ1κ
23	0	0	ακ
24	690	0,96	γ1κ
25	627	0,66	γ1κ
26	231	0,26	γ1κ
27	381	0,41	γ1κ
28	0	0	ακ
29	1545	1,31	γ1κ
30	826	0,95	γ1κ
31	795	1,02	γ1κ
32	346	0,340	γ1λ
33	1635	1,50	γ1κ
34	576	0,96	γ1κ
35	684	0,64	γ1κ
36	420	0,42	γ1κ
37	883	0,94	γ1κ
38	432	0,46	γ1κ
39	232	0,24	γ1κ
40	1547	1,46	γ2bκ

Les anticorps purifiés sont analysés en SDS-PAGE afin d'évaluer leur pureté. En condition non-réductrice, on observe une bande unique à un poids moléculaire d'environ 150 kDa correspondant à l'anticorps entier. En condition réductrice, les ponts disulfures sont réduits et on observe deux bandes à 25 kDa et 50 kDa correspondant aux chaînes légères et aux chaînes lourdes, respectivement. A titre d'exemple, l'analyse SDS-PAGE en condition réductrice et non-réductrice de six anticorps monoclonaux anti-S100A12 (22A, 26A, 27A, 30A, 31A, 32A et 34A) est illustrée en Figure 41. On observe bien une bande majoritaire en condition non-réductrice à 150 kDa et deux bandes proches de 25 et 50 kDa en condition réductrice pour les six anticorps monoclonaux. Les anticorps sont donc intègres et leur pureté est suffisante pour être utilisés pour la suite.

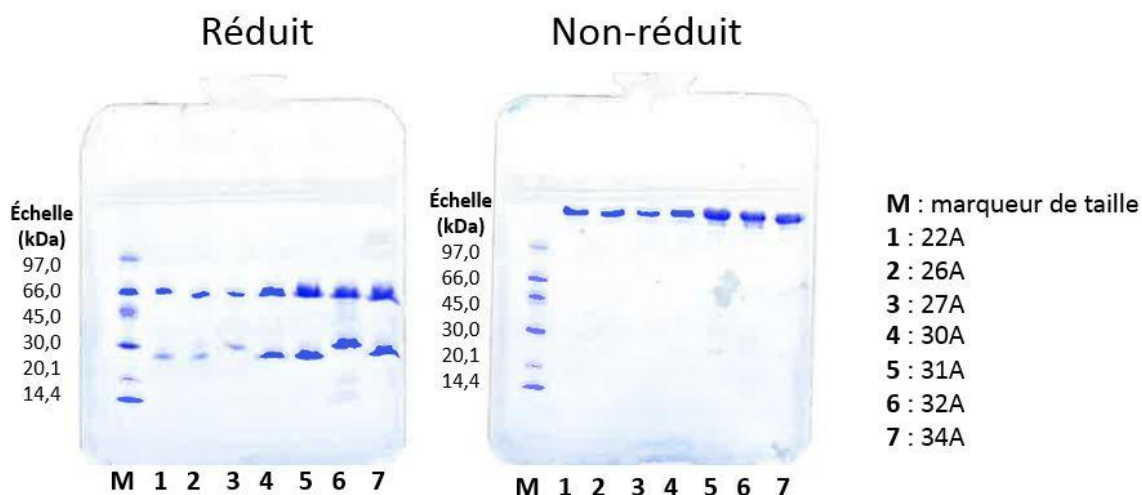


Figure 41 Analyse SDS-PAGE de six anticorps monoclonaux anti-S100A12 en conditions réductrice et non-réductrice

II.1.2.c Analyses combinatoires

II.1.2.c.i) Analyse combinatoire des anticorps anti-S100A8/ S100A9

Un total de quatre et six anticorps monoclonaux dirigés respectivement contre les protéines S100A8 et S100A9 ont été sélectionnés, produits et purifiés. Pour établir un dosage immunométrique à deux sites de l'hétérocomplexe S100A8/S100A9, une analyse combinatoire des anticorps monoclonaux a été effectuée. Au moment de cette analyse nous n'avions pas à disposition d'hétérodimère recombinant et nous avons donc testé chaque anticorps monoclonal soit comme anticorps de capture, soit comme anticorps traceur sur un échantillon de plasma humain dilué 100 fois et 1000 fois comme source de protéine cible. Au total, 48 combinaisons ont été testées. L'ELISA utilisant les anticorps monoclonaux S100A8-3 comme anticorps de capture et S100A9-17 comme anticorps traceur est apparu le seul à détecter l'hétérocomplexe S100A8/S100A9 dans le plasma humain.

II.1.2.c.ii) Analyse combinatoire pour S100A12

Au total, 18 anticorps monoclonaux anti-S100A12 ont été produits. Pour établir un dosage sandwich, une analyse combinatoire des anticorps monoclonaux a été effectuée en utilisant un échantillon de plasma humain dilué 50 fois et de la protéine S100A12 recombinante (1 ng/mL) comme sources du S100A12. Les résultats de l'analyse combinatoire avec un échantillon de plasma humain dilué 50 fois sont donnés dans le Tableau 12. Le meilleur couple d'anticorps a été choisi en fonction du rapport signal spécifique / signal non spécifique (SS/SN) le plus fort avec la protéine S100A12 recombinante et l'échantillon de plasma. Sur un total de 324 paires possibles d'anticorps testés, l'ELISA utilisant les anticorps monoclonaux S100A12-32 comme anticorps de capture et S100A12-37 ou S100A12-40 comme anticorps traceur ont été déterminés comme les plus sensibles. Après une analyse plus précise

CHAPITRE 2 : QUANTIFICATION DES CALGRANULINES DANS LE PLASMA HUMAIN

avec différentes concentrations de protéine S100A12 recombinante et différentes dilutions de plasma humain, le sandwich S100A12-32 / S100A12-37 biot a été sélectionné.

Tableau 12 Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps anti-S100A12 avec un échantillon de plasma humain dilué au 1/100. Avec SS : Signal Spécifique, SN : Signal Non-spécifique, biot : anticorps biotinylé (traceur)

SS/SN	21	22	24	25	26	27	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
21 biot	0.689	0.901	1.524	0.985	0.824	0.698	0.787	0.386	0.836	0.705	0.849	0.756	0.788	0.938	0.800	0.822	0.847	0.732
22 biot	0.473	0.925	2.308	0.983	0.978	0.800	0.914	0.416	1.057	0.878	1.078	0.794	0.944	1.094	0.906	0.882	1.000	0.709
24 biot	0.738	0.750	1.603	1.000	0.674	0.673	0.844	0.372	1.103	0.711	0.800	0.667	0.800	0.861	1.013	0.784	0.972	0.758
25 biot	0.690	0.900	2.486	0.946	0.712	0.741	1.000	0.414	0.864	0.698	1.037	0.642	0.871	0.816	0.339	0.778	0.944	0.688
26 biot	0.735	1.093	1.765	0.657	1.048	1.156	1.333	0.592	1.044	1.051	0.877	0.732	1.207	0.933	0.957	0.771	1.057	0.825
27 biot	1.041	0.786	2.384	0.800	0.762	0.821	1.020	0.796	0.882	0.708	0.741	1.167	0.817	0.766	0.728	0.638	0.779	0.680
29 biot	0.716	0.753	1.804	0.791	0.630	0.789	1.352	0.786	1.123	0.574	0.899	0.820	0.876	1.167	0.811	0.615	0.816	0.884
30 biot	0.740	0.935	1.083	0.840	0.791	0.002	0.932	0.708	0.770	0.629	0.784	0.711	0.741	0.858	0.674	0.684	0.816	0.623
31 biot	0.575	1.098	1.546	0.883	0.926	2.181	1.587	0.634	0.968	0.706	1.206	0.849	1.299	0.828	1.162	0.882	1.180	0.784
32 biot	0.846	0.897	2.122	1.027	1.061	0.975	1.588	0.440	1.219	0.413	1.064	0.719	1.042	0.880	1.083	0.914	1.333	0.706
33 biot	1.048	1.698	1.922	0.821	1.493	0.928	1.093	0.599	1.625	0.534	1.448	0.465	1.784	0.843	0.975	1.063	1.328	1.921
34 biot	0.783	1.069	1.339	0.876	0.841	0.880	0.834	0.815	0.900	0.706	0.776	0.628	0.869	0.898	0.973	0.754	0.969	0.718
35 biot	0.718	1.006	0.992	0.771	1.106	0.848	0.678	0.955	1.268	0.913	0.907	0.711	0.885	1.025	0.780	0.794	0.824	1.538
36 biot	0.649	0.609	0.958	0.753	0.915	0.605	0.933	0.759	1.161	0.884	0.649	0.557	0.756	1.236	2.453	0.710	0.539	0.965
37 biot	0.919	0.673	1.471	0.922	1.080	0.841	1.038	1.180	2.067	17.960	1.074	1.171	1.226	1.333	0.724	0.887	0.815	0.856
38 biot	0.839	1.105	1.179	0.743	1.294	0.790	0.734	0.809	1.600	0.822	0.908	1.006	1.222	0.964	0.721	1.000	0.873	1.290
39 biot	0.646	1.028	1.127	0.659	1.338	0.783	0.702	0.738	1.479	0.942	0.976	0.706	1.432	1.061	0.775	1.030	0.926	1.751
40 biot	1.058	1.224	2.269	0.520	1.167	0.900	2.081	1.124	3.600	16.823	0.644	1.336	1.839	5.152	1.179	0.833	1.054	1.000

II.1.2.d Nouvelle campagne d'immunisations pour l'obtention d'anticorps monoclonaux anti-S100A9

Une nouvelle production *in vitro* de l'anticorps S100A9-17, a été effectuée afin de poursuivre les développements du test ELISA anti-S100A8/S100A9. Cependant, l'ELISA anti-S100A8/S100A9 n'était plus fonctionnel avec ce nouveau lot d'anticorps ni avec les suivants. Cela était probablement dû à une mutation ou instabilité de l'hybridome. Nous avons donc dû faire une nouvelle campagne d'immunisation pour la protéine S100A9.

II.1.2.d.i) Nouvelles stratégies d'immunisation des souris avec la protéine recombinante S100A9

Notre protocole classique d'immunisation consiste en une injection de l'immunogène avec l'alun comme adjuvant. Cependant, pour la protéine S100A9, nous avons obtenu une faible réponse immunitaire et peu d'hybridomes positifs. Nous avons donc entrepris d'autres stratégies d'immunisations. Nous avons comparé deux adjuvants : l'alun et l'AF. De plus, la protéine S100A9 ayant de faible poids moléculaire (13,2 kDa) et étant potentiellement peu immunogène, nous avons testé l'apport d'un couplage à une protéine porteuse (la protéine KLH) sur la réponse immunitaire. Par ailleurs, nous avons vu précédemment qu'il existe une forte homologie de séquences (55%) entre les protéines S100A9 humaine et murine (Figure 36), pouvant conduire à une faible réponse immunitaire.

Ceci nous a amené à tester l'effet de casser la tolérance du système immunitaire des souris par un traitement avec des anticorps anti-CD25. Les stratégies d'immunisations sont résumées dans la Figure 42.

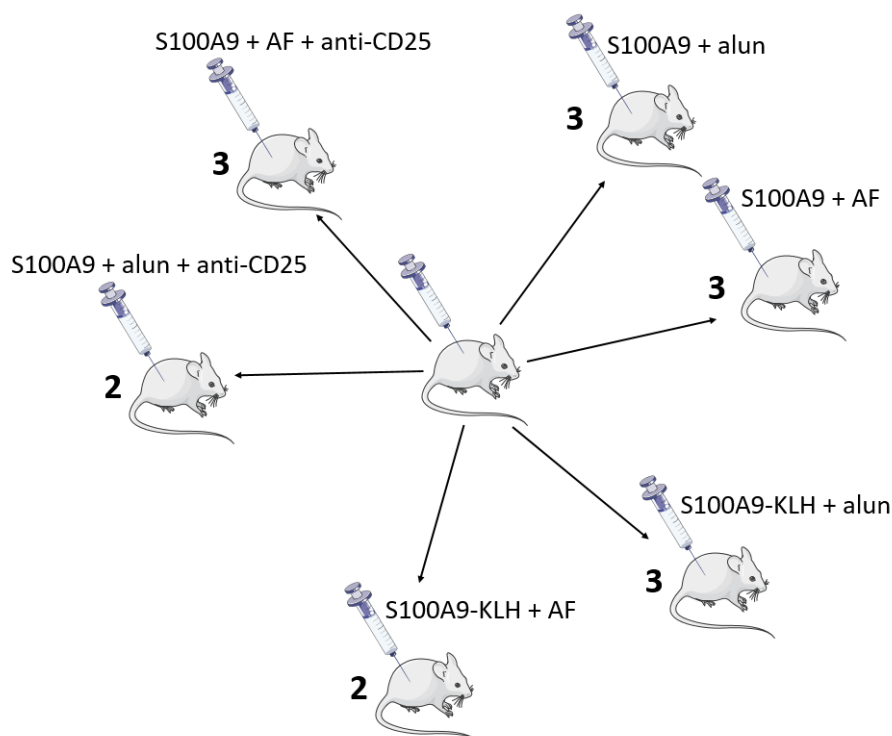


Figure 42 Stratégie d'immunisation pour la seconde campagne d'immunisation des souris pour l'obtention d'anticorps anti-S100A9

II.1.2.d.iii) Réponses immunitaires des souris immunisées lors de la seconde campagne d'immunisations S100A9

Les saignées ont été testées en parallèle avec l'hétérodimère commercial S100A8/S100A9 couplé à la biotine et la protéine S100A9 couplée à l'AChE. Les résultats de suivi d'immunisation sont illustrés dans la Figure 43. Pour ce qui concerne le couplage avec la protéine porteuse KLH nous n'observons aucun effet sur la réponse immunitaire. De même, l'ajout de l'anti-CD25 ne permet pas non plus d'augmenter la réponse immunitaire. Enfin, pour chaque condition, les adjuvants alun et AF sont comparés, et on observe très clairement que, l'AF permet d'obtenir des réponses immunitaires bien plus élevées que l'alun. L'AF est un adjuvant qui contient notamment, des mycobactéries tuées et séchées par la chaleur, ce qui induit des taux élevés d'anticorps circulants spécifiques de l'antigène et une forte réactivité des lymphocytes T, ce qui rend cet adjuvant très puissant et plus adéquat pour certains usages³³⁵.

Trois souris ont été sélectionnées, les souris n°1272, n°1273 et n°1274 immunisées avec S100A9, de l'anti-CD25 en AF, afin de recevoir en intra-veineuse les trois derniers *boosts* avant le prélèvement de la rate, la souris n°1274 est cependant décédée avant la fin du protocole (avant l'administration des

boosts). La fusion des cellules des rates des souris n°1272 et n°1273 n'a cependant donné aucun hybridome. Nous n'avons pas cherché à expliquer la non-obtention des hybridomes. Il peut s'agir d'un problème lors d'une des différentes étapes de la fusion, des cellules de myélomes murins, des agents de fusion ou encore du milieu de culture. Deux autres souris ont donc été sélectionnées, les souris n°1266 et n°1268 immunisées avec S100A9 en AF, afin de recevoir en intra-veineuse les trois derniers *boosts* avant le prélèvement de la rate.

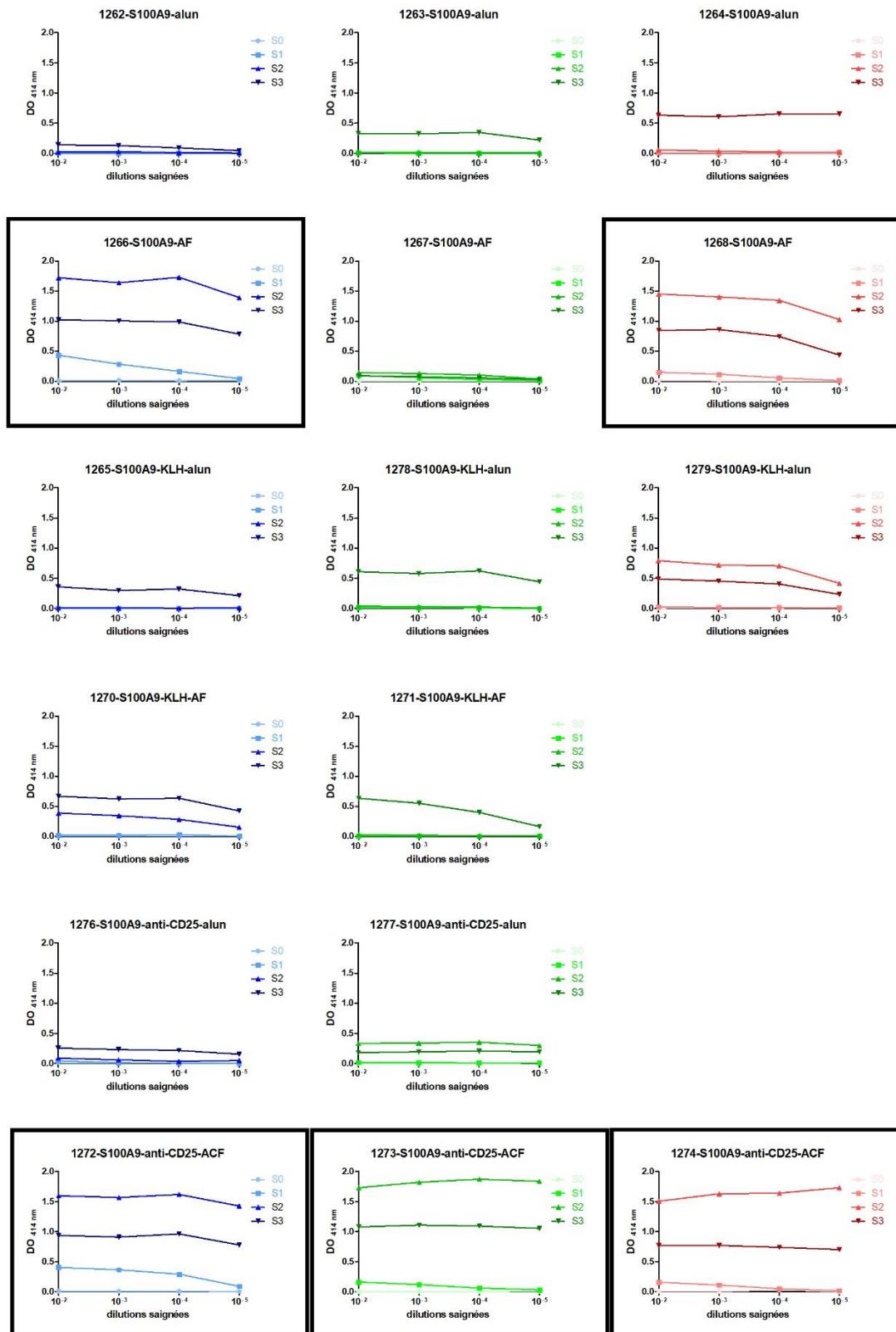


Figure 43 Réponse immunitaire des souris immunisées lors de la seconde campagne d'immunisations avec la protéine S100A9, S100A9 couplée à la protéine porteuse KLH, S100A9 avec ajout d'anti-CD25 et les adjuvants AF ou alun. Les souris sélectionnées sont encadrées en noir.

II.1.2.d.iv) Criblages des hybridomes

Suite à la fusion des splénocytes des deux souris sélectionnées avec les cellules de myélome murin SN1, deux criblages des surnageants d'hybridomes ont été effectués avec S100A9-AChE et S100A8/S100A9 biotinylé. Les hybridomes générant les signaux les plus forts avec S100A9 et S100A8/S100A9, soit 115 puits sélectionnés pour le second criblage, soit trois fois plus d'hybridomes positifs sélectionnés que pour la première fusion. Pour le second criblage, les 115 surnageants de culture d'hybridomes sélectionnés ont été testés avec S100A8/S100A9 biotinylé et du plasma humain. Une très bonne corrélation a été obtenue entre les tests avec l'hétérodimère S100A8/S100A9 et le plasma humain. A la suite du second criblage, 19 hybridomes ont été sélectionnés et clonés par dilution limite. Au cours du clonage six hybridomes ont été perdus (mort des cellules, perte ou mutation du gène codant pour l'anticorps) et les 13 hybridomes restants ont été clonés et des anticorps monoclonaux ont été produits.

II.1.2.d.v) Anticorps monoclonaux anti-S100A9 purifiés

Les résultats de chaque anticorps monoclonal sont donnés dans le Tableau 13.

Tableau 13 Concentrations des anticorps purifiés anti-S100A9

Nom	Quantité (µg)	Concentration (mg/mL)	Isotype
101	3012	2,17	γ1κ
102	2587	2,17	γ1κ
104	2792	1,86	γ1κ
105	2121	2,23	γ2bκ
106	2507	1,98	γ2a/2cκ
107	2124	1,5	γ1κ
109	1868	1,44	γ1κ
111	4170	3,7	γ1κ
114	2456	1,92	γ1κ
115	2624	2,25	γ1κ
116	2894	2,27	γ2bκ
117	2862	1,99	γ1κ
119	2105	1,34	γ1κ

II.1.2.d.vi) Nouvelle analyse combinatoire pour S100A8/S100A9

Une analyse combinatoire a été effectuée afin de déterminer quel anticorps sera utilisé avec l'anticorps de capture S100A8-3. En effet, cet anticorps a été conservé car il s'agit de l'anticorps de capture le plus performant d'après la précédente combinatoire. Les 13 anticorps monoclonaux ont été testés comme anticorps traceur biotinylé en utilisant un échantillon de plasma humain dilué 100 fois, et de l'hétérodimère commercial S100A8/S100A9 à 1 ng/mL comme source de protéine cible. Au total, 13 combinaisons ont été donc testées. Les résultats de l'analyse combinatoire avec un échantillon de plasma humain dilué 100 fois, et de l'hétérodimère commercial S100A8/S100A9 à 1 ng/mL sont donnés dans le Tableau 14. Les anticorps monoclonaux 111 et 116 ont été sélectionnés afin d'effectuer des tests supplémentaires. Ils ont chacun été testé sur deux échantillons de plasmas de patients atteints d'un choc septique avec des concentrations haute et basse connues en S100A8/S100A9 à quatre dilutions (1/100,

1/1 000, 1/10 000, 1/100 000). L'ELISA utilisant les anticorps monoclonaux S100A8-3 comme anticorps de capture et S100A9-111 comme anticorps traceur a été déterminé comme le plus sensible et a ensuite été utilisé pour doser l'hétérocomplexe S100A8/S100A9 dans les plasmas de patients.

Tableau 14 Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps anti-S100A9 avec un échantillon de plasma humain dilué au 1/100 et l'hétérodimère S100A8/S100A9 à 1 ng/mL. Avec SS : Signal Spécifique, SN : Signal Non-spécifique.

SS/SN	101	102	104	105	106	107	109	111	114	115	116	117	119
plasma 1/100	16.455	32.200	32.154	28.517	36.037	37.231	36.375	38.176	36.200	25.846	49.643	24.971	23.800
S100A8/A9 (1 ng/mL)	8.145	15.900	21.385	13.517	17.333	13.846	12.958	23.118	17.500	15.423	20.500	14.471	12.900

II.1.2.e Développement et validation des ELISA

Les ELISA ont été optimisés afin d'obtenir les meilleurs rapports signaux spécifiques sur non-spécifiques. Les temps d'incubation de l'échantillon et de l'anticorps ont été réduits à 1 h chacun. La concentration de streptavidine poly-HRP a été optimisée et fixée à 12,5 ng/mL. Enfin, deux tampons ont été évalués, le tampon EIA, classiquement utilisé dans le laboratoire et un tampon caséine (voir les compositions dans II.1.1.a Réactifs et tampons utilisés). Il s'est avéré que le tampon caséine donnait un bruit de fond plus bas et des duplicats de points plus reproductible.

II.1.2.e.i) ELISA anti-S100A8/S100A9

Une courbe de standard a été réalisée avec l'hétérodimère recombinant S100A8/S100A9 dilué en tampon caséine de 250 pg/mL à 80 ng/mL (Figure 44). La courbe a été ajustée avec une régression non linéaire à l'aide d'un modèle de saturation de liaison à deux sites (liaison totale et non-spécifique). La limite de détection a été déterminée à 98 pg/mL et la limite de quantification à 262 pg/mL. La répétabilité et la reproductibilité intrajournalières (n = 6) et interjournalières (n = 3) ont été évaluées dans un pool de plasma provenant de patients septiques. Le coefficient de variation intra-essai (CV) a été déterminé à 3,97 % et le CV inter-essai à 12,26 %.

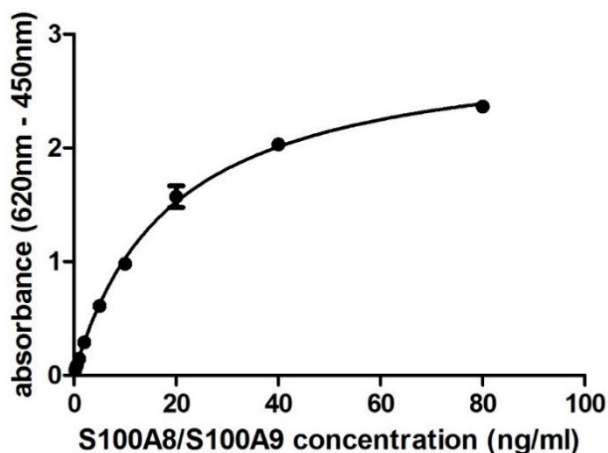


Figure 44 Courbe standard de S100A8/S100A9 recombinant dilué en tampon caséine de 250 pg/mL à 80 ng/mL (régression non linéaire utilisant une saturation de liaison à deux sites -liaison totale et non-spécifique- avec $R^2=0,9943$)

II.1.2.e.ii) ELISA anti-S100A12

Une courbe standard a été réalisée de 250 pg/mL à 40 ng/mL de protéine S100A12 recombinante en tampon caséine (Figure 45). Le dosage a été déterminée linéaire de 250 pg/mL à 40 ng/mL ($R^2=0,9956$). La limite de détection a été déterminée à 2 pg/ml et la limite de quantification à 146 pg/mL. La variabilité intrajournalière (n = 6) et interjournalière (n = 3) d'un mélange de plasma provenant de patients septiques a été déterminé à 2,36 % et 13,99 %, respectivement.

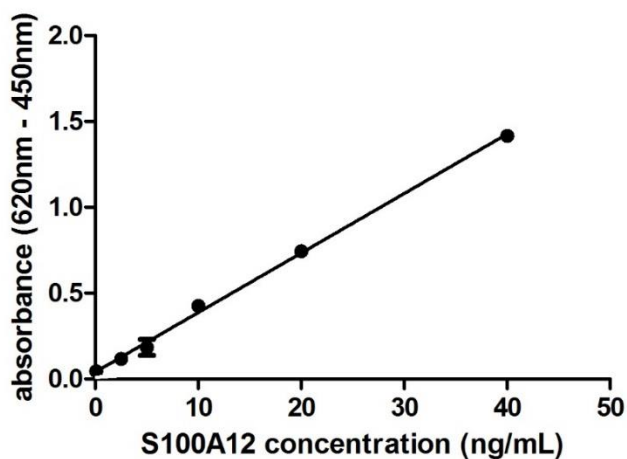


Figure 45 Courbe standard de S100A12 recombinante diluée dans un tampon caséine de 250 pg/ml à 40 ng/ml (modèle linéaire avec $R^2=0,9956$)

II.1.2.e.iii) ELISA 2B9-3D2 anti-S100A8/S100A9 et comparaison des deux ELISA

Un ELISA anti-S100A8/S100A9 avec des anticorps (2B9 et 3D2) provenant d'un laboratoire de recherche japonais³³² fournis par l'hôpital Lariboisière a été utilisé afin de le comparer à notre ELISA. Les concentrations des anticorps de capture et traceur ont été repris de la publication d'Ikemoto *et al.*³³².

Les temps d'incubation, le tampon de saturation et de dilution, la concentration de streptavidine poly-HRP et la dilution des plasmas humains ont été repris de l'ELISA anti-S100A8/S100A9 développé au laboratoire afin de pouvoir les comparer dans des conditions similaires. Une courbe de standard a été réalisée avec l'hétérodimère recombinant S100A8/S100A9 dilué en tampon caséine de 250 pg/mL à 80 ng/mL (Figure 46). La courbe a été ajustée avec une régression non linéaire à l'aide d'un modèle de saturation de liaison à deux sites (liaison totale et non-spécifique). La limite de détection a été déterminée à 119 pg/mL et la limite de quantification à 515 pg/mL. La répétabilité et la reproductibilité intrajournalières (n = 6) et interjournalières (n = 3) ont été évaluées dans un pool de plasma provenant de patients septiques. Le coefficient de variation intra-essai (CV) a été déterminé à 2,50 % et le CV inter-essai à 14,63 %.

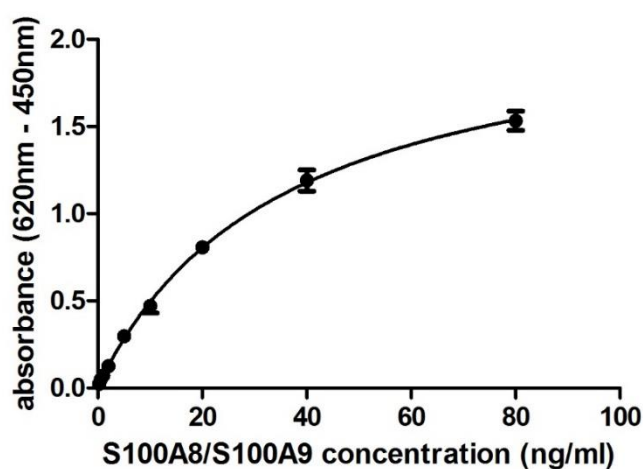


Figure 46 Courbe standard de S100A8/S100A9 recombinant dilué en tampon caséine de 250 pg/mL à 80 ng/mL (régression non linéaire utilisant une saturation de liaison à deux sites -liaison totale et non-spécifique- avec $R^2=0,9912$)

Les deux ELISA anti-S100A8/S100A9 ont été comparés, pour cela les 49 plasmas de patients atteints d'un choc septique (dilution au 1/1 000) ont été dosés le même jour avec les deux tests en parallèle en utilisant l'hétérodimère recombinant S100A8/S100A9 comme standard. La comparaison est illustrée dans la Figure 47. Les concentrations déterminées avec les deux ELISA sont parfaitement corrélées. Les anticorps 2B9 et 3D2 ont été décrits comme ciblant spécifiquement l'hétérocomplexe S100A8/S100A9³³². Cette excellente corrélation permet de conforter la validité de notre ELISA pour mesurer l'hétérocomplexe S100A8/S100A9 dans le plasma humain.

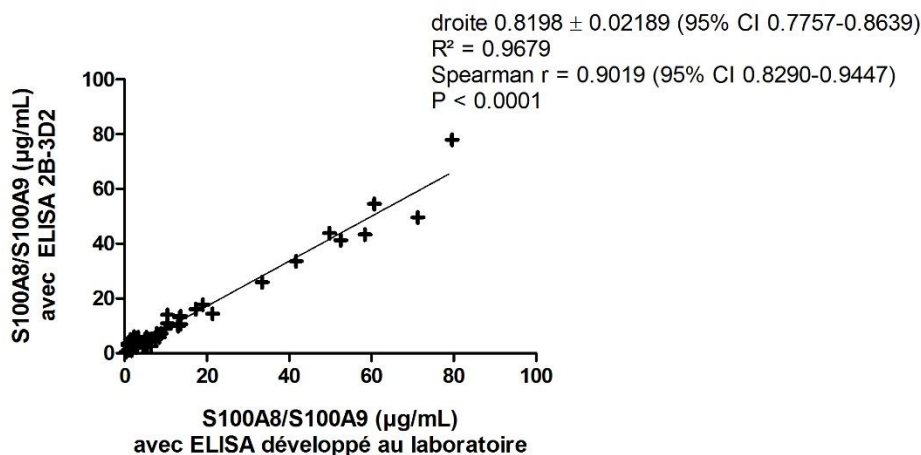


Figure 47 Comparaison des concentrations mesurées avec les deux ELISA anti-S100A8/S100A9 pour les 49 plasmas de patients atteints d'un choc septique

II.2 Article 1 « High plasma level of S100A8/S100A9 and S100A12 at admission indicates a higher risk of death in septic shock patients »

II.2.1 Introduction de l'article

L'objectif de cet article a été de quantifier les calgranulines et déterminer si elles pouvaient être utilisées comme marqueurs précoces du pronostic vital des patients atteints d'un choc septique. Pour cela, une proportion équilibrée d'échantillons de plasmas recueillis dans les premières 24 h de l'admission de survivants (n=23) et non-survivants (n=26) avec des scores SOFA élevés a été sélectionnée. Les calgranulines ont été identifiées par transcriptomique par l'équipe du professeur Didier Payen comme biomarqueurs potentiels. Elles font parties de la famille des DAMPs et leur mesure précoce chez les patients en choc septique pourrait permettre de fournir des informations sur les lésions cellulaires. L'utilisation actuelle du score SOFA, bien qu'informatif sur la gravité, ne peut être associé à une mort cellulaire importante et donc une irréversibilité de l'état du patient. Nous avons ainsi mesuré les concentrations plasmatiques des calgranulines dans ces 49 plasmas avec les deux ELISA développés et validés au laboratoire afin de comparer leurs niveaux chez les survivants et les non-survivants.

II.2.2 Article 1 « High plasma level of S100A8/S100A9 and S100A12 at admission indicates a higher risk of death in septic shock patients »

www.nature.com/scientificreports

**SCIENTIFIC
REPORTS**

natureresearch

open High plasma level of S100A8/ S100A9 and S100A12 at admission indicates a higher risk of death in septic shock patients

Christelle Dubois¹, Dominique Marcé¹, Valérie Faivre^{2,3}, Anne-Claire Lukaszewicz^{2,3},
Christophe Junot¹, François Fenaille¹, Stéphanie Simon¹, François Becher¹, Nathalie
Morel^{1,4*}
& Didier Payen^{2,3,4*}

Biomarkers in sepsis for severity, prediction of outcome or reversibility of organ dysfunction are warranted. Measurements of plasma DAMP levels at admission can reflect the severity of cellular damage in septic shock, which might predict the prognosis and reduce the risk of overtreating patients with costly therapies. We measured plasma levels of two DAMPs, S100A8/S100A9 and S100A12 during the first 24 h of admission of septic shock patients. Forty-nine septic shock patients with a similar SOFA scores were selected from our sepsis database to compare a similar proportion of survivors and nonsurvivors. Plasma levels of S100A8/S100A9 and S100A12 were compared with healthy volunteers using in-house ELISA. Plasma levels of S100A8/S100A9 and S100A12 (5.71 [2.60–13.63] µg/mL and 0.48 [0.22–1.05] µg/mL) were higher in septic shock patients than in healthy volunteers (1.18 [0.74–1.93] µg/mL and 0.09 [0.02–0.39] µg/mL) ($P < 0.0001$ and $P = 0.0030$). Levels of S100A8/S100A9 and S100A12 in non-survivors at day 28 (11.70 [2.85–

¹ Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), CEA, INRA, Université Paris-Saclay, Gif-sur Yvette, 91191, France. ² Université Paris 7 Cité Sorbonne; UMR INSERM 1160, 110 Avenue de Verdun, Paris, 75010, France. ³ Department of Anesthesiology & Critical Care, Hôpital Lariboisière, Assistance publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, 75010, France. ⁴ These authors jointly supervised this work: Nathalie Morel and Didier Payen. *email: nathalie.morel@cea.fr; dpayen1234@orange.fr

24.36] $\mu\text{g/mL}$ and 0.62 [0.30–1.64] $\mu\text{g/mL}$) were significantly higher than in survivors (4.59 [2.16–7.47] $\mu\text{g/mL}$ and 0.30 [0.20–0.49] $\mu\text{g/mL}$) ($P = 0.0420$ and $P = 0.0248$) and correlated well (Spearman $r = 0.879$, $P < 0.0001$). The high level of plasma calgranulins at admission in septic shock, were higher in non-survivors compared to survivors. These markers could indicate a higher risk of death when SOFA scores are similar and help the stratification of patients for improved care and therapy selection.

The definition of septic shock has recently evolved to allow precise selection of severely ill patients with organ failure related to suspected infection¹. In 2016, in the framework of the Third International Consensus Conference, the Sepsis-3 group updated the definition of sepsis and promoted the use of the SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score¹, which highlights inflammation, induced cell damage and organ dysfunction. The SOFA score is a morbidity severity score, but is not associated with substantial cell death² and cannot predict the reversibility of the patient's condition. It is crucial that biomarkers measured at admission in intensive care unit (ICU) may predict which patients will survive, thereby avoiding overuse of costly adjuvant treatments. Many arguments have been reported on the role of DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) in cell dysfunction or damage³ to maintain systemic inflammation by interaction with PRRs (Pattern Recognition Receptors)⁴. In addition to systemic inflammatory markers as IL-6 (Interleukin-6) or IL-10 (Interleukin-10) frequently used to characterize inflammatory status, DAMPs may provide information on cell lesions uncorrelated with inflammatory markers⁴. Conversely, IL-6 and IL-10, which are frequently used to characterize inflammatory status, correlate poorly with cell dysfunction markers^{5–8}. We hypothesized that the plasma calgranulins S100A8/S100A9 and S100A12 might be informative as DAMPs because: (i) their mRNA expression increases in septic shock^{9,10}; (ii) the complex S100A8/S100A9 is related to myeloid cells whereas S100A12 is more restricted to granulocytes¹¹; and (iii) the

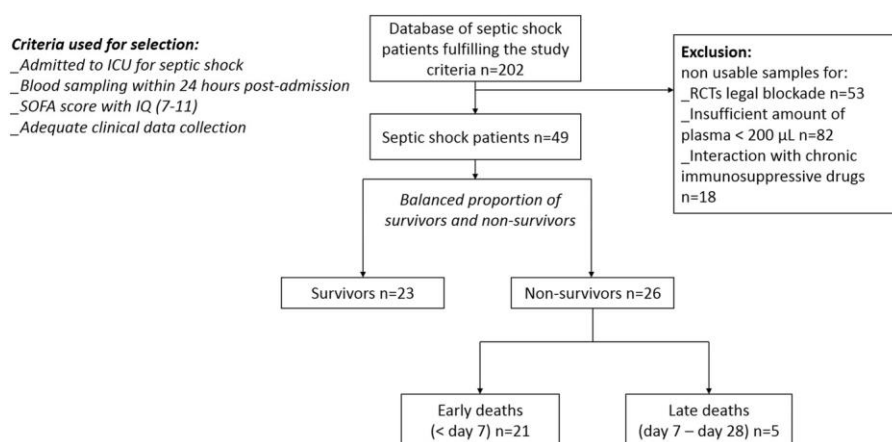


Figure 1 Schematic representation of septic shock patient’s selection from septic database.

effect of complex S100A8/S100A9 is mediated via TLRs (Toll-Like Receptors) and RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-product), whereas the mediation effect occurs purely via RAGE for S100A12¹². In this context, the aims of this study were: 1- to produce monoclonal antibodies (mAbs) against S100A8, S100A9 and S100A12 for implementation of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) to measure the S100A8/S100A9 complex and S100A12 protein; 2- to compare the plasma levels of these two calgranulins in septic shock patients versus age-matched controls; 3- to compare calgranulins levels during the first 24 h after admission for septic shock between survivors and non-survivors; 4- to evaluate the value of adding calgranulins levels to the initial SOFA score for outcome distribution.

Results

Assay development and validation. MAbs against recombinant S100A8, S100A9 and S100A12 proteins were produced and ELISAs were developed. The best sandwich immunoassays were selected according to the strongest signal to noise ratio observed with a commercial recombinant human S100A8/S100A9 heterodimer or S100A12 and plasma samples. Standard curves were established with the recombinant S100A8/S100A9 and S100A12 proteins in casein buffer (not shown). The limit of detection of the heterocomplex S100A8/S100A9ELISA was determined as 98 pg/mL and the lower limit of quantification as 262 pg/mL. Intra-assay and inter-assay coefficients of variation for S100A8/S100A9 were 4.0% and 12.3%, respectively. The limit of detection for the S100A12-ELISA was determined as 2 pg/mL with a lower limit of quantification of 146 pg/mL. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation for S100A12 were 2.4% and 14.0%, respectively.

Patients and plasma calgranulin levels. As shown in Figure 1, the patients were selected from our clinical database and plasma bank on the following criteria: presence of septic shock at admission to ICU; blood samples withdrawn within the first 24 h post-admission for septic shock; informative clinical data; a SOFA score (excluding the neuro component) ranging from 7 to 11. From our previously published results⁹, we estimated that 49 patients with a balanced outcome (survivors and non-survivors) might be convenient to achieve the goal. In addition, among the non-survivors at day 28, we looked at the potential differences in calgranulins between early (before day 7) versus later (after day 7) deaths. The overall clinical characteristics of the selected patients were as follows: 100% were mechanically ventilated and 15% had a renal replacement therapy. Among the cohort, the proportion for a surgical/medical context were 70/30%, with a length of stay in ICU at 13.2 (8.2–17.6) days. Positives cultures were obtained in 62.5% of cases with 18.7% Gram+, 25% Gram-, 18.7% polymicrobial, and 37% with non-identified bacteria. Table 1 shows the clinical characteristics at admission of the selected patients who were similar in age, SOFA score, origin of infection and comorbidities (P-value > 0.05). The study was focused on septic shock patients because of the demonstrated highest level of death compared to patients with no shock¹. Similar SOFA scores (9 [7–11]) as a selection criteria was chosen to limit the impact of this cofounding factor on outcome at day 28. As a consequence, calgranulins levels did not correlate with SOFA scores ($R^2 = 0.031$ for S100A8/S100A9 and $R^2 = 0.0040$ for S100A12) and were analyzed as DAMPs with similar severity (SOFA scores). The median values for both S100A8/S100A9 and S100A12 are reported in Table 1 and in Figure 2. Compared to age-matched controls, the whole cohort of patients had highly significant higher levels of both calgranulins ($P < 0.0001$ and $P = 0.0030$, respectively). The non-survivors at day 28 had significantly higher levels of S100A8/ S100A9 ($P = 0.0420$) and S100A12 ($P = 0.0248$) than survivors at day 28 (Table 1, Figure 2).

Table 1 shows the delay between the date of death and admission. The large majority of deaths occurred before day 7 (21/26) suggesting different mechanisms for late deaths (>day 7)⁴. Table 2 compares the median SOFA score and calgranulin levels in survivors and in patients who died earlier and later. At a similar median SOFA score, the survivors had a significantly lower level of both calgranulins than early and day 28 non-survivors.

Figure 3 shows the strong linear correlation ($R^2 = 0.8366$; $P < 0.0001$) between plasma levels of S100A8/ S100A9 and S100A12, suggesting a simultaneous release of these molecules potentially mediated by similar signalization mechanisms in septic shock despite their different cell origins.

CHAPITRE 2 : QUANTIFICATION DES CALGRANULINES DANS LE PLASMA HUMAIN

Parameter	control n = 13	total cohort n = 49	survivors n = 23	non-survivors n = 26	P-value (controls vs cohort)	P-value (survivors vs non-survivors)	
Age (y/o)	61 (43–74)	66 (54.5–78)	63 (23–80)	70.50 (56.75–77.25)	0.287	0.325	
Sex M/F	12/13	27/49	13/23	14/26	0.025	0.777	
SOFA	NA	9 (7–11)	9 (7–11)	10 (7–12)	NA	0.212	
7-day mortality	0/13	21/49	0/23	21/26	NA	NA	
28-day mortality	0/13	26/49	0/23	26/26	NA	NA	
Origin of infection							
Abdominal sites	NA	35%	30%	38%	NA	0.568	
Urinary	NA	6%	9%	4%	NA	0.500	
Respiratory	NA	47%	48%	46%	NA	0.917	
Others	NA	12%	13%	12%	NA	0.888	
Comorbidities							
<i>Cardiovascular</i>	Hypertension	0%	33%	22%	42%	NA	0.132
	Coronary disease	0%	12%	9%	15%	NA	0.491
	Cardiac failure	0%	20%	13%	27%	NA	0.239
	Others	0%	2%	0%	4%	NA	0.368
<i>Diabetes</i>	0%	22%	17%	27%	NA	0.437	
<i>Chronic pulmonary diseases</i>	0%	10%	17%	4%	NA	0.126	
<i>Neurology diseases</i>	Stroke	0%	2%	4%	0%	NA	0.306
	Intracerebral bleeding	0%	2%	4%	0%	NA	0.306
	Others	0%	10%	17%	4%	NA	0.126
<i>Gastroenterology diseases</i>	0%	12%	9%	15%	NA	0.314	
<i>Cancers</i>	0%	14%	22%	8%	NA	0.170	
<i>Chronic viral infection (HIV, VHB,C)</i>	0%	4%	9%	0%	NA	0.136	
Calgranulins concentrations							
S100A8/S100A9 (µg/mL) 1 st 24 h	1.18 (0.74–1.93)	5.71 (2.60–13.63)	4.59 (2.16–7.47)	11.70 (2.85–24.36)	<0.0001	0.042	
S100A12 (µg/mL) 1 st 24 h	0.09 (0.02–0.39)	0.48 (0.22–1.05)	0.30 (0.23–0.49)	0.62 (0.30–1.64)	0.0030	0.024	

Table 1. Patient characteristics, comorbidities and plasma calgranulin (S100A8/S100A9 & S100A12) levels 24 h post admission for the whole cohort, the survivors and non-survivors at day 28. NA: non-applicable. Data were expressed in median and interquartiles (IQ) or absolute numbers. (Mann-Whitney test).

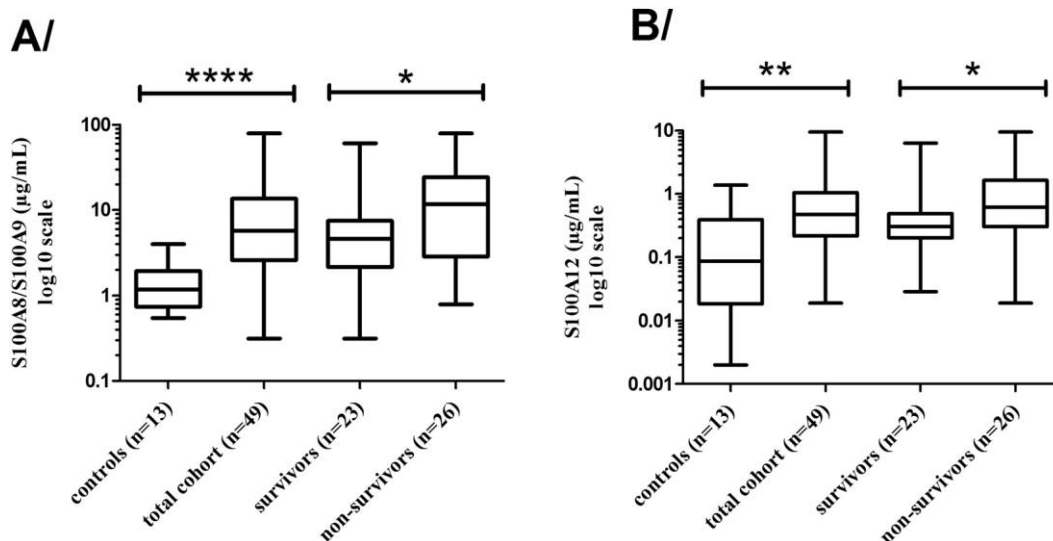


Figure 2. A/S100A8/S100A9 complex levels in controls, total cohort, survivors and non-survivors analyzed using our in-house S100A8/S100A9 ELISA. B/S100A12 protein levels in controls, survivors and non-survivors analyzed using the in-house S100A12 ELISA. Mann-Whitney test. Asterisks indicate P values: ****P < 0.0001, **0.001 < P < 0.01, *0.01 < P < 0.05.

Parameter	survivors (n = 23) A	non-survivors B (< day 7) (n = 21)	late non-survivors (n = 5) C	P-value (A vs B)	P-value (A vs C)	P-value (B vs C)
SOFA	9 (7–11)	11 (7–12)	7 (6–10)	0.053	0.605	0.166
S100A8/S100A9 (µg/mL) 1 st 24 h	4.59 (2.16–7.47)	13.02 (5.13–37.56)	3.03 (1.10–15.36)	0.013	0.857	0.152
S100A12 (µg/mL) 1 st 24 h	0.30 (0.20–0.49)	0.63 (0.41–2.12)	0.33 (0.07–1.63)	0.001	0.473	0.435

Table 2. Comparison of the median values for S100A8/S100A9 and S100A12 and SOFA score in survivors, non-survivors before day 7 and non-survivors at day 28. Data were expressed in median and interquartiles (IQ) or absolute numbers. (Mann-Whitney test).

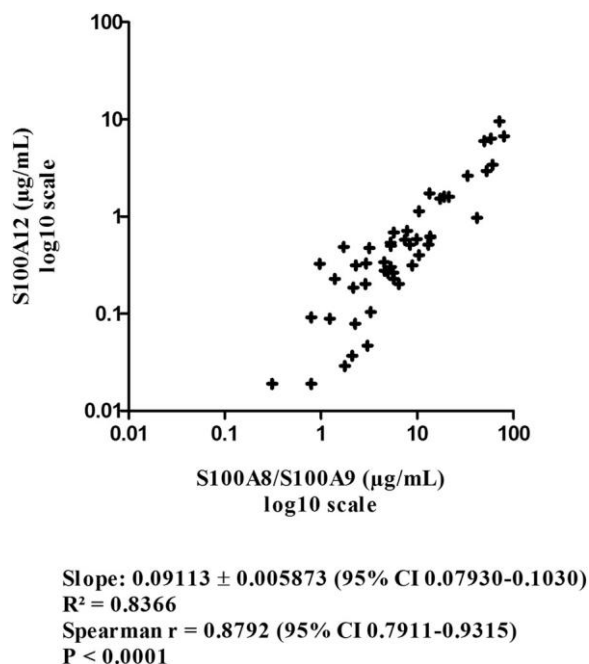


Figure 3. Linear correlation between plasma levels of S100A8/S100A9 and S100A12 on a log₁₀ scale ($R^2 = 0.8366$, $P < 0.0001$ and Spearman $r = 0.8792$, $P < 0.0001$).

Figure 4 displays the distribution of non-surviving patients at day 28 (Fig. 4A) and of survivors (Fig. 4B) as a function of median SOFA scores and S100A8/S100A9 (S100A12 in Supplementary Fig. S1). The three-dimensional combination of SOFA score and calgranulin levels improved the stratification of septic shock patients into 4 groups: (i) SOFA score and calgranulin level higher than the median, (ii) SOFA score and calgranulin level lower than the median, (iii) higher SOFA score and lower calgranulin, and (iv) lower SOFA score and higher calgranulin. The distribution of death differed significantly within the 4 groups (probability for mortality log-rank test: $\chi^2 = 5.132$, $df = 1$, $P = 0.0235$). At both high SOFA score and S100A8/S100A9 level (>median values), the proportion of global death (and early deaths Supplementary Fig. S2) was elevated (42.3%). Conversely, the proportion of survivors fell to 13.0%. At both low SOFA score and S100A8/S100A9 level (<median values), the proportion of death was 19.2% (9.5% for early deaths; Supplementary data Fig. S2) with a large increase of proportions of survivors (52.1%). Similar results were obtained for S100A12 (Supplementary Fig. S1). Addition of high calgranulin levels to high SOFA scores may improve the prediction of deaths at day 28 and at day 7 in septic shock patients, suggesting a higher risk of death when calgranulins are released at the early phase.

Discussion

The choice of biomarkers in septic shock patients remains difficult, due to the complexity of the pathophysiology, the fast disease progression and the difficulty of selecting the main targets. The biomarkers may provide information on the intensity of systemic inflammation, organ failure risk, outcome, and also on tissue or cell damage. The latter seems to be more related to the concept of DAMPs released during cellular stress³. The level of such DAMPs may then differ from those observed for markers of systemic inflammation⁴. Among the DAMPs, we decided to measure the plasma level of two different calgranulins, which have been previously reported in septic shock^{9,13-15}. Among the 20 members of the calgranulin protein family, S100A8/S100A9 and S100A12 were shown to be specifically linked to innate immune function¹². S100A8 and S100A9 are released from granulocytes, monocytes and macrophages in the early differentiation stages¹⁶. By contrast, S100A12 appears more restricted to granulocytes¹¹. The respective cellular effects of these two molecules are mediated by TLRs and RAGE receptors for the complex S100A8/S100A9 and exclusively by RAGE receptors for S100A12¹². This justifies the measurement of the two

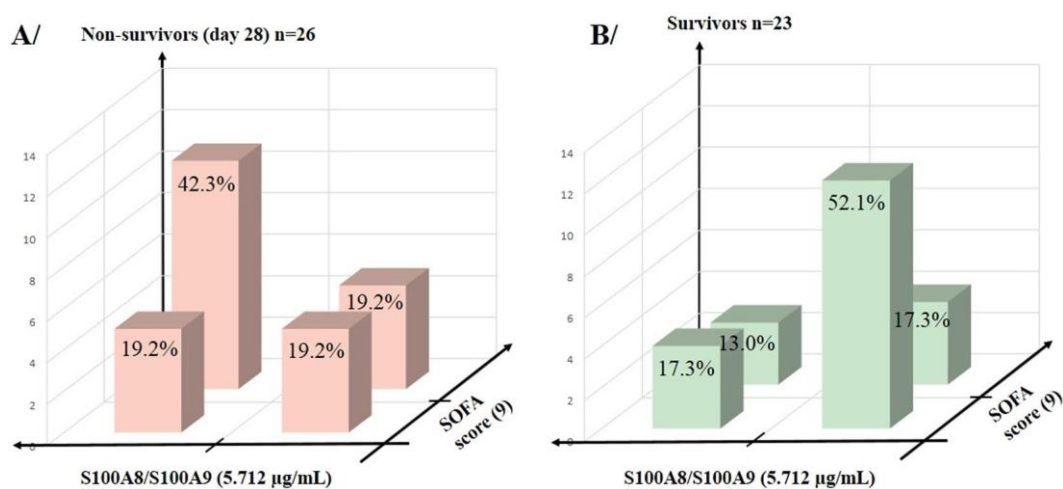


Figure 4. Three-dimensional representation of the patient distribution according to the median values of plasma S100A8/S100A9 levels (5.712 µg/mL) and the SOFA score (9) measured, leading to 4 groups in survivors and non-survivors. The percentage represents the fraction of events (non-survivors, survivors) referring to the total number of patients in each group. A/Distribution of non-survivors at day 28 (n = 26). B/Distribution of survivors at day 28 (n = 23).

protein plasma levels, which may activate endothelial and tissue cells differently according to expression of the receptor⁴.

Plasma levels of both S100A8/S100A9 and S100A12 are higher in septic shock patients than in age-matched controls^{9,13,14}. The levels reached in the present study fit well with those reported for S100A8/S100A9⁹ in patients with septic shock and for S100A12¹³ in a

cohort of septic patients (69% of patients with septic shock). When survivors were compared to non-survivors at a similar high SOFA score, the levels at the first day of admission were higher (>two-fold increase) in non-survivors for both molecules, despite their different sources and receptor targets^{11,16}. Since the plasma protein level at the initial phase of septic shock did not correlate with S100A8 and S100A9 gene expression on peripheral white blood cells^{9,16}, the observed higher levels may result from greater cellular damage related to a more intense cellular stress. The parallel release of these DAMP molecules may have different cellular consequences according to receptor availability and the different mechanisms of action. Figure 4 illustrates the combination between SOFA score and early S100A8/S100A9 levels together with mortality and survival rates (similar for S100A12 in Supplementary Fig. S1 online). This suggests that tissue damage has an additional impact on outcome compared to the intensity of inflammation, adding a mortality risk factor in septic shock patients. This may result from greater cellular damage induced by these molecules, some damage becoming irreversible. More investigations in larger cohorts of septic shock patients are needed to test this hypothesis. Thorough evaluation of cases of patients who died despite having plasma calgranulin levels below the median failed to find specific clinical conditions to explain the death.

Our study has some limitations. The most important relates to the small size of the study cohort, which precludes definitive conclusions before validation in a larger continuous prospective population of septic shock patients. Although the validation of biomarkers was not the goal of the study, the observed results point to the value of testing S100A8/S100A9 and S100A12 in a large population of septic shock patients. The second limitation concerns the method of patient selection applied to our database. Patients were selected on a priori criteria from a database to obtain a balanced rate of non-survivors *vs* survivors at day 28 at similar SOFA. This pilot study gave plasma values of S100A8/S100A9 and S100A12 associated with surviving and non-surviving patients that can then be used to design randomized clinical trials mainly focused on patients with a high risk of death.

Conclusion

Measurements of two DAMP members of the calgranulin family using fully validated in-house ELISAs gave plasma level ranges of both calgranulins consistent with previous reports. The levels of these two molecules were strongly correlated, suggesting broad stimulation of both RAGE and TLR4 receptors. The elevation of these DAMPs was always associated with a higher risk of death than was the SOFA score alone. This suggests that measurement of S100A8/S100A9 and S100A12 levels at the early phase of

septic shock could improve evaluation of tissue damage and indicate a higher risk of death, when added to the SOFA score.

Methods

Ethics statement. All experiments were performed in compliance with French and European regulations on the care of laboratory animals (European Community Directive 86/609, French Law 2001–486, 6 June 2001) and with the agreements of the Ethics Committee of the Commissariat à l’Energie Atomique (CEtEA ‘Comité d’Ethique en Expérimentation Animale’ No. 44) No. 15-046 delivered by the French Veterinary Services.

Patients. The Ethics Committee of the Société de Réanimation de Langue Française (# CE SRLF 11 369) authorized for this study the use of an anonymized list of septic shock patients chosen in our database and informed consent was obtained from all participants and/or their legal guardians. The experiments were conducted in accordance with the SRLF Ethics committee guidelines and regulations. The cohort selection of 49 patients was made using the following criteria: (i) written informed consent from the patient or their legally authorized surrogate to be used anonymously for research purposes; (ii) at least 1 organ failure in addition to the shock (*i.e.* 2 organ failures) to match the Sepsis-3 definition¹; (iii) frozen at –80 °C and well-traceable plasma withdrawn in the first 24 h post-admission in ICU. Severe infection was diagnosed by microbiological tests and/ or on clinical grounds. Patients younger than 18 years old and those with active cancer or a hematologic malignancy were excluded. We selected a balanced proportion of survivor and non-survivor plasma samples with a high SOFA score (exclusion of neuro-component) (9 [7–11]). As a consequence, the proportion of non-survivors (n = 26) vs survivors (n = 23) at day 28 was the result of our selection and did not reflect the real death rate of septic shock patients. We compared the results obtained in our cohort with those for an age-matched group of healthy volunteers (n = 13) as a control group, given the influence of age on the plasma levels of calgranulins¹⁷.

ELISA of S100A8/S100A9 and S100A12. Plasma levels of S100A8/S100A9 and S100A12 were measured by ELISA established with in-house mouse mAbs directed against recombinant human S100A8, S100A9 or S100A12 proteins expressed in *Escherichia coli*. Briefly, high-binding 96-well microplates (MaxiSorpTM, Nunc) were coated overnight at 20 °C with 100 µL of a 5 µg/mL solution of anti-S100A8 mAb (clone A8–3) or anti-S100A12 mAb (clone A12–32) diluted in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4). The plates were then saturated with casein buffer and stored at 4 °C until use. The wells

were washed 5 times with 50 mM potassium phosphate/0.02% Tween-20 before addition of 100 µL of human plasma or recombinant S100A8/S100A9 or S100A12 proteins diluted in casein buffer. After 1-h incubation at room temperature, the plates were washed 5 times and 100 µL of biotinylated anti-S100A9 mAb (clone A9-111) or anti-S100A12 mAb (clone A12-37) at 100 ng/mL was added. After 1 h, the wells were washed and 100 µL of streptavidin poly-HRP was added to the wells for 30 min. The wells were washed 5 times and 100 µL of Ultra TMB-ELISA Substrate Solution was added. The reaction was stopped after 30 min by addition of 100 µL of 1 M H₂SO₄ and the absorbance was measured at 450 nm against a reference wavelength of 620 nm.

Assay validations. The intra-assay coefficient of variation was determined by assaying six times on the same day a pooled plasma sample from the cohort of septic shock patients. The inter-assay coefficient was determined by repeating this experiment on three different days. The limit of detection was calculated as the concentration of recombinant S100A8/S100A9 heterodimer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or in-house S100A12 protein corresponding to the mean of 6 measurements of the casein buffer +3 standard deviations (99.9% confidence) and was determined from the standard curve fit. The limit of quantification was calculated as the concentration of recombinant protein corresponding to the mean of 6 measurements of the casein buffer +10 standard deviations (99.9% confidence).

Statistical analysis. All data were analyzed using GraphPad Prism software (5.04). The data were expressed as median values with interquartile range (25–75) or percentage. Because of the large ranges of plasma concentrations and for better visualization, the results were expressed in log₁₀ of the µg/mL concentration. Intergroup comparison was made using the non-parametric Mann-Whitney test. From the median values, the S100A8/S100A9 and S100A12 and elevated SOFA scores were stratified in high and low levels, which distributed the cohort of septic shock patients in 4 groups. A log-rank (Mantel-Cox) test was used to analyze the outcome difference within the 4 groups. A two-sided value of P < 0.05 was considered as statistically significant.

Received: 24 June 2019; Accepted: 14 October 2019;
Published online: 30 October 2019

References

1. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801 (2016).
2. Hotchkiss, R. S. *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* **27**, 1230–1251 (1999).
3. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994).
4. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).
5. Mera, S. *et al.* Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **119**, 155–163 (2011).

6. Gouel-Chéron, A. *et al.* Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma. *PLoS One* **7**, e33095 (2012).
7. Rau, M. *et al.* Clinical manifestations but not cytokine profiles differentiate adult-onset Still's disease and sepsis. *J. Rheumatol.* **37**, 2369–2376 (2010).
8. Gogos, C. A., Drosou, E., Bassaris, H. P. & Skoutelis, A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J. Infect. Dis.* **181**, 176–180 (2000).
9. Payen, D. *et al.* Gene profiling in human blood leucocytes during recovery from septic shock. *Intensive Care Med.* **34**, 1371–1376 (2008).
10. Fontaine, M. *et al.* Delayed increase of S100A9 messenger RNA predicts hospital-acquired infection after septic shock*. *Crit. Care Med.* **39**, 2684–2690 (2011).
11. Vogl, T. *et al.* S100A12 Is Expressed Exclusively by Granulocytes and Acts Independently from MRP8 and MRP14. *J. Biol. Chem.* **274**, 25291–25296 (1999).
12. Zackular, J. P., Chazin, W. J. & Skaar, E. P. Nutritional Immunity: S100 Proteins at the Host-Pathogen Interface. *J. Biol. Chem.* **290**, 18991–18998 (2015).
13. Achouiti, A. *et al.* S100A12 and Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products Levels During Human Severe Sepsis. *Shock* **40**, 188–194 (2013).
14. Gao, S., Yang, Y., Fu, Y., Guo, W. & Liu, G. Diagnostic and prognostic value of myeloid-related protein complex 8/14 for sepsis. *Am. J. Emerg. Med.* **33**, 1278–1282 (2015).
15. van Zoelen, M. A. D. *et al.* Expression and role of myeloid-related protein-14 in clinical and experimental sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 1098–1106 (2009).
16. Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T. & Roth, J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 28–37 (2007).
17. Tyden, H. *et al.* Increased serum levels of S100A8/A9 and S100A12 are associated with cardiovascular disease in patients with inactive systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* **52**, 2048–2055 (2013).

Acknowledgements

We are grateful to Karine Moreau, Marc Plaisance and Stéphanie Gelhaye for their involvement in the production of the required monoclonal antibodies and recombinant proteins. Christelle Dubois was supported by a “Bourse CIFRE” (Convention Industrielle de Formation pour la REcherche) provided by ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and by BertinTechnologies for her PhD thesis.

Author

contributions

All authors conceived and designed the experiments. C.D., M.D., V.F. and N.M. performed the experiments. C.D., N.M. and D.P. analyzed the data. All authors contributed reagents/materials/analysis tools. Wrote the main manuscript text: C.D., D.P., S.S., N.M., C.J.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52184-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to N.M. or D.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and

reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

II.2.3 Conclusions de l'article

Le développement de deux ELISA caractérisés ont permis le dosage des calgranulines S100A8/S100A9 et S100A12 dans une cohorte de 49 patients atteints d'un choc septique et 13 patients sains. Comparativement aux témoins, l'ensemble de la cohorte présentait des taux significativement plus élevés de calgranulines. De plus, les non-survivants avaient des niveaux significativement plus élevés de calgranulines que les survivants. Aussi, une forte corrélation entre les concentrations de S100A8/S100A9 et de S100A12 a été observée, ce qui suggère une libération simultanée de ces protéines malgré leur origine cellulaire différente. L'augmentation de ces deux DAMPs ajoutée au score SOFA au début du choc septique est donc associée à un risque de mortalité plus élevé.

Généralement, les performances diagnostiques ou pronostiques d'un dosage de biomarqueur sont évaluées en fonction de sa sensibilité et de sa spécificité. Pour cette évaluation, on peut avoir recours à la courbe ROC. Cette courbe permet de déterminer une valeur seuil du biomarqueur qui permet d'atteindre les meilleures sensibilité et spécificité en fonction de ce qu'on souhaite privilégier et d'évaluer le pouvoir discriminant des biomarqueurs. Les courbes ROC de S100A8/S100A9 et S100A12 ont été réalisées et comparées à celles des scores SOFA (Figure 48). Les AUC, sensibilité, spécificité et valeur seuil déterminées avec les courbes ROC sont données dans le Tableau 15. Les calgranulines ont un pouvoir pronostique plus élevé que le score SOFA avec une spécificité de 91,30% et une sensibilité de 50,00% contre 95,65% et 15,38% respectivement. Le score SOFA peut fournir une information pronostique potentiellement utile sur la survie des patients septiques⁹⁰ : d'après certaines publications, un score SOFA plus élevé est associé à une probabilité accrue de mortalité⁹¹. D'après nos résultats, la combinaison d'une des calgranulines avec le score SOFA permet d'améliorer de plus de 7% (avec S100A8/S100A9) la sensibilité. Il a été vu que la combinaison des biomarqueurs dans le cas du sepsis était une alternative particulièrement intéressante car l'utilisation d'un unique biomarqueur comme *gold standard* semble difficile au vu de la complexité du sepsis. Un biomarqueur unique ne pourrait rendre compte de toutes les formes du sepsis. En effet, le sepsis n'est pas une maladie unique mais plutôt un processus hétérogène et complexe qui impacte globalement tout le patient en activant un certain nombre de voies pro- et anti- inflammatoires, qui peuvent varier en fonction du pathogène responsable de l'infection et bien-sûr du patient⁸². Cependant, la sensibilité de la combinaison du SOFA et d'une des calgranulines n'apparaît pas encore assez suffisante. Il est donc essentiel de trouver d'autres biomarqueurs dont le dosage pourrait être combiné aux calgranulines. Il serait intéressant d'étudier la pertinence de biomarqueurs fournissant des informations sur différents aspects du sepsis tel que : l'intensité de l'inflammation systémique, le risque de défaillance d'un organe, la coagulation, ou encore sur les lésions tissulaires ou cellulaires. L'étude des calgranulines a permis de montrer l'intérêt de ces DAMPs pour le pronostic du sepsis dans un de ces domaines : les dommages cellulaires et suggère que l'irréversibilité des dommages cellulaires pourrait avoir un impact sur la mortalité des patients en choc

septique. Notre étude prospective sur un petit nombre de plasmas montre que des taux élevés de calgranulines semblent indiquer un risque plus élevé de décès chez les patients atteints d'un choc septique. Une analyse plus approfondie devrait être réalisée sur un plus grand nombre d'échantillons de patients à différents stades du sepsis et atteints de différentes pathologies afin de mieux évaluer l'intérêt de mesurer les calgranulines de façon précoce pour mieux prédire la mortalité des patients septiques.

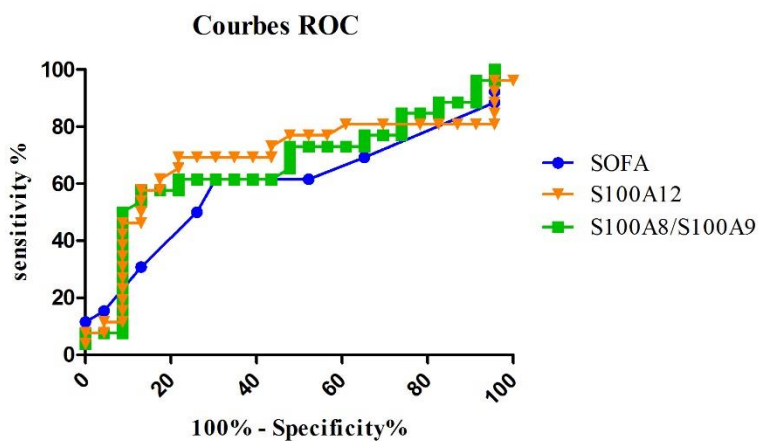


Figure 48 Courbes ROC des scores SOFA et des niveaux plasmatiques de calgranulines mesurés chez les 49 patients atteints d'un choc septique

Tableau 15 Caractéristiques déterminées par les courbes ROC des scores SOFA et des calgranulines

	SOFA	S100A8/S100A9	S100A12	SOFA + S100A8/S100A9	SOFA + S100A12
AUC	0,60	0,67	0,69		
Spécificité (%)	95,65	91,30	91,30	91,30	91,30
Sensibilité (%)	15,38	50,00	46,15	57,69	53,84
Valeur limite	12,5	11,70 µg/ml	0,70 µg/mL		

III. Développement de deux méthodes *bottom-up* et *top-down* pour la quantification de S100A8/S100A9

III.1 Introduction

Dans le contexte de validation des biomarqueurs, il est nécessaire de disposer de méthodes quantitatives validées, notamment en termes de spécificité. Dans cet objectif, il est primordial de bien caractériser les protéines d'intérêt. En effet, nous avons vu que la grande diversité du protéome s'explique par la présence de nombreuses protéoformes²⁶⁴. Concernant les calgranulines, plusieurs complexes intracellulaires et modifications post-traductionnelles de S100A8/S100A9 ont été décrits dans la littérature, cependant, peu d'études se sont intéressées à la caractérisation des formes circulantes et aucune étude sur les formes circulantes de S100A8/S100A9 n'a été rapportée dans le plasma de patients atteints de choc septique. Or, les formes circulantes sont celles qui sont dosées dans le contexte des biomarqueurs. Ainsi, Vogl *et al.*^{315,336} ont identifié S100A8/S100A9 principalement sous forme de complexes non-covalents hétérodimériques et hétérotétramériques dans des granulocytes humains. De plus, dans les neutrophiles humains, il a été rapporté la présence de S100A8 S-nitrosylé³³⁷, S100A9 S-glutathionylée³³⁸ et dans les monocytes, la forme phosphorylée de S100A9³³⁹. Dans le plasma ou le sérum, Yasar *et al.*³⁴⁰ ont montré à l'aide d'ELISA, que les hétérocomplexes de S100A8/S100A9 étaient les formes circulantes prédominantes par rapport aux formes monomériques. Gao *et al.*³⁴¹ ont observé par immuno-MALDI-TOF, des abondances relatives de S100A8 et S100A9 de 74% et 26%, respectivement, ce qui semblent incompatibles avec l'équimolarité des formes hétérodimériques et hétérotétramériques observées dans les granulocytes^{315,336}.

Il nous a donc semblé pertinent d'exploiter les capacités de la spectrométrie de masse à haute résolution, notamment les approches de protéomiques *bottom-up* et *top-down* (II.2.3.a L'approche *bottom-up* et la digestion trypsique et III.2.5.b.iii) Quantification par *top-down*) pour caractériser les formes circulantes de S100A8/S100A9 dans le contexte du choc septique. La spectrométrie de masse à haute résolution apporte également un haut niveau de spécificité pour la quantification absolue de protéines en fluides biologiques. Ainsi, nous avons dans un second temps, développé et validé²⁵⁰ une méthode de dosage des formes totales de S100A8/S100A9, sur la base de quatre peptides quantotypiques afin de compléter les informations obtenues par ELISA.

III.2 Article 2 « Top-down and bottom-up proteomics of circulating S100A8/S100A9 in plasma of septic shock patients »

Article accepté le 08 janvier 2020 dans le journal *Journal of Proteome Research*

Title: Top-down and bottom-up proteomics of circulating S100A8/S100A9 in plasma of septic shock patients

Author list: Christelle Dubois¹, Didier Payen², Stéphanie Simon¹, Christophe Junot¹, François Fenaille¹, Nathalie Morel¹, François Becher*¹

Corresponding and author information:

- 1 Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), CEA, INRA, Université Paris-Saclay, F-91191 Gif-sur Yvette, France.
- 2 Université Paris 7 Cité Sorbonne ; UMR INSERM 1160, 110 Avenue de Verdun, Paris 75010 & Department of Anesthesiology & Critical Care, Hôpital Lariboisière, Assistance publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, 75010, France.

* Corresponding author: Telephone number: +33 1 69 08 13 15. Electronic address: francois.becher@cea.fr

Abstract

Well-characterized prognostic biomarkers and reliable quantitative methods are key in sepsis management. Among Damage-Associated Molecular Patterns, S100A8/S100A9 complexes are reported to be markers for injured cells and to improve the prediction of death in septic shock patients. In view of the structural diversity observed for the intracellular forms, insight into circulating complexes and proteoforms is required to establish prognostic biomarkers.

Here, we developed top-down and bottom-up proteomics to characterize the association of S100A8 and S100A9 in complexes and major circulating proteoforms. An antibody-free method was developed for absolute quantification of S100A8/S100A9 in a cohort of 49 patients to evaluate the prognostic value the first day after admission for septic shock.

The predominant circulating identified forms by top-down proteomics were S100A8, mono-oxidized S100A8, truncated acetylated S100A9 and S-nitrosylated S100A9. S00A8, truncated acetylated S100A9 and mono-oxidized S100A8 were found to be discriminating for septic shock prognosis, along with total S100A8/S100A9 measured by the antibody-free bottom-up method.

Overall, new insights into circulating S100A8/S100A9 and confirmation of its prognostic value in septic shock are crucial in qualification of this biomarker. Also, the simple antibody-free assay would support the harmonization of S100A8/S100A9 measurements.

Keywords: biomarker, prognosis, S100A8/S100A9, top-down, bottom-up, septic shock, complex

Introduction

During the last decades, the model proposed by Polly Matzinger¹ has gained credibility in promoting the concept of “danger” mediators. The molecules released by cells in response to cell damage are called Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), which can activate the inflammatory system via pattern recognition receptors (PRRs)². DAMP molecules can be seen as markers of cell injury and potentially as markers of organ dysfunction. Until now, the most frequently reported DAMP is HMGB1 (High-Mobility Group Box 1)³, whose concentration has been associated with outcome in severe sepsis⁴. Among the other DAMP molecules, the calgranulin family has been proposed to be involved in different inflammatory conditions⁵. S100A8 and S100A9 used for characterization of several chronic diseases^{6,7,8,9,10} were also associated with prognosis in life-threatening situations such as sepsis and septic shock^{11,12,13,14,15,16}.

Septic shock, the clinical presentation with the worst prognosis, induces organ failure and is associated with a high rate of death¹⁷. The heterogeneity of the patients presenting with septic shock may partially explain the repeated failure of successive randomized clinical trials¹⁸. Patients mainly die because of cell and organ dysfunction, which may vary largely according to comorbidities, genetic susceptibility and the chronic treatment used¹⁹. In this context, well-characterized biomarkers are crucial to help predict the prognosis in intensive care units, thereby improving the selection of patients for randomized clinical trials and sophisticated adjuvant therapies.

Translation of proteomic biomarkers into clinical practice requires precise and specific analytical methods for accurate *in vivo* quantification in plasma²⁰, which involves assay validations and investigations of circulating protein forms^{21,22}. Among DAMPs, S100A8 and S100A9 proteins have molecular weights of 10.8 and 13.2 kDa, respectively, and show high structural diversity²³⁻²⁹. Several intracellular complexes and proteoforms²¹ have been described in neutrophils and monocytes, where the S100A8/S100A9 complexes account for up to 40% of the detergent-soluble cytosolic protein content²⁴. Isolated and purified S100A8 and S100A9 from human granulocytes are observed predominantly as noncovalently associated complexes, either in heterodimeric or heterotetrameric forms depending on bivalent cations^{23,25,26}. In addition, post-translational modifications have been reported, including S-nitrosylated S100A8 in human neutrophils²⁷, S-glutathionylated S100A9 in neutrophils²⁸ and phosphorylated S100A9 in monocytes²⁹. In human plasma or serum, S100A8 and S100A9 are low-abundance proteins and few reports have addressed the exact extracellular and circulating forms^{30,31}. Heterocomplexes predominate, with only minor amounts of monomers in enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits³². Respective relative abundances of 74% and 26% of S100A8 and S100A9 have been observed by MALDI-TOF-MS³³. These abundances appear rather inconsistent with the equimolarity of heterodimeric or heterotetrameric forms^{23,25,26}. Moreover, in septic shock, reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide are reported to be hyperproduced³⁴ and could react with

endogenous molecules^{35,36}. It is therefore not clear which circulating complex of S100A8/S100A9 is predominant and, until now, there have been no studies on the circulating forms of S100A8/S100A9 and their post-translational modifications in the plasma of septic shock patients. The identity and prognostic value of circulating forms should be investigated in the context of septic shock.

Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) provides highly specific bioanalytical tools for characterizing circulating protein forms, essentially top-down and bottom-up approaches. The top-down approach identifies the intact protein forms by MS, which offers the unique possibility to provide a global view of the post-translationally modified protein forms and their relative abundances³⁷. In the bottom-up approach, enzymatic digestion of the protein combined with targeted determination of specific signature peptides relative to stable isotope-labeled (SIL) analogs³⁸ allows sensitive and robust absolute quantification in human plasma^{39,40}.

The aims of present study were i) to gain insight into the circulating forms of S100A8/S100A9 complexes in plasma from septic shock patients, ii) to evaluate the prognostic value of S100A8/S100A9 protein forms in relation to the outcome of septic shock by validated methods and iii) to provide a simple, antibody-free assay for S100A8/S100A9 in the perspective of routine quantification in the clinic. In these objectives, we combined top-down and bottom-up HRMS proteomics for characterization and quantification of the predominant circulating complex and proteoforms of S100A8/S100A9 in a selected cohort of surviving and non-surviving septic shock patients.

Materials and Methods

Patients

After approval by the Ethics Committee of the Société de Réanimation de Langue Française (# CE SRLF 11 369), 49 septic shock patients were sampled within the first 24 h after admission to intensive care as a part of global inflammatory survey in sepsis (**Table 1**). The anticoagulant used was either heparin or EDTA. Plasma samples were anonymously collected after written informed consent was obtained from each patient or their legally authorized surrogates in accordance with French ethics law. We selected in our large database 26 patients who subsequently died to be compared with 23 patients who survived. Exclusion criteria from the database were age < 18 years, progressive cancer, hematologic malignancy or chronic inflammatory diseases. The presence of infection was proven by microbiological checking and/or by high clinical suspicion according to the consensus definition Sepsis 2⁴¹.

Chemicals

Recombinant human S100A8/S100A9 covalent and noncovalent associated heterodimers were from R&D Systems (reference 8226-S8-050) (Minneapolis, MN, USA), corresponding to Uniprot entries P05109 (S100A8) and P06702 (M-truncated S100A9). Heterodimers were produced in *E. coli*. Their

purity was assessed by SDS-PAGE and found above 95%. Monoclonal antibody Mo2B9 were obtained from Kyoto University, Japan (Ikemoto *et al.*⁴²). Dithiothreitol, iodoacetamide, bovine serum albumin (BSA), trypsin from bovine pancreas TPCK Treated (reference T1426) and ammonium bicarbonate were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Sequencing grade modified trypsin was from Promega (Madison, WI, USA). RapiGest SF Surfactant was from Waters Corporation (Milford, CT, USA). Dynabeads Protein G magnetic beads were from Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Water (ChromaSolve LC-MS), acetonitrile (HPLC-grade) and formic acid were respectively from Honeywell/Riedel-de Haen (Seelze, Germany) and VWR chemicals (Fontenay sous Bois, France). All other chemicals were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or VWR chemicals (Fontenay sous Bois, France). All experiments were done in LoBind tubes from Eppendorf (Hamburg, Germany). Enzyme immunoassay (EIA) buffer was 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 containing 0.15 M NaCl and 0.1% BSA. Phosphate-buffered saline (PBS) was a buffer solution containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ and 1.8 mM KH₂PO₄.

Labeled peptides for signal normalization were synthesized in PEPotec SRM grade. Labeled peptides for isotope dilution assay (IDA) were synthesized in Absolute QUAntification (AQUA) ultimate quality. All peptides were from Thermo Fisher Scientific (Paisley, UK). Labeled peptides for S100A8 were ALNSIIDVYHK [¹³C₆,¹⁵N₂] and GADVWFK [¹³C₆,¹⁵N₂]. Peptides LGHPDTLNQGEFK [¹³C₆,¹⁵N₂] and DLQNFLK [¹³C₆,¹⁵N₂] were used for S100A9.

LC-MS/MS instrumentation

All LC-MS analyses were performed on a Dionex Ultimate 3000 chromatography system coupled to a Q-exactive Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The column oven temperature was set to 50 °C. Mobile phases consisting of LC-MS grade water with 0.1% formic acid (phase A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (phase B) were delivered at a flow rate of 0.5 mL/min.

Top-down proteomics conditions

Sample preparation for identification and relative quantification of circulating S100A8/S100A9 by top-down proteomics

Monoclonal antibodies Mo2B9 used for S100A8/S100A9 capture were described previously⁴². Mo2B9 on-bead immobilization was done according to the manufacturer's instructions using 5 µg of antibody coupled to 0.3 mg magnetic beads (Dynabeads Protein G, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Plasma (10 µL) was diluted 50-fold in EIA buffer (see composition above) and added to antibody-coated magnetic beads for 1 h at room temperature with rotation and then sequentially washed with 0.5 mL EIA buffer, 0.5 mL PBS (see composition above) and 0.5 mL H₂O. To elute the proteins, the dry beads

were resuspended in 60 μL of 10 mM glycine buffer ($\text{pH} = 2$) and incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The beads were then removed from the elution buffer. The supernatant was injected for LC-MS analysis.

LC-MS conditions

Chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC protein BEH C4 reverse phase column (150 mm \times 2.1 mm; 1.7 μm ; 300 \AA ; Waters, Milford, MA, USA). Total run time was 60 min. After an isocratic step of 0.5 min at 5% phase B, a first linear gradient was applied ramping from 5% to 20% B between 0.5 and 10 min, followed by a second linear gradient from 20% to 50% between 10 and 50 min. The concentration of phase B increased to 95% during the next 0.1 min and was constant for 3.9 min before reverting to the initial condition of 5% B during the next 0.1 min. Column re-equilibration at 5% B was done for 5.9 min.

Instrument parameters of the electrospray ionization source were set as follows: sheath gas flow rate 70 a.u., spray voltage 2 kV, auxiliary gas heater temperature 40 $^{\circ}\text{C}$ and capillary temperature 320 $^{\circ}\text{C}$. The Q-exactive instrument was operated in positive ion mode under full scan MS mode. An in-source collision-induced dissociation (CID) of 10.0 eV and 5 microscans were applied. Resolution was set to 35 000 at m/z 200 (full width at half-maximum), automatic gain control to $1\text{e}6$ and maximum injection time to 500 ms. MS2 spectra were acquired with a target ion inclusion list with a 1.5 m/z isolation window. Precursor ions were fragmented in the higher-energy collisional dissociation (HCD) cell using nitrogen as collision gas and normalized collision energies (**Supplementary Table S1**).

Xcalibur 3.0 software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) was used for instrument control data processing and analysis.

Data analysis for intact protein quantification

The data were analyzed by XCalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific). The three to four most intense charge states of each proteoform⁴³ (**Supplementary Table S2**) were extracted in QuanBrowser using a mass extraction window of 1 m/z unit. The summed extracted ion chromatogram (XIC) peak area of each proteoform, was applied to label-free relative quantification among patients. Proteins were deconvoluted with Protein Deconvolution 4.0 software (Thermo Fisher Scientific) using ReSpect (isotopically unresolved) or Xtract (isotopically resolved) algorithm.

Bottom-up proteomics

Sample preparation for absolute quantification of circulating S100A8/S100A9

Pellet digestion was optimized from the procedure previously described⁴⁴. A volume of 10 μL of human plasma was vortexed with 150 μL of methanol, followed by quick spin down (7 s) in a mini centrifuge. The supernatant was discarded carefully and the protein pellet was suspended with 150 μL of 50 mM

ammonium bicarbonate buffer for 5 min. Then, 10 μL of 20 mM dithiothreitol was added and heated at 60 °C for 30 min to induce denaturation. After cooling to room temperature, 10 μL of 45 mM iodoacetamide was added for alkylation and incubated at room temperature for 45 min in the dark. Then, 20 μL of 2 mg/mL trypsin from bovine pancreas TPCK treated was used for digestion at 37 °C overnight. The digest was stopped by adding 5 μL of 1 M HCl and incubated at 37 °C for 45 min. Five microliters of diluted PEPotec peptides solution between 2 and 2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (crude as synthesized) or 2 pmol of SIL AQUA peptides for IDA, in MS buffer (95% H_2O , 5% acetonitrile, 0.1% formic acid) was added for signal normalization or quantification by IDA.

LC-MS/MS analysis

Chromatographic separation was performed on an Aeris peptide XBC18 reverse phase column (150 mm \times 2.1 mm; 1.7 μm ; 100 Å; Phenomenex, Le Pecq, France). Total run time was 20 min. After an isocratic step of 1 min at 5% phase B, a linear gradient was applied ramping from 5% to 40% B between 1 and 14 min. The concentration of phase B increased to 95% during the next 0.5 min and was constant for 2 min before reverting to the initial condition of 5% B during the next 0.5 min. Column re-equilibration at 5% B was done for 3 min.

Instrument parameters of the electrospray ionization source were set as follows: sheath gas flow rate 70 a.u., spray voltage 4 kV, capillary temperature 320 °C. The Q-exactive instrument was operated in positive ion mode under time-scheduled sequential PRM acquisition. Precursor ions from native and internal standard peptides were selected separately in the quadrupole with an isolation mass window of 1.5 m/z . Precursor ions of S100A8 and S100A9 peptides were fragmented in the HCD cell using nitrogen as collision gas and the optimized normalized collision energy (**Supplementary Table S1**). All fragment ions were transferred to the Orbitrap. Resolution was set to 70 000 at m/z 200 (full width at half-maximum), automatic gain control to $1e6$ and maximum injection time to 125 ms.

Raw mass spectrometry data were exported to Xcalibur 3.0 software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), which was used for quantitative data analysis.

Data analysis for bottom-up quantification

To increase the signal to noise ratio and assay sensitivity, the signals of up to 4 major and non-interfered fragment ions identified with high resolution (5 ppm) from a common peptide precursor were summed up to provide one XIC for each peptide. SIL peptide counterparts with ^{15}N labeled amino acids were used for signal normalization and quantification. Then, the XIC peak area of the endogenous unlabeled peptides was divided by the XIC peak area of the SIL peptides.

For specific quantification in individual plasma samples, we applied the following inclusion criteria (i) similar peak shape and retention time to peptides from internal standards (± 0.05 min), (ii) detection of

the most intense PRM transitions, and (iii) similar area ratio among transitions between endogenous and spiked proteins for signals with enough intensity. Raw mass spectrometry data were exported to Skyline 4.1⁴⁵ for verification of the transition ratios of unlabeled and labeled peptides.

S100A8/S100A9 ELISA

For comparison, all plasma from septic shock patients were analyzed with the ELISA protocol in another study reported by Dubois *et al.*¹⁶.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (5.04). Linear regression with 1/x weighting was applied to generate a standard curve of S100A8/S100A9. Lower limit of quantification (LLOQ) was defined according to guidelines on bioanalytical methods validation as the lowest concentration with < 20% coefficient variation (CV%) and accuracy between 80% and 120%⁴⁶. Data were compared with a Mann-Whitney test and medians were considered significantly different when $P < 0.05$. Data were represented with median and interquartile ranges.

Results

We investigated the interaction between S100A8 and S100A9 and the major proteoforms in plasma from septic shock patients by top-down proteomics. In addition, a carefully evaluated bottom-up method was implemented and used to determine the molarity of circulating S100A8 and S100A9. Finally, we absolutely quantified all proteoforms in a cohort of 49 septic shock patients to evaluate the prognostic value of S100A8/S100A9.

Investigation of circulating S100A8/S100A9 in plasma from septic shock patients using top-down proteomics

The objectives of the top-down⁴⁷ method were to detect intact S100A8/S100A9 complexes and characterize the different proteoforms. Application of top-down proteomics to complex matrices requires prior enrichment of low-abundant target proteins⁴⁸. Therefore, immunoprecipitation was used to selectively extract S100A8/S100A9 complexes from the plasma of all septic shock patients from the cohort. Monoclonal antibody Mo2B9, which is reported to bind with S100A8/S100A9 complexes specifically, but not at all with the individual subunits as demonstrated by Western Blot in non-reducing conditions⁴², was selected. The method was optimized to detect intact S100A8/S100A9 complexes based on separation with a C4 column and analysis in the full scan MS mode. Soft ionization conditions were selected for detection of the intact S100A8/S100A9 complex. The spray voltage was reduced to 2 kV and the auxiliary gas heater temperature to 40 °C.

Two heterodimeric recombinant standards of S100A8/S100A9 were analyzed, either as covalently linked or noncovalently associated complexes. The complex covalently linked by a disulfide bond was detected in the heterodimer form (**Supplementary Figure S1A**), whereas the noncovalently associated heterodimer was detected as monomeric forms (**Supplementary Figure S1B**). The intact method was applied to all the plasma samples of septic shock patients from the cohort where endogenous S100A8/S100A9 was detected as monomers (**Supplementary Figure S2** and **Supplementary Figure S3**). Additionally, we were able to identify 4 proteoforms in all plasma samples from septic shock patients from the cohort based on intact mass measurements (**Table 2**). These proteoforms included native S100A8, mono-oxidized S100A8, S-nitrosylated S100A9 and truncated (-MTCKM) N-acetylated S100A9. MS/MS experiments were performed on two samples to confirm the identifications. Observed y and b fragments after MS2 fragmentation (**Supplementary Figure S3**) were in agreement with oxidation of S100A8 on the first methionine (position 1), truncated (-MTCKM) and acetylated N-terminal forms S100A9, and S-nitrosylated on the first cysteine (position 3) in S100A9.

Precision of the intact LC-MS method was evaluated for label-free relative quantification in patients from the cohort. Label-free relative quantification of each proteoform was obtained by computing the respective XIC peak area. Intraday (n=3) and interday (n=3) precisions were determined in pooled plasma from septic shock patients. Precision was acceptable, with CVs $\leq 20\%$ for all 4 proteoforms (**Supplementary Table S3**). Label-free relative quantification between survivors (n=23) and non-survivors (n=26) was then performed for each detected proteoform. All forms, S-nitrosylated S100A9 excepted, were significantly increased between survivors and non-survivors by the label-free quantification strategy (P=0.0106, P=0.0023, P=0.0082 and P=0.2217 for S100A8, mono-oxidized S100A8, truncated acetylated S100A9 and S-nitrosylated S100A9, respectively) (**Figure 1**).

Absolute quantification of S100A8/S100A9 in plasma from septic shock patients by bottom-up proteomics

Absolute quantification is required to determine the molarity of circulating S100A8/S100A9, and to investigate further the prognostic value of S100A8/S100A9. A simple, antibody-free method for routine absolute quantification of all identified S100A8/S100A9 proteoforms was developed and fully validated in plasma from septic shock patients.

Assay development

Absolute quantification by the bottom-up strategy with targeted mass spectrometry is the standard approach for biomarker evaluation. Selection of relevant peptide candidates is a prerequisite to the implementation of any targeted method⁴⁹. S100A8 and S100A9 proteins are small: 10.8 kDa (Uniprot P05109) and 13.2 kDa (Uniprot P06702), respectively, thus resulting in a rather limited list of putative tryptic peptide candidates. Selection of best proteotypic peptides was based on the recommendations for

targeted proteomics experiments⁴⁹, regarding sequence uniqueness, size and amino acid composition (lack of cysteine and methionine residues). Peptide specificity was checked by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) similarity against the UniprotKB/Swissprot human database. Moreover, quantotypic peptides⁵⁰, i.e. without any of the observed post-translational modifications, were selected to quantify all identified forms (**Supplementary Table S1**). Adherence to these recommendations imposed selection of peptides ALN-8, LGH-9, including peptides GAD-8 and DLQ-9 with miscleavage sites. SIL versions of the four selected peptides were used as internal standards. Ultra-high-performance liquid chromatography on a C18 column was optimized for efficient peptide separation with a total run time of 20 min (**Figure 2**). The mass spectrometer was operated in the PRM mode targeting the four selected peptides and their corresponding four SIL-peptides for quantification. Each endogenous peptide and their corresponding SIL-peptides must strictly co-elute with similar transition ratios across the different samples.

We selected the recombinant noncovalently associated S100A8/S100A9 heterodimer standard for assay development and evaluation. Equimolarity of the recombinant heterodimer standard was verified. Molar ratio of S100A8 to S100A9 in the heterodimer standard was determined using reverse calibration curves. Increasing amounts of SIL AQUA version of the 4 selected peptides, for absolute quantification, were spiked in the standard after a 6-hour tryptic digestion with sequencing-grade modified trypsin for optimal peptide release⁴⁰. Back-calculated molar concentrations of the released peptides were similar except DLQ-9, which was excluded (**Supplementary Table S4**). The lower signal of DLQ-9 was attributed to a lower release efficiency by trypsin probably linked to the miscleavage site. The mean molar ratio between S100A8 and S100A9 peptides determined at 0.973 confirms the equimolarity of the recombinant noncovalently associated heterodimer (**Supplementary Table S4**).

A simple and fast antibody-free workflow was developed for application to plasma samples. Pellet digestion, based on a recently published method for monoclonal antibody quantification in human plasma⁵¹, was evaluated for the detection and quantification of S100A8 and S100A9 proteins in plasma of septic shock patients. The recombinant S100A8/S100A9 heterodimer standard spiked in triplicate at 10 µg/mL in mouse plasma, as a substitute for blank human plasma, before and after methanol precipitation demonstrated good recovery with similar yields between peptides from 69.4% to 75.9% (**Supplementary Table S5**). The pellet protocol is therefore appropriate for S100A8/S100A9 quantification.

Mouse plasma was used as a surrogate blank matrix for human plasma. Indeed, the four proteotypic peptides selected for quantification are not present in mice due to single point mutations. To determine a potential matrix effect between mouse and human plasma, recombinant S100A8/S100A9 was spiked in human plasma in triplicate at 40 µg/mL and compared against a calibration curve in mice (**Supplementary Table S6**). The concentration at 40 µg/mL was in the range of S100A8/S100A9 levels

in patients and was high enough to overcome the endogenous signal of S100A8/S100A9 in human plasma. Calibration curves in the surrogate and the authentic matrices should be performed in a dedicated full validation study for comparison of the slopes⁵². S100A8/S100A9 concentrations measured with each of the four peptides displayed good accuracy (bias < 20%), which demonstrates the suitability of mouse plasma as a surrogate matrix for human plasma for the quantification of S100A8 and S100A9 proteins.

Assay evaluation

The assay was evaluated for S100A8/S100A9 quantification in plasma from septic shock patients including intraday precision, interday precision and stability. Linearity, LLOQ and recovery of sample preparation were determined with a pool of mouse plasma as a surrogate blank matrix for human plasma.

Assay linearity was evaluated with a 7-point calibration curve of the recombinant heterodimer standard in a pooled mouse plasma as surrogate matrix. The method was shown to be linear from 0.250 µg/mL to 50 µg/mL with $R^2 > 0.99$ (**Figure 3**). LLOQ was estimated to be 0.250 µg/mL based on bias in back-calculated concentration below 20%.

Intraday and interday precisions of the analytical method were determined. Briefly, a pool of plasma from septic shock patients was divided into three aliquots for evaluation on three different days. Each aliquot was divided into five replicates for protein precipitation, digestion and LC-MS/MS analysis. Intra- and inter- day variabilities were acceptable, with CV < 20% for all four quantitative peptides (**Table 3**).

Total recovery of sample preparation was determined with the recombinant S100A8/S100A9 heterodimer standard spiked in pooled mouse plasma and SIL AQUA peptides spiked after the pellet digestion. Three concentrations of recombinant S100A8/S100A9 were spiked in duplicate, i.e. 5 µg/mL, 10 µg/mL and 20 µg/mL. Concentrations of the resulting selected tryptic peptides were determined using the signal of the SIL AQUA peptides. The yield was calculated for each peptide based on measured concentration / theoretical concentration assuming total recovery, expressed as a percentage. Maximum recovery was observed respectively at 32.5% and 33.5% for peptides ALN-8 and LGH-9 (**Table 4**). The lower values at 16.6% and 14.1% for peptides GAD-8 and DLQ-9 indicate a less efficient release of these peptides upon trypsin digestion probably due to the occurrence of miscleavages at N-terminal (GAD-8, DLQ-9) or C-terminal (DLQ-9).

Most protein quantification studies incorporate the SIL-peptides after digestion. However, the stability of signature peptides during digestion should be determined to highlight any bias in the assay. A human plasma pool was proteolyzed with SIL-peptides spiked pre-digestion and compared to the condition with SIL-peptides spiked post-digestion. Bias and CV of triplicate samples were calculated when heavy

peptides were added pre-digestion vs post-digestion. The calculated biases were all below 20%, showing peptide stability during digestion (**Supplementary Table S7**).

Equimolarity of S100A8 and S100A9 in plasma from septic shock patients

The relative molarity of S100A8 and S100A9 was determined in the cohort by the bottom-up method, using IDA. SIL AQUA versions of the 4 signature peptides were spiked after digestion by trypsin and used as internal standards. All but one patient had a molar ratio between S100A8 and S100A9 close to 1 (0.973). This indicated an equivalent molar concentration of circulating S100A8 and S100A9. (**Supplementary Figure S4**).

Prognostic value of plasma S100A8/S100A9 in septic shock patients

We determined the plasma levels of S100A8/S100A9 in survivors (n=23) and non-survivors (n=26). All samples from the cohort were above LLOQ (**Figure 4A**). The median plasma S100A8/S100A9 levels of survivors and non-survivors were respectively 3.401 µg/mL (interquartile 2.866 to 4.979 µg/mL) and 7.836 µg/mL (interquartile 4.045 to 19.94 µg/mL), which were significantly different (P=0.0084). No impact of the anticoagulant was noted on the levels of S100A8/S100A9 (**Supplementary Table S8**).

Additionally, levels of S100A8/S100A9 were also determined by IDA and plotted with concentrations measured by external calibration. Both methods are well correlated, as illustrated in **Figure 4B**.

Comparison of ELISA and bottom-up proteomics

A comparison of the concentrations determined by the bottom-up assay was made with an ELISA for S100A8/S100A9 using monoclonal anti-S100A8 as capture antibody and anti-S100A9 as tracer antibody¹⁶. ELISA S100A8/S100A9 concentrations were back calculated from a calibration curve made with the same recombinant S100A8/S100A9 non-covalently associated heterodimer standard as used in the bottom-up assay. A scatterplot of LC-MS/MS vs. ELISA in all 49 samples is shown in **Figure 4C**. Both methods are well correlated (Spearman correlation of R= 0.9504, 95% confidence interval from 0.9118 to 0.9723), with similar measured concentrations.

Discussion

The aims of the present study were to i) gain insight into S100A8/S100A9 complexes and major circulating proteoforms in plasma from septic shock patients by top-down and bottom-up proteomics, ii) evaluate the prognostic value of the identified proteoforms. We also wished to provide a simple and well-characterized method for evaluation of the prognostic value of S100A8/S100A9 in septic shock patients.

The S100A8/S100A9 noncovalently associated heterocomplex is the most abundant intracellular form in human granulocytes^{23,53,25,26}, as demonstrated by direct detection of the complexes by native mass spectrometry²⁵. However, few reports have addressed the extracellular circulating forms. The inherent issue of sensitivity with native MS methods prevented direct detection of the low-abundance plasma S100A8/S100A9 complexes. The top-down MS method under denaturing conditions combined with immunoprecipitation as developed in the present study detected the intact covalently linked recombinant heterodimer standard. As expected, the noncovalently associated standard was not detected intact, but in monomeric forms. In human plasma from septic shock patients, different monomeric forms of S100A8 and S100A9 were detected. Assuming a release of intracellular S100A8/S100A9 complexes from myeloid cells to extracellular space resulting from cellular damage related to intense cellular stress¹⁶, circulating plasma complexes would consequently be noncovalently associated.

We observed an excellent correlation and match in absolute concentrations of S100A8/S100A9 determined by ELISA and the bottom-up MS assay. The ELISA measured selectively the S100A8/S100A9 heterocomplexes because the immunoassay was composed of an anti-S100A8 capture monoclonal antibody and an anti-S100A9 tracer monoclonal antibody¹⁶. The bottom-up MS method was designed to detect all S100A8/S100A9 forms because the chosen peptides are common to all the proteoforms we have identified. The perfect correlation between both methods suggests that the S100A8/S100A9 heterocomplexes would be the predominant circulating plasma forms, as reported by Yasar *et al.*³². However, only native MS could directly prove the presence and the predominance of the S100A8/S100A9 heterocomplexes.

The equimolarity of plasma S100A8 and S100A9 demonstrated by the validated bottom-up method with IDA suggested equimolar circulating heterocomplexes, similar to the intracellular forms^{23,25,26}. Differences with the recently reported relative abundances of 74% and 26% of plasma S100A8 and S100A9 respectively³³, could be related to the internal standards used, immuno-affinity enrichment or MS detection. In our study, we used highly characterized SIL AQUA peptides for quantification, an antibody-free extraction and targeted high-resolution quantification.

The complexity of proteoforms²¹ raises the question of the clinical utility of specific forms. Part of the present study was dedicated to the identification and relative quantification of S100A8 and S100A9 proteoforms in plasma from septic shock patients cohort. It has been shown *in vitro* and *in vivo*, but not in plasma, that S100A8 and S100A9 may be post-translationally modified by S-nitrosylation, oxidation, S-glutathionylation and phosphorylation^{27,28,29}. Interestingly, transnitrosylase activity was recently reported for intracellular S-nitrosylated S100A9⁵⁴. In addition, S100A9 was acetylated with an alternative splicing variant, lacking the first amino acids²³. In human serum samples, De Seny *et al.*⁸ identified unmodified S100A8 and S100A9, and truncated acetylated S100A9 by SELDI-TOF in samples from patients with inflammatory arthritis. Recently, Gao *et al.*³³ detected 4 proteoforms by

MALDI-TOF in human plasma from patients with inflammation and renal dysfunction: unmodified S100A8, di-oxidized S100A9, truncated acetylated S100A9, and M-truncated S100A9. In the present study, top-down HRMS proteomics identified 4 proteoforms in plasma from septic shock patients following immunoprecipitation with Mo2B9 monoclonal antibody, specific of the S100A8/S100A9 complexes⁴². We observed, like previous studies, unmodified S100A8 and truncated acetylated S100A9. We detected 2 additional forms, *i.e.* oxidized S100A8 and S-nitrosylated S100A9, but not the di-oxidized S100A9^{33, 8} and M-truncated S100A9³³. Identification of the oxidized S100A8 form can be linked to the high oxidative status of septic shock patients. The di-oxidized S100A9 form was reported previously based on a signal detected at m/z around 13272 Da by MALDI-TOF/SELDI-TOF MS. In our study, we observed a signal with similar m/z (13271.4 Da), but attribution to the S-nitrosylated S100A9 form was a perfect match with the precise mass measurement offered by HRMS and further confirmed by the subsequent MS/MS analysis. The M-truncated S100A9 form only was identified by Gao *et al.*³³ in minor abundance (5%). The absence of signal for the M-truncated S100A9 form with the HRMS method could be related to a difference in mass spectrometry sensitivity for this specific form or to a potential lack of isolation by the Mo2B9 antibody.

Signals of all forms were increased in non-survivors, although not significantly for S-nitrosylated S100A9. Death of septic shock patients is most probably related to irreversible cell damage resulting in massive release of S100A8/S100A9 complexes from myeloid cells to the extracellular compartment¹⁶. Sepsis and septic shock are associated with massive production of ROS by neutrophils and monocytes³⁴. Indeed, abundant production and release of ROS target bacteria in sepsis, but also contribute to the inflammation-associated organ and tissue injuries seen in sepsis⁵⁵ and other life-threatening contexts as ischemia/reperfusion injury⁵⁶. Higher oxidation of S100A8 may result from excess ROS release and S100A8 have been proposed as oxidant scavengers⁵⁷. Moreover, S100A8 is known to inhibit the ROS production by phagocytes in endotoxemic mice⁵⁸. Regarding the increase of truncated acetylated S100A9, the loss of the first amino acids of S100A9 is due to alternative translation²³, resulting in a protein which lacks the oxidation-sensitive amino acids Cys and Met. Higher stability of truncated S100A9 in biological fluid was observed by Preiano *et al.*⁵⁹, and related to protection from oxidative damaging processes. Obviously, our results on both proteoforms need to be further confirmed in a second validation cohort. Ideally, an alternative method, based on antibodies for instance, could investigate the prognostic value of mono-oxidized S100A8 and truncated acetylated S100A9.

Because almost all identified forms were increased in non-survivors of septic shock, we investigated further the prognostic value of circulating S100A8/S100A9. The standard approach for biomarker evaluation in biofluids is based on absolute quantification by the bottom-up strategy with targeted mass spectrometry²⁰. Indeed, targeted peptide detection combined with normalization by SIL peptides generally provides sensitive and robust quantitative assays^{39,60}. Reproducibility, precision and transfer across laboratories of protein measurements by targeted mass spectrometry are well demonstrated^{60,61}.

Targeted HRMS/MS operated on the Orbitrap instrument was implemented for highly specific and precise quantification of non-modified quantotypic tryptic peptides⁵⁰, representative of all identified protein forms. Method evaluation was conducted using recombinant noncovalently associated S100A8/S100A9 heterodimer standard and plasma from septic shock patients for the most representative conditions of clinical samples. The well-characterized bottom-up mass spectrometry method confirmed the prognostic utility of S100A8/S100A9 in our cohort.

The bottom-up method is based on a simple and efficient antibody-free protocol. Removing metabolites, small proteins and some lipids by protein precipitation⁵¹ was appropriate for quantification of endogenous S100A8/S100A9. In addition, proteins were denatured by the organic solvent used in the pellet digestion protocol, therefore minimizing the impact of oligomer structures or potential higher structure differences between recombinant and endogenous complexes on peptide release by trypsin⁴⁴. According to the recommendations for clinical biomarkers²⁰, the evaluation experiments demonstrated adequate assay precision with coefficients of variation below 20% and ability to determine an absolute concentration of S100A8/S100A9 in plasma, with an LLOQ of 250 ng/mL. No impact of the miscleavage sites was observed on assay precision, with CV (%) in the same range compared to other peptides.

Absolute quantification by external calibration and IDA were compared in the present work. On the one hand, external calibration with the recombinant heterodimer standard determined assay linearity in the range of endogenous S100A8/S100A9 concentrations and recovery of the entire sample preparation. The external calibration protocol was fully validated according to the recommendations for clinical biomarkers²⁰. On the other hand, IDA used SIL-peptides accurately quantified by amino acid analysis (AAA) spiked directly in the patient samples. Remarkably, the fully validated external calibration protocol perfectly correlated with IDA and provided similar S100A8/S100A9 levels in the patient cohort. The IDA avoids the preparation of an external protein calibration curve and could be routinely applied to quantify S100A8/S100A9 in human plasma. Indeed, targeted mass spectrometry with SIL internal standard peptides is now routinely used in clinical laboratories^{62,63}. Thus, the simple, antibody-free IDA method could constitute a reliable alternative for routine quantification of S100A8/S100A9 in the clinic, so as to further confirm its prognostic value in larger cohorts. Full method validation and standard characterization will be expected if the assay is to be used in clinical decision making.

Conclusion

Bottom-up and top-down methods were combined here to gain insight into the circulating S100A8/S100A9 forms in septic shock patients. Our results suggest that the predominant circulating forms are noncovalently associated equimolar S100A8/S100A9 heterocomplexes. Moreover, 4 circulating proteoforms were identified, with S100A8, truncated acetylated S100A9 and mono-oxidized S100A8 being significantly increased in non-survivor septic shock patients. Finally, S100A8/S100A9

was determined by a validated absolute quantification assay and discriminated between survivors and non-survivors.

The well-characterized MS assays developed in the present study confirmed the prognostic value of S100A8/S100A9 in our cohort of septic shock patients. Quantification of S100A8/S100A9 by the simple and validated antibody-free protocol could be easily transferred between hospital laboratories for harmonization of S100A8/S100A9 quantification, which would help in stratification of septic shock patients and in early decision-making about dangerous or costly treatment and assistance options.

Supporting Information:

The following supporting information is available free of charge at ACS website

<http://pubs.acs.org>

Supporting Methods:

Characterization of recombinant human noncovalently associated S100A8/S100A9 heterodimer

Supporting Figures:

Supplementary Figure S1

Raw MS and deconvoluted spectra of A/ recombinant covalently linked S100A8/S100A9 heterodimer (observed average mass, using the ReSpect algorithm and mass deviation with theoretical mass in ppm) and B/ recombinant noncovalently associated S100A8/S100A9 heterodimer (observed monoisotopic masses, using the Xtract algorithm and mass deviation with theoretical mass in ppm).

Supplementary Figure S2

XIC of the four identified proteoforms by top-down proteomics. The three to four most intense charge states of each proteoform were extracted in QuanBrowser using a mass extraction window of 1 *Da*.

Supplementary Figure S3

MS2 fragmentation of the four identified S100A8 and S100A9 proteoforms. Attributed *b* and *y* ions are indicated (< 5 ppm mass deviation). From top to bottom: S100A8, mono-oxidized S100A8, truncated acetylated S100A9, and S-nitrosylated S100A9.

Supplementary Figure S4

Molar ratio between S100A8 and S100A9 proteins in the cohort of septic shock patients. The survivors are plotted in green and non-survivors in red.

Supporting Tables:

Supplementary Table S1

MS parameters for PRM detection of S100A8 and S100A9 peptides and corresponding SIL internal standards.

Supplementary Table S2

Charge states selected for intact quantification of each proteoform.

Supplementary Table S3

Intraday (n=3) and interday precisions (n=3) determined for each proteoform by computing either the XIC area or the XIC peak area normalized to the total area of all the forms, by replicate analysis of a pool of plasma from septic shock patients. The mean intra-assay (CV_{intra}) and inter-assay (CV_{inter}) CVs were calculated. CV_{intra} includes all 3 replicates measured in a single day. CV_{inter} was determined for each replicate individually across all 3 days. Results are given for each of the 4 proteoforms.

Supplementary Table S4

Characterization of the recombinant S100A8/S100A9 heterodimer standard. The result for the DLQ-9 peptide was excluded. The lower signal for DLQ-9 was attributed to a lower efficiency of release by trypsin.

Supplementary Table S5

Methanol precipitation yield of the recombinant S100A8/S100A9 heterodimer standard in mouse plasma. The yield was calculated for each peptide as $ratio_{pre}/ratio_{post}$, expressed as a percentage. Results are given for each of the 4 quantitative peptides.

Supplementary Table S6

Matrix effect between mouse and human plasma evaluated for each quantitative peptide. Human plasma was spiked with 40 $\mu\text{g/mL}$ of recombinant S100A8/S100A9 heterodimer standard and back calculated against a calibration curve prepared in mouse plasma. Endogenous S100A8/S100A9 concentrations were added to the spiked amount for calculation of bias. Bias and CV % are reported.

Supplementary Table S7

Peptide stability during digestion. Estimation of bias on S100A8/S100A9 concentrations due to peptide degradation during the proteolysis step was calculated for each peptide as $(SIL_{pre}-SIL_{post})/SIL_{post}$, expressed as a percentage.

Supplementary Table S8

S100A8/S100A9 median levels in patients sampled with EDTA or Heparin, determined by the bottom-up LC-MS/MS assay

Acknowledgements

Christelle Dubois was supported by a “Bourse CIFRE” (Convention Industrielle de Formation pour la REcherche) provided by ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and by BertinTechnologies for her PhD thesis.

Author Contributions

All authors conceived and designed the experiments. C.D performed the experiments. C.D and F.B analyzed the data. C.D, C.J, F.F, and F.B wrote the main manuscript text.

Conflict of interest:

All authors had no conflict of interest for the study.

DATA AVAILABILITY

All data for this study are provided in a public repository. Data can be downloaded from PASSEL (Peptide Atlas) at: <ftp://PASS01483:QB5464km@ftp.peptideatlas.org/>

Data set Identifier: PASS01483

References

- (1) Matzinger, P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* **2002**, 296 (5566), 301–305. <https://doi.org/10.1126/science.1071059>.
- (2) Roh, J. S.; Sohn, D. H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Network* **2018**, 18 (4), e27. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>.
- (3) Andersson, U.; Yang, H.; Harris, H. High-Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) Operates as an Alarmin Outside as Well as inside Cells. *Semin. Immunol.* **2018**, 38, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.02.011>.
- (4) Gibot, S.; Massin, F.; Cravoisy, A.; Barraud, D.; Nace, L.; Levy, B.; Bollaert, P.-E. High-Mobility Group Box 1 Protein Plasma Concentrations during Septic Shock. *Intensive Care Medicine* **2007**, 33 (8), 1347–1353. <https://doi.org/10.1007/s00134-007-0691-2>.
- (5) Vogl, T.; Gharibyan, A. L.; Morozova-Roche, L. A. Pro-Inflammatory S100A8 and S100A9 Proteins: Self-Assembly into Multifunctional Native and Amyloid Complexes. *Int J Mol Sci* **2012**, 13 (3), 2893–2917. <https://doi.org/10.3390/ijms13032893>.
- (6) Foell, D.; Wittkowski, H.; Ren, Z.; Turton, J.; Pang, G.; Daebritz, J.; Ehrchen, J.; Heidemann, J.; Borody, T.; Roth, J.; et al. Phagocyte-Specific S100 Proteins Are Released from Affected Mucosa and Promote Immune Responses during Inflammatory Bowel Disease. *J. Pathol.* **2008**, 216 (2), 183–192. <https://doi.org/10.1002/path.2394>.
- (7) Tyden, H.; Lood, C.; Gullstrand, B.; Jonsen, A.; Nived, O.; Sturfelt, G.; Truedsson, L.; Ivars, F.; Leanderson, T.; Bengtsson, A. A. Increased Serum Levels of S100A8/A9 and S100A12 Are Associated with Cardiovascular Disease in Patients with Inactive Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatology* **2013**, 52 (11), 2048–2055. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket263>.
- (8) de Seny, D.; Fillet, M.; Ribbens, C.; Marée, R.; Meuwis, M.-A.; Lutteri, L.; Chapelle, J.-P.; Wehenkel, L.; Louis, E.; Merville, M.-P.; et al. Monomeric Calgranulins Measured by SELDI-TOF Mass Spectrometry and Calprotectin Measured by ELISA as Biomarkers in Arthritis. *Clin. Chem.* **2008**, 54 (6), 1066–1075. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.099549>.
- (9) van Bon, L.; Cossu, M.; Loof, A.; Gohar, F.; Wittkowski, H.; Vonk, M.; Roth, J.; van den Berg, W.; van Heerde, W.; Broen, J. C. A.; et al. Proteomic Analysis of Plasma Identifies the Toll-like

- Receptor Agonists S100A8/A9 as a Novel Possible Marker for Systemic Sclerosis Phenotype. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73* (8), 1585–1589. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-205013>.
- (10) Bhattacharjee, M.; Balakrishnan, L.; Renuse, S.; Advani, J.; Goel, R.; Sathe, G.; Keshava Prasad, T. S.; Nair, B.; Jois, R.; Shankar, S.; et al. Synovial Fluid Proteome in Rheumatoid Arthritis. *Clinical Proteomics* **2016**, *13* (1). <https://doi.org/10.1186/s12014-016-9113-1>.
- (11) Payen, D.; Lukaszewicz, A.-C.; Belikova, I.; Faivre, V.; Gelin, C.; Russwurm, S.; Launay, J.-M.; Sevenet, N. Gene Profiling in Human Blood Leucocytes during Recovery from Septic Shock. *Intensive Care Med* **2008**, *34* (8), 1371–1376. <https://doi.org/10.1007/s00134-008-1048-1>.
- (12) Gao, S.; Yang, Y.; Fu, Y.; Guo, W.; Liu, G. Diagnostic and Prognostic Value of Myeloid-Related Protein Complex 8/14 for Sepsis. *Am J Emerg Med* **2015**, *33* (9), 1278–1282. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2015.06.025>.
- (13) van Zoelen, M. A. D.; Vogl, T.; Foell, D.; Van Veen, S. Q.; van Till, J. W. O.; Florquin, S.; Tanck, M. W.; Wittebole, X.; Laterre, P.-F.; Boermeester, M. A.; et al. Expression and Role of Myeloid-Related Protein-14 in Clinical and Experimental Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2009**, *180* (11), 1098–1106. <https://doi.org/10.1164/rccm.200810-1552OC>.
- (14) Fontaine, M.; Pachot, A.; Larue, A.; Mougin, B.; Landelle, C.; Venet, F.; Allombert, C.; Cazalis, M.-A.; Monneret, G.; Lepape, A. Delayed Increase of S100A9 Messenger RNA Predicts Hospital-Acquired Infection after Septic Shock*: *Critical Care Medicine* **2011**, *39* (12), 2684–2690. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182282a40>.
- (15) Fontaine, M.; Planel, S.; Peronnet, E.; Turrel-Davin, F.; Piriou, V.; Pachot, A.; Monneret, G.; Lepape, A.; Venet, F. S100A8/A9 mRNA Induction in an Ex Vivo Model of Endotoxin Tolerance: Roles of IL-10 and IFN γ . *PLoS ONE* **2014**, *9* (6), e100909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100909>.
- (16) Dubois, C.; Marcé, D.; Faivre, V.; Lukaszewicz, A.-C.; Junot, C.; Fenaille, F.; Simon, S.; Becher, F.; Morel, N.; Payen, D. High Plasma Level of S100A8/S100A9 and S100A12 at Admission Indicates a Higher Risk of Death in Septic Shock Patients. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 15660. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52184-8>.

- (17) Singer, M.; Deutschman, C. S.; Seymour, C. W.; Shankar-Hari, M.; Annane, D.; Bauer, M.; Bellomo, R.; Bernard, G. R.; Chiche, J.-D.; Coopersmith, C. M.; et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **2016**, *315* (8), 801. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.
- (18) Wong, J. L. C.; Mason, A. J.; Gordon, A. C.; Brett, S. J. Are Large Randomised Controlled Trials in Severe Sepsis and Septic Shock Statistically Disadvantaged by Repeated Inadvertent Underestimates of Required Sample Size? *BMJ Open* **2018**, *8* (8), e020068. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-020068>.
- (19) Hotchkiss, R. S.; Moldawer, L. L.; Opal, S. M.; Reinhart, K.; Turnbull, I. R.; Vincent, J.-L. Sepsis and Septic Shock. *Nature Reviews Disease Primers* **2016**, *2*, 16045. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45>.
- (20) Grant, R. P.; Hoofnagle, A. N. From Lost in Translation to Paradise Found: Enabling Protein Biomarker Method Transfer by Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* **2014**, *60* (7), 941–944. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.224840>.
- (21) Smith, L. M.; Kelleher, N. L.; Consortium for Top Down Proteomics. Proteoform: A Single Term Describing Protein Complexity. *Nat. Methods* **2013**, *10* (3), 186–187. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2369>.
- (22) Nedelkov, D. Human Proteoforms as New Targets for Clinical Mass Spectrometry Protein Tests. *Expert Rev Proteomics* **2017**, *14* (8), 691–699. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1362337>.
- (23) Vogl, T.; Roth, J.; Sorg, C.; Hillenkamp, F.; Strupat, K. Calcium-Induced Noncovalently Linked Tetramers of MRP8 and MRP14 Detected by Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10* (11), 1124–1130.
- (24) Edgeworth, J.; Gorman, M.; Bennett, R.; Freemont, P.; Hogg, N. Identification of P8,14 as a Highly Abundant Heterodimeric Calcium Binding Protein Complex of Myeloid Cells. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (12), 7706–7713.

- (25) Strupat, K.; Rogniaux, H.; Van Dorsselaer, A.; Roth, J.; Vogl, T. Calcium-Induced Noncovalently Linked Tetramers of MRP8 and MRP14 Are Confirmed by Electrospray Ionization-Mass Analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, *11* (9), 780–788.
- (26) Vogl, T.; Leukert, N.; Barczyk, K.; Strupat, K.; Roth, J. Biophysical Characterization of S100A8 and S100A9 in the Absence and Presence of Bivalent Cations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2006**, *1763* (11), 1298–1306. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.028>.
- (27) Lim, S. Y.; Raftery, M.; Cai, H.; Hsu, K.; Yan, W. X.; Hseih, H.-L.; Watts, R. N.; Richardson, D.; Thomas, S.; Perry, M.; et al. S-Nitrosylated S100A8: Novel Anti-Inflammatory Properties. *The Journal of Immunology* **2008**, *181* (8), 5627–5636. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5627>.
- (28) Lim, S. Y.; Raftery, M. J.; Goyette, J.; Geczy, C. L. S-Glutathionylation Regulates Inflammatory Activities of S100A9. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (19), 14377–14388. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.075242>.
- (29) van den Bos, C.; Roth, J.; Koch, H. G.; Hartmann, M.; Sorg, C. Phosphorylation of MRP14, an S100 Protein Expressed during Monocytic Differentiation, Modulates Ca(2+)-Dependent Translocation from Cytoplasm to Membranes and Cytoskeleton. *J. Immunol.* **1996**, *156* (3), 1247–1254.
- (30) Welinder, C.; Jönsson, G.; Ingvar, C.; Lundgren, L.; Baldetorp, B.; Olsson, H.; Breslin, T.; Rezeli, M.; Jansson, B.; Laurell, T.; et al. Feasibility Study on Measuring Selected Proteins in Malignant Melanoma Tissue by SRM Quantification. *Journal of Proteome Research* **2014**, *13* (3), 1315–1326. <https://doi.org/10.1021/pr400876p>.
- (31) Ishizaki, J.; Takemori, A.; Suemori, K.; Matsumoto, T.; Akita, Y.; Sada, K.-E.; Yuzawa, Y.; Amano, K.; Takasaki, Y.; Harigai, M.; et al. Targeted Proteomics Reveals Promising Biomarkers of Disease Activity and Organ Involvement in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Arthritis Res. Ther.* **2017**, *19* (1), 218. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1429-3>.
- (32) Yasar, O.; Akcay, T.; Obek, C.; Turegun, F. A. Significance of S100A8, S100A9 and Calprotectin Levels in Bladder Cancer. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **2017**, *77* (6), 437–441. <https://doi.org/10.1080/00365513.2017.1336567>.

- (33) Gao, J.; Meyer, K.; Borucki, K.; Ueland, P. M. Multiplex Immuno-MALDI-TOF MS for Targeted Quantification of Protein Biomarkers and Their Proteoforms Related to Inflammation and Renal Dysfunction. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (5), 3366–3373. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04975>.
- (34) Cobb, J. P.; Danner, R. L. Nitric Oxide and Septic Shock. *JAMA* **1996**, *275* (15), 1192–1196.
- (35) Blanchard, B.; Dendane, M.; Gallard, J.-F.; Houée-Levin, C.; Karim, A.; Payen, D.; Launay, J.-M.; Ducrocq, C. Oxidation, Nitrosation, and Nitration of Serotonin by Nitric Oxide-Derived Nitrogen Oxides: Biological Implications in the Rat Vascular System. *Nitric Oxide* **1997**, *1* (6), 442–452.
- (36) Ducrocq, C.; Dendane, M.; Laprévotte, O.; Serani, L.; Das, B. C.; Bouchemal-Chibani, N.; Doan, B.-T.; Gillet, B.; Karim, A.; Carayon, A. Chemical Modifications of the Vasoconstrictor Peptide Angiotensin II by Nitrogen Oxides (NO, HNO₂, HOONO) Evaluation by Mass Spectrometry. *European journal of biochemistry* **1998**, *253* (1), 146–153.
- (37) Gucinski, A. C.; Boyne, M. T. Evaluation of Intact Mass Spectrometry for the Quantitative Analysis of Protein Therapeutics. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (18), 8045–8051. <https://doi.org/10.1021/ac301949j>.
- (38) Barr, J. R.; Maggio, V. L.; Patterson, D. G.; Cooper, G. R.; Henderson, L. O.; Turner, W. E.; Smith, S. J.; Hannon, W. H.; Needham, L. L.; Sampson, E. J. Isotope Dilution--Mass Spectrometric Quantification of Specific Proteins: Model Application with Apolipoprotein A-I. *Clin. Chem.* **1996**, *42* (10), 1676–1682.
- (39) Viodé, A.; Fournier, C.; Camuzat, A.; Fenaille, F.; NeuroCEB Brain Bank; Latouche, M.; Elahi, F.; Le Ber, I.; Junot, C.; Lamari, F.; et al. New Antibody-Free Mass Spectrometry-Based Quantification Reveals That C9ORF72 Long Protein Isoform Is Reduced in the Frontal Cortex of Hexanucleotide-Repeat Expansion Carriers. *Front Neurosci* **2018**, *12*, 589. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00589>.
- (40) Hansbauer, E.-M.; Worbs, S.; Volland, H.; Simon, S.; Junot, C.; Fenaille, F.; Dorner, B. G.; Becher, F. Rapid Detection of Abrin Toxin and Its Isoforms in Complex Matrices by Immuno-

- Extraction and Quantitative High Resolution Targeted Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (21), 11719–11727. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03189>.
- (41) Bone, R. C.; Balk, R. A.; Cerra, F. B.; Dellinger, R. P.; Fein, A. M.; Knaus, W. A.; Schein, R. M.; Sibbald, W. J. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **1992**, *101* (6), 1644–1655.
- (42) Ikemoto, M.; Tanaka, T.; Takai, Y.; Murayama, H.; Tanaka, K.; Fujita, M. New ELISA System for Myeloid-Related Protein Complex (MRP8/14) and Its Clinical Significance as a Sensitive Marker for Inflammatory Responses Associated with Transplant Rejection. *Clin. Chem.* **2003**, *49* (4), 594–600.
- (43) Lanshoeft, C.; Cianférani, S.; Heudi, O. Generic Hybrid Ligand Binding Assay Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry-Based Workflow for Multiplexed Human Immunoglobulin G1 Quantification at the Intact Protein Level: Application to Preclinical Pharmacokinetic Studies. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (4), 2628–2635. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04997>.
- (44) Ouyang, Z.; Furlong, M. T.; Wu, S.; Sleczyka, B.; Tamura, J.; Wang, H.; Suchard, S.; Suri, A.; Olah, T.; Tymiak, A.; et al. Pellet Digestion: A Simple and Efficient Sample Preparation Technique for LC–MS/MS Quantification of Large Therapeutic Proteins in Plasma. *Bioanalysis* **2012**, *4* (1), 17–28. <https://doi.org/10.4155/bio.11.286>.
- (45) MacLean, B.; Tomazela, D. M.; Shulman, N.; Chambers, M.; Finney, G. L.; Frewen, B.; Kern, R.; Tabb, D. L.; Liebler, D. C.; MacCoss, M. J. Skyline: An Open Source Document Editor for Creating and Analyzing Targeted Proteomics Experiments. *Bioinformatics* **2010**, *26* (7), 966–968. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq054>.
- (46) Jenkins, R.; Duggan, J. X.; Aubry, A.-F.; Zeng, J.; Lee, J. W.; Cojocar, L.; Dufield, D.; Garofolo, F.; Kaur, S.; Schultz, G. A.; et al. Recommendations for Validation of LC-MS/MS Bioanalytical Methods for Protein Biotherapeutics. *The AAPS Journal* **2015**, *17* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9685-5>.

- (47) Donnelly, D. P.; Rawlins, C. M.; DeHart, C. J.; Fornelli, L.; Schachner, L. F.; Lin, Z.; Lippens, J. L.; Aluri, K. C.; Sarin, R.; Chen, B.; et al. Best Practices and Benchmarks for Intact Protein Analysis for Top-down Mass Spectrometry. *Nat Methods* **2019**, *16* (7), 587–594. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0457-0>.
- (48) Kellie, J. F.; Higgs, R. E.; Ryder, J. W.; Major, A.; Beach, T. G.; Adler, C. H.; Merchant, K.; Knierman, M. D. Quantitative Measurement of Intact Alpha-Synuclein Proteoforms from Post-Mortem Control and Parkinson’s Disease Brain Tissue by Intact Protein Mass Spectrometry. *Sci Rep* **2014**, *4*, 5797. <https://doi.org/10.1038/srep05797>.
- (49) Picotti, P.; Aebersold, R. Selected Reaction Monitoring-Based Proteomics: Workflows, Potential, Pitfalls and Future Directions. *Nat. Methods* **2012**, *9* (6), 555–566. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2015>.
- (50) Worboys, J. D.; Sinclair, J.; Yuan, Y.; Jørgensen, C. Systematic Evaluation of Quantotypic Peptides for Targeted Analysis of the Human Kinome. *Nature Methods* **2014**, *11* (10), 1041–1044. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3072>.
- (51) Becher, F.; Ciccolini, J.; Imbs, D.-C.; Marin, C.; Fournel, C.; Dupuis, C.; Fakhry, N.; Pourroy, B.; Ghetas, A.; Pruvost, A.; et al. A Simple and Rapid LC-MS/MS Method for Therapeutic Drug Monitoring of Cetuximab: A GPCO-UNICANCER Proof of Concept Study in Head-and-Neck Cancer Patients. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 2714. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02821-x>.
- (52) van de Merbel, N. C. Quantitative Determination of Endogenous Compounds in Biological Samples Using Chromatographic Techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27* (10), 924–933. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.002>.
- (53) Hunter, M. J.; Chazin, W. J. High Level Expression and Dimer Characterization of the S100 EF-Hand Proteins, Migration Inhibitory Factor-Related Proteins 8 and 14. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (20), 12427–12435.
- (54) Jia, J.; Arif, A.; Terenzi, F.; Willard, B.; Plow, E. F.; Hazen, S. L.; Fox, P. L. Target-Selective Protein S-Nitrosylation by Sequence Motif Recognition. *Cell* **2014**, *159* (3), 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.032>.

- (55) Kovach, M. A.; Standiford, T. J. The Function of Neutrophils in Sepsis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2012**, *25* (3), 321–327. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283528c9b>.
- (56) Chouchani, E. T.; Pell, V. R.; Gaude, E.; Aksentijević, D.; Sundier, S. Y.; Robb, E. L.; Logan, A.; Nadtochiy, S. M.; Ord, E. N. J.; Smith, A. C.; et al. Ischaemic Accumulation of Succinate Controls Reperfusion Injury through Mitochondrial ROS. *Nature* **2014**, *515* (7527), 431–435. <https://doi.org/10.1038/nature13909>.
- (57) Lim, S. Y.; Raftery, M. J.; Geczy, C. L. Oxidative Modifications of DAMPs Suppress Inflammation: The Case for S100A8 and S100A9. *Antioxidants & redox signaling* **2011**, *15* (8), 2235–2248.
- (58) Sun, Y.; Lu, Y.; Engeland, C. G.; Gordon, S. C.; Sroussi, H. Y. The Anti-Oxidative, Anti-Inflammatory, and Protective Effect of S100A8 in Endotoxemic Mice. *Molecular Immunology* **2013**, *53* (4), 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.002>.
- (59) Preianò, M.; Maggisano, G.; Lombardo, N.; Montalcini, T.; Paduano, S.; Pelaia, G.; Savino, R.; Terracciano, R. Influence of Storage Conditions on MALDI-TOF MS Profiling of Gingival Crevicular Fluid: Implications on the Role of S100A8 and S100A9 for Clinical and Proteomic Based Diagnostic Investigations. *PROTEOMICS* **2016**, *16* (6), 1033–1045. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500328>.
- (60) Abbatiello, S. E.; Schilling, B.; Mani, D. R.; Zimmerman, L. J.; Hall, S. C.; MacLean, B.; Albertolle, M.; Allen, S.; Burgess, M.; Cusack, M. P.; et al. Large-Scale Interlaboratory Study to Develop, Analytically Validate and Apply Highly Multiplexed, Quantitative Peptide Assays to Measure Cancer-Relevant Proteins in Plasma. *Mol. Cell Proteomics* **2015**, *14* (9), 2357–2374. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.047050>.
- (61) Addona, T. A.; Abbatiello, S. E.; Schilling, B.; Skates, S. J.; Mani, D. R.; Bunk, D. M.; Spiegelman, C. H.; Zimmerman, L. J.; Ham, A.-J. L.; Keshishian, H.; et al. Multi-Site Assessment of the Precision and Reproducibility of Multiple Reaction Monitoring-Based Measurements of Proteins in Plasma. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27* (7), 633–641. <https://doi.org/10.1038/nbt.1546>.

- (62) Barnidge, D. R.; Dratz, E. A.; Martin, T.; Bonilla, L. E.; Moran, L. B.; Lindall, A. Absolute Quantification of the G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin by LC/MS/MS Using Proteolysis Product Peptides and Synthetic Peptide Standards. *Anal. Chem.* **2003**, 75 (3), 445–451.
- (63) Gerber, S. A.; Rush, J.; Stemman, O.; Kirschner, M. W.; Gygi, S. P. Absolute Quantification of Proteins and Phosphoproteins from Cell Lysates by Tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100 (12), 6940–6945. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832254100>.

Figures

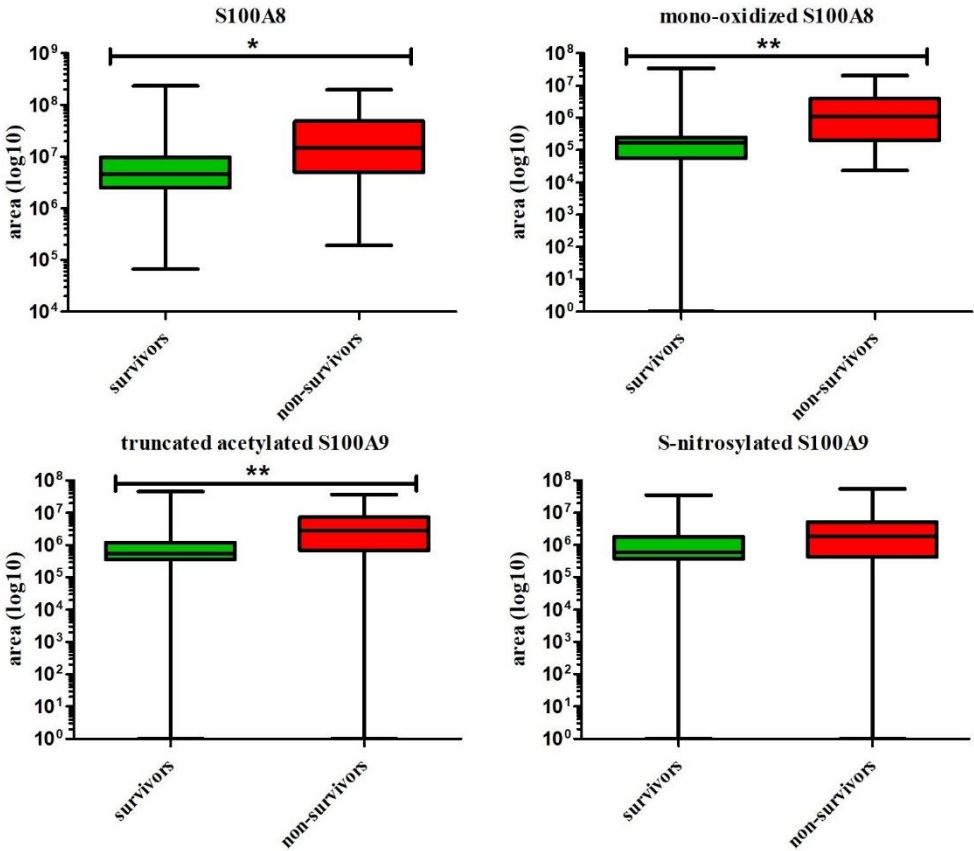


Figure 1

A/ Comparison of peak areas of the 4 detected proteoforms between survivors and non-survivors for 28-day mortality: S100A8 (P = 0.0106), mono-oxidized S100A8 (P = 0.0023), truncated acetylated S100A9 (P = 0.0082), and S-nitrosylated S100A9 (P = 0.2217).

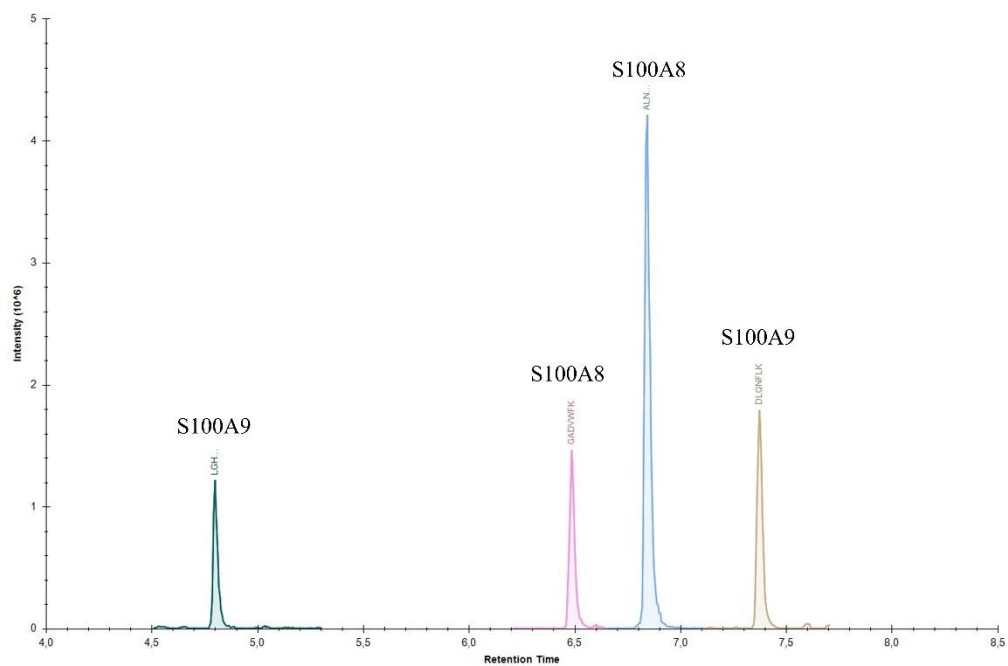


Figure 2

Extracted ion chromatogram of the 4 quantotypic peptides of S100A8 and S100A9.

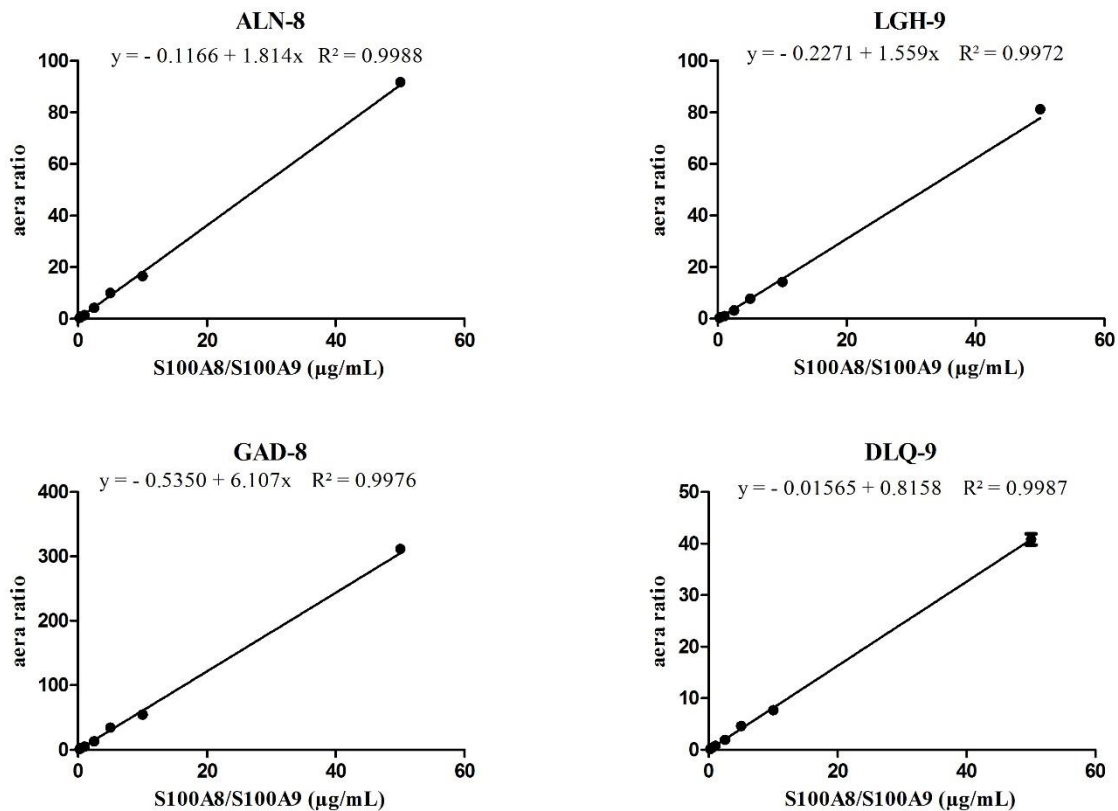


Figure 3

Standard curves of the four selected quantotypic peptides for quantification of S100A8 and S100A9 in a pool of mouse plasma. Recombinant noncovalently associated S100A8/S100A9 heterodimer standard was spiked at increasing concentration, allowing the generation of a 7-point standard curve (weighting 1/x).

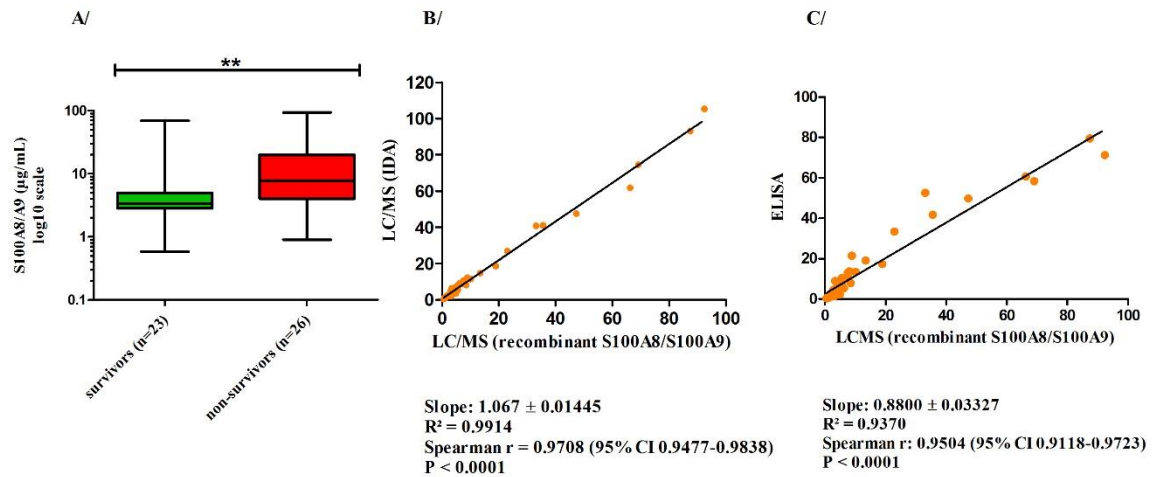


Figure 4

A/ S100A8/S100A9 levels (log₁₀ scale) in survivors and non-survivors (28-day mortality) determined by LC-MS/MS and a calibration curve prepared with the recombinant noncovalently associated S100A8/S100A9 heterodimer standard ($P = 0.0084$).

B/ Correlation between concentrations determined by the external standard calibration curve with recombinant noncovalently associated S100A8/S100A9 heterodimer standard and the isotopic dilution assay with SIL AQUA peptides ($R_{\text{spearman}}=0.9708$, 95% CI, 0.9477 to 0.9838).

C/ Correlation between concentrations determined by the external standard calibration curve with recombinant noncovalently associated S100A8/S100A9 heterodimer standard and ELISA ($R_{\text{spearman}}=0.9504$, 95% CI, 0.9118 to 0.9723).

Tables

Parameter	total cohort n=49	survivors n=23	non-survivors n=26	P-value (survivors vs non-survivors)
Age (y/o)	66 (54.5-78)	63 (23-80)	70.50 (56.75-77.25)	0.325
Sex M/F	27/49	13/23	14/26	0.777
SOFA	9 (7-11)	9 (7-11)	10 (7-12)	0.212
7-day mortality	21/49	0/23	21/26	NA
28-day mortality	26/49	0/23	26/26	NA
<u>Origin of infection</u>				
Abdominal sites	35%	30%	38%	0.568
Urinary	6%	9%	4%	0.500
Respiratory	47%	48%	46%	0.917
Others	12%	13%	12%	0.888
<u>S100A8/S100A9 (µg/mL)</u>				
Recombinant standard	4.814 (3.024-8.714)	3.401 (2.866-4.979)	7.836 (4.045-19.94)	0.0084
IDA (AQUA peptides)	5.730 (3.179-11.14)	5.125 (2.551-6.378)	10.210 (3.563-20.680)	0.0186
ELISA	5.710 (2.595-13.630)	4.592 (2.158-7.465)	11.700 (2.852-24.360)	0.0420

Table 1

Patient characteristics and plasma S100A8/S100A9 level determined by LC-MS/MS and ELISA in the whole cohort, the survivors and the non-survivors at day 28. NA: non-applicable; NS: non-significant. Data were expressed in median (interquartile) or absolute numbers (Mann Whitney test).

Proteoform	Monoisotopic experimental mass	Δppm
S100A8	10827.6319	1.6
Mono-oxidized S100A8	10844.6153	2.7
S-nitrosylated S100A9	13263.4673	2.9
Des-MTCKM acetylated S100A9	12681.2503	2.8

Table 2

S100A8/S100A9 proteoforms detected in plasma from septic shock patients. Observed monoisotopic masses using Xtract algorithm and mass deviation with theoretical mass in ppm are indicated.

	S100A8		S100A9	
	ALN-8	GAD-8	LGH-9	DLQ-9
CV_{intra} (%)	9.1	10.0	5.1	4.7
CV_{inter} (%)	6.6	14.7	7.1	4.7

Table 3

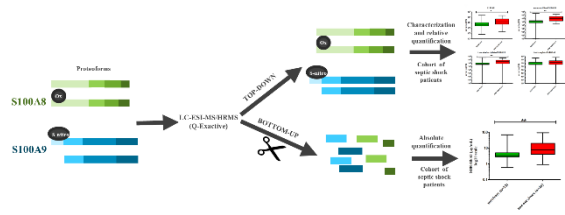
Intraday (n = 5) and interday precisions (n = 3) of the bottom-up method for determination of S100A8/S100A9 concentrations, by replicate analysis of a pool of plasma from septic shock patients. Results are given for the 4 quantitative peptides. CV_{intra} includes all 5 replicates measured in a single day. CV_{inter} was determined for each replicate individually across all 3 days.

	S100A8		S100A9	
Yield (%)	ALN-8	GAD-8	LGH-9	DLQ-9
	32.5	16.6	33.5	14.1

Table 4

Total recovery of the 4 peptides by the pellet digestion protocol. Recovery was determined by spiking S100A8/S100A8 recombinant standard at three different levels in duplicates: 5 µg/mL, 10 µg/mL and 20 µg/mL. Mean recovery values of the three levels are reported.

CHAPITRE 2 : QUANTIFICATION DES CALGRANULINES DANS LE PLASMA HUMAIN



For Table of Contents Only

III.3 Conclusions de l'article

Nous avons développé deux méthodes *top-down* et *bottom-up* afin de caractériser les principaux complexes et protéoformes circulants de S100A8/S100A9, puis d'évaluer leur valeur pronostique dans le plasma de patients atteints d'un choc septique. Nous avons également fourni un protocole simple et validé basé sur l'approche *bottom-up* pour l'évaluation de la valeur pronostique des formes totales de S100A8/S100A9 chez les patients en état de choc septique.

Les résultats obtenus avec la méthode d'immuno-précipitation combinée à l'approche *top-down* sont cohérents avec les complexes de S100A8/S100A9 constitués de liaisons non-covalentes. Nos résultats sont en accord avec une libération des complexes intracellulaires résultant des dommages cellulaires liés au choc septique comme évoqué dans l'article 1. De plus, nous avons démontré par corrélation entre les résultats de l'ELISA et de la méthode de quantification *bottom-up* que les formes circulantes plasmatiques prédominantes étaient des hétérocomplexes de S100A8/S100A9. De plus, toujours avec la méthode *bottom-up*, nous avons démontré l'équimolarité de S100A8 et S100A9, de manière similaire aux formes intracellulaires^{315,336}. Ainsi, nos résultats ont permis d'indiquer que les formes circulantes prédominantes de S100A8 et S100A9 dans un contexte de choc septique étaient des hétérocomplexes équimolaires non-covalents.

La méthode *top-down* a également permis d'identifier quatre principales protéoformes dans les plasmas de patients atteints d'un choc septique : S100A8 non modifiée, S100A8 oxydée, S100A9 tronquée acétylée et S100A9 S-nitrosylée. De plus, ces quatre formes ont été trouvées augmentées chez les non-survivants. C'est pourquoi la méthode *bottom-up* a été validée, car elle permet de quantifier de façon absolue toutes les formes identifiées de S100A8/S100A9 à l'aide de peptides non impactés par les modifications identifiées, c'est-à-dire quantotypiques²³⁸. La répétabilité, reproductibilité, linéarité, limite de quantification, stabilité en digestion et le rendement de la méthode de quantification absolue par étalonnage externe ont été évaluées. Cette méthode a été parfaitement corrélée à l'ELISA et à la méthode par dilution isotopique utilisant des peptides SIL AQUA permettant ainsi l'utilisation d'une méthode simple avec ou sans anticorps facilement transférable afin de quantifier S100A8/S100A9 et de confirmer sa valeur pronostique dans de plus grandes cohortes.

IV. Discussion et perspectives

Dans ces études, nous nous sommes intéressés aux calgranulines, c'est-à-dire, au complexe S100A8/S100A9 et à la protéine S100A12. Nous avons montré que, dans notre cohorte de 49 plasmas de patients atteints de choc septique, les niveaux plasmatiques de S100A8/S100A9 et S100A12 étaient corrélés. Le faible nombre d'échantillons de plasmas de patients ne permet pas de conclure sur l'intérêt de mesurer systématiquement ces deux paramètres pour améliorer le pronostic. Le choix de nous intéresser à toutes les calgranulines était guidé par le fait qu'elles ont été identifiées en transcriptomique comme biomarqueurs potentiels par l'équipe du professeur Didier Payen. De plus, les calgranulines sont sécrétées et peuvent activer des cellules différentes. En effet, S100A8/S100A9 est libérée par les granulocytes, les monocytes et les macrophages aux premiers stades de la différenciation et ses effets cellulaires sont médiés par les TLRs et RAGE, alors que S100A12 est seulement libérée par les granulocytes et n'a comme récepteur que RAGE. Ainsi, ces deux protéines sont libérées par des cellules différentes et activent des voies différentes, et n'ont donc a priori pas forcément le même comportement. Cependant, leurs niveaux plasmatiques corrèlent. On peut alors se demander, lequel des deux dosages effectuer dans un cadre clinique. La méthode ELISA développée a été parfaitement corrélée à la LC-MS/MS et à un autre ELISA publié comme reconnaissant spécifiquement l'hétérocomplexe³³², ce qui apporte une meilleure validation de l'immunoessai S100A8/S100A9. En termes d'abondance, S100A8/S100A9 est environ 10 fois plus concentré que S100A12, à la fois chez les patients sains et chez les patients en choc septique, ce qui permet une détection plus sensible de S100A8/S100A9 à dilution équivalente de plasma et d'utiliser un plus faible volume d'échantillons. Aussi, S100A8/S100A9 augmente légèrement plus chez les non-survivants comparés aux survivants que S100A12 (x2,5 pour S100A8/S100A9, et x2,0 pour S100A12). A ce stade, il semble donc que le dosage de S100A8/S100A9 est plus avantageux que S100A12. A l'évidence, il faudrait effectuer ces mesures sur une plus grande cohorte afin de confirmer l'intérêt de ces deux biomarqueurs et de statuer sur la pertinence du dosage de deux ou de l'un par rapport à l'autre pour mieux prédire le devenir du patient.

Deux méthodes ont été développées pour doser les complexes S100A8/S100A9 dans le plasma humain, un ELISA et une méthode *bottom-up* LC-MS/MS. L'approche ELISA permet de doser l'hétérocomplexe rapidement avec relativement peu d'investissement de matériels : pipettes, laveur automatique de plaque, agitateur de plaque et lecteur de plaque. L'utilisation d'un ELISA demande peu de compétences techniques et la préparation de l'échantillon est simple car le plasma est simplement dilué. Aussi, les volumes de plasma utilisés sont très faibles (moins de 1 µL par dosage). De plus, le format ELISA permet l'analyse d'échantillons à haut débit. L'approche LC-MS/MS *bottom-up*, basée sur une identification spécifique de la cible, identifie et quantifie spécifiquement des peptides protéotypiques et quantotypiques de S100A8/S100A9. L'utilisation de cette méthode demande l'investissement important d'un spectromètre de masse à haute résolution. La méthode est également relativement simple à mettre

en place, mais la préparation d'échantillon est un peu plus complexe et longue que pour l'ELISA (précipitation, réduction, alkylation, digestion sur la nuit). Cependant, l'étape de digestion peut être optimisée et raccourcie à quelques heures avec par exemple l'utilisation de micro-ondes, la digestion enzymatique assistée par ultrasons ou la protéolyse accélérée par le rayonnement infrarouges qui permettent de diminuer le temps de digestion à quelques minutes^{342,343}. De plus, la méthode utilise des peptides SIL AQUA pour la quantification, moins chères qu'un hétérodimère recombinant commercial. Enfin, la méthode LC-MS/MS peut facilement être multiplexée pour une quantification précise de plusieurs protéines en un seul passage. Ainsi, les deux méthodes ont leurs avantages et inconvénients et l'utilisation de l'une ou l'autre semble équivalente en fonction des appareils déjà en place dans les laboratoires.

L'utilisation de la méthode LC-MS/MS basée sur l'approche *bottom-up* dans le milieu hospitalier nécessiterait la présence d'appareil à haute résolution. Cependant, dans les hôpitaux la présence de tels appareils n'est pas encore systématique, voire rare. Les triples quadripôles et donc le mode SRM/MRM sont actuellement plus utilisés dans le milieu hospitalier. On peut alors se demander si la méthode développée pourrait être utilisée sur un triple quadripôle en mode SRM/MRM. D'après Shi *et al.*¹⁸⁰, les méthodes SRM/MRM et PRM possèdent des capacités de reproductibilité similaire. En tampon¹⁷⁷, la gamme dynamique de quantification de SRM/MRM et PRM est équivalente, cependant, les études tendent à montrer que plus la matrice est complexe, plus l'apport de la haute résolution est important en termes de gamme dynamique de quantification car elle permet d'éliminer les interférences. Gallien *et al.*¹⁷⁸ ont montré que la méthode PRM appliquée à des échantillons d'urine présentait des performances similaires ou supérieures en termes de sélectivité, de gamme dynamique et de sensibilité comparée à la SRM. Le mode PRM est donc plus adapté à la complexité de la matrice plasma seulement purifié par une méthode de précipitation. Nguyen *et al.*¹⁸² ont comparé les capacités d'un triple quadripôle en mode MRM et d'un Q-exactive en mode PRM pour la quantification absolue d'un anticorps thérapeutique et ont montré que la méthode MRM pouvait détecter l'anticorps dans des plasmas humains à partir de 2,5 µg/mL. Or, les concentrations de S100A8/S100A9 dans le cas de patients en choc septique sont relativement élevés (dans notre cas > 1 µg/mL) et une forte concentration indique une mortalité élevée. Ainsi, une méthode SRM/MRM pourrait donc être utilisée pour la quantification de S100A8/S100A9 pour une prédiction de la mortalité des patients en choc septique.

De plus, nous avons observé avec la caractérisation des formes circulantes de S100A8/S100A9 que les formes modifiées pouvaient également discriminer survivants et non-survivants. Ainsi, une des formes modifiées pourrait permettre une meilleure discrimination des patients. La méthode utilisée pour cette discrimination n'est pas une méthode de quantification absolue. Il pourrait être envisageable de développer une méthode basée sur l'utilisation d'anticorps permettant de cibler spécifiquement une des formes. Le développement d'un ELISA semble le plus adéquat car il est difficile de suivre en spectrométrie de masse les peptides oxydés ou la troncation de S100A9. La production d'anticorps

spécifiques par exemple des protéoformes oxydée ou tronquée pourrait être développée en immunisant des souris avec l'immunogène correspondant. De grandes quantités de protéines recombinantes S100A8 et S100A9 ayant été produites au laboratoire, nous avons essayé d'oxyder spécifiquement la première méthionine de S100A8 afin d'obtenir un immunogène pour l'immunisation de souris dans le but d'obtenir des anticorps monoclonaux dirigés contre S100A8 oxydé, mais par manque de temps, cette piste n'a pas pu être poursuivie.

Enfin, un de nos objectifs étaient de mieux caractériser les complexes circulants de S100A8/S100A9, pour lesquels de nombreux questionnements notamment sur sa covalence et ses modifications post-traductionnelles n'avaient pas été résolues. Concernant S100A12, il aurait été également intéressant de caractériser ses formes circulantes, très peu étudiées. Si les concentrations de S100A12 avaient été plus élevées, une méthode de quantification multiplexe par LC-MS/MS de toutes les calgranulines (S100A8/S100A9 et S100A12) aurait été envisageable. Cependant, nous avons vu par ELISA que les concentrations de S100A12 chez les patients atteints de choc septique pouvaient être de l'ordre d'une dizaine de ng/mL. Or, à ces concentrations une simple méthode de précipitation au méthanol suivie d'une digestion ne permet pas de purifier suffisamment l'échantillon pour atteindre cette sensibilité (cf Tableau 2). A l'aide de cette même stratégie analytique de précipitation au méthanol suivie d'une digestion puis d'une analyse ciblée par LC-MS/MS nous avons étudié dans le chapitre suivant une liste de six biomarqueurs candidats afin d'effectuer leur quantification multiplexe.

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

De nombreuses protéines circulantes ont déjà été évaluées comme biomarqueurs potentiels du pronostic du sepsis. Des listes de biomarqueurs ont ainsi été générées, notamment en protéomique non-ciblée par comparaison des niveaux protéiques de deux populations différentes. Cependant, dans ces listes de biomarqueurs, une majorité des biomarqueurs potentiels n'ont pas été vérifiés. Ainsi, il est essentiel de disposer de méthodes analytiques à la fois précise et spécifique pour uniformiser le dosage et vérifier la pertinence des biomarqueurs potentiels.

I. Introduction

I.1 Sélection des biomarqueurs candidats

De nombreuses listes de biomarqueurs diagnostiques et pronostiques du sepsis ont été produites, notamment en protéomique¹³¹⁻¹³⁵. Nous nous sommes particulièrement appuyés sur la revue de Pierrakos *et al.*¹³⁶ listant 178 biomarqueurs. Dans un premier temps, tous les biomarqueurs permettant de distinguer les survivants des non-survivants à 28 jours ont été sélectionnés. A cette sélection, ont été ajoutés des biomarqueurs candidats issus de l'étude protéomique non-ciblée de Malmström *et al.*¹³⁵ et des biomarqueurs candidats identifiés par transcriptomique par l'équipe du professeur Didier Payen. Dans un second temps, les biomarqueurs non-circulants et ceux dont la concentration était inférieure aux limites de quantification connues de la MS (cf Tableau 2), soit 1 ng/mL, ont été retirés de la sélection. Enfin, une dernière analyse plus fine a été faite par le professeur Didier Payen grâce à son expérience clinique en réanimation. Ainsi, 16 biomarqueurs potentiels du pronostic vital ont été sélectionnés afin d'être vérifiés à l'aide de méthodes de quantification robustes et validées : l'amyloïde sérique A, la protéine C-réactive, le facteur de von Willebrand, l'haptoglobine, la glycoprotéine alpha-1-acide, la protéine de liaison au lipopolysaccharide, la procalcitonine, le récepteur soluble RAGE, l'angiopoiétine-1, l'angiopoiétine-2, NGAL, HMGB1, HLAG5, CD74, les granulines et l'amphiréguline. Pour certaines de ces protéines, il existe des immunodosages, mais pas d'approches quantitatives multiplexes basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse permettant de valider efficacement leur pertinence biologique. Cette liste de protéines a été séparée en deux groupes en fonction des abondances plasmatiques, c'est-à-dire, les protéines majoritaires > 1 µg/mL et les protéines minoritaires < 1 µg/mL. Une première approche analytique multiplexe a été développée pour les protéines fortement concentrées basée sur la même stratégie de préparation d'échantillon simple et rapide comme développée précédemment pour la quantification de S100A8/S100A9 (cf Chapitre 2).

Une seconde approche multiplexe a été développée pour les protéines faiblement concentrées basée sur l'immuno-enrichissement afin de concentrer les biomarqueurs candidats de faible abondance.

I.1.1 Amyloïde sérique A (SAA)

L'amyloïde sérique A (SAA) est le nom d'une petite famille de protéines. Ce sont des apolipoprotéines, c'est-à-dire qu'elles sont constitutives des lipoprotéines qui ont pour but de transporter des molécules hydrophobes dans le sang comme les triglycérides et les cholestérols. Quatre gènes codent ces protéines³⁴⁴. La protéine SAA-1 est essentiellement étudiée. L'expression de SAA-1 est induite par des signaux inflammatoires et contribue significativement à l'augmentation de SAA dans le plasma pendant la réponse en phase aiguë. La réponse en phase aiguë peut survenir à la suite par exemple d'une inflammation ou d'une infection. SAA-1 est une apolipoprotéine qui se lie aux lipoprotéines de haute densité, influençant le métabolisme du cholestérol pendant les états inflammatoires, provoquant l'adhésion et le déplacement des cellules phagocytes et lymphocytes. Les niveaux plasmatiques de SAA chez des patients sains se situent autour de 20-50 µg/mL et peuvent augmenter jusqu'à 1000 fois 24 h après l'apparition de la réponse en phase aiguë³⁴⁵. Récemment, SAA-1 a été identifiée par MALDI-TOF et vérifiée par ELISA dans une cohorte de 85 patients septiques parmi un panel de protéines comme biomarqueur précoce du sepsis³⁴⁶. De plus, la valeur pronostique de SAA, a été évaluée chez 100 patients septiques par ELISA et a permis d'observer une différence significative entre survivants et non-survivants pour les jours 3 (112,4 µg/mL chez les survivants et 301,2 µg/mL chez les non-survivants) et 7 suivant le diagnostic, sans différence apparente pour le jour 1 (74,54 µg/mL chez les survivants et 69,96 µg/mL chez les non-survivants)³⁴⁷.

I.1.2 Protéine C-réactive (CRP)

La CRP est également une protéine de phase aiguë, tout comme SAA et généralement étudiée ensemble dans la littérature afin d'être comparée. La CRP étant un des biomarqueurs actuellement utilisé en clinique avec la PCT, une partie concernant ce biomarqueur a déjà été développée dans le paragraphe II.2.1 La protéine C-réactive (CRP). Comme vu précédemment, le statut de la CRP est remis en cause par des études montrant qu'il n'y a pas de différence significative de niveaux de CRP entre les survivants et les non-survivants^{113,114}. Cependant, récemment, le niveau de CRP a été observé significativement plus élevé chez les non-survivants comparés aux survivants chez 100 patients septiques et choc septiques aux jours 3 (128,3 µg/mL chez les survivants et 197,1 µg/mL chez les non-survivants) et 7 suivant le diagnostic sans différence au jour 1³⁴⁷ et également chez 59 patients septiques et choc septiques aux jours 2 (115,0 µg/mL chez les survivants et 163,3 µg/mL chez les non-survivants), 3 et 5 suivant le diagnostic mais pas au jour 1³⁴⁸. Il nous a donc semblé essentiel de nous intéresser à ce biomarqueur « historique ».

I.1.3 Facteur de von Willebrand (VWF)

Le facteur de von Willebrand (VWF) est une glycoprotéine plasmatique constituée de 2050 acides aminés produite sélectivement dans les mégacaryocytes (cellules de la moelle hématopoïétique, productrices notamment des plaquettes sanguines) et les cellules endothéliales. Le VWF se multimérise allant du dimère aux multimères ultralarges (jusqu'à 100 monomères)³⁴⁹. Les multimères ultralarges sont très réactifs et permettent l'adhésion et l'agrégation des plaquettes sur les cellules endothéliales et le sous-endothélium endommagés³⁴⁹. Différents médiateurs de l'inflammation, comme les cytokines TNF- α et IL-6 provoquent une augmentation des niveaux de VWF par une activation des cellules endothéliales ou par une inhibition du clivage de VWF par ADAMTS13^{350,351}, une métalloprotéase qui se lie à VWF afin de cliver les multimères de VWF en protéines plus petites et moins actives. Ces données suggèrent donc que, dans les processus inflammatoires, les multimères plasmatiques de VWF s'accumulent et leurs niveaux augmentent. Une augmentation trop importante de VWF provoque cependant une occlusion des microvaisseaux et donc une hypoperfusion tissulaire et une défaillance des organes³⁵². Ces raisons ont donc motivé l'étude de VWF dans le sepsis. Il a été montré qu'un sepsis grave ou un choc septique entraînait l'accumulation d'une quantité importante de multimères ultralarges de VWF plasmatiques, qui est en corrélation avec la gravité de l'inflammation et la défaillance d'organes³⁵³. De même, un haut niveau de VWF a été observé chez les patients avec un sepsis sévère ou un choc septique comparé à des patients sains et suggérait que VWF pouvait prédire la survie des patients³⁵⁴. VWF a donc été étudié comme biomarqueur endothélial dans le pronostic du sepsis chez 275 patients présentant un SRIS ou plus (SRIS 59,7%, sepsis 1,8%, sepsis grave 18,5% et choc septique 20%)³⁵⁵. Les niveaux de VWF au moment de l'admission ont été observés significativement plus élevés chez les non-survivants (0,69 $\mu\text{g/mL}$) que chez les survivants (0,47 $\mu\text{g/mL}$) au jour 1.

I.1.4 Haptoglobine (HP)

L'haptoglobine est une protéine qui permet de capturer et détoxifier l'hémoglobine pendant l'hémolyse³⁵⁶. L'haptoglobine fixe et stabilise l'hémoglobine afin de l'éliminer de la circulation par le récepteur CD163 spécifique des macrophages³⁵⁷. Cependant, dans certaines conditions, comme le sepsis, il y a diminution de l'haptoglobine, ce qui entraîne une augmentation et accumulation de l'hémoglobine libre dans le plasma³⁵⁷. L'hème de l'hémoglobine libre peut être oxydé en présence d' H_2O_2 et les radicaux produits entraînent des dommages cellulaires et tissulaires³⁵⁸. Son rôle protecteur dans les poumons a été étudié par Yang *et al.*³⁵⁹ à l'aide d'un modèle de souris transgénique surexprimant l'haptoglobine dans les macrophages alvéolaires. Ils ont démontré que l'haptoglobine diminuait les lésions pulmonaires induites par l'hémoglobine. L'effet protecteur de l'haptoglobine a été étudié notamment, dans un modèle animal de souris dont le choc septique était induit par le LPS : Arredouani *et al.*³⁶⁰ ont montré par injection d'haptoglobine aux souris que cette dernière avait la capacité de

diminuer les biomarqueurs de l'inflammation (TNF- α , IL-10, IL-12). Les niveaux plasmatiques d'haptoglobine dans les premières 24 h de l'admission ont donc été étudiés notamment par Janz *et al.*³⁶¹ qui ont montré que des concentrations plasmatiques d'haptoglobine plus élevées chez les patients septiques étaient associées à une diminution du risque de mortalité avec une concentration médiane de 1234 $\mu\text{g/mL}$ chez les survivants et 750 $\mu\text{g/mL}$ chez les non-survivants. Ainsi, le potentiel rôle protecteur de l'haptoglobine circulante et sa diminution chez les patients septiques non-survivants nous ont amené à sélectionner et évaluer ce biomarqueur candidat dans le cas de patients plus graves atteints d'un choc septique.

I.1.5 Glycoprotéine alpha-1-acide (AGP)

La glycoprotéine alpha-1-acide (AGP), aussi connue sous le nom d'orosomucoïde, est l'une des principales protéines de la phase aiguë. L'AGP est principalement sécrétée par les hépatocytes en raison de la réponse systémique à l'inflammation qui suit divers stimuli comme les traumatismes physiques, blessures, infections bactériennes³⁶². La surexpression hépatique de l'AGP est régulée par des cytokines pro-inflammatoires et chimiokines, notamment IL-1, IL-6, CXCL8³⁶². L'AGP appartient à la famille des lipocalines, un groupe de protéines qui se lient et transportent de petites molécules hydrophobes, et appartient également à une sous-famille de protéines, les immunocalines qui partagent une activité qui modulent les réponses immunitaires et inflammatoires³⁶³. AGP interagit avec les monocytes et permet de diminuer leurs effets afin de réguler à la baisse la réponse inflammatoire³⁶⁴, mais ses fonctions biologiques ne sont pas clairement identifiées. De plus, il a été démontré que l'AGP pouvait se lier à plus de 300 molécules différentes et également des molécules toxiques produits par des micro-organismes, comme les lectines et le LPS^{365,366}. L'AGP peut donc avoir un effet protecteur dans le cas de sepsis. De plus, il a été montré que l'AGP en surface de l'endothélium permettait le maintien de la perméabilité capillaire et donc maintenait les perfusions d'organes et protégeait des dysfonctions d'organes dans des modèles de choc septique chez les rats³⁶⁷. Ainsi, Barroso-Sousa *et al.*³⁶⁸ ont montré chez des patients atteints de sepsis grave et choc septique que, les non-survivants (132,2 $\mu\text{g/mL}$) étaient caractérisés par des taux plus bas d'AGP au moment de leur admission comparés aux survivants (179,8 $\mu\text{g/mL}$). Ainsi, par ses effets anti-inflammatoires pouvant permettre de prévenir les dommages tissulaires permanents causés par les protéases neutrophiles, ses propriétés sur la protection de la perméabilité vasculaire permettant la perfusion et le fonctionnement normal des organes, ses propriétés antimicrobiennes et sa valeur pronostique entre survivants et non-survivants chez des patients septiques graves et atteints de choc septique, il nous a semblé intéressant d'ajouter ce biomarqueur candidat à notre liste.

I.1.6 Protéine de liaison au lipopolysaccharide (LBP)

La protéine de liaison aux lipopolysaccharides (LBP) est une protéine de 58 kDa qui est synthétisée dans le foie. Elle augmente la sensibilité des monocytes et des granulocytes aux LPS en facilitant la liaison du LPS et des endotoxines à CD14, exprimé à la surface des cellules myéloïdes³⁶⁹. Il en résulte la phagocytose et la clairance des bactéries^{370,371}. Le LBP a donc un rôle protecteur contre les endotoxines et les bactéries pathogènes. Dans des circonstances normales, les taux sériques de LBP varient entre 5 et 15 µg/mL mais augmentent lors de la réponse en phase aiguë³⁷². Les niveaux plasmatiques de LBP dans les premières 24 h de l'admission ont donc été étudiés notamment par Opal *et al.*³⁷³ qui ont montré que des concentrations plasmatiques de LBP plus élevées chez les patients septiques étaient associées à une diminution du risque de mortalité avec une concentration médiane de 33,2 µg/mL chez les survivants et 28,0 µg/mL chez les non-survivants. Ainsi, le rôle protecteur de LBP et son augmentation chez les patients septiques survivants nous ont amené à sélectionner et évaluer ce biomarqueur candidat dans le cas de patients plus graves atteints d'un choc septique.

I.1.7 Récepteur soluble pour produits finis de glycation avancée (sRAGE pour soluble receptor for advanced glycation end products)

RAGE est un récepteur multiligand de la superfamille des immunoglobulines des molécules de surface cellulaire^{374,375}. RAGE comme son nom l'indique est récepteur des produits finis de glycation avancée (AGE). En plus des AGE, RAGE se lie notamment aux S100³⁷⁶ et à HMGB1³⁷⁷ et active les voies responsables de l'inflammation aiguë et chronique. En 1999, l'analyse de l'ADN complémentaire a révélé un clone codant seulement la partie extracellulaire soluble du récepteur, il s'agit donc d'une forme sécrétée³⁷⁸. En 2008, trois groupes indépendants ont également montré un clivage de RAGE par des métalloprotéases à qui il manque également la partie membranaire³⁷⁹⁻³⁸¹. Ainsi, les formes sécrétées et clivées représentent les formes solubles sRAGE. Cependant, il a été montré que la forme sécrétée de RAGE représentait une faible proportion de sRAGE et peu d'informations sont connus quant à leur régulation^{380,382}. Les formes sRAGE agissent comme des leurres, empêchant l'activation de RAGE par ses ligands. Bopp *et al.*³⁸³ ont montré que chez des patients atteints de sepsis sévères et choc septique, les non-survivants avaient un niveau plus élevé de sRAGE que les survivants (2302 pg/mL *versus* 1326 pg/mL). Yamagishi *et al.*³⁸⁴ suggèrent que les taux circulants de sRAGE pourraient représenter le RAGE membranaire, et donc représenter un marqueur de dommages cellulaires. Cependant, Achouiti *et al.*³³⁰ n'ont pas observé d'augmentation de sRAGE chez des patients atteints de sepsis grave. Malgré des faibles concentrations, et des résultats contradictoires concernant ce récepteur soluble, il nous a semblé intéressant de vérifier sa pertinence pronostique.

I.1.8 Angiopoïétine-1 et angiopoïétine-2

Les protéines angiopoïétine-1 (ANG1) et angiopoïétine-2 (ANG2) jouent des rôles importants dans la régulation de l'intégrité et le remodelage vasculaire. ANG1 et ANG2 ont des rôles distincts : la liaison de ANG1 avec le récepteur Tie2 induit une stimulation de la survie et de la migration des cellules endothéliales et réduit la perméabilité vasculaire en réponse à des stimuli inflammatoires³⁸⁵, alors que ANG2 agit comme un ligand antagoniste et inhibe la liaison d'ANG1 à Tie2, ce qui entraîne une déstabilisation des vaisseaux³⁸⁶. L'endothélium, soit la couche la plus interne des vaisseaux sanguins, est une cible clé des événements induits par le sepsis avec un recrutement des leucocytes, une altération du tonus vasomoteur, une thrombose vasculaire et finalement une perméabilité des capillaires sanguins^{387,388}. Huang *et al.*³⁸⁹ ont observé que des souris ayant reçu des injections d'ANG1 avant l'administration d'endotoxines présentaient un taux de survie plus important que celles qui n'en avaient pas reçues. David *et al.*³⁹⁰ ont montré que les taux d'ANG2 circulant étaient proportionnels à la gravité des patients admis au service d'urgence avec une infection soupçonnée et augmentaient avec le temps chez les non-survivants. Ainsi, Fang *et al.*³⁹¹ ont étudié le ratio ANG2/ANG1 chez 440 patients septiques (SRIS, sepsis, sepsis grave et choc septique) et ont montré que les concentrations d'ANG1 diminuaient avec la gravité (contrôle : 9,54 ng/mL, SRIS : 9,11 ng/mL, sepsis : 7,57 ng/mL, sepsis grave : 5,32 ng/mL et choc septique : 3,06 ng/mL) et que celles d'ANG2 augmentaient (contrôle : 3,41 ng/mL, SRIS : 5,42 ng/mL, sepsis : 13,0 ng/mL, sepsis grave : 18,7 ng/mL et choc septique : 15,7 ng/mL). Ils ont également montré que le ratio ANG2/ANG1 était supérieur chez les non-survivants par rapport aux survivants. Ainsi, ANG1 a un potentiel effet protecteur contre la perméabilité des vaisseaux sanguins et donc le dysfonctionnement des organes, tandis que ANG2 serait associée à la gravité du sepsis et au dysfonctionnement des organes. L'étude de ces deux biomarqueurs nous a donc semblé utile afin de surveiller l'aspect hautement important de la perméabilité vasculaire et donc de l'hypotension qui peut causer les dysfonctions d'organes.

I.1.9 NGAL

La lipocaline associée à la gélatinase neutrophile (NGAL pour *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) est une protéine de la phase aiguë³⁹² exprimée dans les neutrophiles initialement, mais qui est également exprimée dans les cellules rénales, hépatiques et épithéliales en réponse à divers états pathologiques³⁹³. L'expression de NGAL peut être induite de manière significative lors de lésions épithéliales et notamment tubulaires rénales³⁹⁴. En effet, NGAL est essentiellement étudié en tant que biomarqueur d'insuffisance rénale aiguë^{395,396}. NGAL possède également des effets antibactériens en tant que piègeur de fer, elle peut se lier aux sidérophores bactériens, réduisant le fer disponible et inhibant ainsi la croissance bactérienne³⁹⁷. Ainsi, des études en culture cellulaire ont montré une augmentation de l'expression de NGAL après une stimulation par LPS³⁹⁸. De plus, des souris déficientes

en NGAL ont montré une plus grande susceptibilité aux infections bactériennes^{396,399}. Cependant, Otto *et al.*⁴⁰⁰ ont montré que les concentrations plasmatiques de NGAL étaient fortement influencées par l'inflammation dans des conditions infectieuses (sepsis infectieux 381,7 ng/mL) ou pas (inflammation chronique 98,2 ng/mL). Les auteurs affirment également que chez les patients atteints d'un sepsis grave et souffrant souvent d'insuffisance rénale aiguë, l'augmentation de NGAL dans le plasma peut être interprétée à tort comme étant exclusivement d'origine rénale plutôt que d'origines rénale et inflammatoire combinées. Ainsi, ils estiment que la valeur prédictive de NGAL dans le plasma en termes de fonction rénale pourrait être davantage liée à l'inflammation qu'aux lésions rénales elles-mêmes. De plus, il a été montré que NGAL plasmatique était significativement plus élevée chez les patients atteints d'insuffisance rénale aiguë septique que chez les patients atteints d'insuffisance rénale aiguë non septique, tandis que les caractéristiques rénales étaient comparables entre les deux groupes⁴⁰¹. Ainsi, NGAL pourrait représenter un biomarqueur global de l'inflammation. Concernant l'aspect pronostique de NGAL, Kim *et al.*⁴⁰² ont montré une augmentation (non-significative) de NGAL chez les non-survivants (548.5 ng/mL) par rapport aux survivants (407 ng/mL) chez 167 patients septiques. Cependant, Md Ralib *et al.*³⁹⁵ ont observé une différence significative de concentration entre survivants et non-survivants (P=0,001) sur 225 patients septique. Ainsi, les effets antibactériens, la corrélation avec l'inflammation et l'augmentation avec le risque de mortalité nous ont semblé des aspects pertinents pour évaluer NGAL en tant que biomarqueur pronostique du choc septique.

I.1.10 Antigène leucocytaire humain G (HLA-G)

L'épissage alternatif lors de la transcription du gène de l'antigène leucocytaire humain G (HLA-G pour *human leukocyte antigen-G*) conduit à la production de sept protéines HLA-G liées à la membrane (HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4) ou solubles (HLA-G5, HLA-G6, HLA-G7)⁴⁰³. Ces HLA-G diffèrent par leur nombre de domaines globulaires et leur présence ou absence de séquences introniques. HLA-G5 est l'homologue soluble de HLA-G1, et HLA-G5 peut être sécrétée ou libérée par clivage de HLA-G1⁴⁰⁴. Dans des conditions non pathologiques, l'expression des HLA-G est très spécifique à des tissus et peut être détectée dans les cellules trophoblastiques (couche cellulaire qui limite l'œuf), la cornée, le pancréas, les cellules épithéliales bronchiques, et dans les fluides comme le plasma^{404,405}. LILRB1 et LILRB2 sont les principaux récepteurs des HLA-G des cellules immunitaires périphériques⁴⁰⁶. Ainsi, l'interaction avec ces récepteurs inhibe l'immunité innée et l'inhibition de la prolifération, l'activation, la maturation et la sécrétion d'anticorps⁴⁰³. La protéine HLA-G5 a la particularité d'induire l'apoptose des cellules T et CD8. De plus, chez les patients transplantés, une augmentation de HLA-G5 est associée à une meilleure tolérance des greffes de cellules souches, alors que chez les patients atteints de cancer, l'augmentation des niveaux de HLA-G5 pourraient participer à un échec des réponses immunitaires pour les tumeurs⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹. Ainsi, Monneret *et al.*⁴¹⁰ ont voulu étudier les niveaux de HLA-G5 chez des patients en état de choc septique afin de connaître la contribution d'HLA-G5 dans l'immunosuppression induite

par le sepsis. Ils ont alors observé que l'augmentation des taux de HLAG5 était prédictive de la survie chez les patients en état de choc septique avec des niveaux aux jours 1-2 chez les non-survivants de 37 ng/mL et chez les survivants de 109 ng/mL. Selon les auteurs, cette diminution significative chez les non-survivants peut être due à une augmentation des récepteurs LILB1 et LILRB2 induisant un complexe avec HLAG5 et donc une diminution de son taux circulant. De plus, l'augmentation initiale de HLAG5 chez les survivants pourrait réguler la pro-inflammation induite par le choc septique et donc refléter une réponse appropriée et efficace face au processus inflammatoire. L'immunosuppression induite par HLAG5 en réponse au processus inflammatoire lors d'un choc septique et son potentiel pouvoir prédictif nous ont donc amené à ajouter cette protéine à notre liste de biomarqueurs à vérifier.

I.1.11 CD74

CD74 est une glycoprotéine transmembranaire et sa forme soluble a été identifiée pour la première fois dans le sérum de patients atteints d'une maladie auto-immune du foie⁴¹¹ puis dans le sérum de patients atteints de lésions pulmonaires aiguës⁴¹². CD74 permet la formation, la maturation et le transport des molécules CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité). Les molécules CMH II sont des glycoprotéines essentielles pour la discrimination entre le soi et le non-soi. Elles sont exprimées dans les cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules B, les cellules dendritiques ou les macrophages. Wu *et al.*⁴¹² ont montré que le macrophage était l'une des sources cellulaires de CD74 soluble et que sa production n'était pas due à la mort cellulaire ou à l'apoptose des macrophages. Cependant, le mécanisme précis de la production de CD74 soluble reste à élucider⁴¹². De plus, les auteurs ont observé une augmentation de CD74 soluble dans des souris ayant reçu des injections de LPS, que cette augmentation était corrélée aux marqueurs d'inflammation et que CD74 soluble induisait la production de cytokines inflammatoires. Chez les patients sains, on retrouve un taux circulant de CD74 autour de 20 ng/mL⁴¹³. Cazalis *et al.*⁴¹⁴ ont montré qu'une diminution de l'expression de l'ARN messager de CD74 pouvait prédire la mortalité à 28 jours des patients atteints d'un choc septique. Il nous a donc semblé intéressant de doser la forme soluble de CD74 afin d'évaluer son caractère pronostique.

I.1.12 Granulines

Chaque protéine de granuline est clivée à partir de la progranuline par des protéases. Pendant l'inflammation, les neutrophiles et macrophages libèrent des protéases qui digèrent la progranuline en granulines⁴¹⁵. La progranuline et les granulines semblent avoir des rôles différents notamment dans l'inflammation où les granulines seraient pro-inflammatoires contrairement à la progranuline qui tend à supprimer l'inflammation⁴¹⁶. Des études *in vitro* suggèrent que l'ajout de granulines jouent un rôle pro-inflammatoires en permettant aux cellules épithéliales cultivées de sécréter l'interleukine-8, un puissant

agent chimiattracteur des monocytes et des neutrophiles⁴¹⁷. Peu d'études ont été menées sur les granulines et seulement une seule concernant le sepsis. Malmström *et al.*¹³⁵ sont pour l'instant les seuls qui ont étudié et montré une diminution des granulines dans l'analyse des protéines dérivées de neutrophiles libérées par des patients septiques. Les concentrations endogènes de la progranuline, précurseur des granulines ont été déterminés à 152,4 ng/mL chez les patients sains⁴¹⁸. Comme les taux de granulines diminuent avec le sepsis, ce biomarqueur potentiel est considéré comme faiblement concentré. Ainsi, ce candidat n'ayant pas encore été confirmé, il nous a semblé pertinent de l'ajouter à notre liste de biomarqueur à vérifier.

I.1.13 Amphiréguline

L'amphiréguline est un ligand du récepteur du facteur de croissance épidermique. En se liant à ce récepteur, l'amphiréguline active les principales cascades de signalisation intracellulaire qui régissent la survie et la prolifération des cellules⁴¹⁹. Elle est exprimée de façon constitutive par un certain nombre de cellules épithéliales et mésenchymateuses (tissu de soutien embryonnaire à l'origine de diverses formes de ces tissus chez l'adulte). Dans le contexte inflammatoire, les cellules immunitaires comme les neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules T peuvent également exprimer l'amphiréguline⁴²⁰. Il a été montré que la production d'amphiréguline lors de l'inflammation participait aux mécanismes de défense et de réparation des tissus^{421,422}. Cependant, la surexpression d'amphiréguline a également été associée à la production de cytokines pro-inflammatoires dans la polyarthrite rhumatoïde⁴²³. La surexpression de l'amphiréguline dans les cas de cancer est également associée au développement des tissus malins et à la progression de la maladie^{424,425}. Actuellement, l'amphiréguline n'a jamais été étudiée dans le cadre du sepsis. L'équipe du service de réanimation de l'hôpital Lariboisière anciennement dirigée par le professeur Didier Payen avait identifié par transcriptomique ce potentiel biomarqueur pour le pronostic du sepsis. C'est pourquoi, la nouveauté de ce biomarqueur candidat nous a poussé à l'ajouter à notre liste de protéines à doser.

I.1.14 HMGB1

HMGB1 (pour *high-mobility group box 1*) est une protéine chromatine qui se lie à l'ADN de façon transitoire et réversible. HMGB1 est impliquée dans la formation des nucléosomes, dans la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN⁴²⁶. HMGB1 fait partie de la famille des DAMPs. Il a été démontré que HMGB1 peut être sécrété passivement au moment de la mort cellulaire ou activement dans des conditions de stress⁴²⁷. Si elle n'est pas régulée, une libération excessive de HMGB1 contribue négativement à la pathogenèse des maladies inflammatoires provoquées à la fois par l'infection et par les blessures⁴²⁸. En effet, HMGB1 permet le recrutement des neutrophiles, des monocytes et des macrophages, et est capable d'induire la production et la libération des cytokines et chimiokines qui

élargissent les dommages de façon systémique³⁹. HMGB1 est donc largement étudiée dans le cas du sepsis. Dans des conditions physiologiques, les niveaux circulants de HMGB1 sont très bas (< 1 ng/mL⁴²⁹). Gibot *et al.*⁴²⁹ ont montré qu'il y a une augmentation (non-significative) des concentrations de HMGB1 circulant dans les trois premiers jours chez les non-survivants et que seulement à partir du 3^{ème} jour, les différences de concentrations entre survivants (2,7 ng/mL) et non-survivants (18,2 ng/mL) sont significatives. De la même façon, bien qu'augmentée chez les patients septiques par rapport aux patients sains, Karlsson *et al.*⁴³⁰ n'ont pas trouvé de différence significative entre les survivants et non-survivants dans les premières 24 h. De plus, l'équipe du service de réanimation de l'hôpital Lariboisière avait identifié par transcriptomique ce potentiel biomarqueur pour le pronostic du sepsis. Son rôle de DAMP et les résultats contradictoires pour la prédiction de la mortalité des patients septiques nous ont amené à vérifier l'intérêt de ce potentiel biomarqueur pour le pronostic des patients atteints de choc septique.

I.1.15 Procalcitonine

La procalcitonine (PCT) étant la protéine la plus connue et la plus utilisée pour le sepsis, une section a déjà été développée à son propos dans l'introduction (II.2.2 La procalcitonine (PCT)). Comme vu précédemment, son statut de biomarqueur diagnostique et pronostique est remis en cause. C'est pourquoi, ce biomarqueur « historique » a été ajouté à notre liste de biomarqueurs à vérifier.

I.1.16 Récapitulatif des concentrations des biomarqueurs potentiels

Les concentrations endogènes plasmatiques retrouvées d'après la littérature chez les patients sains et les patients septiques ont été résumées dans le Tableau 16. La gamme de concentrations de ces protéines est large et nécessite d'étudier ces biomarqueurs en deux groupes de concentrations distincts :

- les protéines fortement concentrées avec des concentrations > 1 µg/mL, qui ne nécessitent pas un immunoenrichissement afin d'être quantifiées
- les protéines faiblement concentrées avec des concentrations < 1 µg/mL, qui nécessitent un immunoenrichissement.

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

Tableau 16 Récapitulatif des concentrations endogènes plasmatiques des biomarqueurs potentiels

Protéine	Contrôle	Sepsis	Référence
SAA	20-50 µg/mL	S : 74,54 µg/mL NS : 69,96 µg/mL	345, 347
CRP	< 6 µg/mL	S : 128,3 µg/mL NS : 197,1 µg/mL	347
VWF	0,1 µg/mL	S : 0,47 µg/mL NS : 0,69 µg/mL	355
HP	500 µg/mL	S : 750 µg/mL NS : 1234 µg/mL	361
AGP		S : 132,2 µg/mL NS : 179,8 µg/mL	368
LBP	4,1 µg/mL	S : 33,2 µg/mL NS : 28 µg/mL	373
sRAGE	1026 pg/mL	S : 1326 pg/mL NS : 2302 pg/mL	383
ANG-1	9,54 ng/mL	Choc septique : 3,06 ng/mL	391
ANG-2	3,41 ng/mL	Choc septique : 15,7 ng/mL	391
NGAL	130 ng/mL	S : 407 ng/mL NS : 548 ng/mL	402
HLAG5	200 ng/mL	S : 109 ng/mL NS : 37 ng/mL	410
CD74	20 ng/mL		413
GRAN	28,5 ng/mL		431
AMPH	1 ng/mL		432
HMGB1	0,43 ng/mL	S : 2,7 ng/mL NS : 18,2 ng/mL	429
PCT	< 1 ng/mL	Choc septique : 4-45 ng/mL	116

S : survivants, NS : non-survivants

1.2 La méthode SISCAPA

Un des enjeux principaux de la quantification de protéines et de la **vérification de biomarqueurs** protéiques est de pouvoir atteindre des **sensibilités** toujours plus basses avec une grande précision et une bonne plage de réponse linéaire dans des **matrices biologiques** qui contiennent une large gamme dynamique de concentrations de protéines. Le seuil inférieur de détection par MS des protéines dans un digest de plasma non fractionné par cette approche semble se situer aux alentours de 1-20 µg/mL de concentration plasmatique, ce qui limiterait l'analyse aux quelques 100 premières protéines du plasma⁴³³. La sensibilité des méthodes MS peut être augmentée en fractionnant l'échantillon. Par exemple, l'immunodéplétion des six protéines plasmatiques les plus abondantes élimine environ 85% de la masse protéique⁴³⁴. Cependant, l'augmentation du fractionnement de l'échantillon entraîne les inconvénients d'un coût et d'un temps accrus et le risque de perdre des protéines d'intérêt.

Afin de valider des biomarqueurs protéiques dont la concentration atteint le ng/mL, voire le pg/mL dans des fluides biologiques, des outils sensibles de haute qualité et validés sont nécessaires. Les immunoessais sont parmi les méthodes les plus sensibles. Cependant, les tests de haute qualité ne sont développés que pour des biomarqueurs validés d'utilité établie. Or, le développement pour chaque dosage est long, difficile et coûteux. Il était donc nécessaire de développer une technologie qui

permettent de doser rapidement de façon sensible et quantitative un grand nombre de protéines dans des échantillons biologiques. L'approche **SISCAPA** développée par Anderson *et al.*²²⁴ combine quatre éléments : (1) la digestion des protéines d'un échantillon en peptides, (2) l'ajout de peptides étalons internes marqués aux isotopes stables, (3) l'enrichissement des peptides faiblement concentrés par immunocapture *via* des anticorps anti-peptide immobilisés, (4) la séparation par LC et la quantification par MS/MS. En combinant ces quatre éléments, la méthode SISCAPA permet l'enrichissement spécifique et la quantification de peptides protéotypiques à partir de mélange complexes et peut donc servir d'outil de recherche important pour la vérification de biomarqueurs dans des matrices biologiques comme le plasma.

La précision et la reproductibilité de la méthode sont obtenues grâce à l'incorporation de standards internes peptidiques SIL. Ils permettent la normalisation de la capture par les anticorps et possèdent des propriétés physico-chimiques identiques aux peptides endogènes, y compris le temps de rétention en chromatographie et ne diffèrent de l'analyte endogène que par la masse des ions parents et fragments. Ainsi, toute matrice qui provoque la suppression du signal de l'analyte affecte également le signal de peptide standard interne de manière équivalente, et ces effets sont donc compensés. De plus, le peptide SIL peut être fabriqué par synthèse peptidique automatisée. De tels peptides peuvent être fabriqués commercialement à un coût raisonnable et sont plus facilement obtenus que des protéines entières, dont la production et la caractérisation sont beaucoup plus coûteuses et prennent beaucoup plus de temps. De plus, l'immunoprécipitation d'un peptide, qui est linéaire, car composé de 8 à 15 acides aminés, est plus « simple » à standardiser que l'immunoprécipitation d'une protéine dont la conformation endogène peut différer de la conformation d'une protéine recombinante utilisée pour la normalisation du signal. Cependant, l'ajout de peptides standards internes ne permet pas de normaliser l'étape de **digestion**.

Des anticorps anti-peptides sont utilisés afin d'immunoenrichir les peptides issus des protéines d'intérêt à quantifier. La production **d'anticorps anti-peptide** est une pratique courante qui fait appel à des immunogènes peptidiques synthétiques, plus faciles à obtenir qu'une protéine entière. Un peptide est habituellement trop petit pour induire une réponse immunitaire et obtenir des bons anticorps de haute affinité. Le poids minimum nécessaire pour induire une réponse immunitaire suffisante est d'environ 5 kDa⁴³⁵. Pour être immunogénique, le peptide doit être conjugué à une **protéine porteuse** de plus grande taille. Les protéines porteuses pouvant être utilisées sont le KLH, l'ovalbumine ou la BSA (*Bovine Serum Albumin*). Les peptides sont synthétisés avec une cystéine supplémentaire en N- ou C-terminale dont la fonction thiol est utilisée pour former une liaison covalente avec la protéine porteuse²²⁴. Les anticorps utilisés dans la méthode SISCAPA peuvent être polyclonaux^{224,436,226} ou monoclonaux^{437,438}. Des ensembles d'**immunisations multiplexes** allant de 1 à 5 peptides ont été testées avec succès⁴³⁹. L'étude de Whiteaker *et al.*⁴³⁹ a montré que le coût de développement d'une méthode SISCAPA peut être réduite de 80% en multiplexant les immunisations avec au moins 5 peptides par lapin. En effet, un coût important de la production d'une méthode SISCAPA est le coût de production des anticorps anti-

peptide, en particulier pour l'entretien et la manipulation des animaux. Il est donc nécessaire de minimiser le nombre d'animaux.

Un des avantages non négligeables de la méthode SISCAPA est le **multiplexage**. Il est possible de multiplexer à la fois la préparation d'échantillons avec des immunoprécipitations dirigés contre plusieurs peptides puis de multiplexer les analyser par MS en ciblant ces mêmes peptides. Lors de son développement en 2004 par Anderson *et al.*²²⁴ la méthode dosait quatre protéines du plasma avec quatre peptides. Récemment, Ippoliti *et al.*²²⁶ a pu multiplexer plus de 100 peptides. Une étape essentielle est néanmoins la sélection des peptides qui seront ciblés par les anticorps et la spectrométrie de masse.

II. Matériel et Méthodes

III.1 Réactifs et tampons

Les différents solvants : eau (ChromaSolve LC-MS), acétonitrile (HPLC-grade) et méthanol proviennent de chez Honeywell (Seelze, Allemagne). Le dithiothréitol (DTT), l'iodoacétamide (IAA), la trypsine de pancréas bovin, le N α -tosyl-L-lysine chlorométhyl cétone hydrochloride (TLCK), le PBS Tween20 (0,05%), l'acide acétique et l'ammonium bicarbonate viennent de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Les unités de filtration par centrifugation Nanosep 10 K Omega (Pall) proviennent de chez Life Sciences. Les billes magnétiques Dynabeads M-280 tosylactivés (Invitrogen), les peptides SIL (PEPotec SRM grade), l'acide formique et le robot KingFisher Duo Prime proviennent de chez Thermo Fisher Scientific (Paisley, UK). Toutes les expériences ont été effectuées en tubes LoBind de chez Eppendorf (Hamburg, Allemagne). Les peptides utilisés pour l'immunisation proviennent de chez GeneCust. Les quarante souris *Biozzi* ont été élevées à l'unité de soins du CEA (Gif-sur-Yvette, France). La plaque pour analyse MALDI-TOF MTP AnchorChip 384 BC provient de chez Bruker. La BSA, le Tween 20, la NHS-LC-biotine, 6-Maleimidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (SMC), le N-ethylmaleimide (NEM), l'acide trifluoroacétique et la streptavidine proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Des anticorps polyclonaux IgG et IgM anti-souris de chèvre proviennent de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Pour les immunoessais, les plaques de microtitration à 96 puits (Maxisorp) sont de Nunc (Roskilde, Danemark). Le tampon EIA est composé de phosphate 0,1 M pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,1% de sérum-albumine bovine (BSA) et 0,01% d'azide de sodium. Les plaques ont été lavées en tampon de lavage contenant du phosphate 0,01 M pH 7,4 et 0,05 % de Tween 20. Le lavage et la lecture des plaques de microtitration ont été réalisés à l'aide d'un laveur automatique de plaques (Bio Tek ELX405, Winooski, VT, USA) et d'un lecteur Multiskan Ex Thermo, respectivement.

III.2 Les peptides

La sélection des peptides se fait à partir d'une digestion *in silico* des protéines sélectionnées pour obtenir une base de données des peptides possibles. Pour maximiser les chances d'obtenir au moins un bon dosage par protéine cible, il est préférable de sélectionner de multiples peptides protéotypiques dérivés d'une seule protéine. Les peptides sélectionnés sont donnés dans les Tableau 17 (protéines majoritaires) et Tableau 18 (protéines minoritaires). Leur place dans les séquences d'acides aminés des protéines, les acides aminés qui les précèdent et qui les suivent, et leur longueur sont donnés pour chaque peptide. Les peptides utilisés pour les immunisations sont donnés dans le Tableau 18 et possèdent en plus une cystéine en C-terminale pour le couplage avec la BSA (protéine porteuse).

Tableau 17 Peptides sélectionnés pour la méthode multiplexe des protéines fortement concentrées

protéines	AA	pre AA	peptides	post AA	longueur (AA)
sérum amyloïd A	25-33	R	EANYIGSDK	G	9
	47-61	R	GPGGVWAAEAISDAR	E	15
	67-86	R	FFGHGAEDSLADQAANEWGR	S	20
protéine C-reactive	14-23	K	ESDTSYVSLK	A	10
	47-56	R	GYSIFS YATK	R	10
	47-57	R	GYSIFS YATKR	Q	11
facteur de von Willebrand	205-212	K	ALSVVWDR	H	8
	1298-1307	R	LSEAEFEVLK	K	10
	1820-1830	R	VTVPPIGIGDR	Y	11
haptoglobine	143-151	R	ILGGHLDK	G	9
	152-159	K	GSFPWQAK	M	8
	259-267	R	VG YVSGWGR	N	9
	373-382	K	VTSIQDWVQK	T	10
alpha-1-acide glycoprotéine	39-54	K	SVQEIQATFF YFTP NK	T	16
	55-62	K	TEDTIFLR	E	8
	43-51	K	WFYIASAFR	N	9
protéine de liaison au lipopolysaccharide	31-41	R	ITLPDFTGDLR	I	11
	99-108	K	LQGSFDVSVK	G	10
	355-371	R	LSVATNVSATLTFNTSK	I	16

Légende : AA : acide aminé

Tableau 18 Peptides sélectionnés pour la méthode SISCAPA

protéines	AA	pre AA	peptides	post AA	longueur (AA)
procalcitonine	29-47	R	SALESSPADPATLSEDEAR	L	19
	62-71	K	ASELEQEQR	E	10
	72-80	R	EGSSLDSR	S	9
sRAGE	63-77	K	VLSPQGGPWDSVAR	V	15
	78-98	R	VLPNGSLFLPAVGIQDEGIFR	C	21
	315-336	R	AVSISIEPGGEGPTAGEGFDK	V	22
angiopoïétine-1	69-81	R	DAPHVEPDFSSQK	L	13
	144-157	K	LTDVETQVLNQTSR	L	14
	330-338	R	EDGSLDFQR	G	9
angiopoïétine-2	67-78	R	DAPLEYDDSVQR	L	12
	233-245	K	IVTATVNNSVLQK	Q	13
	412-425	K	ISSISQPGNDFSTK	D	14
NGAL	35-49	K	VPLQQNFQDNQFQK	W	15
	102-118	R	TFVPGCQPGFTLGNIK	S	17
	118-128	K	SYPLTSLYLR	V	11
	82-91	K	SYNVTSLFR	K	10
HMGB1	114-126	K	GEHPGLSIGDVAK	K	13
	129-141	K	LGEMWNNTAADDK	Q	13
	29-43	K	KKHPDASVNFSEFSK	K	15
HLAG-5	111-120	R	GYEQYAYDGK	D	10
	186-201	K	THVTHHPVFDYEATLR	C	16
	243-255	K	WAAVVVPSGEEQR	Y	13
CD74	80-93	K	LTVTSQNLQLENLR	M	14
	159-166	K	GSFPENLR	H	8
	196-208	R	HSLEQKPTDAPPK	V	13
granuline	263-272	K	ENATDLLTK	L	10
	418-427	R	GSEIVAGLEK	M	10
	497-509	K	EVVSAQPATFLAR	S	13
amphiréguline	15-25	K	TESENTSDKPK	P	11
	61-71	K	YIEHLEAVTCK	C	11
	72-80	K	CQQEYFGER	C	9

légende : AA : acide aminé

III.3 Production des anticorps anti-peptide (SISCAPA)

III.3.1 Couplage des peptides

III.3.1.a Couplage des peptides avec la BSA-SMC

- **Couplage de la BSA avec le bras SMC**

Afin de coupler le SMC à la BSA, 150 mg de BSA (soit 2,23 μ mol) ont été repris dans 2,5 mL de tampon phosphate 10 mM pH 7,4 puis 205 μ L de NEM à 12,5 mg/mL en tampon phosphate 10 mM pH 7,4 ont été ajoutés. Le mélange a été agité pendant 30 min à l'obscurité. A la fin de l'agitation, 68,75 mg (soit

223 μmol) de SMC sont repris en DMF anhydre et ajoutés au mélange. La solution a ensuite été agitée pendant 30 min à l'obscurité. Afin d'éliminer l'excès de NEM et de SMC, la solution a été filtrée sur gel d'exclusion. Le produit de couplage de la BSA avec le SMC est noté BSA-SMC.

- **Couplage de la BSA-SMC avec les peptides**

Les peptides ont été pesés afin d'obtenir 0,4 μmol de chaque. Chaque peptide a été repris avec 5 μL de méthanol et 195 μL de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6,0 et ajouté à 50 μl de solution de BSA-SMC. Le mélange a été incubé sur la nuit à 4 °C puis conservé à -20 °C avant utilisation. Le produit de couplage des peptides avec la BSA-SMC est noté BSA-SMC-peptide.

III.3.1.b Vérification des couplages

Afin de vérifier les couplages, une analyse sur MALDI-TOF a été effectuée. Pour cela, 1 mL d'une solution d'acide sinapinique saturante en 50% acétonitrile et 0,1% d'acide trifluoroacétique a été préparée afin de servir de matrice. Chaque solution de BSA-SMC-peptide a été diluée au quart dans cette matrice, soit 5 μL de BSA-SMC-peptide dans 15 μL de matrice et 1 μL de chaque solution diluée a été déposé sur plaque afin d'être analysé en MALDI-TOF. De la même façon, les solutions de BSA et de BSA-SMC ont été diluées dans la matrice et analysées. Ainsi, les masses de la BSA, de la BSA-SMC et de BSA-SMC-peptide ont été comparées afin de déterminer le nombre de bras SMC couplés et le nombre de peptides couplés.

III.3.2 Immunisation des souris

Pour chaque protéine, les trois préparations des BSA-SMC-peptide par protéine ont été regroupées. Des souris *Biozzi* âgées de 10 semaines ont été immunisées séparément avec les solutions poolées. Ainsi, quatre souris par protéine ont été immunisées. Quatre injections intrapéritonéales de 50 μg d'immunogène (équivalent en BSA de BSA-SMC-peptide) avec de l'alun, utilisé comme adjuvant, ont été réalisées sur chaque souris. Les injections ont été espacées de trois semaines. Afin de suivre la réponse immunitaire des souris, un prélèvement sanguin a été effectué le jour de la première injection (saignée pré-immune) qui servira de contrôle puis deux semaines après chaque injection (saignée n^ox). Les animaux ont ensuite été laissés au repos pendant deux mois après le dernier rappel. Sur les quatre souris, les deux souris ayant les meilleures réponses immunitaires ont été sélectionnées afin de recevoir trois jours de suite un « boost » de 50 μg de protéine par injection intra-veineuse avant de les sacrifier et prélever leur rate (cf Chapitre 2, Figure 37).

III.3.3 Obtention des hybridomes par fusion entre lymphocytes B et myélomes

Les fusions pour l'obtention des hybridomes ont été réalisées comme décrit dans le Chapitre 2 : II.1.1.c.ii) Obtention des hybridomes par fusion entre lymphocytes B et myélomes. Après l'étape de fusion, la suspension cellulaire a été distribuée dans 20 microplaques de cultures 96 puits et incubées à

37 °C sous 7% de CO₂. Après 7 à 10 jours, la présence d'anticorps spécifiques des peptides dans les surnageant de culture a été mesurée à l'aide de test immuno-enzymatique. Une centaine d'hybridomes, ceux avec les intensités de signal les plus fortes, ont été présélectionnés, remis en culture pendant 24 h puis testés à différentes dilutions avec chaque des peptides. Enfin, environ cinq hybridomes par peptide ont été sélectionnés afin d'obtenir un pool des meilleures cellules sécrétant des anticorps spécifiques de chaque peptide, on les nommera anticorps oligoclonaux.

III.3.4 Purification des anticorps anti-peptide

Les anticorps oligoclonaux ont été produits *in vitro* et leur purification a été effectuée comme décrit dans le Chapitre 2 : II.1.1.c.iii) Purification des anticorps monoclonaux.

III.4 Dosages immunométriques

III.4.1 Les traceurs

- **Couplage des peptides à l'AChE**

Pour la sélection des hybridomes sécréteurs d'anticorps par ELISA, les peptides contenant une cystéine en C-terminale utilisés pour les immunisations ont été couplés à l'AChE à l'aide du réactif SMCC comme décrit par Grassi *et al.*³³³ pour être utilisés comme traceurs. Pour cela 0,03 nmol d'AChE-SMCC ont été ajoutés à 0,3 nmol de peptides repris en tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6,0. Afin d'ajouter 0,3 nmol de peptides, la mesure des fonctions thiols réduites des cystéines en C-terminale des peptides a été mesurée par la méthode d'Ellmann. Aussi, l'activité enzymatique des peptides couplés à l'AChE a été mesurée par la méthode d'Ellman³³⁴.

- **Couplage des anticorps anti-peptide à la biotine**

Les anticorps anti-peptide ont été couplés à la biotine de façon covalente comme décrit précédemment dans le Chapitre 2 : II.1.1.d.i) Les traceurs.

III.4.2 ELISA pour l'évaluation des réponses immunitaires

Les saignées de souris ont été testées par ELISA comme décrit dans le Chapitre 2 : II.1.1.d.ii) ELISA pour l'évaluation des réponses immunitaires, en utilisant comme traceur les peptides-AChE à 1 UE/mL.

III.4.3 ELISA pour le criblage des hybridomes

Le test de criblage est le même que celui utilisé pour l'évaluation des réponses immunitaires (cf III.4.2 ELISA pour l'évaluation des réponses immunitaires) mais le sérum des saignées est remplacé par le surnageant de culture. Enfin, cinq puits par peptide avec les signaux les plus élevés ont été sélectionnés.

III.4.4 Test d'évaluation de la liaison des anticorps anti-peptide par SPIE-IA

Chaque anticorps anti-peptide a été évalué par la méthode SPIE-IA décrite par Volland *et al.*⁴⁴⁰ (Figure 49). Pour cela, des plaques de microtitration 96 puits ont été coatées par adsorption passive avec chaque anticorps anti-peptide : 100 µL d'anticorps anti-peptide à 10 µg/mL en tampon phosphate 50 mM à pH 7,4 ont été déposés et incubés sur la nuit à température ambiante. Les plaques ont ensuite été vidées et 300 µL de tampon caséine ont été déposés afin de saturer et conserver les plaques jusqu'à utilisation (avant utilisation la plaque est vidée et lavée trois fois). Ensuite, 100 µL des peptides SIL PEPotec à 10 ng/mL en tampon caséine ont été déposés. Après une incubation de 2 h à température ambiante sous agitation, les plaques ont été vidées et lavées trois fois. Ensuite, 100 µL de glutaraldéhyde (Sigma) 0,1% en tampon phosphate de K 0,1 M à pH 7,4 ont été déposés sur les plaques coatées avec les anticorps anti-peptide. Après une incubation de 5 min à température ambiante, les plaques ont été vidées et lavées trois fois, puis 100 µL d'une solution de borane triméthylamine (Sigma) à 10 mg/mL dissous en 50% méthanol / 50% HCl 1M ont été ajoutés et incubés 5 min à température ambiante sous agitation. Après trois lavages, 100 µL d'anticorps anti-peptide biotinylé à 500 ng/mL en tampon caséine ont été ajoutés. Après 2 h d'incubation à température ambiante sous agitation, les plaques ont été vidées et lavées trois fois, puis 100 µL d'une solution de streptavidine couplée à l'AChe à 2 UE ont été ajoutés et incubés 30 min à température ambiante sous agitation. Après cinq lavages, 200 µL du réactif d'Ellman ont été ajoutés. L'absorbance à 414 nm a été mesurée après 30 min de réaction à température ambiante sous agitation.

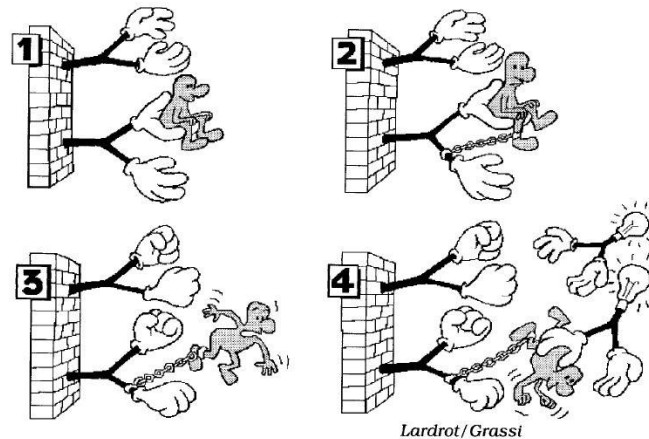


Figure 49 Principe de la méthode SPIE-IA. 1) Immobilisation de l'analyte par l'anticorps coaté sur les microplaques. 2) Réticulation de l'analyte avec l'anticorps. 3) Dissociation du complexe anticorps/analyte (libération de l'épitope). 4) Révélation à l'aide du même anticorps utilisé en traceur. Issu de Volland *et al.*⁴⁴⁰

III.5 Préparations des échantillons de plasma

III.5.1 Méthode pour les protéines fortement concentrées

Dix microlitres de plasma humain ont été précipités avec 150 μL de méthanol. Après homogénéisation du mélange, la solution a été centrifugée 5 sec à moins de 1 000 g. Le surnageant a été enlevé et le culot a été repris et homogénéisé dans 150 μL de tampon ammonium bicarbonate 50 mM. Ensuite, 10 μL de DTT à 20 mM en tampon ammonium bicarbonate 50 mM ont été ajoutés à la solution et le mélange a été agité pendant 30 min à 60 °C. Après refroidissement de la solution à température ambiante, 10 μL d'IAA à 45 mM en tampon ammonium bicarbonate 50 mM ont été ajoutés. Après agitation, la solution a été incubée à l'obscurité 45 min à température ambiante. Ensuite, 20 μL de trypsine de pancréas bovin à 2 mg/mL ont été ajoutés afin de digérer les protéines de l'échantillon et la solution a été agitée sur la nuit à 37 °C. Cinq microlitres de peptides SIL PEPotec correspondant à chaque peptide ciblé à environ 2 $\mu\text{g/mL}$ ou 2,5 pmol de peptides SIL AQUA dilués en 95% H_2O , 5% acetonitrile, 0.1% acide formique ont été ajoutés pour la normalisation du signal ou quantification par IDA, respectivement. La digestion a été stoppée en ajoutant 5 μL d'une solution de HCl 1M et la solution a été agitée à 37 °C pendant 45 min.

III.5.2 Méthode pour les protéines faiblement concentrées

III.5.2.1 Couplage des anticorps sur les billes magnétiques

Dix milligrammes de billes magnétiques Dynabeads M280 tosylactivées, soit 330 μL ont été prélevés. Les billes ont été resuspendues dans 200 μg d'anticorps oligoclonaux dilués en tampon borate 0,1 M à pH 9,5 pour un volume final de 300 μL . Après agitation légère, 200 μL de tampon ammonium sulfate 3 M à pH 9,5 ont été ajoutés à la suspension. La suspension a été agitée à 37 °C pendant 18 h. Les billes

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

ont ensuite été lavées une première fois à l'aide de 1 mL de tampon PBS à pH 7,4 à 0,5% de BSA par incubation pendant 1 h à 37 °C. Puis, elles ont été lavées une seconde fois à l'aide de 1 mL de tampon PBS à pH 7,4 à 0,1% de BSA par simple agitation puis élimination du surnageant. Enfin, les billes ont été reprises dans 480 µL de de tampon PBS à pH 7,4 à 0,1% de BSA.

III.5.2.2 Préparation des échantillons

Cent microlitres de plasma humain ont été précipités avec 300 µL de méthanol. Après homogénéisation du mélange, la solution a été centrifugée 7 sec à moins de 1 000 g. Le surnageant a été enlevé et le culot a été repris et homogénéisé dans 150 µL de tampon ammonium bicarbonate 50 mM. Ensuite, 50 µL de DTT à 20 mM en tampon ammonium bicarbonate 50 mM ont été ajoutés à la solution et le mélange a été agité pendant 30 min à 60 °C. Après refroidissement de la solution à température ambiante, 50 µL d'IAA à 45 mM en tampon ammonium bicarbonate 50 mM ont été ajoutés. Après agitation, la solution a été incubée à l'obscurité 45 min à température ambiante. Ensuite, 50 µL de trypsine de pancréas bovin à 4 mg/mL ont été ajoutés afin de digérer les protéines de l'échantillon et la solution a été incubée sur la nuit à 37 °C sous agitation. La digestion a été stoppée en ajoutant 50 µL d'une solution de TLCK à 0,1 mg/ml dilué en eau et la solution a été agitée 5 min à température ambiante. La solution a ensuite été diluée dans 0,9 mL final de tampon PBS Tween20 (0,05%). Un mélange de peptides SIL PEPotec à environ 0,5 pmol/mL dilués en PBS Tween20 (0,05%) ont été ajoutés pour la normalisation du signal. Ensuite, 10 µL de chaque suspension de billes couplées aux anticorps oligoclonaux ont été prélevés et poolés, les surnageants ont été enlevés à l'aide d'un aimant et le pool de billes a été repris dans 100 µL de PBS Tween20 (0,05%). Ces 100 µL ont été ajoutés au digestat de plasma. Un robot KingFisher Duo Prime a été utilisé pour l'immunoprécipitation (2 h) et les lavages successifs des billes en tampons PBS Tween20 (0,05%), PBS et eau. Les peptides immunoprécipités ont ensuite été élués dans la barrette d'éluion contenant 50 µL d'acide acétique à 5% et 5 % d'acétonitrile. L'éluat a ensuite été filtré par centrifugation à 14 000 g pendant 10 min à l'aide d'une unité de filtration Nanosep 10 K Omega au préalablement rincée et équilibrée par 500 µL d'eau et 400 µL d'acide acétique à 5% et 5 % d'acétonitrile.

III.6 Analyse LC-MS/MS

III.6.1 Analyse LC-MS/MS pour les protéines fortement concentrées

La séparation par chromatographie liquide en phase inverse a été réalisée avec une colonne XBC18 Aeris (150 mm x 2,1 mm ; 1,7 µm ; 100 Å ; Phenomenex, Le Pecq, France) à 500 µL/min. Les phases mobiles utilisées sont, pour la phase A : eau + 0,1 % acide formique et pour la phase B : acétonitrile + 0,1% acide formique. Après un palier isocratique de 1 min à 5% de B, le gradient a été augmenté jusqu'à 20% de B en 10 min, puis jusqu'à 40% en 7 min. Le pourcentage de B% a ensuite été augmenté à 95% en 0,5 min et a été constant pendant 2 min avant de revenir à la condition initiale de 5% pendant les 0,5

min qui ont suivies. Enfin, la colonne a été rééquilibrée à 5% de B pendant 3 min. Les paramètres de la source d'ionisation de l'électrospray ont été réglés comme suit : débit de gaz 70 a.u., tension de nébulisation 4 kV, température capillaire 320 °C. L'acquisition a été réalisée en mode PRM sur un instrument Q-exactive travaillant en mode ion positif avec une acquisition séquentielle programmée dans le temps. Les ions précurseurs des peptides endogènes et des peptides SIL ont été sélectionnés séparément dans le quadrupôle avec une fenêtre de masse de 1,7 m/z . Les ions précurseurs des peptides ont été fragmentés dans la cellule HCD en utilisant l'azote comme gaz de collision et les énergies de collision normalisées ont été optimisées. Tous les ions fragments ont été transférés dans l'Orbitrap. La résolution a été fixée à 70 000 à 200 m/z , le gain à $1e6$ et le temps d'injection maximum à 125 ms.

Les données brutes de spectrométrie de masse ont été exportées vers les logiciels Skyline (version 4.142) et Xcalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne), qui a servi à l'analyse quantitative des données.

III.6.2 Analyse LC-MS/MS pour les protéines faiblement concentrées

La séparation par chromatographie liquide en phase inverse a été réalisée avec une colonne Acclaim PepMap 300 C18 (150 mm × 0.3 mm; 5 μm , 300 Å; Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) à un débit de 6 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les phases mobiles qui ont été utilisées sont, pour la phase A : eau + 0,1 % acide formique et pour la phase B : 80% acétonitrile, 20% eau + 0,1% acide formique. Après un palier isocratique de 3 min à 4% de B, le gradient a été augmenté jusqu'à 55% de B en 40 min. Le pourcentage de B% a ensuite été augmenté à 90% en 1 min et a été constant pendant 5 min avant de revenir à la condition initiale de 4% pendant la minute suivante. Enfin, la colonne a été rééquilibrée à 4% de B pendant 30 min. Les paramètres de la source d'ionisation électrospray ont été réglés comme suit : tension de nébulisation 2,5 kV et température capillaire 300 °C. L'acquisition a été réalisée en mode PRM sur un instrument Q-exactive travaillant en mode ion positif avec une acquisition séquentielle programmée dans le temps. Les ions précurseurs des peptides endogènes et des peptides SIL ont été sélectionnés séparément dans le quadrupôle avec une fenêtre de masse d'isolement de 2,0 m/z . Les ions précurseurs des peptides ont été fragmentés dans la cellule HCD en utilisant l'azote comme gaz de collision et les énergies de collision normalisées ont été optimisées. Tous les ions fragments ont été transférés dans l'Orbitrap. La résolution a été fixée à 70 000 à 200 m/z , le gain à $1e6$ et le temps d'injection maximum à 500 ms.

Les données brutes de spectrométrie de masse ont été exportées vers les logiciels Skyline (version 4.142) et Xcalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne), qui a servi à l'analyse quantitative des données.

III.7 Analyse des données

Pour augmenter le rapport signal/bruit et la sensibilité des méthodes, les signaux d'au moins quatre ions fragments majeurs et non interférés identifiés à haute résolution (5 ppm) à partir d'un précurseur peptidique commun ont été additionnés pour fournir un signal XIC pour chaque peptide. Des équivalents peptidiques SIL ont été utilisés pour la normalisation et la quantification du signal. Ensuite, l'aire du pic XIC des peptides endogènes a été divisée par l'aire du pic XIC des peptides SIL. Pour assurer une quantification spécifique dans des échantillons de plasma individuels, nous avons appliqué les critères d'inclusion suivants : (i) forme de pic et temps de rétention similaires aux peptides des étalons internes ($\pm 0,05$ min), (ii) détection des transitions PRM les plus intenses (d'après le spectre MS du peptide de référence), et (iii) rapport des aires similaires entre les transitions entre peptides endogènes et SIL. Les données brutes de spectrométrie de masse ont été exportées vers Skyline (version 4.142) pour la vérification des rapports de transition des peptides non marqués et marqués.

III. Résultats et Discussions

III.1 Cohorte de patients atteints de choc septique

Les patients ont été sélectionnés à partir d'une la base de données cliniques du service de réanimation de l'hôpital Lariboisière en fonction des critères suivants :

- Choc septique à l'admission en unité de soins intensifs
- Echantillons de plasmas prélevés dans les 24 h suivant l'admission pour choc septique
- Un score SOFA (excluant la composante neurologique) élevé de 7 à 11.

Ainsi, notre cohorte de travail était constituée de 49 patients remplissant ces critères avec une balance équilibrée de survivants (n=23) et non-survivants (n=26). Les caractéristiques cliniques des patients sélectionnés à l'admission sont données dans le Tableau 19. L'étude s'est concentrée sur les patients ayant subi un choc septique en raison du taux de mortalité plus élevé par rapport aux autres patients septiques⁹².

Tableau 19 Caractéristiques de la cohorte des patients atteints d'un choc septique. Les données sont exprimées en valeur médiane et interquartile (test de Mann-Whitney).

Paramètres	Cohorte totale n=49	Survivants n=23	Non-survivants n=26	P-value (survivors vs non-survivors)
Age	66 (54.5-78)	63 (23-80)	70.50 (56.7-77.2)	0,325
Sexe M/F	27/49	13/23	14/26	0,777
SOFA	9 (7-11)	9 (7-11)	10 (7-12)	0,212
Mortalité à 28 jours	26/49	0/23	26/26	NA
Origine de l'infection				
Pulmonaire	47%	48%	46%	0,917
Abdominale	35%	30%	38%	0,568
Urinaire	6%	9%	4%	0,500
Autres	12%	13%	12%	0,888

III.2 Peptides sélectionnés

Deux méthodes de quantification par acquisition PRM ciblant chacune des protéines circulantes dans des plasmas humains par LC-MS/MS ont été développées. La sélection des peptides protéotypiques et quantotypiques est une condition préalable à la mise en place de toute méthode ciblée²⁴¹. La sélection des meilleurs peptides protéotypiques et quantotypiques²³⁸ a été basée sur les recommandations de protéomique ciblée²⁴¹, concernant l'unicité de séquence, la taille et la composition en acides aminés (éviter les cystéines et méthionine) et sans modifications post-traductionnelles observées (d'après la base Uniprot). Une série de caractéristiques a été appliquée afin de ne conserver que les peptides susceptibles de créer une bonne détection en MS. Les critères sont les suivants²²⁴ :

- Une longueur compris entre 8 et 15 acides aminés
- Aucune modification post-traductionnels connus (peptides quantotypiques)
- Une masse plus grande que 800 amu (pour faciliter la détection)
- Des peptides sans acides aminés chimiquement réactifs (tels que Cys, Met ou Trp) et séquences instables (telles que NG, DG, QG, et N-ter Q)
- Une hydrophilie moyenne (hydrophilie de Hopp-Woods comprise entre -0.5 et 0.5)
- Son unicité (à vérifier dans les bases de données)
- Les sites de potentiels mauvais clivages par la trypsine sont évités (enchaînements RR, RK, ...)
- Les données expérimentales de détection des peptides (par exemple, Peptide Atlas).

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

La spécificité des peptides a été vérifiée à l'aide de l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) par rapport à la base de données humaine UniprotKB/Swissprot. De plus, la détectabilité des peptides a été vérifiée à partir de la base de données Peptide Atlas en se basant sur les scores de détectabilité des peptides, scores calculés à partir de données empiriques ou prédits par des algorithmes. Pour chaque protéine, au moins trois peptides ont été sélectionnés. Ce ne sont cependant pas des critères stricts. En effet, selon les protéines choisies, une hiérarchie de ces critères est parfois nécessaire pour permettre la sélection de peptides protéotypiques.

Au final, au moins un peptide a été détecté pour chaque protéine. Les peptides sélectionnés et détectés sont rassemblés dans le Tableau 20 et le Tableau 21 pour les deux méthodes. Par manque de choix (petites protéines, disposition des R ou K, unicité, ...) des peptides non parfaits ont dû être sélectionnés. La sélection des peptides était notamment basée sur un score de détection d'après la base de PeptideAtlas, cependant les peptides SIL SAA-2, CRP-2, CRP-3, AGP-1 et LBP-3 n'ont pas pu être détectés pour les protéines majoritaires. De même, les peptides SIL AMPH-1, HMGB1-3 et PCT-3 n'ont pas pu être détectés pour les protéines minoritaires. Cette absence de détection est probablement due aux conditions chromatographiques, les peptides ont peut-être été élués dans le volume mort ou trop retenus par la colonne chromatographique.

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

Tableau 20 Paramètres MS pour la détection PRM des peptides des biomarqueurs candidats fortement concentrées

protéine	peptide	séquence	masse moyenne (m/z)	ion précurseur (m/z)	ions fragments (m/z)	énergie de collision normalisée(eV)	temps de rétention (min)
serum amyloïd A	SAA-1	EANYIGSDK	499,0 (z=2)	498,7353 (z=2)	867,4207 (y8) 796,3836 (y7) 682,3406 (y6) 5179,2773 (y5)	18	2,8
	SAA-3	FFGHGAEDSLADQAANEWGR	727,1 (z=3)	726,6594 (z=3)	1117,5021 (y10) 1046,4650 (y9) 931,4381 (y8), 803,3795 (y7) 732,3424 (y6)	17	11,0
protéine C-reactive	CRP-1	ESDTSYVSLK	565,1 (z=2)	564,7746 (z=2)	999,4993 (y9) 912,4673 (y8) 797,4403 (y7) 696,3927 (y6) 609,3606 (y5)	17	6,4
facteur de von Willebrand	VWF-1	ALSVVWDR	473,5 (z=2)	473,2613 (z=2)	761,3941 (y6) 674,3620 (y5) 575,2936 (y4) 476,2252 (y3)	16	9,6
	VWF-2	LSEAEFEVLK	583,1 (z=2)	582,8110 (z=2)	1051,5306 (y9) 964,4986 (y8) 835,4560 (y7) 764,4189 (y6) 635,3763 (y5)	18	10,7
	VWF-3	VTVPFVIGDR	587,7 (z=2)	587,3350 (z=2)	973,5465 (y9) 874,4781 (y8) 727,4097 (y7) 630,3570 (y6)	18	12,7
haptoglobine	HP-1	ILGGHLDK	462,5 (z=2)	462,2691 (z=2)	810,4468 (y8) 697,3628 (y7) 640,3413 (y6) 583,3198 (y5)	21	4,4
	HP-2	GSPFWQAK	461,0 (z=2)	460,7349 (z=2)	863,4410 (y7) 776,4090 (y6) 629,3406 (y5) 532,2878 (y4)	14	8,7
	HP-3	VGYSVGWGR	491,0 (z=2)	490,7511 (z=2)	881,4264 (y8) 824,4050 (y7) 661,3416 (y6) 562,2732 (y5)	18	7,7
	HP-4	VTSIQDWVQK	602,6 (z=2)	602,3320 (z=2)	1104,5684 (y9) 1003,5207 (y8) 916,4887 (y7) 803,4046 (y6) 675,3461 (y5)	22	9,4
alpha-1-acide glycoprotéine	AGP-2	TEDTIFLR	498,0 (z=2)	497,7638 (z=2)	893,4727 (y7) 764,4301 (y6) 649,4032 (y5) 548,3555 (y4)	18	9,1
	AGP-3	WFYIASAFR	581,1 (z=2)	580,7980 (z=2)	974,5094 (y8) 827,4410 (y7) 664,3777 (y6)	18	13,9
protéine de liaison au lipopolysaccharide	LPB-1	ITLPDFTGDLR	624,7 (z=2)	624,3352 (z=2)	1134,5790 (y10) 1033,5313 (y9) 920,4472 (y8) 823,3945 (y7) 708,3675 (y6)	19	13,4
	LPB-2	LQCSFDVSVK	540,6 (z=2)	540,2902 (z=2)	966,4891 (y9) 838,4305 (y8) 781,4090 (y7) 694,3770 (y6) 547,3086 (y5)	19	8,1

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

Tableau 21 Paramètres MS pour la détection PRM des peptides des biomarqueurs candidats faiblement concentrées

protéine	peptide	séquence	masse moyenne (m/z)	ion précurseur (m/z)	ions fragments (m/z)	énergie de collision normalisée (eV)	temps de rétention (min)
sRAGE	sRAGE-1	VLSPQGGPWDSVAR	763,8 (z=2)	763,3915 (z=2)	1226,5913 (y12) 1129,5385 (y11) 1001,4799 (y10) 944,4585 (y9) 830,4155 (y7)	22	26,4
	sRAGE-2	VLPNGSLFLPAVGIQDEGIFR	1122,3 (z=2)	1121,6152 (z=2)	1414,7689 (y13) 1301,6848 (y12) 1204,6321 (y11) 1133,5949 (y10)	20	
	sRAGE-3	AVSISIIPEGEGPTAGEGFDK	1102,6 (z=2)	1102,0419 (z=2)	1390,6121 (y14) 1293,5594 (y13) 1236,5379 (y12) 1107,4953 (y11)	19	
ANG-1	ANG1-1	DAPHVEPDFSSQK	486,1 (z=3)	486,2283 (z=3)	1036,4946 (y9) 937,4262 (y8) 808,3836 (y7) 711,3308 (y6) 596,3039 (y5)	14	
	ANG1-2	LTDVETQVLNQTSR	802,8 (z=2)	802,4179 (z=2)	1389,6968 (y12) 1274,6699 (y11) 1175,6015 (y10) 1046,5589 (y9) 945,5112 (y8) 817,4526 (y7)	20	
	ANG1-3	EDGSLDFQR	534,0 (z=2)	533,7436 (z=2)	937,4374 (y8) 822,4104 (y7) 765,3890 (y6) 678,3570 (y5) 565,2729 (y4)	17	
NGAL	NGAL-1	VPLQQNFQDNQFQGK	597,9 (z=3)	597,6322 (z=3)	1225,5596 (y10) 1111,5167 (y9) 964,4483 (y8) 836,3897 (y7) 721,3628 (y6) 607,3198 (y5)	14	
	NGAL-2	TFVPGCQPGFETLGNIK	622,7 (z=2)	622,3136 (z=2)	1075,5782 (y10) 978,5255 (y9) 921,5040 (y8) 792,4614 (y7) 645,3930 (y6) 808,9087 (y15) 759,3745 (y14) 710,8481 (y13)	12	30,6
	NGAL-3	SYPLTSLVLR	628,7210 (z=2)	628,337 (z=2)	1168,6361 (y10) 1005,5728 (y9) 908,5200 (y8) 851,4985 (y7) 738,4145 (y6) 637,3668 (y5)	16	

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

HLAG-5	HLAG5-1	GYEQYAYDGK	597,6 (z=2)	597,2591 (z=2)	1136,4895 (y9) 973,4262 (y8) 844,3836 (y7) 716,3250 (y6)	17	
	HLAG5-3	WAAVVVPSGEEQR	714,7 (z=2)	714,3675 (z=2)	1241,6484 (y12) 1170,6113 (y11) 1099,5742 (y10) 1000,5058 (y9) 901,4374 (y8) 802,3690 (y7)	20	25,3
granuline	GRAN-1	ENATDLLTK	553,6 (z=2)	553,2904 (z=2)	976,5310 (y9) 862,4880 (y8) 791,4509 (y7) 690,4032 (y6) 589,3556 (y5)	17	
	GRAN-2	GSEIVAGLEK	502,0 (z=2)	501,7769 (z=2)	858,4931 (y8) 729,4505 (y7) 616,3665 (y6) 517,2980 (y5)	15	22,8
	GRAN-3	EVVSAQPATFLAR	695,2 (z=2)	694,8803 (z=2)	1160,6422 (y11) 1061,5738 (y10) 974,5418 (y9) 903,5047 (y8) 775,4461 (y7)	17	27,1
amphreguline	AMPH-2	YIEHLEAVTCK	455,1 (z=3)	454,8956 (z=3)	820,4233 (y7) 707,3393 (y6) 578,2967 (y5) 507,2595 (y4) 600,3081 (y10) 543,7660 (y9) 479,2448 (y8)	20	21,7
HMGB1	HMGB1-1	GEHPGLSIGDVAK	427,4 (z=2)	427,2262 (z=2)	689,3828 (y7) 602,3508 (y6) 489,2667 (y5) 432,2453 (y4)	18	23,3
	HMGB1-2	LGEMWNNTAADDK	733,2 (z=2)	732,8248 (z=2)	1351,5583 (y12) 1294,5368 (y11) 1165,4942 (y10) 1034,4538 (y9) 848,3745 (y8)	17	24,0
procalcitonine	PCT-1	SALESSPADPATLSEDEAR	974,0 (z=2)	973,4529 (z=2)	1458,6707 (y14) 1371,6387 (y13) 1274,5859 (y12) 1203,5488 (y11) 1088,5218 (y10) 991,4691 (y9)	20	23,4
	PCT-2	ASELEQEQR	610,1 (z=2)	609,7835 (z=2)	1060,4905 (y8) 931,4480 (y7) 818,3639 (y6) 689,3213 (y5)	18	15,4

III.3 Développement de la méthode pour la quantification multiplexe des biomarqueurs potentiels majoritaires du plasma

III.3.1 Développement de la préparation d'échantillons

Une méthode simple et rapide sans anticorps a été développée pour l'application aux échantillons de plasma humain. La précipitation au méthanol suivie d'une digestion trypsique, basée sur une méthode récemment publiée pour la quantification des anticorps monoclonaux dans le plasma humain⁴⁴¹, a été utilisée ici pour la détection et la quantification des six biomarqueurs potentiels : SAA, CRP, VWF, haptoglobine, AGP et LPB. En effet, ces six protéines étant abondantes (> µg/mL) dans le plasma humain d'après la littérature^{347, 355, 442, 361, 368, 373}, la précipitation des protéines a donc semblé être adaptée, comme illustré avec la quantification de S100A8/S100A9 au Chapitre 2. Des tests préalables de détectabilité ont été effectués en plasma de patients sains et ont permis de vérifier que cette méthode

pouvait être utilisée pour ces six protéines. Afin d'évaluer au mieux la pertinence de cette préparation d'échantillons sur ces six protéines, il aurait fallu utiliser une matrice mime du plasma humain ne contenant pas ces protéines et les ajouter à des quantités connues avant et après précipitation au méthanol afin de déterminer le rendement. Pour cela, il aurait fallu disposer des six protéines purifiées ou recombinantes. Cependant, d'autres éléments comme la répétabilité, la reproductibilité et la stabilité des peptides lors de la digestion ont été évaluées avec des plasma de patients atteints de choc septique, d'après la publication de Grant et Hoofnagle²⁵⁰.

III.3.2 Evaluation de la méthode

III.3.2.a) Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité et la reproductibilité de la méthode ont été évaluées avec un pool de plasmas de patients atteints de choc septique. Ce pool a été divisé en trois aliquots qui ont été évalués sur trois jours différents et chaque aliquot a été divisé en cinq réplicats à analyser par jour. Les variabilités intra- et inter-journalières ont été estimées acceptables si les CV < 20 %²⁵⁰. Les résultats de répétabilité et reproductibilité des peptides des six biomarqueurs candidats fortement concentrés sont donnés dans le Tableau 22. Les peptides VWF-1, VWF-3, AGP-2 et AGP-3 ont au moins un de leur CV (intra ou inter) > 20%, ils n'ont donc pas été pris en compte pour quantifier les protéines correspondantes. Malgré cela, toutes les protéines ont au minimum un peptide qui remplit les critères d'acceptabilité en termes de répétabilité et reproductibilité sauf la protéine AGP. Le peptide AGP-2 a un CV_{intra} < 20% mais un CV_{inter} > 20% et le peptide AGP-3 a ses deux CV > 20%. Afin d'effectuer tout de même une quantification de cette protéine le peptide AGP-2 a été conservé dans la méthode multiplexe malgré un CV_{inter} > 20 %, car deux autres peptides protéotypiques d'AGP (Tableau 17) ont été testés mais n'ont pas pu être détectés en LC-MS/MS. Ces CV élevés peuvent être dûs à des problèmes de digestion de la protéine au niveau de ces peptides ou des séquences d'acides aminés moins stables.

Tableau 22 Répétabilité et reproductibilité de la méthode pour la détection PRM des peptides des six biomarqueurs candidats fortement concentrés, par analyse répétée d'un pool de plasmas de patients ayant subi un choc septique (5 replicats/jour sur 3 jours)

Peptides	Répétabilité CV _{intra} (%)	Reproductibilité CV _{inter} (%)
SAA-1	5.06	8.37
SAA-3	5.60	5.07
CRP-1	7.00	6.53
VWF-1	25.50	37.50
VWF-2	3.96	8.33
VWF-3	16.46	33.74
HP-1	4.35	9.05
HP-2	6.10	7.62
HP-3	16.24	19.26
HP-4	4.21	17.84
AGP-2	15.37	35.28
AGP-3	40.45	46.46
LBP-1	3.01	6.11
LBP-2	9.65	15.63

III.3.2.b) Stabilité des peptides en digestion

Pour évaluer la stabilité des peptides lors de la digestion, les peptides SIL ont été ajoutés avant la digestion (n=3) et les ratios de peptides endogènes / peptides SIL ont été comparés avec un ajout des peptides SIL après la digestion (n=3). La majorité des études ajoutent des peptides SIL après digestion. Cependant, l'influence de la formation/dégradation des peptides protéolytiques par rapport au peptide SIL et son effet sur le biais d'analyse doivent être déterminés. Les biais ont été calculés comme suivant : (pré-post)/post, où pré représente la moyenne des triplicats pré-digestion et post la moyenne des triplicats post-digestion, et sont exprimés en pourcentage. Les biais ont été estimés acceptables si < 20%²⁵⁰. Les résultats des biais sont donnés dans Tableau 23. Les peptides CRP-1, VWF-1, HP-3 et AGP-3 ont des biais > 20%. Des CV intra- et inter- journaliers > 20% avaient déjà été observés pour les peptides VWF-1 et AGP-3, un problème de stabilité de ces peptides pourrait donc expliquer ces CV et biais élevés. L'instabilité des cinq peptides peut être due à une instabilité de la séquence des acides aminés ou de l'utilisation d'une trypsine (Sigma) non pure qui pourrait contenir d'autres protéases qui cliveraient les protéines et peptides d'intérêt. Malgré ça, toutes les protéines ont au minimum un peptide qui remplis les critères d'acceptabilité en termes de stabilité sauf la protéine CRP. Afin d'effectuer tout de même une quantification de cette protéine le peptide, CRP-1 qui a un biais très légèrement supérieur à 20% a été conservé dans la méthode multiplexe, car les deux autres peptides de CRP (Tableau 17) ont été testés mais n'ont pas pu être détectés en LC-MS/MS.

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

Tableau 23 Estimation du biais de la digestion des peptides

	biais
SAA-1	6.0%
SAA-3	14.7%
CRP-1	24.0%
VWF-1	74.3%
VWF-2	11.6%
VWF-3	11.4%
HP-1	10.3%
HP-2	17.6%
HP-3	107.3%
HP-4	4.3%
AGP-2	12.0%
AGP-3	685.0%
LBP-1	7.1%
LBP-2	1.8%

Ainsi, les peptides SAA-1, SAA-3, CRP-1, VWF-2, HP-1, HP-2, HP-4, AGP-2, LBP-1 et LBP-2 ont été conservés dans la méthode multiplexe pour le dosage des protéines SAA, CRP, VWF, haptoglobine, AGP et LBP dans le plasma humain (Figure 50).

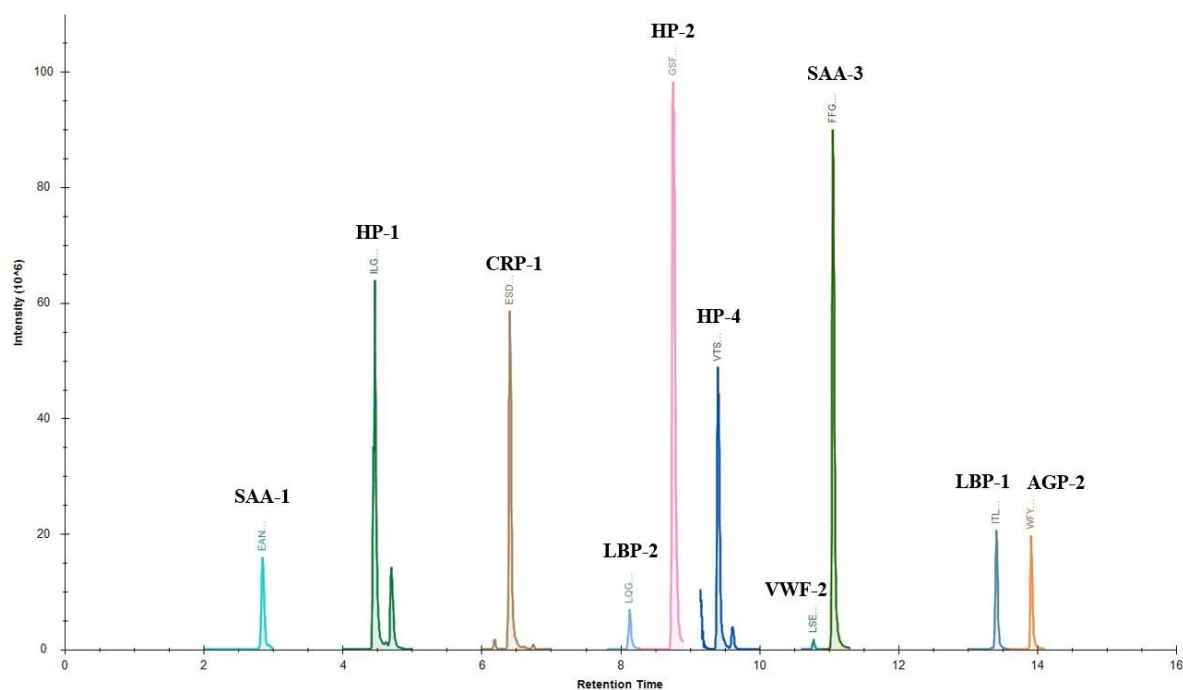


Figure 50 Chromatogramme des ions extraits des dix peptides quantotypiques des six protéines à doser dans le plasma humain

Conclusion :

L'utilisation de peptides SIL est une option moins coûteuse que l'utilisation de protéines SIL pour quantifier des protéines. Cependant, les peptides SIL sont ajoutés après l'étape de digestion et ne rendent pas compte des rendements de préparation des échantillons. Ainsi, même si le choix des peptides est fait de manière à favoriser une digestion efficace et répétable, certaines protéines sont mal digérées. Brownridge *et al.*¹⁹⁴ ont montré sur une digestion trypsique d'un extrait de levure que 51% des peptides étaient des peptides mal clivés à l'extrémité N-terminale et 32% contenaient des extensions en C-terminale, le reste était constitué de peptides plus longs de chaque côté. L'utilisation de protéines SIL, comme les PSAQ permettrait d'améliorer la précision de la méthode, comme l'ont montré par exemple Abbatiello *et al.*²⁵² dans leur étude interlaboratoire avec l'amélioration des CV interlaboratoires de 45% à 36% en passant des peptides SIL aux protéines SIL. Comme la protéine standard alourdie subit le même traitement que la protéine cible légère, le rendement du peptide est le même pour le peptide endogène et le peptide alourdi. Ainsi, ce travail montre l'importance de vérifier les performances de la méthode pour mettre en évidence les peptides les moins robustes, et éviter des biais de quantification. De plus, dans cette méthode, n'ayant pas à disposition de standard, une quantification relative a été effectuée.

III.3.3 Dosage des biomarqueurs candidats fortement concentrés dans 49 plasmas de patients atteints d'un choc septique

La cohorte de 49 plasmas de patients atteints de choc septique (Tableau 19) a été analysée avec la méthode multiplexe développée pour la quantification relative des biomarqueurs candidats majoritaires du plasma.

La comparaison des taux plasmatiques entre survivants et les non-survivants par un test non-paramétrique de Mann-Whitney est donnée dans la Figure 51. On observe une augmentation des niveaux plasmatiques des deux peptides de SAA chez les survivants comparés aux non-survivants, mais cette augmentation n'est pas significative. Cette tendance pour le jour 1 est comparable aux résultats de Cicarelli *et al.*⁴⁴³ et Yu *et al.*³⁴⁷ qui ont comparé les niveaux plasmatiques de SAA à l'aide de kits commerciaux sur plusieurs jours et ont observé lors du premier jour que le niveau de SAA était plus élevé chez les survivants et que cette tendance s'inversait dans les jours qui suivaient. Nous n'avons cependant que les prélèvements effectués lors des premières 24 h suivant l'admission des patients.

Concernant la CRP, aucune différence n'est observée entre survivants et non-survivants. Cette observation est en accord avec Yu *et al.*³⁴⁷ et Cui *et al.*³⁴⁸ qui n'avaient pas non plus observé de différence significative de la CRP au jour 1 mais plus tardivement aux jours 3, 5 et 7. La CRP est un biomarqueur actuellement utilisé, mais nous n'avons observé aucune différence dans les premières 24 h des patients

atteints d'un choc septique, ce qui remet bien en cause l'utilisation de la CRP pour le pronostic du sepsis. Ainsi, la CRP ne semble pas pouvoir prédire la mortalité des patients les plus graves.

Concernant **VWF**, une très légère augmentation est observée chez les non-survivants mais n'est cependant pas significative. Hyseni *et al.*³⁵⁵ avaient observé une augmentation significative de VWF chez les non-survivants d'une cohorte de patients présentant un SRIS ou plus dans les trois premiers jours suivant l'admission. Cependant, notre cohorte, à la différence de celle de Hyseni *et al.*³⁵⁵ qui n'en contient que 20%, ne comporte que des patients atteints d'un choc septique.

Dans notre analyse, seuls les niveaux des trois peptides de la protéine **haptoglobine** sont significativement différents entre survivants et non-survivants. On retrouve, de façon comparable à Janz *et al.*³⁶¹ un niveau significativement plus élevé d'haptoglobine chez les survivants que chez les non-survivants.

Concernant **AGP**, les niveaux plasmatiques sont plus bas chez les non-survivants mais ne sont pas significatifs. Cette diminution chez les non-survivants a également été rapportée par Barroso-Sousa *et al.*³⁶⁸ dans une cohorte de patients septiques avec 42% de patients atteints d'un choc septique. Ainsi, de la même façon que pour VWF, nos résultats peuvent différer de la littérature du fait que notre cohorte a été sélectionnée afin de n'avoir que des patients en choc septique, c'est-à-dire, les patients les plus graves. De plus, la taille de la cohorte et également la robustesse des peptides utilisés pour la quantification d'AGP peuvent expliquer cette absence de significativité.

Enfin, concernant la **LBP**, on observe un niveau plus bas chez les non-survivants pour les deux peptides. Cette diminution avait été associée à un risque de mortalité plus élevé chez les patients septiques par Opal *et al.*³⁷³. Cependant, notre diminution chez les non-survivants n'est pas significative.

Pour résumer, nous retrouvons pour les six protéines des résultats comparables à la littérature. Cependant, nos différences de niveaux entre survivants et non-survivants ne sont généralement pas significatives, sauf pour l'haptoglobine. Cette absence de significativité peut s'expliquer par la sélection et la taille de la cohorte, et de la robustesse de certains peptides. En effet, les patients ont été sélectionnés pour leur gravité : tous les patients étaient atteints d'un choc septique avec des scores SOFA élevés (médiane à 9). Dans la grande majorité des études, les cohortes de patients prennent également en compte des patients sepsis et certaines études prennent également des patients SRIS. Or, ce sont les patients atteints d'un choc septique qui ont le taux de mortalité le plus élevé : si on se réfère aux anciennes définitions, la mortalité est d'environ 10% pour le sepsis, 20% pour le sepsis grave et plus de 40% pour le choc septique^{21,28}. Ainsi, il semble cohérent qu'une sélection faite uniquement sur les patients les plus graves peut amener à des résultats non significatifs et moins nets que pour des cohortes faites sur des sélections plus larges de patients.

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

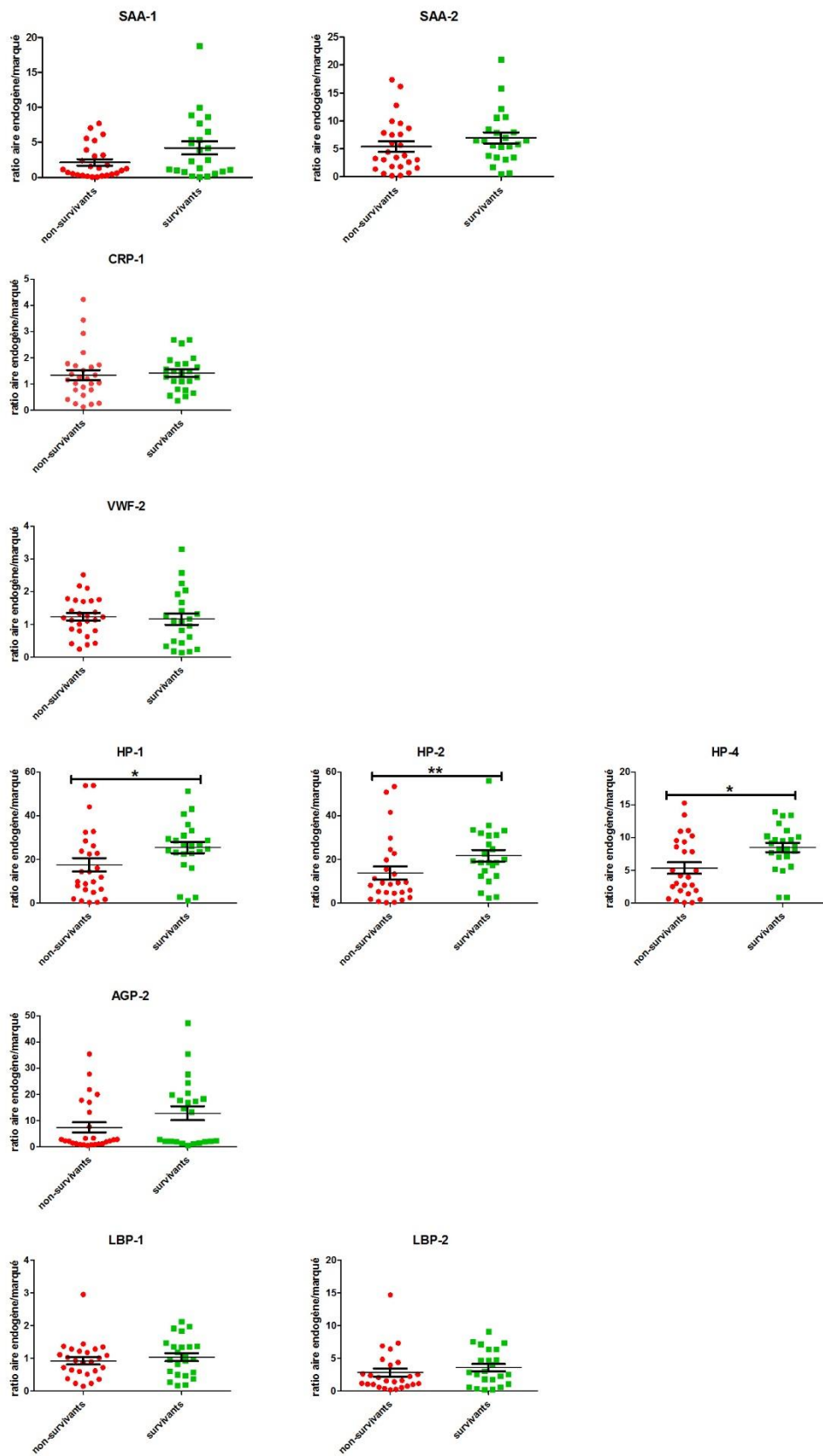


Figure 51 Dosage des 6 protéines fortement concentrées dans les 49 plasmas de patients atteints d'un choc septique

III.4 Quantification pseudo absolue de l'haptoglobine

L'haptoglobine étant la seule protéine avec des niveaux plasmatiques significativement différents entre survivants et non-survivants, son analyse a été approfondie avec une méthode de quantification par IDA permettant la quantification pseudo absolue de ses trois peptides quantotypiques avec des peptides SIL AQUA dont la pureté a été évaluée par analyse des acides aminés. De plus, la linéarité de cette méthode a été évaluée.

III.4.1 Linéarité

Afin de mieux appréhender la distinction des survivants et des non-survivants, la linéarité de la méthode de quantification de l'haptoglobine a été évaluée. Pour cela, un schéma proposé par Grant *et al.*²⁵⁰ de cinq mélanges avec un pool de plasmas de survivants et un pool de plasmas de non-survivants dans les proportions 1:0, 3:1, 1:1, 1:3 et 0:1 a été réalisé en duplicat. Les résultats sont présentés dans la Figure 52. La linéarité en dilution des pools de plasmas entre eux pour les trois peptides de l'haptoglobine met en évidence la capacité la linéarité de la méthode dans la gamme testée et donc la capacité à donner une réponse proportionnelle à la concentration.

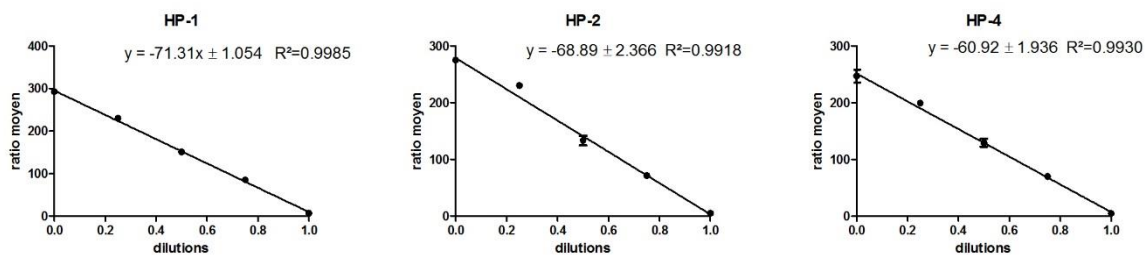


Figure 52 Evaluation de la linéarité de la méthode de quantification de l'haptoglobine

III.4.2 Quantification pseudo absolue de l'haptoglobine dans 49 plasmas de patients ayant subi un choc septique

Pour la quantification, des peptides SIL AQUA ont été ajoutés à une concentration connue. La résolution et les temps de remplissage ont été ajustés afin d'obtenir au moins 10 points par pic par peptide. Les concentrations ont été obtenues par comparaison des aires des signaux des peptides endogènes et peptides AQUA ajoutés à des quantités connues. Il s'agit donc d'une quantification pseudo absolue car les rendements de précipitation et digestion de la protéine ne sont pas connus. Pour cela, il aurait fallu disposer de la protéine recombinante ou purifiée. La moyenne des concentrations obtenues (avec CV < 20%) pour les trois peptides a été déterminée et la comparaison entre survivants et non-survivants est représentée Figure 53. Parmi les 49 patients, les survivants ont des concentrations d'haptoglobine

significativement ($P=0,0218$) plus élevées (médiane 2282 $\mu\text{g/mL}$, interquartiles [1710 ; 2962]) comparées aux non-survivants (médiane 1095 $\mu\text{g/mL}$, interquartiles [522,4 ; 2383]). On retrouve, de façon comparable à Janz *et al.*³⁶¹ des concentrations similaires d'haptoglobine chez les survivants (médiane 1234 $\mu\text{g/mL}$, interquartiles [569 ; 3037]) et les non-survivants (médiane 750 $\mu\text{g/mL}$, interquartiles [404 ; 2421]) pour une cohorte de 387 patients septiques.

Le sepsis et le choc septique sont associés à des lésions membranaires des globules rouges qui provoquent alors la libération d'hémoglobine dans la circulation sanguine⁴⁴⁴. Or, il a été montré qu'un taux élevé d'hémoglobine sans cellule dans la circulation augmentait le risque de mortalité⁴⁴⁵. En effet, l'hémoglobine libre induit des lésions cellulaires et tissulaires par oxydation, vasoconstriction, lésions endothéliales et activation des neutrophiles³⁶¹. L'haptoglobine est une protéine produite par le foie qui a pour fonction d'éliminer l'hémoglobine sans cellule et sert ainsi d'antioxydant en raison de sa capacité à prévenir les dommages oxydatifs causés aux tissus par l'hémoglobine sans cellule⁴⁴⁶. L'haptoglobine peut donc avoir un effet protecteur contre la mortalité dans le cas de chocs septiques ou serait « plus consommée » chez les non-survivants à cause d'un état plus grave et d'une lyse plus importante des globules rouges.

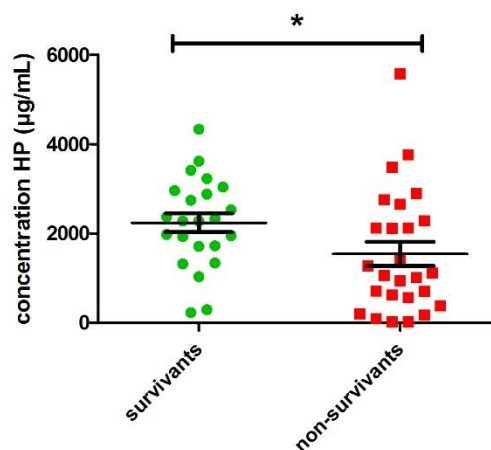


Figure 53 Quantification de l'haptoglobine par IDA dans les 49 plasmas de patients atteints d'un choc septique avec la moyenne des concentrations individuelles des peptides HP-1 , HP-2 et HP-4

III.5 Développement de la méthode pour la quantification multiplexe des biomarqueurs potentiels minoritaires du plasma

Afin de détecter et quantifier les protéines plasmatiques de faibles abondances en LC-MS/MS, des anticorps sont souvent nécessaires (cf Tableau 2). Les anticorps anti-peptide offre la possibilité d'enrichir les peptides des protéines d'intérêt permettant ainsi d'atteindre une meilleure sensibilité. Pour des protéines cibles présentes à de faibles concentrations dans le plasma, l'enrichissement par une

approche SISCAPA permet de concentrer efficacement les peptides cibles de façon multiplexe, réduisant la complexité de l'échantillon et de les quantifier grâce aux peptides alourdis ajoutés.

III.5.1 Obtention des anticorps anti-peptide

III.5.1.a) Couplage des peptides à la BSA

Les peptides sont couplés à la protéine porteuse BSA afin de les rendre immunogènes. Les masses des lots de BSA, BSA-SMC et BSA-SMC-peptide ont été déterminées et les différents couplages ont été vérifiés par analyse MALDI-TOF. Les résultats sont reportés dans le Tableau 24. Ainsi, en moyenne 22 molécules de SMC ont été couplées à la BSA et la grande majorité des peptides ont été couplés correctement à la BSA-SMC. Seuls les peptides ANG2-2, NGAL-4, HLAG5-2 ont été très faiblement ou pas couplés à la BSA-SMC. Les fonctions thiols de ces peptides étaient majoritairement oxydées et par conséquent le couplage avec le BSA-SMC n'a pas fonctionné, même après des essais de réduction effectués avec du DTT 20 mM puis dessalage par cartouche SPE (Oasis HLB Cartridges, Waters). Ces trois peptides n'ont donc pas été injectés aux souris.

Tableau 24 Couplages de la BSA avec SMC et des peptides avec la BSA-SMC

protéines	peptides	masse théorique sans couplage (kDa)	masse mesurée après couplage (kDa)	nombre de peptide-BSA
BSA		66330	70514	22
procalcitonine	PCT-1	100746	2049.16	15
	PCT-2	92781	1321.39	17
	PCT-3	89094	1050.11	18
sRAGE	sRAGE-1	99648	1628.83	18
	sRAGE-2	114524	2345.76	19
	sRAGE-3	109392	2306.54	17
angiopoeitine-1	ANG1-1	96848	1559.68	17
	ANG1-2	95950	1706.9	15
	ANG1-3	91199	1168.24	18
angiopoeitine-2	ANG2-1	97380	1510.6	18
	ANG2-2	72777	1489.76	2
	ANG2-3	98701	1583.74	18
NGAL	NGAL-1	97079	1894.1	14
	NGAL-2	91355	1911.23	11
	NGAL-3	82236	1358.58	9
	NGAL-4	70807	1288.49	0
HMGB1	HMGB1-1	102080	1382.56	22
	HMGB1-2	93552	1567.72	15
	HMGB1-3	93782	1824.05	13
HLA5	HLA5-1	93494	1296.38	18
	HLA5-2	72892	2026.27	1
	HLA5-3	97849	1530.73	18
CD74	CD74-1	80315	1732	6
	CD74-2	88310	1022.15	17
	CD74-3	94788	1550.76	16
granuline	GRAN-1	89546	1208.35	16
	GRAN-2	87492	1105.28	15
	GRAN-3	97099	1491.73	18
amphireguline	AMPH-1	89154	1338.42	14
	AMPH-2	87431	1408.65	12
	AMPH-3	97068	1159.24	22

III.5.1.b) Réponses immunitaires des souris immunisées

Les saignées de souris ont été testées avec chaque peptide couplé à l'AChE séparément. Les résultats obtenus pour les deux souris sur quatre répondant le mieux contre les peptides injectés sont présentés dans les cinq figures de la Figure 54 à Figure 58. En abscisse sont reportées les dilutions des saignées du 1/100 au 1/10 000. L'intensité du signal exprimée en unité d'absorbance à 414 nm est reportée en ordonnée. Les souris sélectionnées sont celles qui ont les signaux les plus forts pour tous les peptides aux plus fortes dilutions. On observe de bonnes réponses immunitaires pour la grande majorité des peptides. De faibles titres en anticorps polyclonaux ont été obtenus pour les peptides CD74-1 et NGAL-

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

3, ce qui peut être expliqué par un couplage des peptides avec la BSA-SMC relativement bas (6 et 9, respectivement) par rapport aux autres peptides (moyenne 16) (Tableau 24).

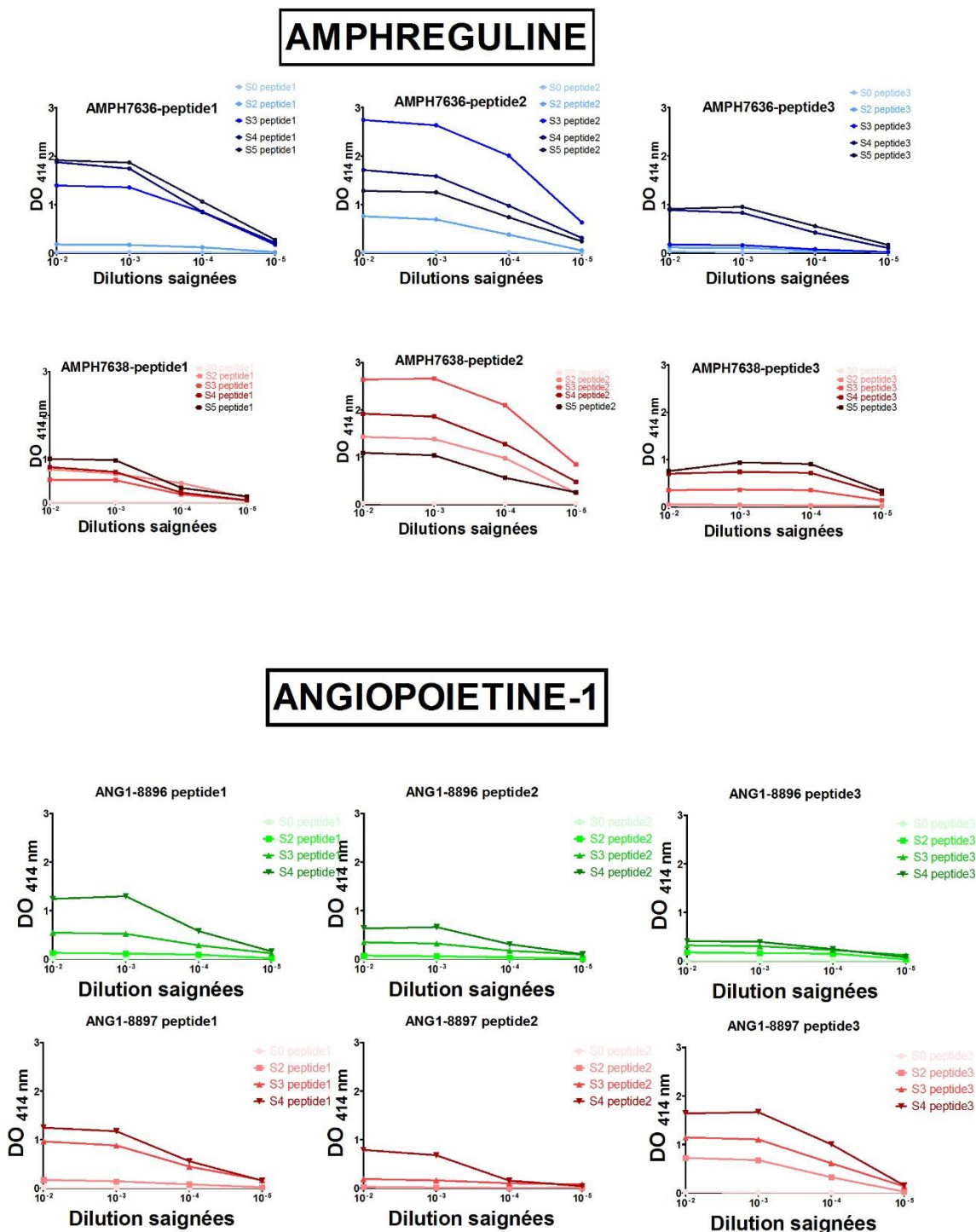
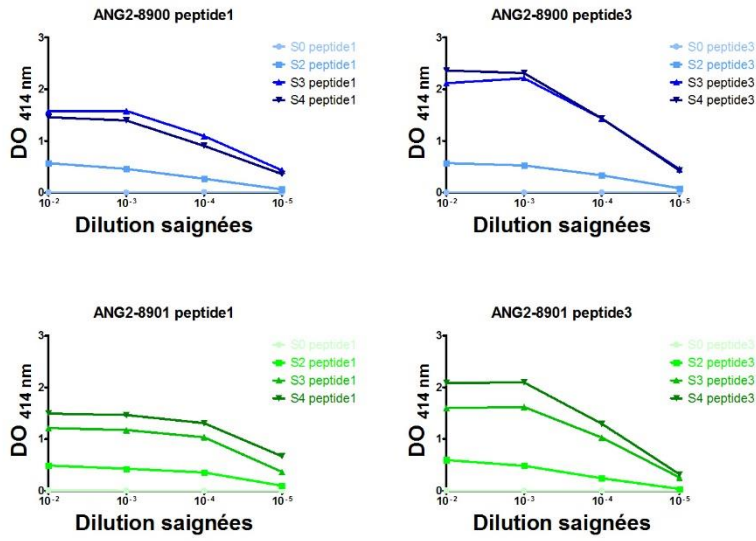


Figure 54 Réponse immunitaire des souris immunisées avec les peptides de amphreguline et angiotensine-1 et sélectionnés pour la production des anticorps

ANGIOPOIETINE-2



CD74

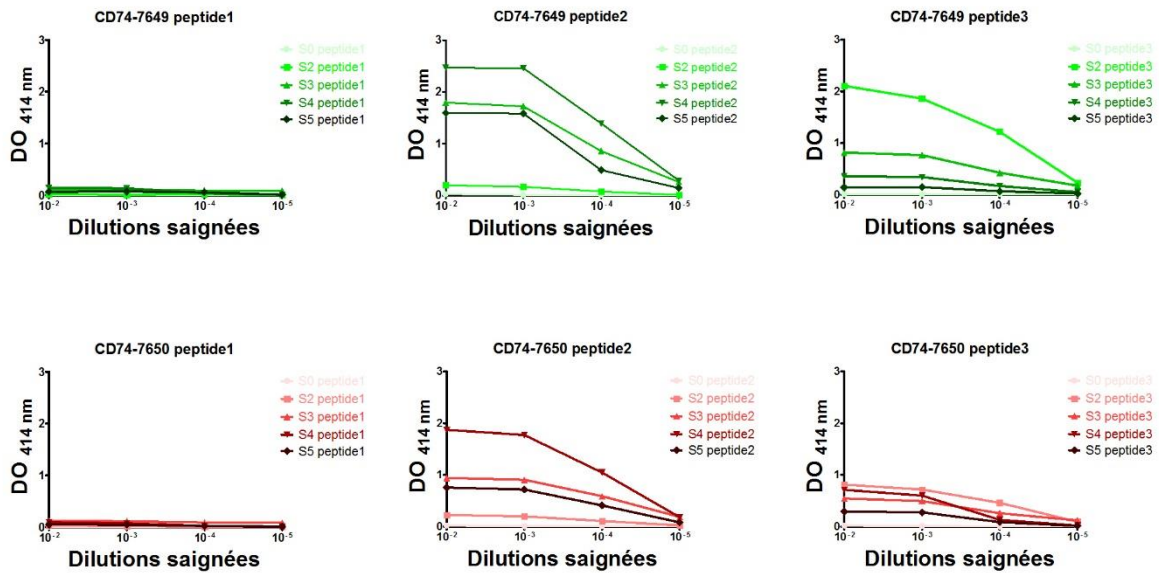
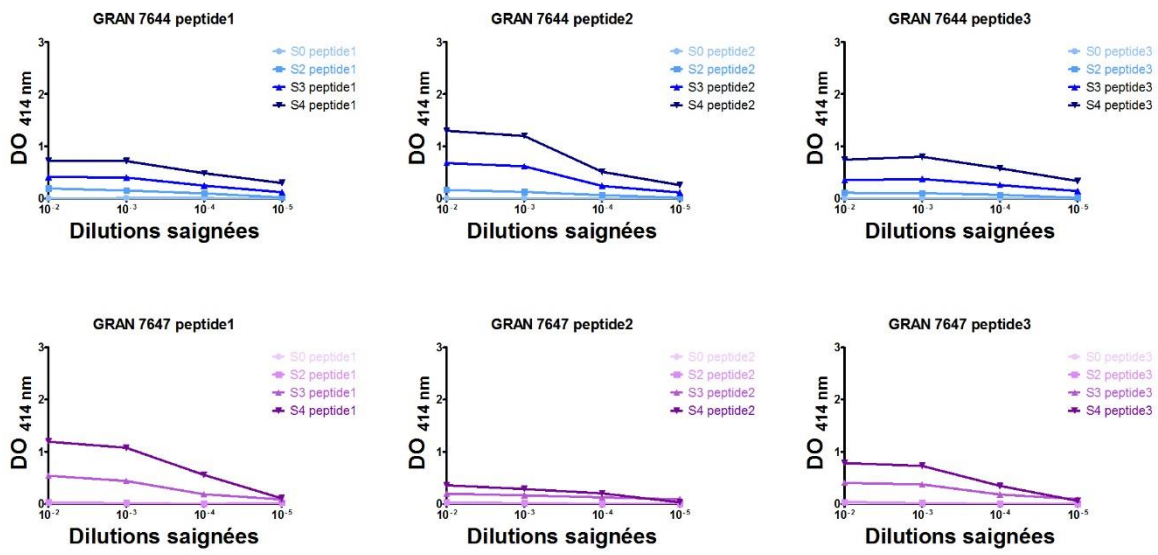


Figure 55 Réponse immunitaire des souris immunisées avec les peptides de angiopoietine-2 et CD74 et sélectionnées pour la production des anticorps

GRANULINE



HLAG5

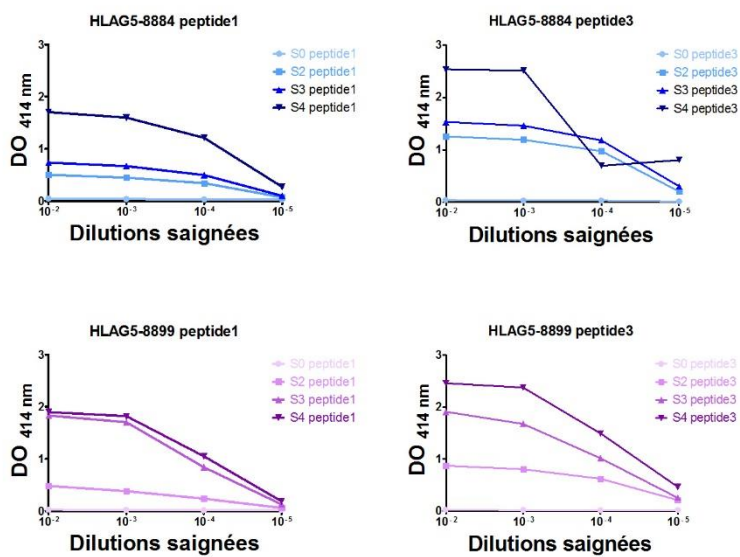


Figure 56 Réponse immunitaire des souris immunisées avec les peptides de granuline et HLAG5 et sélectionnés pour la production des anticorps

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

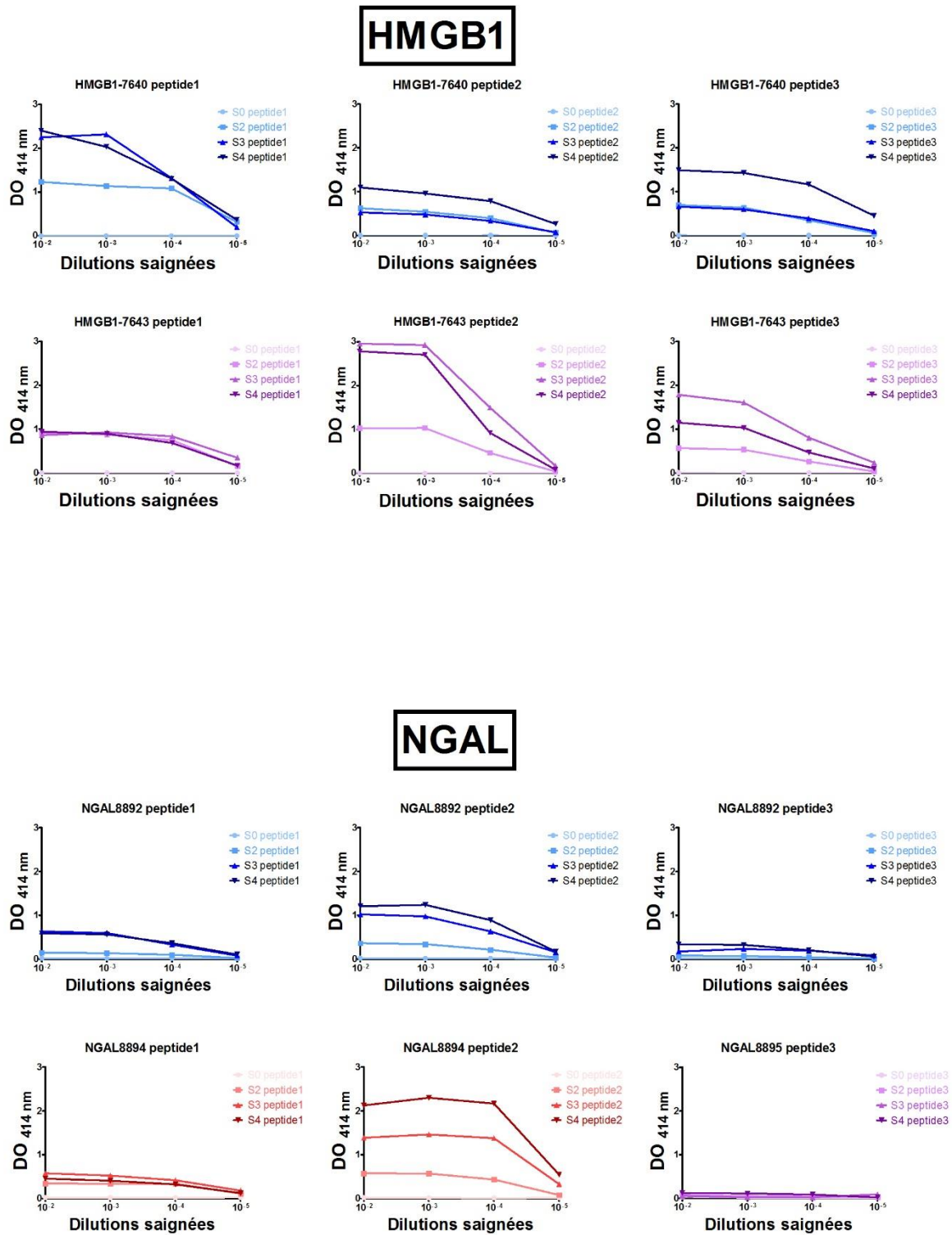


Figure 57 Réponse immunitaire des souris immunisées avec les peptides de HMGB1 et NGAL et sélectionnées pour la production des anticorps

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

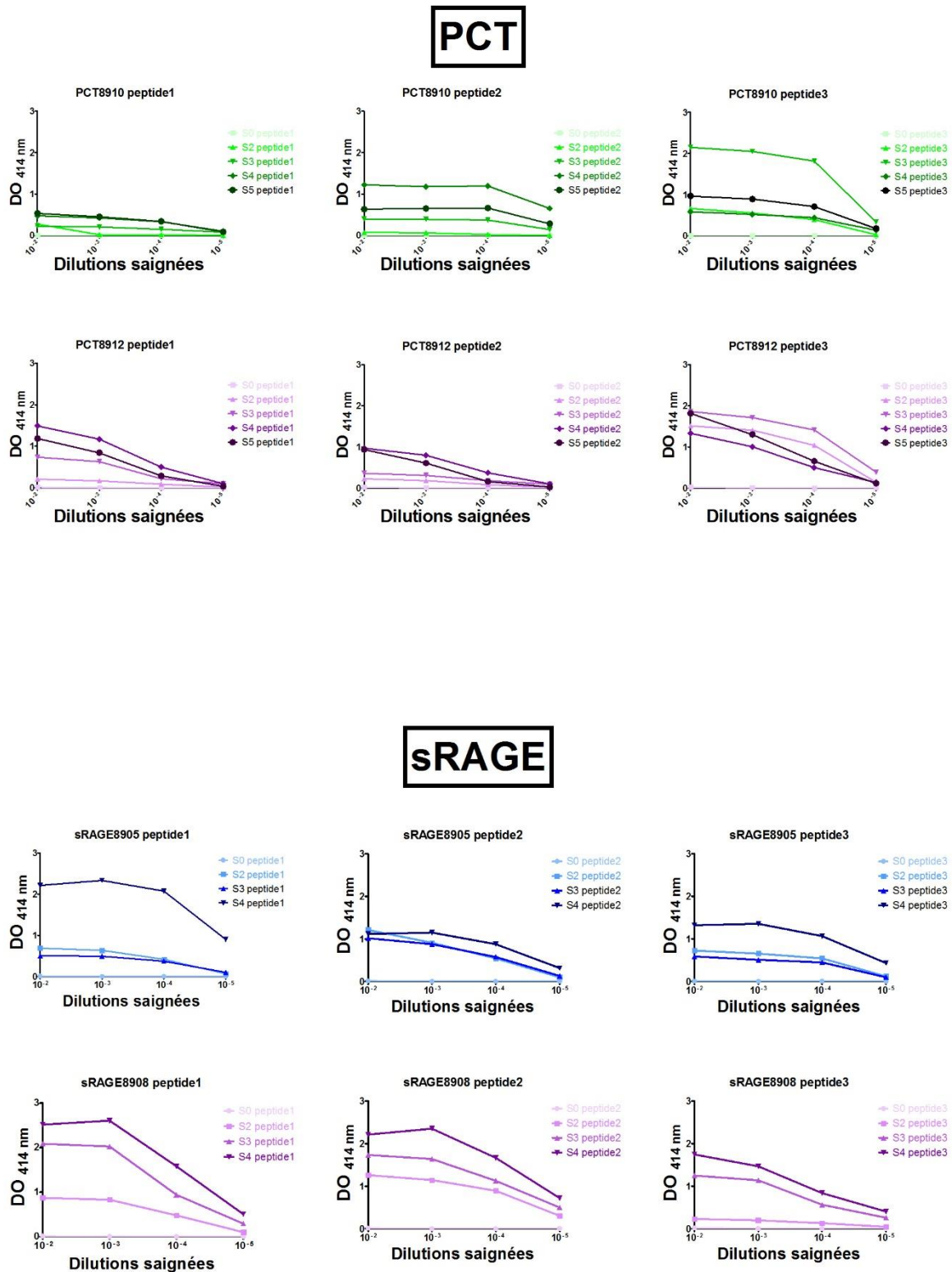


Figure 58 Réponse immunitaire des souris immunisées avec les peptides de procalcitonine (PCT) et sRAGE et sélectionnées pour la production des anticorps

III.5.1.c) Criblage des hybridomes

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

Suite à la fusion des splénocytes des deux souris sélectionnées avec les cellules de myélome murin SN1, deux criblages des surnageants d'hybridomes ont été effectués. Les premiers criblages, soit 20 plaques de microtitration par mélange de peptides immunisés, ont été réalisés avec un mélange de peptides couplés à l'AChE et non avec les peptides séparés afin de réduire d'un facteur trois le nombre de plaques à tester. A l'issue de ces criblages, jusqu'à 173 clones positifs ont été sélectionnés (Tableau 25), remis en culture pour 24 h puis testés à trois dilutions différentes (pur, 1/10 et 1/100) pour un second criblage avec les trois peptides-AChE séparément. Pour chaque peptide, cinq hybridomes générant les plus forts signaux en ELISA ont été sélectionnés. Le nombre d'hybridomes sélectionnés à l'issue des criblages est résumé dans le Tableau 25.

Pour certaines protéines, un bon nombre d'hybridomes positifs a été obtenu en accord avec de bonnes réponses immunitaires des souris comme pour la procalcitonine, HMGB1 et HLAG5. Cependant, de bonnes réponses immunitaires ne garantissent pas l'obtention systématique d'un grand nombre d'hybridomes positifs comme pour amphireguline ou angiopoietine-2. Enfin, dans les moins bons cas, de faibles réponses immunitaires sont en accord avec un très faible nombre d'hybridomes positifs comme pour NGAL et CD74 pour lesquelles pas ou peu d'hybridomes ont été obtenus.

Tableau 25 Résultats des criblages des hybridomes pour l'obtention d'anticorps spécifiques des protéines AMPH, ANG1, ANG2, CD74, GRAN, HLAG5, HMGB1, NGAL, PCT et sRAGE

protéines	Nbre d'hybridomes total	1 ^{er} criblage (nbre d'hybridomes positifs)	2 ^{ème} criblage (nbre d'hybridomes sélectionnés)	Nbre d'hybridomes sélectionnés pour le peptide		
				1	2	3
Angiopoietine-1	541	173	15	5	5	5
sRAGE	870	95	16	5	6	5
Amphreguline	177	14	8	3	5	0
Granuline	742	86	15	5	5	5
Procalcitonine	636	93	18	5	5	8
HMGB1	343	91	15	5	5	5
HLAG5	621	53	11	5	/	6
Angiopoietine-2	148	27	8	3	/	5
NGAL	120	7		2	3	0
CD74	244	4		0	4	0

Légende : / = peptide non injecté pour immunisation

III.5.1.d) Anticorps anti-peptide oligoclonaux

Les hybridomes sélectionnés pour chaque peptide ont été poolés pour produire un pool d'anticorps spécifique de chaque peptide. Au total, 24 lots d'anticorps oligoclonaux ont été produits et purifiés. L'absorbance à 280 nm de chaque solution d'anticorps purifiés a été mesurée afin de déterminer leur concentration ; les données sur chaque anticorps anti-peptide oligoclonal sont présentées dans le Tableau 26.

Tableau 26 Résumé des résultats des anticorps anti-peptides purifiés

anticorps	quantité (mg)	concentration (mg/mL)
sRAGE-1	16,3	3,9
sRAGE-2	12,5	2,3
sRAGE-3	9,5	2,4
ANG1-1	4,7	1,6
ANG1-2	10,1	2,1
ANG1-3	14,9	3,4
GRAN-1	8,7	1,8
GRAN-2	8,8	1,9
GRAN-3	6,7	0,8
PCT-1	10,8	2,7
PCT-2	10,8	3,7
PCT-3	15,9	3,9
ANG2-1	13,1	2,8
ANG2-3	1,6	0,3
HMGB1-1	11,0	2,5
HMGB1-2	6,4	2,4
HMGB1-3	12,8	2,3
NGAL-1	9,8	2,8
NGAL-2	10,2	3,6
AMPH-1	5,0	2,1
AMPH-2	6,9	2,0
HLA5-1	3,5	1,4
HLA5-3	5,3	1,7
CD74-2	5,6	1,1

Les anticorps purifiés ont été analysés en SDS-PAGE afin d'évaluer leur pureté. A titre d'exemple, l'analyse SDS-PAGE en condition réductrice et non-réductrice de trois anticorps oligoclonaux anti-peptide de la protéine sRAGE est illustrée en Figure 59. On observe bien une bande majoritaire en condition non-réductrice à 150 kDa correspondant à l'anticorps entier et deux bandes proches de 25 et 50 kDa en condition réductrice correspondant à la chaîne légère et la chaîne lourde pour les trois anticorps anti-peptide. Les anticorps ont donc été considérés intègres et leur pureté suffisante pour être utilisés pour la suite.

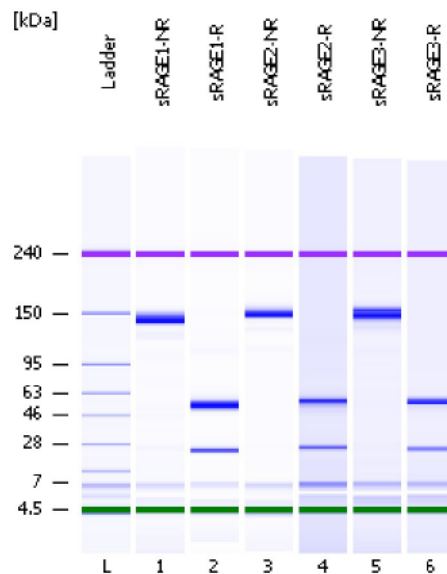


Figure 59 Analyse SDS-PAGE de trois anticorps anti-peptide sRAGE en conditions réductrice (R) et non-réductrice (NR)

III.5.1.e) Evaluation des anticorps anti-peptide

III.5.1.e.i) Test SPIE-IA

La méthode SPIE-IA a été utilisée afin de vérifier si les anticorps reconnaissent bien les peptides d'intérêt. Pour cela, les peptides SIL PEPotec (peptides alourdis utilisés en LC-MS/MS), équivalents aux peptides protéotypiques choisis, ont été utilisés. Cette méthode a été développée pour la détection de petites protéines, peptides ou haptènes, avec un unique anticorps (Figure 49). Nous avons considéré que l'anticorps anti-peptide reconnaissait le peptide si le rapport signal spécifique / signal non spécifique était > 2 . Les résultats de cette analyse sont donnés dans le Tableau 27. Sur les 24 anticorps anti-peptide produits, 19 anticorps semblent reconnaître les peptides correspondants, soit 79% des anticorps. Il est possible que les cinq anticorps restants ne reconnaissent pas les peptides cibles et soient dirigés en partie contre la cystéine C-terminal des peptides et les bras SMC de l'immunogène.

Tableau 27 Résultats de l'analyse par SPIE-IA des 24 anticorps anti-peptide

Anticorps	SS/SN
sRAGE-1	75.616
sRAGE-2	20.448
sRAGE-3	11.959
ANG1-1	45.097
ANG1-2	5.000
ANG1-3	5.400
GRAN-1	8.737
GRAN-2	18.682
GRAN-3	17.500
PCT-1	5.521
PCT-2	0.731
PCT-3	1.149
ANG2-1	0.921
ANG2-3	0.400
HMGB1-1	24.257
HMGB1-2	2.338
HMGB1-3	6.833
NGAL-1	4.635
NGAL-2	26.364
AMPH-1	43.176
AMPH-2	63.522
HLAG5-1	1.013
HLAG5-3	2.566
CD74-2	2.833

Légende : SS= signal spécifique, SN=signal non spécifique

III.5.1.e).ii) Rendement d'immunoprécipitation en tampon

Un rendement d'immunoprécipitation (capture et élution) a pu être déterminé pour chaque anticorps anti-peptide par ajout de peptides *light* (peptide non marqué) en tampon PBS Tween20 0,05% et ajout de la même quantité de peptides SIL avant ou après l'immunoprécipitation, en duplicat. Les rendements sont donnés dans le Tableau 28. Les rendements varient de 0% à 80%. Les peptides ANG2-1, ANG2-3, et HLAG5-1 n'ont pas été détectés après immunoprécipitation par spectrométrie de masse. Les trois anticorps correspondants avaient déjà été observés comme potentiellement non fonctionnels d'après les résultats de l'évaluation par la méthode SPIE-IA. Il s'agit d'une première évaluation des anticorps pour l'immunoprécipitation en tampon et non en matrice complexe (plasma) mais elle permet notamment de montrer que trois lots d'anticorps oligoclonaux ne sont probablement pas fonctionnels : ANG2-1, ANG2-3, et HLAG5-1.

Tableau 28 Rendement d'immunoprécipitation des anticorps anti-peptide en tampon (n=2)

	rendement	CV
sRAGE-1	6,2%	11,3%
sRAGE-2	<i>Peptide non détecté en LC-MS/MS</i>	
sRAGE-3	<i>Peptide non détecté en LC-MS/MS</i>	
ANG1-1	7,6%	9,0%
ANG1-2	<i>Problème de détection du peptide light</i>	
ANG1-3	6,8%	14,0%
GRAN-1	20,3%	8,5%
GRAN-2	44,6%	9,3%
GRAN-3	75,8%	8,5%
PCT-1	80,2%	9,4%
PCT-2	8,5%	24,5%
PCT-3	<i>Peptide non détecté en LC-MS/MS</i>	
ANG2-1	0%	
ANG2-3	0%	
HMGB1-1	8,7%	13,1%
HMGB1-2	18,9%	6,5%
HMGB1-3	<i>Peptide non détecté en LC-MS/MS</i>	
NGAL-1	2,3%	8,4%
NGAL-2	14,2%	7,2%
AMPH-1	<i>Peptide non détecté en LC-MS/MS</i>	
AMPH-2	80,4%	17,6%
HLAG5-1	0%	
HLAG5-3	16,4%	5,3%
CD74-2	3,0%	9,4%

Conclusion :

Sur 31 peptides, pour trois peptides, le couplage à la protéine BSA n'a pas pu être réalisé efficacement, pour quatre peptides, aucun hybridome n'a été sélectionné, et enfin, pour trois peptides, les anticorps produits n'étaient pas fonctionnels et ne reconnaissaient pas la cible peptidique. Ces données sont rassemblées dans le Tableau 29.

Tableau 29 Récapitulatif des anticorps utilisables pour la méthode SISCAPA

protéines	Nom de peptides et anticorps	Fonctionnalité
sRAGE	sRAGE-1	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
	sRAGE-2	Fonctionnel en SPIE-IA
	sRAGE-3	Fonctionnel en SPIE-IA
angiopoïétine-1	ANG1-1	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
	ANG1-2	Fonctionnel en SPIE-IA
	ANG1-3	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
granuline	GRAN-1	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
	GRAN-2	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
	GRAN-3	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
procalcitonine	PCT-1	Fonctionnel en IP
	PCT-2	Fonctionnel en IP
	PCT-3	Anticorps non fonctionnel en SPIE-IA
angiopoïétine-2	ANG2-2	Anticorps non fonctionnel en SPIE-IA et IP
	ANG2-2	Peptide non couplé à la BSA
	ANG2-3	Anticorps non fonctionnel en SPIE-IA et IP
HMGB1	HMGB1-1	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
	HMGB1-2	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
	HMGB1-3	Anticorps fonctionnel en SPIE-IA
NGAL	NGAL-1	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
	NGAL-2	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
	NGAL-3	Pas d'hybridome
	NGAL-4	Peptide non couplé à la BSA
amphiréguline	AMPH-1	Anticorps fonctionnel en SPIE-IA
	AMPH-2	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
	AMPH-3	Pas d'hybridome
HLAG-5	HLAG5-1	Anticorps non fonctionnel
	HLAG5-2	Peptide non couplé à la BSA
	HLAG5-3	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
CD74	CD74-1	Pas d'hybridome
	CD74-2	Fonctionnel en SPIE-IA et IP
	CD74-3	Pas d'hybridome

La génération de bons anticorps n'est pas simple et leur efficacité doit être suffisante en immunoprécipitation pour pouvoir être utilisés pour l'approche SISCAPA. Plusieurs études ont évalué leur taux de réussite pour l'obtention de bons anticorps et ont mis en place des méthodes pour cribler leurs anticorps. Witheaker et al.²¹⁸ ont obtenu un taux de réussite d'obtention de bons anticorps de 60% par peptide (9 sur 15), qu'ils ont défini comme une efficacité de capture > 10%. Hsiao et al.⁴³⁸ ont également obtenu un taux de réussite similaire de 66% (24 sur 36). Les causes possibles d'échec d'un anticorps à immunoconcentrer une cible sont : une affinité faible de l'anticorps pour le peptide et une cross-réactivité de l'anticorps pour d'autres peptides de haute abondance dans le plasma qui entrent en compétition avec le peptide d'intérêt. Afin d'obtenir des meilleurs rendements d'obtention de bons anticorps, il est possible de cribler et d'évaluer les anticorps lors de leur production. Pope et al.⁴⁴⁷ ont effectué des analyses cinétiques de liaison par une technique de résonance plasmonique de surface pour

sélectionner des anticorps monoclonaux anti-peptides de lapin de haute affinité contre dix peptides en utilisant des surnageants d'hybridomes bruts après des criblages ELISA. En classant les surnageants d'hybridomes en fonction des données cinétiques, ils ont pu sélectionner des anticorps monoclonaux de haute qualité. Hsiao *et al.*⁴³⁸ ont également appliqué une stratégie d'analyse par résonance plasmonique de surface afin de mesurer les constantes d'affinité des anticorps, ils ont estimé qu'un anticorps était efficace en immunoprécipitation si son affinité pour le peptide était supérieur à $2,82 \times 10^{-9}$ M. Schoenherr *et al.*⁴³⁷ ont utilisé la technologie SISCAPA à l'aide d'un robot KingFisher 96 puits (Thermo Fisher Scientific) pour cribler directement les anticorps monoclonaux anti-peptides sélectionnés contre les deux peptides d'intérêt. Cette technique peut sembler plus adéquate, car les anticorps sont testés dans le format utilisé dans la méthode SISCAPA. En effet, Hsiao *et al.*⁴³⁸ ont observé que plusieurs anticorps possédaient une affinité élevée par analyse par résonance plasmonique mais une efficacité faible en SISCAPA. Les auteurs expliquent cette différence par le fait que la mesure d'affinité s'effectue à l'aide d'une puce revêtue d'un peptide pour capturer l'anticorps alors que l'approche SISCAPA immobilise l'anticorps pour capturer le peptide.

III.5.2 Mise au point de la méthode SISCAPA

La méthode SISCAPA est un processus multi-étapes qui implique :

1. Dénaturation des protéines du plasma
2. Réduction des protéines
3. Alkylation des protéines
4. Digestion enzymatique des protéines en peptides
5. Arrêt de la digestion enzymatique
6. Dilution de l'échantillon digéré
7. Immunoprécipitation des peptides par des anticorps anti-peptide immobilisés
8. Elution des peptides
9. Analyse LC-MS/MS.

Les différentes étapes de la méthode SISCAPA ont été optimisées afin d'obtenir les sensibilités nécessaires pour détecter les biomarqueurs candidats faiblement concentrés dans le plasma ($< 1 \mu\text{g/mL}$). Afin d'économiser les échantillons de plasmas de patients, les optimisations ont été faites sur des plasmas de sujets sains. Cependant, les concentrations des protéines endogènes cibles sont extrêmement faibles chez les sujets sains et parfois non détectables par LC-MS/MS (cf Tableau 2 et Tableau 16). Les optimisations de l'immunoprécipitation ont donc été faites par ajout de peptides SIL. Trois protéines endogènes détectables dans les plasmas sains ont été utilisées : GRAN, NGAL et HLAG5 pour l'optimisation de la précipitation du plasma.

III.5.2.a. Précipitation du plasma

La méthode de pellet digestion a été utilisée afin de faciliter la digestion des protéines du plasma tout en purifiant l'échantillon des petites molécules²¹². La précipitation par un solvant organique permet à la fois de dénaturer les protéines pour un meilleur rendement de digestion et également de diminuer l'effet matrice en éliminant les peptides solubles, les petites molécules comme les métabolites et certains lipides²¹². Les solvants organiques permettent un dépliage partiel ou une altération de la structure secondaire de la protéine, qui devient donc insoluble²¹³. Le pellet a été obtenu par précipitation des protéines par un solvant organique pour un ratio 3:1 de solvant:plasma. Trois conditions de précipitation des protéines ont été comparées en duplicat : précipitation par du méthanol (utilisé pour la quantification de S100A8/S100A9 au Chapitre 2), précipitation par de l'éthanol (autre solvant organique proposé par Ouyang *et al.*²¹²) et pas de précipitation. Ces différentes conditions ont été suivies d'une réduction, alkylation, digestion et immunoprécipitation des échantillons avant analyse par LC-MS/MS. Le ratio des aires des pics des peptides endogènes et SIL a été déterminé et la moyenne a été faite sur les duplicats (Tableau 30) et les trois conditions ont été comparées entre elles afin de déterminer le gain des différentes conditions (Tableau 31). Les précipitations par les deux solvants organiques ont permis d'obtenir globalement de meilleurs signaux pour les protéines endogènes en comparaison à une digestion directe sans précipitation. Le méthanol a cependant permis d'obtenir de meilleurs signaux et également d'un point de vue pratique de meilleurs pellets, à la fois plus compacts, permettant ainsi une élimination plus reproductible du surnageant, tout en permettant une bonne reprise des protéines du pellet dans du tampon au bicarbonate d'ammonium 50 mM à pH 7,4. Ces observations concernant les solvants organiques pour la dénaturation et la précipitation des protéines ont également été faites par Ouyang *et al.*²¹² qui classent également le méthanol avant l'éthanol et constatent les mêmes observations concernant les pellets obtenus et leurs reprises en tampon. La précipitation au méthanol a donc été choisie afin de dénaturer les protéines du plasma, permettre une meilleure digestion enzymatique et diminuer en partie les interférences matricielles. Nous avons fait le choix d'utiliser une précipitation au méthanol contrairement à la grande majorité des publications sur l'approche SISCAPA qui utilise principalement l'urée^{226,231,439,448}, le chlorure de guanidinium²²⁴ et l'acide désoxycholique (DOC)⁴³⁸. Cependant, l'utilisation de ces dénaturants oblige le réajustement du pH avant la digestion trypsique et/ou l'élimination de l'agent dénaturant. Ainsi, la dénaturation par solvant organique permettrait de nous affranchir de ces étapes.

Tableau 30 Ratio moyen des aires des peptides endogène/SIL pour les protéines NGAL, HLAG5 et GRAN pour les deux conditions de précipitation des protéines du plasma au méthanol et à l'éthanol et sans précipitation (n=2)

	ratio moyen peptides endogène/SIL					
	méthanol	CV	éthanol	CV	pas de précipitation	CV
NGAL	3,76	4,0%	1,54	2,9%	0,47	4,6%
HLAG5	14,32	5,4%	9,67	10,1%	8,38	5,3%
GRAN	0,27	9,4%	0,36	6,1%	0,51	5,9%

Tableau 31 Comparaison des conditions de précipitation des protéines du plasma avant digestion

Comparaison des conditions de précipitation	Gain moyen
éthanol / rien	2,28
méthanol / rien	5,02
méthanol / éthanol	1,88

III.5.2.b Arrêt de la digestion enzymatique

Après précipitation des protéines du plasma, ces dernières sont réduites, alkylées et digérées par la trypsine afin d'obtenir des peptides. Avant l'étape d'immunoprécipitation, il est important de stopper l'action de la trypsine car elle pourrait notamment digérer les anticorps utilisés pour l'immuno-capture. Pour cela, une quantité deux fois supérieure à la trypsine de TLCK (inhibiteur de la trypsine) est ajoutée afin d'arrêter le clivage trypsique²⁹⁴. Cet ajout de TLCK permet d'éviter d'ajouter de l'acide comme il est habituellement fait dans la littérature^{228,436,439,449}. L'utilisation d'acide avec les anticorps peut endommager leur structure et donc diminuer leur efficacité. De plus, l'utilisation de TLCK permet un gain de temps, car le digestat est agité seulement 5 min à température ambiante avec l'inhibiteur de trypsine, il ne modifie pas le pH et il ne gêne pas la suite du processus.

III.5.2.c Dilution de l'échantillon

A la suite de la précipitation des protéines du plasma, leur réduction, alkylation et digestion, l'échantillon est ensuite dilué avant l'immunoprécipitation afin de diminuer l'effet matrice et donc améliorer l'efficacité de capture des anticorps. Deux tampons pour diluer le plasma digéré ont été testés : un tampon EIA (tampon PBS contenant 0,1% de BSA) et un tampon PBS Tween 20 à 0,05%. Chaque condition de dilution a été effectuée en duplicat. L'évaluation des tampons de dilution a été faite sur la moyenne des aires des pics des peptides SIL ajoutés après digestion (Tableau 32). En moyenne, les aires des pics obtenues avec la dilution en PBS Tween 20 à 0,05% sont deux fois plus élevées qu'avec une dilution en tampon EIA. En effet, le Tween 20 permet de limiter les interactions non spécifiques des

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

anticorps avec des peptides non-ciblés. Dans notre cas, le Tween 20 semble plus efficace que l'ajout de BSA. Le tampon PBS Tween 20 à 0,05% a donc été utilisé dans la méthode SISCAPA développée.

Tableau 32 Comparaison des aires moyennes des peptides SIL pour différents tampons de dilutions (EIA et PBST) d'un pool de plasmas digéré (n=2)

	Aires moyennes des peptides SIL				
	EIA	CV	PBS Tween 20	CV	rapport PBS Tween 20/EIA
sRAGE-1	2,7E+05	21,2%	5,2E+05	8,6%	1,9
ANG1-1	1,0E+06	15,1%	8,7E+05	0,5%	0,9
ANG1-2	1,2E+06	10,7%	1,4E+06	0,3%	1,2
ANG1-3	1,8E+05	13,8%	2,0E+05	19,9%	1,1
GRAN-1	2,9E+05	6,0%	4,9E+05	1,0%	1,7
GRAN-2	2,4E+06	5,2%	3,9E+06	0,9%	1,6
PCT-1	2,5E+05	4,9%	1,2E+06	12,1%	4,9
HMGB1-1	4,6E+05	21,5%	1,1E+06	0,5%	2,3
HMGB1-2	1,2E+05	87,2%	5,3E+05	12,9%	4,4
NGAL-1	5,7E+04	44,4%	5,4E+04	5,8%	0,9
NGAL-2	4,9E+05	19,0%	6,0E+05	9,6%	1,2
AMPH-2	4,2E+06	139,3%	1,4E+07	6,2%	3,5
HLA5-3	5,0E+05	11,0%	1,1E+06	4,8%	2,3
CD74-2	4,1E+04	89,1%	2,3E+04	40,1%	0,6
			moyenne		2,0

Ensuite, plusieurs dilutions de plasma en tampon PBS Tween 20 ont été testées : 1/10, 1/20 et 1/50 avec 100 µL de pool de plasmas digéré, en duplicat avec des volumes finaux de 1 mL, 2 mL et 5 mL, respectivement. Les moyennes des aires ont été comparées pour tous les peptides SIL dans le Tableau 33. La dilution du plasma au 1/10 est celle qui a permis d'obtenir les meilleurs signaux. Une dilution de l'échantillon est nécessaire afin d'assurer la fonctionnalité des anticorps. Une dilution importante avec un même volume de plasma peut permettre une meilleure efficacité de certains anticorps, mais il semblerait qu'une dilution plus faible permette d'obtenir des aires des pics plus grandes. La dilution diminue les concentrations des antigènes, ce qui défavorise la liaison anticorps-antigène. La dilution au 1/10 a donc été choisie. Cette dilution possède également l'avantage avec un volume final de 1 mL de pouvoir automatiser l'immunoprécipitation, les trois lavages et l'élution avec le robot King Fisher.

Tableau 33 Comparaison des aires moyennes des peptides SIL pour différentes dilutions d'un pool de plasmas digéré (n=2)

	Aires moyennes des peptides SIL					
	1/50	CV	1/20	CV	1/10	CV
sRAGE-1	5,2E+05	41,7%	1,6E+06	18,7%	2,4E+06	12,7%
ANG1-1	3,5E+05	19,3%	1,8E+06	25,8%	1,9E+06	0,9%
ANG1-2	2,1E+06	14,7%	3,2E+06	10,5%	9,2E+06	8,1%
ANG1-3	6,3E+04	40,3%	9,0E+04	100,7%	1,6E+05	23,5%
GRAN-1	5,8E+05	10,2%	5,6E+05	43,9%	1,5E+06	4,5%
GRAN-2	2,8E+06	17,6%	3,0E+06	17,5%	1,8E+07	3,1%
GRAN-3	5,9E+06	2,9%	8,5E+06	20,6%	1,7E+07	0,8%
PCT-1	1,1E+07	17,6%	7,9E+06	30,1%	2,1E+07	4,1%
PCT-2	1,9E+05	53,0%	2,5E+05	34,1%	1,0E+06	19,0%
HMGB1-1	5,6E+05	0,4%	6,6E+05	6,0%	9,9E+05	15,1%
HMGB1-2	8,2E+05	18,4%	6,4E+05	21,1%	2,3E+06	1,2%
NGAL-2	3,4E+05	16,0%	4,1E+05	11,5%	1,0E+06	5,4%
AMPH-2	4,0E+07	28,7%	3,6E+07	13,6%	8,5E+07	3,7%
HLA5-3	1,1E+06	0,2%	2,0E+06	5,4%	3,6E+06	8,5%

III.5.2.d. Elution des peptides

Afin de libérer les peptides immunoprécipités par les anticorps, une dénaturation de la liaison antigène-anticorps est nécessaire. Dans la littérature, différents acides sont utilisés afin d'éluer les peptides dans les approches SISCAPA : glycine 0,1 M à pH 2^{449,450}, HCl 1 M²²⁶ et acide acétique à 5%^{253,438,448}. Différents acides ont donc été testés afin d'éluer les peptides immunoprécipités : glycine 0,1 M à pH 2, HCl 1 M, acide trifluoroacétique (TFA) à 1% et acide acétique à 5%. Les quatre conditions ont été comparées en duplicat après précipitation, réduction, alkylation, digestion, dilution et IP sur un pool de plasmas provenant de patients sains. Les moyennes des aires des peptides SIL ont été comparées et les résultats obtenus pour les différents acides sont donnés dans le Tableau 34. Des résultats équivalents ont été obtenus pour les quatre conditions. L'acide acétique à 5% a donc été choisi car c'est l'acide le plus utilisé dans les publications.

Tableau 34 Comparaison des aires moyennes des peptides SIL pour différentes conditions d'éluions acides (n=2)

	Aire moyenne des peptides SIL							
	glycine	CV	HCl	CV	TFA	CV	acide acétique	CV
sRAGE-1	2,2E+04	62,6%	9,2E+04	55,0%	1,3E+05	57,1%	2,6E+05	13,9%
ANG1-1	8,6E+05	8,0%	9,5E+05	1,4%	1,0E+06	10,0%	1,0E+06	9,3%
ANG1-2	2,4E+06	23,9%	1,6E+06	1,2%	1,7E+06	4,5%	1,9E+06	9,1%
ANG1-3	5,1E+05	0,2%	5,2E+05	1,7%	5,2E+05	9,3%	5,1E+05	3,3%
GRAN-1	4,1E+05	19,0%	2,4E+05	120,2%	4,2E+05	8,2%	5,3E+05	4,4%
GRAN-2	3,3E+06	8,0%	3,3E+06	8,0%	3,5E+06	3,8%	3,9E+06	3,8%
PCT-1	1,5E+06	39,1%	1,7E+06	2,9%	2,4E+06	49,2%	3,8E+06	3,9%
PCT-2	3,4E+05	14,5%	3,5E+05	1,7%	3,2E+05	10,5%	3,0E+05	3,7%
HMGB1-1	6,6E+05	9,5%	7,1E+05	2,4%	6,7E+05	7,5%	7,5E+05	3,8%
NGAL-2	7,9E+05	2,3%	8,5E+05	38,6%	9,6E+05	7,1%	8,3E+05	5,1%
AMPH-2	1,1E+07	1,2%	9,7E+06	25,1%	1,2E+07	10,0%	1,4E+07	0,9%
HLA5-3	1,2E+06	4,6%	1,2E+06	0,8%	1,2E+06	3,9%	1,3E+06	5,7%

III.5.2.e. Analyse LC-MS/MS

III.5.2.e.i) Comparaison des chaînes standard UHPLC et capillaire-LC

Afin d'évaluer une possible augmentation de la sensibilité de la méthode par diminution du débit chromatographique, une séparation sur chaîne chromatographique capillaire a été comparée avec une chaîne standard UHPLC. La diminution des diamètres avec la chaîne capillaire permet une diminution de la dilution chromatographique et donc une augmentation de la concentration locale de l'analyte par rapport à la chaîne standard⁴⁵¹. Cependant, une diminution des diamètres et des débits impose des temps de séparation plus long. Les gradients de séparation avec une chaîne standard UHPLC sont généralement bien plus courts que ceux utilisés en capillaire-LC.

Afin d'évaluer la méthode SISCAPA pour les chaînes standards UHPLC et capillaire-LC, une gamme d'un mélange de peptides SIL a été réalisée de 0,2 pmol/mL à 20 pmol/mL (pondération 1/x) avec le même volume d'injection de 10 µL. Un exemple de deux peptides (GRAN-2 et PCT-1) est illustré dans la Figure 60. Ces injections ont été faites sur deux appareils distincts avec la même technologie MS (Q-exactive) mais des chaînes chromatographiques différentes. Les aires des pics des peptides SIL ont été comparées. On observe pour tous les peptides, un gain moyen en aire de signal de 8,9 avec la capillaire-LC. De plus, toujours dans le but de comparer les deux chaînes LC, deux immunoprécipitations multiplexes d'un mélange de peptides SIL à 0,5 pmol/mL ont été effectuées en duplicat en tampon et dans une digestion d'un pool de plasmas provenant de patients sains. Les moyennes des aires des pics des peptides SIL ont été comparées et les résultats sont donnés dans le Tableau 35. On observe pour tous les peptides avec la capillaire-LC, un gain moyen similaire en aire de signal de 8,9 en tampon et en plasma digéré dilué. Ce même gain observé en tampon et en plasma semble indiquer un effet matrice similaire entre les deux systèmes, probablement lié à l'utilisation de l'immunoprécipitation comme technique d'extraction. Ainsi, un gain de sensibilité avec la chaîne capillaire est observé en comparaison

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

à l'UHPLC pour la gamme de peptides marqués en tampon et les deux immunoprécipitations en tampon et en matrice complexe (plasma digéré). Même si ce gain est inférieur au gain théorique, de 49, donné par l'équation suivante :

$$f = \frac{d_1^2}{d_2^2} \quad \text{où } d_1(\text{diamètre colonne 1}) > d_2(\text{diamètre colonne 2})$$

le gain expérimental obtenu est cependant suffisant pour continuer les analyses sur la chaîne capillaire-LC plutôt que sur l'UHPLC. En effet, lorsqu'on utilise des colonnes avec des diamètres internes plus étroits, les composés pénètrent dans la source à des concentrations plus élevées et à un débit plus bas, ce qui entraîne une augmentation du signal et un meilleur rendement d'ionisation⁴⁵¹. Cependant, il faut noter que de plus grandes quantités d'échantillon peuvent être injectées sur des colonnes conventionnelles, ce qui peut compenser en partie le gain des colonnes capillaires.

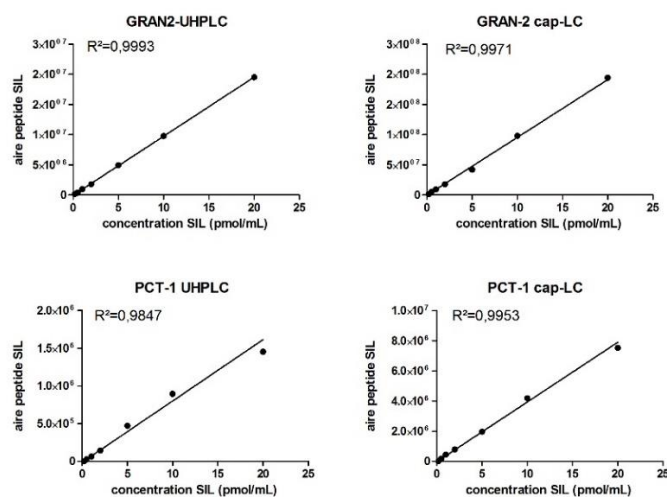


Figure 60 Exemple de gammes de deux peptides SIL (GRAN-2 et PCT-1) en tampon pour comparaison entre chaînes UHPLC et capillaire-LC

A noter que, deux peptides ANG1-1 et ANG1-3 n'ont pas été détectés en UHPLC alors qu'ils le sont avec la chaîne capillaire. Par contre, l'anticorps CD74-2 semble ne pas être fonctionnel en milieu complexe car le peptide n'est pas détecté après immunoprécipitation en plasma digéré quelque soit le système chromatographique. Cet anticorps avait déjà montré une faible reconnaissance lors du test SPIE-IA (paragraphe III.5.1.e.i) Test SPIE-IA). Même avec une dilution élevée au 1/50, permettant de diminuer l'effet matrice du plasma, l'anticorps ne permet pas la détection du peptide CD74-2.

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

Tableau 35 Comparaison des aires des peptides SIL après IP en tampon et en plasma digéré avec UHPLC et capillaire-LC (n=2)

IP tampon

	Aire moyenne des peptides SIL				
	UHPLC	CV	capillaire	CV	rapport
sRAGE1	1,3E+05	4,0%	1,1E+06	25,1%	8,8
ANG1-1			8,2E+05	27,3%	
ANG1-2	6,7E+05	4,2%	1,9E+06	5,0%	2,8
ANG1-3			5,0E+05	23,3%	
GRAN-1	8,4E+04	0,5%	6,9E+05	20,4%	8,2
GRAN-2	2,6E+05	7,1%	2,6E+06	27,4%	10,2
GRAN-3	5,6E+05	1,4%	3,6E+06	20,0%	6,5
PCT-1	3,5E+05	0,6%	1,2E+06	5,6%	3,3
HMGB1-1	1,8E+05	12,5%	1,7E+06	20,5%	9,6
HMGB1-2	2,0E+05	1,9%	1,4E+06	27,4%	7,2
NGAL-2	1,7E+05	0,0%	4,0E+06	24,6%	23,2
AMPH-2	7,5E+05	0,9%	8,0E+06	23,1%	10,8
HLAG5-3	4,6E+05	2,5%	2,2E+06	32,6%	4,8
CD74-2	3,2E+04	23,6%	3,8E+05	59,5%	11,8
			moyenne		8,9

IP plasma

	Aire moyenne des peptides SIL				
	UHPLC	CV	capillaire	CV	rapport
sRAGE1	1,3E+05	0,3%	7,5E+05	2,8%	5,9
ANG1-1			1,8E+05	0,9%	
ANG1-2	2,8E+05	2,5%	7,3E+05	5,4%	2,6
ANG1-3			2,9E+04	12,5%	
GRAN-1	2,2E+04	9,3%	1,9E+05	22,4%	8,4
GRAN-2	2,5E+05	3,5%	1,9E+06	4,0%	7,6
GRAN-3	4,6E+05	0,3%	2,2E+06	0,8%	4,7
PCT-1	2,8E+05	3,0%	9,3E+05	2,1%	3,4
HMGB1-1	1,5E+04	30,3%	3,0E+05	3,5%	19,2
HMGB1-2	2,0E+04	13,0%	2,7E+05	2,8%	13,3
NGAL-2	1,5E+04	87,5%	3,1E+05	1,8%	20,8
AMPH-2	6,7E+05	20,0%	5,2E+06	3,6%	7,8
HLAG5-3	1,3E+05	19,1%	5,1E+05	11,5%	4,1
CD74-2					
			moyenne		8,9

La séparation sur chaîne capillaire a nécessité l'ajout d'une étape de filtration des échantillons après élution des peptides. En effet, l'analyse des éluats après immunoprécipitation a provoqué des montées en pression de la colonne, sans doute dues à la présence dans l'éluat de protéines mal digérées ou

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

d'anticorps mal couplés aux billes magnétiques. Ainsi, l'utilisation de filtre 10 K (Nanosep 10 K Omega, Pall) préalablement rincé et équilibré a été mise en place. Afin d'évaluer les pertes que pouvaient impliquer cette étape supplémentaire, deux solutions d'un mélange de peptides SIL à 0,5 pmol/mL ont été filtrées et comparées aux deux-mêmes solutions non filtrées. Les analyses LC-MS/MS ont montré que les aires n'étaient pas sensiblement réduites avec filtration. Nous avons ainsi estimé que cette étape était nécessaire, et sans perte de signal trop importante, afin de conserver notre chaîne et nos colonnes capillaires sans les boucher.

Tableau 36 Comparaison des aires moyennes des peptides SIL avec et sans filtration (n=2)

	moyenne sans filtre	CV	moyenne avec filtre	CV	rapport sans filtre/avec filtre
sRAGE-1	2,6E+06	13,1%	2,2E+06	3,6%	1,16
ANG1-1	4,2E+06	8,6%	4,0E+06	1,3%	1,05
ANG1-2	2,3E+06	10,9%	2,0E+06	3,5%	1,14
ANG1-3	2,0E+06	8,3%	1,7E+06	8,9%	1,20
GRAN-1	7,6E+05	7,9%	6,5E+05	6,8%	1,17
GRAN-2	2,8E+06	1,1%	2,5E+06	8,3%	1,12
GRAN-3	2,3E+06	6,4%	1,9E+06	7,2%	1,16
PCT-1	1,0E+06	4,8%	9,8E+05	7,5%	1,07
PCT-2	8,2E+05	28,4%	8,9E+05	6,3%	0,91
HMGB1-1	5,6E+06	11,2%	5,6E+06	5,6%	1,00
HMGB1-2	1,5E+06	1,9%	1,1E+06	11,5%	1,37
NGAL-2	7,7E+05	9,3%	7,3E+05	1,0%	1,06
AMPH-2	5,6E+06	5,7%	4,3E+06	0,6%	1,29
HLAG5-3	2,8E+06	2,9%	2,9E+06	2,6%	0,98
CD74-2	3,7E+06	3,6%	2,7E+06	1,9%	1,38

III.5.3.e.ii) Sources ESI

Deux sources ESI ont été comparées afin d'améliorer la sensibilité de la méthode SISCAPA sur colonne capillaire, une source ESI adaptée à une chaîne UHPLC et une source ESI avec un sprayer adapté au microflux d'un diamètre de 75 µm. L'unité ESI capillaire génère de plus petites gouttelettes chargées à des débits réduits, ce qui entraîne une amélioration de l'ionisation⁴⁵². Les moyennes des aires d'un mélange de peptides SIL à 25 pmol/mL (en triplicat) ont été comparées avec les deux sources et les résultats sont donnés dans le Tableau 37. Un gain moyen de 3,8 a été obtenu avec la source ESI microflux. Nous avons donc continué nos analyses avec la source ESI et son sprayer adapté au microflux.

Tableau 37 Comparaison de deux sources ESI avec un mélange de peptides SIL (n=3)

	moyenne des aire des peptides SIL				rapport
	ESI microflux	CV	ESI UHPLC	CV	
sRAGE-1	2,7E+07	14,8%	5,1E+06	7,4%	5,3
ANG1-1	8,0E+07	9,0%	2,6E+07	5,7%	3,1
ANG1-2	8,8E+07	41,8%	1,6E+07	63,2%	5,5
ANG1-3	4,4E+07	7,9%	1,2E+07	2,8%	3,7
GRAN-1	1,7E+07	9,0%	6,2E+06	4,7%	2,8
GRAN-2	6,1E+07	7,3%	2,3E+07	4,7%	2,7
GRAN-3	4,0E+07	13,3%	9,2E+06	8,7%	4,4
NGAL-1	6,5E+06	20,6%	3,2E+06	17,3%	2,0
PCT-1	2,8E+07	7,2%	3,8E+06	6,9%	7,2
PCT-2	3,2E+07	7,0%	5,1E+06	36,7%	6,3
HMGB1-1	9,9E+07	10,2%	3,7E+07	3,0%	2,7
HMGB1-2	3,8E+07	5,5%	7,9E+06	8,7%	4,8
NGAL-2	1,6E+05	92,6%	5,2E+05	111,7%	0,3
AMPH-2	8,7E+07	8,3%	2,7E+07	7,5%	3,2
HLA5-3	6,4E+07	4,9%	1,5E+07	3,8%	4,2
CD74-2	7,8E+07	6,6%	3,0E+07	3,6%	2,7
			moyenne		3,8

III.5.3 Evaluation de la méthode SISCAPA mise au point

Afin d'évaluer la méthode SISCAPA mise au point, différents éléments ont été examinés : le rendement d'immunoprécipitation des anticorps anti-peptide, la linéarité de la méthode, la répétabilité et la reproductibilité.

III.5.3.a. Rendement d'immunoprécipitation

Un rendement d'immunoprécipitation (capture et élution) a pu être déterminé pour chaque anticorps anti-peptide par ajout de peptides *light* (peptide non marqué) dans un pool de plasmas digéré et dilué et ajout de la même quantité de peptides SIL avant ou après l'immunoprécipitation, en duplicat. Ainsi, des peptides *light* ont été utilisés pour normaliser les signaux car certains peptides endogènes sont détectés dans le plasma. Les rendements sont donnés dans le Tableau 38. Les rendements varient de 1,0% à 95,2%. Les peptides de NGAL n'ont pas pu être détectés, ce qui est sûrement dû à un problème de variation des temps de rétention. Les anticorps ont été sélectionnés d'après leur capacité à reconnaître le peptide correspondant. Les rendements obtenus en plasma sont globalement proches de ceux obtenus pour l'évaluation des anticorps lors de la détermination des rendements d'immunoprécipitation en tampon (Tableau 28).

Tableau 38 Rendement d'immunoprécipitation des anticorps anti-peptide déterminé par ajout de peptides SIL et light (n=2)

	rendement	CV
sRAGE-1	33,4%	2,5%
ANG1-1	1,0%	11,1%
ANG1-2	<i>Problème de detection du peptide light</i>	
ANG1-3	1,4%	17,5%
GRAN-1	7,7%	8,3%
GRAN-2	30,5%	7,3%
GRAN-3	72,0%	3,7%
PCT-1	95,2%	3,1%
PCT-2	2,1%	22,6%
HMGB1-1	1,3%	5,9%
HMGB1-2	7,1%	3,1%
AMPH-2	87,2%	10,1%
HLA5-3	6,4%	0,8%

III.5.3.b. Linéarité par gamme de protéine recombinante

Afin d'évaluer la linéarité de la méthode, la protéine PCT humain recombinante (Sigma) a été utilisée afin de réaliser une gamme dans un pool de plasmas provenant de patients sains. Cette protéine a été choisie car les concentrations chez les patients sains sont basses ($< 0,5 \text{ ng/mL}^{453}$) et l'ajout de protéine recombinante n'est donc pas gênée par les niveaux endogènes. Ainsi, huit concentrations connues de PCT ont été ajoutées à un pool de plasmas provenant de patients sains de $0,1 \text{ ng/mL}$ à 100 ng/mL . Seul le peptide PCT-1 a été utilisé, car le peptide PCT-2 n'était pas détecté aux faibles concentrations ($< 10 \text{ ng/mL}$), sûrement en lien avec un faible rendement d'immunoprécipitation et une moins bonne détection en MS. Ainsi, une gamme de calibration de huit points a été réalisée (pondération $1/x$) et illustrée dans la Figure 61. La méthode est linéaire pour la protéine PCT de $0,1 \text{ ng/mL}$ à 100 ng/mL ($CV < 20\%$). Nous pouvons évaluer cette sensibilité par rapport aux méthodes SISCAPA publiées pour d'autres protéines plasmatiques. Whiteaker *et al.*²¹⁸ ont atteint des sensibilités inférieures au ng/mL pour $10 \mu\text{L}$ de plasma. Ils ont obtenu par exemple, une sensibilité de $0.01 \text{ fmol}/\mu\text{L}$ (0.9 ng/mL) pour la protéine osteopontine par exemple. Kuhn *et al.*²²⁵ ont obtenu des limites de détection allant jusqu'à $0.02 \text{ fmol}/\mu\text{L}$ (0.2 ng/mL) pour la protéine S100B. Ippoliti *et al.*²²⁶ ont obtenu des sensibilités similaires avec une limite de détection moyenne pour leurs 110 peptides de $0,072 \text{ fmol/mL}$ pour $10 \mu\text{L}$ de plasma. Notre limite de détection est proche de celles trouvées dans la littérature, mais notre méthode est moins performante car elle utilise 10 fois plus de plasma ($100 \mu\text{L}$). Contrairement aux auteurs, nous travaillons actuellement en format capillaire et pas encore en nano (LC et source ESI). On peut donc espérer atteindre ces sensibilités avec moins de plasma en couplant la nano-LC et une source nanoESI, développée par Wilm and Mann⁴⁵⁴.

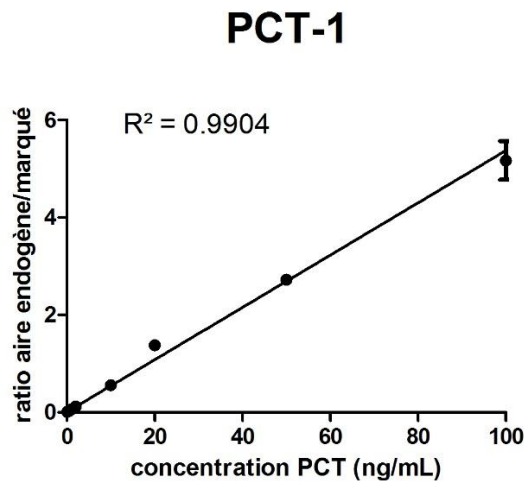


Figure 61 Gamme de calibration de 0,1 ng/mL à 100 ng/mL obtenue en plasma digéré dilué au 1/10 (pondération 1/x)

III.5.3.c. Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité et la reproductibilité de la méthode ont été évaluées avec un pool de plasmas de patients atteints de choc septique. Ce pool a été divisé en trois aliquots qui ont été évalués sur trois jours différents et chaque aliquot a été divisé en quatre répliqués à analyser par jour. Les ratios d'aires des peptides endogènes / peptides SIL ont été utilisés afin de calculer les CV_{intra} et CV_{inter} correspondants aux coefficients de variation intra- et inter- journaliers. Les variabilités intra- et inter- journalières ont été estimées acceptables si les $CV < 20\%$ ²⁵⁰. Les résultats de répétabilité et reproductibilité sont donnés dans le Tableau 39. Les peptides endogènes ANG1-1, ANG1-2, ANG1-3, GRAN-1, HMGB1-1 et HMGB1-2 n'ont pas été détectés. Le rendement de capture et élution de ces anticorps anti-peptide étaient faibles et les concentrations endogènes sont faibles (Tableau 16). Ces anticorps n'étaient peut-être pas suffisamment efficaces pour immunoprécipiter les peptides d'intérêt. Il est également possible que la digestion de ces protéines n'ait pas été optimale et les peptides correspondants trop faiblement clivés ou non accessibles. Les deux peptides GRAN-3 et PCT-2 ont des $CV > 20\%$. Afin d'améliorer la précision, des protéines SIL comme les PSAQ auraient pu être utilisées car elles permettent de comptabiliser efficacement les pertes d'échantillons au cours des étapes de préparation⁴⁵⁵. Cependant, pour les six protéines (sRAGE, NGAL, HALG5, GRAN, AMPH et PCT), un peptide par protéine remplit les critères de répétabilité et reproductibilité pour être utilisé pour la quantification de la protéine.

Tableau 39 Répétabilité et reproductibilité de la méthode SISCAPA développée, par analyse répétée d'un pool de plasmas de patients ayant subi un choc septique (4 replicats/jour sur 3 jours)

Peptide	Répétabilité CV _{intra} (%)	Reproductibilité CV _{inter} (%)
sRAGE-1	19.9	19.2
GRAN-2	8.5	16.4
GRAN-3	59.9	54.8
PCT-1	6.7	9.4
PCT-2	35.0	32.2
NGAL-2	8.0	15.3
AMPH-2	10.0	13.0
HLAG5-3	12.5	11.2

III.5.4 Dosage des biomarqueurs candidats faiblement concentrés dans 49 plasmas de patients ayant subi un choc septique

La cohorte de 49 plasmas prélevés dans les 24 premières heures d'admission des patients en unité de soins intensifs pour choc septique (Tableau 19) a été analysée avec la méthode multiplexe développée pour mesurer les biomarqueurs candidats minoritaires dans le plasma. Dans l'idéal, le ratio peptide endogène et peptide SIL doit être proche de 1. Cependant, il n'a pas été possible d'optimiser ce paramètre par manque de volume d'échantillon. Ainsi, une concentration similaire de tous les peptides SIL a été choisie (0,5 pmol/mL) pour les analyses des plasmas de patients. Les résultats comparant les ratios entre survivants et les non-survivants par un test non-paramétrique de Mann-Whitney sont donnés dans la Figure 62.

Nous avons observé une augmentation de **sRAGE** chez les non-survivants par rapport aux survivants. Même si cette augmentation n'est pas significative, nos résultats sont cohérents à ceux observés par Bopp *et al.*³⁸³ qui ont montré que chez des patients atteints de sepsis sévères et choc septique, les non-survivants avaient un niveau plus élevé de sRAGE que les survivants.

Concernant **NGAL**, nous avons observé une augmentation non-significative chez les non-survivants par rapport aux survivants. Nos observations sont similaires à Kim *et al.*⁴⁰² qui ont également observé une augmentation non-significative de concentration chez les non-survivants et à Md Ralib *et al.*³⁹⁵ qui ont observé une différence significative.

Concernant **HLAG5**, nous avons observé des taux plus élevés chez les non-survivants, ce qui est en contradiction avec les résultats trouvés par Monneret *et al.*⁴¹⁰ qui ont mesuré des niveaux plus élevés de HLAG5 chez les survivants (109 ng/mL) par rapport aux non-survivants (37 ng/mL). D'après les auteurs, HLAG5 induit une immunosuppression lors du sepsis. Cette immunosuppression pourrait donc être délétère chez les patients atteints d'un choc septique.

Concernant les **granulines**, nous avons observé des taux significativement plus élevés chez les non-survivants. La seule étude ayant traité des granulines était une analyse de découverte par protéomique non-ciblée de biomarqueurs potentiels pour le diagnostic du sepsis¹³⁵. C'est donc la première fois qu'une différence significative des niveaux de granulines est observée sur une cohorte de patients atteints de choc septique entre des survivants et des non-survivants. Les granulines ont été décrites comme des protéines pro-inflammatoires⁴¹⁶, ce qui induirait des dommages systémiques lors du choc septique. Il est donc cohérent qu'une augmentation de ces protéines soit observée chez des patients non-survivants.

Concernant l'**amphiréguline**, nous avons observé une augmentation significative chez les non-survivants. Cette protéine n'avait été étudiée que par l'équipe du service de réanimation de l'hôpital Lariboisière dirigée par le professeur Didier Payen en transcriptomique. C'est donc la première fois qu'une différence des niveaux circulants d'amphiréguline est observée entre les survivants et les non-survivants. De la même façon que les granulines, l'amphiréguline est associée à la production de cytokines pro-inflammatoire, qui pourrait donc induire de nombreux dommages systémiques et augmenter le risque de mortalité.

Enfin, pour la **procalcitonine**, un profil pratiquement similaire a été obtenu pour les survivants et les non-survivants et aucune différence des niveaux circulants n'a été observée. Ces observations rejoignent les résultats de nombreuses études qui remettent en question l'utilisation de la procalcitonine pour le pronostic du sepsis notamment pour les cas de choc septique où aucune différence n'a été trouvée entre survivants et non-survivants¹²⁶.

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

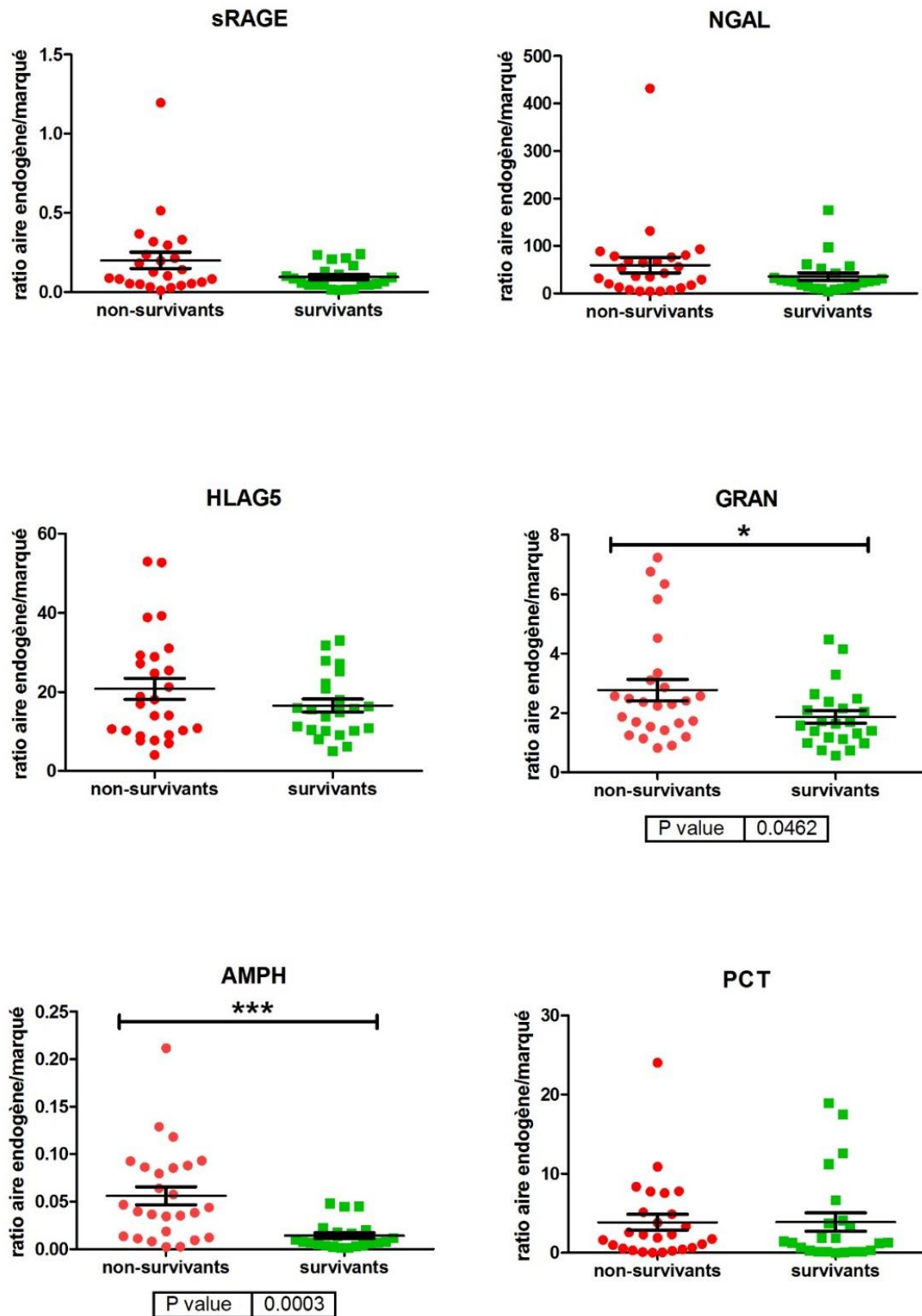


Figure 62 Quantification relative des six protéines faiblement concentrées dans les 49 plasmas de patients atteints d'un choc septique

IV. Conclusions et perspectives

Une liste de biomarqueurs potentiels a été établie afin de vérifier leur pertinence avec des méthodes robustes et validées pour le pronostic vital. Pour cela, deux méthodes multiplexes par spectrométrie de masse ont été développées pour les protéines majoritaires ($> 1 \mu\text{g/mL}$) et les protéines minoritaires ($< 1 \mu\text{g/mL}$) afin de comparer leurs niveaux chez les survivants et non-survivants d'une cohorte de 49 patients atteints d'un choc septique. Une première méthode multiplexe simple et sans anticorps a été développée et évaluée en termes de répétabilité, reproductibilité et stabilité en digestion pour six biomarqueurs. Cette méthode appliquée à une cohorte de 49 patients atteints de choc septique a permis de mettre en évidence des niveaux d'haptoglobine significativement différents entre les survivants et les non-survivants. Cette différence a été confirmée par une seconde analyse par quantification pseudo absolue utilisant des peptides AQUA. Une seconde méthode multiplexe basée sur l'approche SISCAPA a été développée pour comparer les niveaux de dix biomarqueurs minoritaires. Pour cela, 24 anticorps anti-peptide oligoclonaux, correspondant à neuf protéines ont été produits dont 21 ont été évalués comme fonctionnels pour l'immunoprécipitation des cibles. Pour une des dix protéines (angiopoïétine-2), nous n'avons pas obtenu d'anticorps anti-peptide fonctionnels. Puis, la méthode SISCAPA a été mise au point en optimisant la dénaturation des protéines du plasma, l'arrêt de la digestion enzymatique, la capture et l'éluat des peptides issus de la digestion du plasma puis l'analyse LC-MS/MS. De plus, la méthode a été évaluée en termes de rendement d'immunoprécipitation, de linéarité, de répétabilité et reproductibilité. Enfin, cette méthode SISCAPA optimisée a été appliquée à la cohorte de patients atteints de choc septique et a permis de montrer la pertinence de l'amphiréguline et des granulines pour le pronostic vital.

La vérification de biomarqueurs plasmatiques implique une notion de sensibilité des méthodes. Le degré de sensibilité à atteindre est lié aux concentrations des analytes et à la complexité des matrices. La sensibilité de la méthode SISCAPA pourrait être améliorée en utilisant une chaîne nano-LC couplée à une source nanoESI. De plus, deux méthodes ciblées PRM ont été développées pour les deux séries de protéines fortement et faiblement concentrées. Gallien *et al.*¹⁷⁸ ont montré que la méthode PRM appliquée à des échantillons complexes présentait des performances supérieures en termes de sélectivité, de gamme dynamique et de sensibilité comparée à la SRM/MRM. Pour les protéines fortement concentrées pour lesquelles une préparation d'échantillons simple et rapide a été développée par une précipitation des protéines au méthanol, une méthode PRM semble être la plus adéquate car le milieu est encore complexe. Cependant, on peut se demander si une méthode SRM/MRM développée sur un triple quadripôle de dernière génération aurait pu être envisagée afin d'améliorer la sensibilité de la méthode pour les protéines faiblement concentrées avec l'approche SISCAPA. En effet, l'éluat final après immunoprécipitation peut être considéré comme un milieu propre, non complexe. Cependant, nous avons vu expérimentalement qu'après l'éluat une filtration était nécessaire afin de ne pas boucher les

instruments. La notion de propreté n'est donc pas si évidente après immunoprécipitation suivie d'une élution.

Les possibilités de la MS en termes de multiplexage en font un des outils de premier plan pour la vérification de biomarqueurs. Pour les protéines majoritaires, six biomarqueurs ont été dosés, mais la méthode pourrait facilement être étendue à d'autres cibles abondantes. En effet, comme il a été vu dans le Chapitre 1, le niveau de multiplexage peut atteindre quelques centaines de protéines²⁵⁹. Cela paraît néanmoins plus fastidieux avec l'approche SISCAPA qui a été utilisée pour la quantification multiplexe des protéines plasmatiques faiblement concentrées par l'ajout de peptides SIL et d'anticorps anti-peptides. Sur dix protéines sélectionnées pour une approche SISCAPA, six ont pu être dosées dans une cohorte de patients. Les quatre autres protéines n'ont pu être mesurées pour diverses raisons (Figure 63). En termes de protéines, 60% des protéines sélectionnées ont pu être quantifiées, mais en termes de peptides, seulement 20% ont pu être utilisés pour le dosage des protéines correspondantes. Ce pourcentage illustre bien la pertinence de sélectionner au préalable trois peptides protéotypiques par protéine. Les échecs ont été observés à plusieurs étapes du développement de la méthode SISCAPA : (i) la production des anticorps, (ii) le rendement des anticorps en immunoprécipitation, (iii) la détection du peptide, (iv) le rendement de digestion et (v) la sensibilité de la méthode. Afin d'améliorer la sélection des anticorps il serait possible de cribler les anticorps dans les surnageants de cultures cellulaires en fonction de leur constante d'affinité par résonance plasmonique de surface, comme effectué notamment par Hsiao *et al.*⁴³⁸. La récente acquisition d'un appareil Octet® (principe d'interférométrie en lumière blanche pour suivre les caractéristiques d'une liaison antigène-anticorps) dans le laboratoire nous permettra l'analyse de l'affinité des anticorps et donc une meilleure sélection des anticorps.

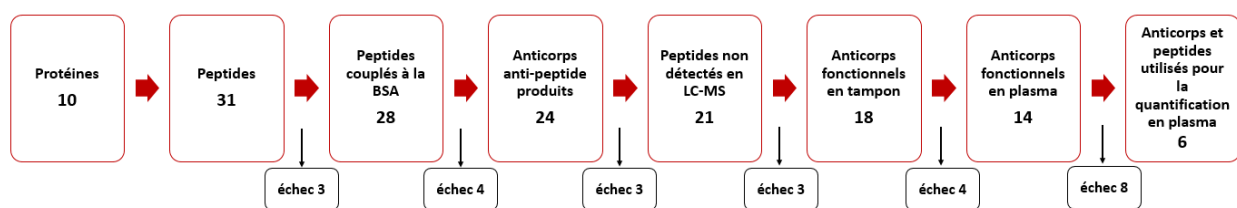


Figure 63 Suivi de l'approche SISCAPA

La méthode SISCAPA est une approche longue, même si son développement est moins long que le développement du même nombre d'ELISA. Un test SISCAPA peut être généré par un laboratoire en environ une année⁴³⁹. L'étape limitante et la plus coûteuse est la génération d'anticorps anti-peptide. D'après Kuhn *et al.*²²⁵, les coûts initiaux des réactifs sont estimés à environ 4000 \$ / anticorps anti-peptide. D'après Whiteaker *et al.*⁴³⁹, la sélection des peptides est estimée à 1 mois, la synthèse des peptides et la production d'anticorps est évaluée à 6 mois comprenant l'immunisation, la sélection des anticorps et leur purification. Cette étape peut être allongée si les anticorps sont poussés aux stades oligoclonal ou monoclonal. La collection de données et de contrôle et le développement des méthodes

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

est estimée à 2 mois. Lors de ce travail de thèse, les temps de production des anticorps ont été raccourcis à deux étapes clés : lors des immunisations avec l'injection multiplexe de trois peptides par souris et du clonage des anticorps avec l'utilisation d'anticorps oligoclonaux. Enfin, l'évaluation préliminaire des caractéristiques de réponse est évaluée à 2 mois. Dans notre cas, les différentes étapes ont duré 8 mois depuis les immunisations jusqu'à la production et la purification des anticorps oligoclonaux. L'évaluation des anticorps et l'optimisation de la méthode SISCAPA a été longue car elle a nécessité l'amélioration de chaque étape de la préparation d'échantillon et la mise au point de la méthode sur une nouvelle chaîne capillaire-LC couplée à une source capillaire. Des optimisations supplémentaires pourraient encore être effectuées notamment pour la digestion qui pourrait être améliorée et raccourcie. L'utilisation de protéines pourrait aussi améliorer la précision des dosages en tenant compte du rendement de la digestion. Cependant, l'achat de toutes les protéines marquées n'est pas possible pour une raison de coût. A l'avenir, une nouvelle méthode SISCAPA avec de nouveaux biomarqueurs candidats pourrait plus rapidement être mise en place dans le laboratoire mais avec toujours une étape longue de génération d'anticorps anti-peptide.

Les différentes méthodes développées ont permis de mesurer les niveaux de protéines dans la cohorte de 49 patients atteints de choc septique. D'après les analyses effectuées, 5 des 15 protéines mesurées permettent de discriminer les survivants des non-survivants de façon significative. Pour évaluer les valeurs pronostiques des protéines dont les niveaux sont significativement différents entre les groupes de survivants et non-survivants et du score SOFA, les caractéristiques déterminées par les courbes ROC ont été reportées dans le Tableau 40. Les valeurs seuils, les sensibilités et spécificités ont été déterminées en prenant le ratio de vraisemblance le plus élevé, qui correspond au rapport sensibilité sur $(100 - \text{la spécificité})^{456}$. On observe qu'à une spécificité supérieure à 90%, l'hétérodimère S100A8/S100A9 permet d'atteindre la meilleure sensibilité qui est de 50%. Le score SOFA et les niveaux des biomarqueurs discriminants (calgranulines, haptoglobine, granuline et amphiréguline) ont été reportés pour chaque patient dans le Tableau 41. Les niveaux supérieurs (ou inférieur pour l'haptoglobine) aux valeurs seuils ont été surlignés en rouge. Afin de déterminer si la combinaison de biomarqueurs pourrait permettre d'améliorer la sensibilité du pronostic vital des patients, les sensibilités et spécificités associées à chaque combinaison de deux marqueurs ont été déterminées. Les résultats de ces combinaisons sont reportés dans le Tableau 42. La meilleure combinaison de biomarqueurs, l'haptoglobine avec l'une ou l'autre des calgranulines (S100A8/S100A9 ou S100A12), permet d'atteindre une sensibilité de 80,8% et une spécificité de 87,0%. L'haptoglobine permet de fixer l'hémoglobine libre afin de l'éliminer pour éviter l'oxydation de l'hème produisant des radicaux qui entraînent des dommages cellulaires et tissulaires. Les calgranulines sont des DAMPs qui reflètent le niveau de sévérité des dommages cellulaires et tissulaires. Ainsi, une diminution de l'haptoglobine et une augmentation des calgranulines, deux événements en lien avec des dommages cellulaires, seraient associées à un risque de mortalité plus élevé. Une deuxième combinaison intéressante est

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

l'amphiréguline associée à l'haptoglobine ou à S100A8/S100A9 avec une sensibilité de 69,2% et une spécificité de 91,3%. Il est indispensable de tester ces combinaisons de biomarqueurs dans une cohorte plus importante afin de confirmer leur intérêt, et d'y combiner, pourquoi pas, un troisième biomarqueur comme l'amphiréguline qui est associée au processus de pro-inflammation et qui semble être un biomarqueur pronostic prometteur.

Tableau 40 Caractéristiques déterminées par les courbes ROC du score SOFA et des cinq biomarqueurs discriminant les survivants des non-survivants

	AUC	valeur seuil	sensibilité (%)	spécificité (%)
SOFA	0,6	> 12,5	15,4	95,7
S100A8/9	0,67	> 11,7	50,0	91,3
S100A12	0,69	> 0,7	46,2	91,3
haptoglobine	0,69	< 1031	46,2	91,3
granuline	0,67	> 4,327	19,2	95,7
amphiréguline	0,81	> 0,046	46,2	95,7

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

Tableau 41 Récapitulatif des cinq biomarqueurs discriminant les survivants des non-survivants

patients	survivant / non-survivant	SOFA	S100A8/S100A9 (µg/mL)	S100A12 (µg/mL)	haptoglobine (µg/mL)	granuline	amphiréguline
NS1	non-survivant	15	5,274	0,539	205,457	1,529	0,0863
NS2	non-survivant	8	1,768	0,029	627,709	0,816	0,0397
NS3	non-survivant	15	52,552	2,947	2663,479	2,561	0,0365
NS4	non-survivant	12	21,342	1,594	1452,851	1,659	0,0385
NS5	non-survivant	11	4,982	0,265	2131,190	3,106	0,0576
NS6	non-survivant	12	13,600	0,625	2123,769	2,237	0,1288
NS7	non-survivant	11	13,405	1,730	2757,430	2,365	0,0134
NS8	non-survivant	14	2,255	0,079	1022,575	1,731	0,0354
NS9	non-survivant	13	19,004	1,606	2289,709	2,483	0,0927
NS10	non-survivant	10	10,386	1,135	178,108	3,341	0,0933
NS11	non-survivant	11	13,016	0,514	1118,183	2,288	0,0186
NS12	non-survivant	7	0,972	0,327	566,833	0,905	0,0021
NS13	non-survivant	5	1,233	0,089	3768,289	1,240	0,0025
NS14	non-survivant	5	33,417	2,637	3491,785	1,695	0,0083
NS15	non-survivant	7	49,776	6,002	389,140	2,563	0,088
NS16	non-survivant	6	7,806	0,712	2899,147	1,134	0,0094
NS17	non-survivant	12	41,694	0,973	1070,869	5,833	0,0641
NS18	non-survivant	12	13,649	0,613	28,969	7,231	0,0345
NS19	non-survivant	7	71,248	9,540	25,541	4,515	0,1182
NS20	non-survivant	8	5,323	0,501	946,028	6,760	0,0794
NS21	non-survivant	10	0,793	0,019	719,664	2,860	0,0439
NS22	non-survivant	11	2,304	0,315	707,345	6,345	0,0856
NS23	non-survivant	11	79,574	6,722	95,081	1,861	0,2115
NS24	non-survivant	10	17,300	1,532	1278,473	1,197	0,0467
NS25	non-survivant	7	3,034	0,047	2130,361	2,404	0,0112
NS26	non-survivant	7	9,851	0,588	5579,088	1,417	0,0121
S1	survivant	9	3,180	0,476	2962,095	2,035	0,0076
S2	survivant	9	8,877	0,315	4338,927	2,161	0,0117
S3	survivant	12	0,314	0,019	231,789	2,385	0,0141
S4	survivant	7	2,109	0,037	2745,827	0,742	0,0015
S5	survivant	7	2,158	0,186	3419,495	1,646	0,0016
S6	survivant	7	7,465	0,576	2281,873	1,132	0,0453
S7	survivant	9	3,278	0,104	3230,952	1,731	0,0043
S8	survivant	13	58,394	6,362	298,843	4,490	0,0483
S9	survivant	8	1,391	0,228	1039,112	0,572	0,0028
S10	survivant	8	5,323	0,303	1727,735	1,182	0,0062
S11	survivant	7	10,386	0,402	3622,503	2,646	0,0206
S12	survivant	7	0,795	0,092	2281,685	0,749	0,0076
S13	survivant	7	2,937	0,330	1320,513	1,584	0,0178
S14	survivant	11	4,592	0,278	2531,103	3,298	0,0052
S15	survivant	11	2,888	0,203	1343,643	1,393	0,0103
S16	survivant	8	5,712	0,228	3044,406	2,096	0,0069
S17	survivant	10	8,390	0,514	2378,499	0,993	0,0225
S18	survivant	5	5,615	0,265	1984,726	0,992	0,0033
S19	survivant	7	4,544	0,340	1954,325	2,489	0,0167
S20	survivant	9	1,720	0,489	1710,331	1,413	0,0071
S21	survivant	11	6,443	0,203	1930,140	1,318	0,004
S22	survivant	12	5,712	0,688	2334,688	4,164	0,045
S23	survivant	9	60,683	3,419	2880,576	1,713	0,0161

Les valeurs surlignées en rouge sont supérieures (ou inférieure pour l'haptoglobine) aux valeurs limites déterminées avec les courbes ROC

CHAPITRE 3 : QUANTIFICATION MULTIPLEXE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DU PRONOSTIC VITAL DU SEPSIS

Tableau 42 Combinaison de biomarqueurs

	SOFA	S100A8/A9	S100A12	haptoglobine	granuline	amphiréguline
SOFA	<i>se : 15,4%</i> <i>sp : 95,7%</i>					
S100A8/A9	<i>se : 57,7%</i> <i>sp : 91,3%</i>	<i>se : 50,0%</i> <i>sp : 91,3%</i>				
S100A12	<i>se : 53,8%</i> <i>sp : 91,3%</i>	<i>se : 57,7%</i> <i>sp : 91,3%</i>	<i>se : 46,2%</i> <i>sp : 91,3%</i>			
haptoglobine	<i>se : 57,7%</i> <i>sp : 91,3%</i>	<i>se : 80,8%</i> <i>sp : 87,0%</i>	<i>se : 80,8%</i> <i>sp : 87,0%</i>	<i>se : 46,2%</i> <i>sp : 91,3%</i>		
granuline	<i>se : 34,6%</i> <i>sp : 95,7%</i>	<i>se : 57,7%</i> <i>sp : 91,3%</i>	<i>se : 57,7%</i> <i>sp : 91,3%</i>	<i>se : 53,8%</i> <i>sp : 91,3%</i>	<i>se : 19,2%</i> <i>sp : 95,7%</i>	
amphiréguline	<i>se : 53,8%</i> <i>sp : 95,7%</i>	<i>se : 69,2%</i> <i>sp : 91,3%</i>	<i>se : 65,4%</i> <i>sp : 91,3%</i>	<i>se : 69,2%</i> <i>sp : 91,3%</i>	<i>se : 50,0%</i> <i>sp : 95,7%</i>	<i>se : 46,2%</i> <i>sp : 95,7%</i>

se : sensibilité, sp : spécificité

CONCLUSION GENERALE

Le sepsis est un problème majeur de santé publique d'après l'Organisation Mondiale de la Santé. En effet, la mortalité à 28 jours des patients atteints d'un sepsis ou d'un choc septique atteint plus de 40% pour les cas plus graves. Cette forte mortalité reflète le besoin d'une prédiction précoce de l'issue des patients admis dans les unités de soins intensifs pour sepsis ou choc septique. La prédiction du pronostic vital des patients permettrait de mieux rationaliser les ressources humaines, matérielles, biologiques et thérapeutiques pour mieux prendre en charge les patients et permettre l'amélioration de leur état. Quelques protéines marqueurs de l'inflammation ou d'une infection sont actuellement utilisés pour le suivi des patients en clinique mais manquent de spécificité pour le sepsis. La procalcitonine et la protéine C-réactive sont dosées dans le plasma de patients. Cependant, leur efficacité est largement remise en cause. En effet, le sepsis n'étant pas une maladie spécifique mais un processus multiforme systémique avec une physiopathologie complexe, le pronostic reste encore un enjeu de taille. A la suite d'une infection, des réponses pro-inflammatoire, anti-inflammatoire, une coagulation disséminée et une hypotension induisent des dommages tissulaires et des défaillances d'organes. Contrairement à d'autres maladies qui touchent spécifiquement des organes en particuliers, le sepsis par son aspect systémique touche un très grand nombre de cellules, de tissus et d'organes. Ainsi, un très grand nombre de biomarqueurs a été étudié dans la littérature avec en 2018 presque 800 articles (Pubmed) traitant des biomarqueurs du sepsis. En effet, les études omiques (génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomiques) ont révolutionné le processus de découverte et d'identification de biomarqueurs candidats. Ces études omiques ont permis de générer des listes de biomarqueurs potentiels du pronostic vital du sepsis. Cependant, ces biomarqueurs potentiels doivent être confirmés en fonction de la gravité du sepsis et du devenir du patient. Pour cela, des cohortes de patients parfaitement caractérisées sont nécessaires. De plus, des méthodes analytiques robustes et validées permettant la détection spécifique et la quantification simultanée de plusieurs biomarqueurs potentiels sont essentiels. Cependant, la large gamme de concentrations des biomarqueurs potentiels, allant de l'ordre du ng/mL pour les protéines minoritaires du plasma jusqu'au mg/mL pour les protéines majoritaires, nécessite des méthodes complémentaires de détection.

Au travers de cette thèse, nous avons établi une liste de biomarqueurs potentiellement pertinents, comprenant des marqueurs de l'inflammation, de la réponse immunitaire, des dommages cellulaires et tissulaires, de la coagulation et d'autres aspects de la physiopathologie du sepsis. Pour mesurer ces marqueurs, nous avons développé des méthodes d'immunoanalyse, qui est la méthode de référence pour la quantification de protéines dans les milieux biologiques de par sa sensibilité, son faible coût et sa simplicité de mise en œuvre, des méthodes de spectrométrie de masse *bottom-up* (digestion enzymatique des protéines) et *top-down* (sans digestion enzymatique des protéines), qui permettent une forte spécificité, une grande capacité de multiplexage et l'analyse de modifications des protéines. Enfin, une

CONCLUSION GENERALE

méthode SISCAPA a été développée, combinant les avantages de l'immunoanalyse et de la spectrométrie de masse en termes de sensibilité, spécificité et grande capacité de multiplexage. Nous nous sommes intéressés d'une part à quantifier les calgranulines (S100A8/S100A9 et S100A12), famille de protéines identifiées comme biomarqueurs potentiels du pronostic vital du sepsis par transcriptomique par Payen *et al.* et à la caractérisation des complexes circulants de S100A8/S100A9 et des protéoformes de ce complexe lors du choc septique. D'autre part, la capacité de multiplexage des approches *bottom-up* nous a permis d'évaluer la pertinence pour le pronostic du choc septique d'une liste de biomarqueurs potentiels reflétant les différents aspects de la physiopathologie du sepsis.

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à la quantification des calgranulines dans une cohorte de patients atteints d'un choc septique. Les calgranulines ont récemment été ajoutés à la famille des DAMPs, molécules de l'hôte libérées par les cellules endommagées ou à la suite de stress cellulaire. De plus, les calgranulines ont été associées à de nombreux troubles inflammatoires aigus et chroniques, mais surtout une étude transcriptomique de Payen *et al.* a montré qu'elles étaient surexprimées chez les non-survivants. Afin de doser les niveaux circulants de ces protéines de façon fiable, il nous a paru essentiel de développer et caractériser nos propres tests immunoenzymatiques (ELISA). Ces ELISA ont été développés à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre les protéines S100A8, S100A9 et S100A12. Après validation de ces deux tests, nous avons dosé S100A8/S100A9 et S100A12 plasmatiques dans une cohorte de 62 sujets, dont 49 patients atteints d'un choc septique avec 23 survivants et 26 non-survivants, et 13 sujets sains. Nous avons pu mettre en valeur premièrement, une augmentation significative des concentrations de S100A8/S100A9 et S100A12 chez les patients atteints d'un choc septique comparés aux sujets sains et également une augmentation significative chez les non-survivants comparés aux survivants. Ces résultats confirment donc les observations faites en transcriptomique et le potentiel intérêt des calgranulines pour le pronostic vital des patients atteints d'un choc septique. De plus, ces ELISA développés seront commercialisés et pourront être utilisés pour valider sur des cohortes plus larges et indépendantes leur pertinence pour le pronostic vital du sepsis. En parallèle, nous avons souhaité caractériser les complexes circulants de S100A8/S100A9 et ses modifications potentiellement induites par le choc septique. En effet, plusieurs complexes intracellulaires et modifications post-traductionnelles de S100A8/S100A9 ont été décrits dans la littérature, cependant aucune étude n'a été rapportée pour les formes circulantes dans le plasma de patients atteints de choc septique. Or, ce sont les formes circulantes qui sont dosées dans le contexte des biomarqueurs. Nous avons donc développé une méthode d'immuno-LC-MS/MS *top-down* afin de caractériser les formes circulantes plasmatiques de S100A8/S100A9 dans la cohorte de 49 patients atteint de choc septique. Puis, nous avons développé et validé une méthode de dosage des formes totales de S100A8/S100A9, basée sur une approche *bottom-up*. A l'aide de ces deux méthodes, nous avons montré que le complexe majoritaire circulant était un hétérocomplexe équimolaire non-covalent de S100A8/S100A9. Ces résultats sont en accord avec une libération des complexes intracellulaires de

CONCLUSION GENERALE

S100A8/S100A9 pouvant survenir lors des dommages cellulaires liés au choc septique. De plus, quatre protéoformes principales ont pu être détectées dans les plasmas de patients atteints de choc septique : S100A8, S100A8 oxydé, S100A9 tronqué acétylé et S100A9 S-nitrosylé. Leurs niveaux ont été comparés chez les survivants et non-survivants et ont été trouvés augmentés chez les non-survivants. Cette augmentation de toutes les protéoformes nous a poussé à valider la méthode *bottom-up* en termes de répétabilité, reproductibilité, linéarité, limite de quantification, stabilité en digestion et rendement de la préparation d'échantillons, permettant ainsi de quantifier de façon absolue toutes les formes identifiées de S100A8/S100A9 par des peptides quantotypiques. De plus, cette méthode validée a été parfaitement corrélée à l'ELISA développé, permettant ainsi l'utilisation de méthodes simples facilement transférables.

La seconde partie de ce travail de thèse a porté sur la vérification d'une liste de biomarqueurs potentiels sélectionnés par une étude bibliographique. Des combinaisons de biomarqueurs permettraient de rendre compte des différents aspects du sepsis affectant les patients et auraient l'avantage théorique d'améliorer la précision du pronostic. Une liste de 16 biomarqueurs potentiels a été établie, les protéines ont été choisies en fonction de leur rôle dans la physiopathologie du sepsis et du choc septique et de leur pertinence pour le pronostic. Deux groupes ont été créés en fonction des niveaux circulants endogènes des protéines trouvés dans la littérature. Ainsi, deux méthodes ont été développées afin de quantifier ces deux groupes de biomarqueurs potentiels dans le plasma humain. Une première méthode multiplexe simple et rapide sans anticorps avec une précipitation au méthanol, suivie d'une digestion trypsique a été utilisée pour la détection et la quantification de six biomarqueurs potentiels abondants dans le plasma : l'amyloïde sérique A, la protéine C-réactive, le facteur de von Willebrand, l'haptoglobine, la glycoprotéine alpha-1-acide et la protéine de liaison au lipopolysaccharide. La méthode développée a été évaluée en termes de répétabilité, reproductibilité et stabilité des peptides en digestion. Puis, une fois validée, elle a été appliquée à la cohorte de 49 patients atteints de choc septique. Les taux plasmatiques de chaque protéine ont été comparés entre survivants et les non-survivants. Les différences observées pour les six biomarqueurs potentiels étaient comparables à ceux de la littérature. Cependant, seule la différence entre les niveaux d'haptoglobine entre survivants et non-survivants était significative. L'haptoglobine circulante a donc été quantifiée de façon absolue avec des peptides AQUA. Les concentrations d'haptoglobine ont été trouvées significativement plus élevées chez les survivants, ce qui est cohérent avec le rôle protecteur de l'haptoglobine qui permet de capturer et détoxifier l'hémoglobine libre car l'hème de l'hémoglobine peut oxyder et les radicaux produits entraînent des dommages cellulaires et tissulaires. Une seconde méthode multiplexe basée sur l'approche SISCAPA (*Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies*) a été développée pour la détection et la quantification de dix biomarqueurs potentiels minoritaires du plasma : la procalcitonine, récepteur soluble RAGE, l'angiopoïétine-1, l'angiopoïétine-2, NGAL, HMGB1, HLAG5, CD74, les granulines et l'amphiréguline. Pour cela, des anticorps anti-peptide ont été produits afin de permettre l'immuno-

CONCLUSION GENERALE

enrichissement des peptides signatures des biomarqueurs, générés lors de la digestion enzymatique. Ce choix a permis, entre autres, d'augmenter la sensibilité de détection, de s'affranchir de la purification préalable des biomarqueurs et de la préparation de protéines recombinantes. Un nouveau protocole d'immunisations 3-plex avec trois peptides protéotypiques couplés à une protéine porteuse a été effectué afin d'obtenir plus rapidement des anticorps murins. Ainsi, 24 anticorps oligoclonaux anti-peptide dirigés contre les peptides signatures de neuf biomarqueurs potentiels sur dix ont été produits. Après évaluation de ces anticorps, 14 se sont révélés fonctionnels pour immuno-enrichir les peptides des protéines d'intérêt du plasma humain. Après optimisation des différentes étapes de l'approche SISCAPA, soit la précipitation des protéines du plasma, l'arrêt de la digestion, la dilution de l'échantillon digéré pour l'immunoprécipitation des peptides, l'élution des peptides après immunoprécipitation, et l'analyse LC-MS, la méthode optimisée a été évaluée en termes de rendement de capture et d'élution, de linéarité, de répétabilité et reproductibilité. Enfin, la méthode a été appliquée à l'analyse de la cohorte de patients. Nous avons pu quantifier six biomarqueurs potentiels : la procalcitonine, sRAGE, NGAL, HLAG5, les granulines et l'amphiréguline. Nous avons trouvé que les non-survivants avaient des concentrations significativement plus élevées que les survivants. Ces protéines sont des protéines pro-inflammatoires qui peuvent induire une augmentation des dommages cellulaires et tissulaires et donc une augmentation de la mortalité. Enfin, différents biomarqueurs trouvés discriminants ont été combinés afin d'obtenir un meilleur pronostic.

Ce travail a permis de vérifier une liste de biomarqueurs potentiels à l'aide de méthodes analytiques robustes et validées basées sur l'utilisation d'anticorps et de la spectrométrie de masse sur une cohorte de 49 patients atteints de choc septique. Sur les 17 biomarqueurs potentiels, cinq ont montré un pouvoir pronostique prometteur. Cependant, notre cohorte de travail est constituée de patients atteints de choc septique avec des score SOFA élevé. Notre étude s'est concentrée sur les patients ayant subi un choc septique en raison du taux de mortalité le plus élevé par rapport aux autres patients septiques⁹². C'est probablement une des raisons pour lesquelles les différences de niveaux des douze autres biomarqueurs n'étaient pas significatives. Il serait donc intéressant de tester à nouveau les 17 biomarqueurs et leur combinaison sur une cohorte plus large, en nombre de patients et en gravité.

Différentes pistes pourront être abordées par la suite concernant la précision des méthodes MS afin d'améliorer la significativité des biomarqueurs. Pour la méthode dosant les biomarqueurs majoritaires, de nouveaux peptides protéotypiques pourraient être ajoutés pour les protéines avec seulement un peptide. Pour la méthode SISCAPA, des nouveaux anticorps pourraient être développés et produits afin d'immunoprécipiter les peptides des protéines non détectées comme CD74, HMGB1 et angiopoïétine-2 ou également de nouvelles cibles. Aussi, une diminution du débit chromatographique avec une séparation sur chaîne chromatographique nano couplée à une source nano-ESI est également envisagée dans un futur proche afin d'améliorer la sensibilité de la méthode SISCAPA.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail a également permis de mettre en évidence la complémentarité des méthodes de spectrométrie de masse et celles basées sur les anticorps. Premièrement, avec la complémentarité des méthodes *bottom-up*, *top-down* et ELISA, qui ont permis de mieux caractériser les complexes circulants de S100A8/S100A9 dosés en tant que biomarqueurs et de mettre en évidence l'association d'une augmentation de S100A8/S100A9 et S100A12 avec la mortalité des patients atteints d'un choc septique. Deuxièmement, en associant l'approche *bottom-up* et les anticorps anti-peptides, ce qui a permis la quantification de biomarqueurs faiblement abondants dans le plasma.

La production d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre les biomarqueurs les plus prometteurs, le développement et la validation de tests immunologiques rapides ELISA et l'accès à de plus grandes cohortes pourraient permettre de valider le pouvoir pronostique des biomarqueurs mis en lumière lors de ce travail de thèse et permettre une mise à disposition des ELISA développés et validés auprès des cliniciens.

Références

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* **20**, 864–874 (1992).
2. Vincent, J. L. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you.. *Crit. Care Med.* **25**, 372–374 (1997).
3. Vincent, J.-L., Opal, S. M., Marshall, J. C. & Tracey, K. J. Sepsis definitions: time for change. *The Lancet* **381**, 774–775 (2013).
4. Levy, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit. Care Med.* **31**, 1250–1256 (2003).
5. Bone, R. C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **101**, 1644–1655 (1992).
6. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
7. Liu, Y.-C. *et al.* Quick Sequential Organ Failure Assessment as a prognostic factor for infected patients outside the intensive care unit: a systematic review and meta-analysis. *Intern. Emerg. Med.* (2019) doi:10.1007/s11739-019-02036-0.
8. Mancia, G. *et al.* 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. 98 (2018).
9. Ludwig, K. R. & Hummon, A. B. Mass spectrometry for the discovery of biomarkers of sepsis. *Mol. Biosyst.* **13**, 648–664 (2017).
10. Esper, A. M. *et al.* The role of infection and comorbidity: Factors that influence disparities in sepsis. *Crit. Care Med.* **34**, 2576–2582 (2006).
11. Leligdowicz, A. *et al.* Association between Source of Infection and Hospital Mortality in Patients Who Have Septic Shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 1204–1213 (2014).
12. Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1546–1554 (2003).

Références

13. Heffner, A. C., Horton, J. M., Marchick, M. R. & Jones, A. E. Etiology of illness in patients with severe sepsis admitted to the hospital from the emergency department. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **50**, 814–820 (2010).
14. Gupta, S. *et al.* Culture-Negative Severe Sepsis: Nationwide Trends and Outcomes. *Chest* **150**, 1251–1259 (2016).
15. Phua, J. *et al.* Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis. *Crit. Care* **17**, R202 (2013).
16. Lever, A. & Mackenzie, I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ* **335**, 879–883 (2007).
17. Suarez De La Rica, A., Gilsanz, F. & Maseda, E. Epidemiologic trends of sepsis in western countries. *Ann. Transl. Med.* **4**, 325 (2016).
18. Brun-Buisson, C., Meshaka, P., Pinton, P., Vallet, B. & EPISEPSIS Study Group. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* **30**, 580–588 (2004).
19. Annane, D., Aegerter, P., Jars-Guinestre, M. C., Guidet, B. & CUB-Réa Network. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Réa Network. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 165–172 (2003).
20. Gaieski, D. F., Edwards, J. M., Kallan, M. J. & Carr, B. G. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit. Care Med.* **41**, 1167–1174 (2013).
21. Kaukonen, K.-M., Bailey, M., Suzuki, S., Pilcher, D. & Bellomo, R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* **311**, 1308–1316 (2014).
22. Noritomi, D. T. *et al.* Implementation of a multifaceted sepsis education program in an emerging country setting: clinical outcomes and cost-effectiveness in a long-term follow-up study. *Intensive Care Med.* **40**, 182–191 (2014).
23. Angus, D. C. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* **29**, 1303–1310 (2001).

Références

24. Harrison, D. A., Welch, C. A. & Eddleston, J. M. The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database. *Crit. Care Lond. Engl.* **10**, R42 (2006).
25. Gobatto, A. L. N., Besen, B. A. M. P. & Azevedo, L. C. P. How Can We Estimate Sepsis Incidence and Mortality? *Shock Augusta Ga* **47**, 6–11 (2017).
26. Angus, D. C. The lingering consequences of sepsis: a hidden public health disaster? *JAMA* **304**, 1833–1834 (2010).
27. Fleischmann, C. *et al.* Global burden of sepsis: a systematic review. *Crit. Care* **19**, P21 (2015).
28. Quenot, J.-P. *et al.* The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Crit. Care Lond. Engl.* **17**, R65 (2013).
29. Quartin, A. A., Schein, R. M., Kett, D. H. & Peduzzi, P. N. Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. Department of Veterans Affairs Systemic Sepsis Cooperative Studies Group. *JAMA* **277**, 1058–1063 (1997).
30. Adrie, C. *et al.* Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost. *J. Crit. Care* **20**, 46–58 (2005).
31. Brun-Buisson, C., Roudot-Thoraval, F., Girou, E., Grenier-Sennelier, C. & Durand-Zaleski, I. The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. *Intensive Care Med.* **29**, 1464–1471 (2003).
32. Tiru, B. *et al.* The Economic and Humanistic Burden of Severe Sepsis. *Pharmacoeconomics* **33**, 925–937 (2015).
33. Gentile, L. F. & Moldawer, L. L. DAMPs, PAMPs, and the Origins of SIRS in Bacterial Sepsis: *Shock* **39**, 113–114 (2013).
34. Blander, J. M. & Barbet, G. Exploiting vita-PAMPs in vaccines. *Curr. Opin. Pharmacol.* **41**, 128–136 (2018).
35. Blander, J. M. & Sander, L. E. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 215–225 (2012).

Références

36. Barbet, G. *et al.* Sensing Microbial Viability through Bacterial RNA Augments T Follicular Helper Cell and Antibody Responses. *Immunity* **48**, 584-598.e5 (2018).
37. Moretti, J. *et al.* STING Senses Microbial Viability to Orchestrate Stress-Mediated Autophagy of the Endoplasmic Reticulum. *Cell* **171**, 809-823.e13 (2017).
38. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 991–1045 (1994).
39. Pandolfi, F., Altamura, S., Frosali, S. & Conti, P. Key Role of DAMP in Inflammation, Cancer, and Tissue Repair. *Clin. Ther.* **38**, 1017–1028 (2016).
40. Schaefer, L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J. Biol. Chem.* **289**, 35237–35245 (2014).
41. Celona, B. *et al.* Substantial histone reduction modulates genomewide nucleosomal occupancy and global transcriptional output. *PLoS Biol.* **9**, e1001086 (2011).
42. Andersson, U., Yang, H. & Harris, H. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. *Semin. Immunol.* **38**, 40–48 (2018).
43. Vénéreau, E., Ceriotti, C. & Bianchi, M. E. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
44. Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T. & Roth, J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 28–37 (2007).
45. Wolf, R. *et al.* Chemotactic activity of S100A7 (Psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation end products and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 1499–1506 (2008).
46. Foell, D., Frosch, M., Sorg, C. & Roth, J. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **344**, 37–51 (2004).
47. Vogl, T., Gharibyan, A. L. & Morozova-Roche, L. A. Pro-inflammatory S100A8 and S100A9 proteins: self-assembly into multifunctional native and amyloid complexes. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 2893–2917 (2012).
48. Ehrchen, J. M., Sunderkötter, C., Foell, D., Vogl, T. & Roth, J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 557–566 (2009).

Références

49. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
50. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
51. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 1–5 (2007).
52. Oppenheim, J. J. & Yang, D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 359–365 (2005).
53. Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. & O’Neill, L. A. J. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 446–458 (2005).
54. Rathinam, V. A. K., Vanaja, S. K. & Fitzgerald, K. A. Regulation of inflammasome signaling. *Nat. Immunol.* **13**, 333–342 (2012).
55. Dambuzza, I. M. & Brown, G. D. C-type lectins in immunity: recent developments. *Curr. Opin. Immunol.* **32**, 21–27 (2015).
56. Yamasaki, S. *et al.* Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells. *Nat. Immunol.* **9**, 1179–1188 (2008).
57. Legler, D. F. & Thelen, M. Chemokines: Chemistry, Biochemistry and Biological Function. *Chimia* **70**, 856–859 (2016).
58. Samson, M., Aubry, F. & Parmentier, M. Que sont les chimiokines ? *MS Médecine Sci. Rev. Pap. ISSN 0767-0974 1999 Vol 15 N° 8-9 P966-73* (1999) doi:10.4267/10608/1466.
59. Wang, H. & Ma, S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am. J. Emerg. Med.* **26**, 711–715 (2008).
60. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 260–268 (2013).
61. Munford, R. S. & Pugin, J. Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 316–321 (2001).
62. Xiao, W. *et al.* A genomic storm in critically injured humans. *J. Exp. Med.* **208**, 2581–2590 (2011).

Références

63. Stearns-Kurosawa, D. J., Osuchowski, M. F., Valentine, C., Kurosawa, S. & Remick, D. G. The pathogenesis of sepsis. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 19–48 (2011).
64. Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 862–874 (2013).
65. Levi, M. & Ten Cate, H. Disseminated intravascular coagulation. *N. Engl. J. Med.* **341**, 586–592 (1999).
66. Levi, M. & van der Poll, T. Inflammation and coagulation. *Crit. Care Med.* **38**, S26–34 (2010).
67. Russell, J. A. Management of sepsis. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1699–1713 (2006).
68. Rubenfeld, G. D., Weaver, J. & Stern, E. J. Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury. *N. Engl. J. Med.* **9** (2005).
69. Ferdinandy, P., Danial, H., Ambrus, I., Rothery, R. A. & Schulz, R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ. Res.* **87**, 241–247 (2000).
70. Adam, N., Kandelman, S., Mantz, J., Chrétien, F. & Sharshar, T. Sepsis-induced brain dysfunction. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **11**, 211–221 (2013).
71. Strnad, P., Tacke, F., Koch, A. & Trautwein, C. Liver — guardian, modifier and target of sepsis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 55–66 (2017).
72. Doi, K. & Rabb, H. Impact of acute kidney injury on distant organ function: recent findings and potential therapeutic targets. *Kidney Int.* **89**, 555–564 (2016).
73. Gonçalves, G. M., Zamboni, D. S. & Câmara, N. O. S. The role of innate immunity in septic acute kidney injuries. *Shock Augusta Ga* **34 Suppl 1**, 22–26 (2010).
74. Rhodes, A. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* **43**, 304–377 (2017).
75. Kumar, A. *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit. Care Med.* **34**, 1589–1596 (2006).
76. Kumar, A. *et al.* Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* **136**, 1237–1248 (2009).

Références

77. Ferrer, R. *et al.* Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit. Care Med.* **42**, 1749–1755 (2014).
78. Textoris, J., Wiramus, S., Martin, C. & Leone, M. Overview of antimicrobial therapy in intensive care units. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **9**, 97–109 (2011).
79. Levy, M. M., Evans, L. E. & Rhodes, A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med.* **44**, 925–928 (2018).
80. Rimmelé, T. & Kellum, J. A. High-volume hemofiltration in the intensive care unit: a blood purification therapy. *Anesthesiology* **116**, 1377–1387 (2012).
81. Cawcutt, K. A. & Peters, S. G. Severe Sepsis and Septic Shock: Clinical Overview and Update on Management. *Mayo Clin. Proc.* **89**, 1572–1578 (2014).
82. Angus, D. C. & van der Poll, T. Severe Sepsis and Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–851 (2013).
83. Esposito, S., De Simone, G., Boccia, G., De Caro, F. & Pagliano, P. Sepsis and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **10**, 204–212 (2017).
84. Sankar, V. & Webster, N. R. Clinical application of sepsis biomarkers. *J. Anesth.* **27**, 269–283 (2013).
85. Shafazand, S. & Weinacker, A. B. Blood Cultures in the Critical Care Unit: Improving Utilization and Yield. *Chest* **122**, 1727–1736 (2002).
86. Schaub, N. *et al.* Incremental value of multiplex real-time PCR for the early diagnosis of sepsis in the emergency department. *Swiss Med. Wkly.* **144**, w13911 (2014).
87. Croxatto, A., Prod'hom, G. & Greub, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 380–407 (2012).
88. Opota, O., Croxatto, A., Prod'hom, G. & Greub, G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 313–322 (2015).
89. Idelevich, E. A. *et al.* Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 1001–1006 (2014).

Références

90. Jones, A. E., Trzeciak, S. & Kline, J. A. The Sequential Organ Failure Assessment score for predicting outcome in patients with severe sepsis and evidence of hypoperfusion at the time of emergency department presentation. *Crit. Care Med.* **37**, 1649–1654 (2009).
91. Vincent, J. L. *et al.* Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on ‘sepsis-related problems’ of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit. Care Med.* **26**, 1793–1800 (1998).
92. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801 (2016).
93. Jiang, J., Yang, J., Mei, J., Jin, Y. & Lu, Y. Head-to-head comparison of qSOFA and SIRS criteria in predicting the mortality of infected patients in the emergency department: a meta-analysis. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* **26**, (2018).
94. Askim, Å. *et al.* Poor performance of quick-SOFA (qSOFA) score in predicting severe sepsis and mortality - a prospective study of patients admitted with infection to the emergency department. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* **25**, 56 (2017).
95. Cohen, J. *et al.* Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect. Dis.* **15**, 581–614 (2015).
96. Lashley, T. *et al.* Molecular biomarkers of Alzheimer’s disease: progress and prospects. *Dis. Model. Mech.* **11**, (2018).
97. McDermott, J. E. *et al.* Challenges in Biomarker Discovery: Combining Expert Insights with Statistical Analysis of Complex Omics Data. *Expert Opin. Med. Diagn.* **7**, 37–51 (2013).
98. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89–95 (2001).
99. Aronson, J. K. & Ferner, R. E. Biomarkers-A General Review. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **76**, 9.23.1-9.23.17 (2017).
100. Lagu, T. *et al.* Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit. Care Med.* **40**, 754–761 (2012).

Références

101. Dupuy, A.-M. *et al.* Role of biomarkers in the management of antibiotic therapy: an expert panel review: I - currently available biomarkers for clinical use in acute infections. *Ann. Intensive Care* **3**, 22 (2013).
102. van Engelen, T. S. R., Wiersinga, W. J., Scicluna, B. P. & van der Poll, T. Biomarkers in Sepsis. *Crit. Care Clin.* **34**, 139–152 (2018).
103. Tillett, W. S. & Francis, T. SEROLOGICAL REACTIONS IN PNEUMONIA WITH A NON-PROTEIN SOMATIC FRACTION OF PNEUMOCOCCUS. *J. Exp. Med.* **52**, 561–571 (1930).
104. Henriquez-Camacho, C. & Losa, J. Biomarkers for Sepsis. *BioMed Res. Int.* **2014**, (2014).
105. Nehring, S. M. & Patel, B. C. C Reactive Protein (CRP). in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
106. Black, S., Kushner, I. & Samols, D. C-reactive Protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 48487–48490 (2004).
107. Li, H.-X. *et al.* Measuring both procalcitonin and C-reactive protein for a diagnosis of sepsis in critically ill patients. *J. Int. Med. Res.* **42**, 1050–1059 (2014).
108. Clyne, B. & Olshaker, J. S. The C-reactive protein. *J. Emerg. Med.* **17**, 1019–1025 (1999).
109. Lobo, S. M. A. *et al.* C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest* **123**, 2043–2049 (2003).
110. Komiya, K. *et al.* Plasma C-reactive protein levels are associated with mortality in elderly with acute lung injury. *J. Crit. Care* **27**, 524.e1–6 (2012).
111. Barati, M. *et al.* Comparison of WBC, ESR, CRP and PCT serum levels in septic and non-septic burn cases. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* **34**, 770–774 (2008).
112. Lavrentieva, A. *et al.* Inflammatory markers in patients with severe burn injury. What is the best indicator of sepsis? *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* **33**, 189–194 (2007).
113. Tschaikowsky, K., Hedwig-Geissing, M., Schmidt, J. & Braun, G. G. Lipopolysaccharide-binding protein for monitoring of postoperative sepsis: complementary to C-reactive protein or redundant? *PLoS One* **6**, e23615 (2011).
114. Fraunberger, P. *et al.* Prognostic value of interleukin 6, procalcitonin, and C-reactive protein levels in intensive care unit patients during first increase of fever. *Shock Augusta Ga* **26**, 10–12 (2006).

Références

115. Assicot, M. *et al.* High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet Lond. Engl.* **341**, 515–518 (1993).
116. Bloos, F. & Reinhart, K. Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence* **5**, 154–160 (2014).
117. Christ-Crain, M. & Müller, B. Procalcitonin in bacterial infections--hype, hope, more or less? *Swiss Med. Wkly.* **135**, 451–460 (2005).
118. Kibe, S., Adams, K. & Barlow, G. Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, ii33–ii40 (2011).
119. Reinhart, K. & Brunkhorst, F. M. Meta-analysis of procalcitonin for sepsis detection. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 500–502; author reply 502-503 (2007).
120. Tang, B. M., Eslick, G. D., Craig, J. C. & McLean, A. S. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 210–217 (2007).
121. Kojic, D. Are there new approaches for diagnosis, therapy guidance and outcome prediction of sepsis? *World J. Exp. Med.* **5**, 50 (2015).
122. Sponholz, C., Sakr, Y., Reinhart, K. & Brunkhorst, F. Diagnostic value and prognostic implications of serum procalcitonin after cardiac surgery: a systematic review of the literature. *Crit. Care Lond. Engl.* **10**, R145 (2006).
123. Okada, Y. *et al.* Serum procalcitonin concentration in patients with Kawasaki disease. *J. Infect.* **48**, 199–205 (2004).
124. Reinhart, K. & Meisner, M. Biomarkers in the critically ill patient: procalcitonin. *Crit. Care Clin.* **27**, 253–263 (2011).
125. Lee, C.-C. *et al.* Prognostic value of mortality in emergency department sepsis score, procalcitonin, and C-reactive protein in patients with sepsis at the emergency department. *Shock Augusta Ga* **29**, 322–327 (2008).
126. Arora, S., Singh, P., Singh, P. M. & Trikha, A. Procalcitonin Levels in Survivors and Nonsurvivors of Sepsis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Shock Augusta Ga* **43**, 212–221 (2015).

Références

127. Lemarié, J. & Gibot, S. Combinaison de biomarqueurs pour le diagnostic du sepsis en réanimation. *Réanimation* **22**, 306–313 (2013).
128. Dolin, H. H., Papadimos, T. J., Stepkowski, S., Chen, X. & Pan, Z. K. A Novel Combination of Biomarkers to Herald the Onset of Sepsis Prior to the Manifestation of Symptoms: *SHOCK* **49**, 364–370 (2018).
129. Jedynak, M. *et al.* Soluble TREM-1 Serum Level can Early Predict Mortality of Patients with Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **66**, 299–306 (2018).
130. Taneja, I. *et al.* Combining Biomarkers with EMR Data to Identify Patients in Different Phases of Sepsis. *Sci. Rep.* **7**, 10800 (2017).
131. Qian, W.-J. *et al.* Comparative proteome analyses of human plasma following in vivo lipopolysaccharide administration using multidimensional separations coupled with tandem mass spectrometry. *Proteomics* **5**, 572–584 (2005).
132. Shen, Z. *et al.* Sepsis plasma protein profiling with immunodepletion, three-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry, and spectrum counting. *J. Proteome Res.* **5**, 3154–3160 (2006).
133. Paiva, R. A. de, David, C. M. & Domont, G. B. Proteomics in sepsis: a pilot study. *Rev. Bras. Ter. Intensiva* **22**, 403–412 (2010).
134. Su, L. *et al.* Identification of novel biomarkers for sepsis prognosis via urinary proteomic analysis using iTRAQ labeling and 2D-LC-MS/MS. *PloS One* **8**, e54237 (2013).
135. Malmström, E. *et al.* Targeted mass spectrometry analysis of neutrophil-derived proteins released during sepsis progression. *Thromb. Haemost.* **112**, 1230–1243 (2014).
136. Pierrakos, C. & Vincent, J.-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit. Care* **14**, R15 (2010).
137. Anderson, N. L. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. *Clin. Chem.* **56**, 177–185 (2010).
138. Rifai, N., Gillette, M. A. & Carr, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **24**, 971–983 (2006).

Références

139. Geyer, P. E., Holdt, L. M., Teupser, D. & Mann, M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol. Syst. Biol.* **13**, (2017).
140. van Gool, A. J., Henry, B. & Sprengers, E. D. From biomarker strategies to biomarker activities and back. *Drug Discov. Today* **15**, 121–126 (2010).
141. Anjo, S. I., Santa, C. & Manadas, B. SWATH-MS as a tool for biomarker discovery: From basic research to clinical applications. *Proteomics* **17**, (2017).
142. Surinova, S. *et al.* On the Development of Plasma Protein Biomarkers. *J. Proteome Res.* **10**, 5–16 (2011).
143. Lee, S. E. *et al.* Plasma Proteome Biomarkers of Inflammation in School Aged Children in Nepal. *PloS One* **10**, e0144279 (2015).
144. Keshishian, H. *et al.* Multiplexed, Quantitative Workflow for Sensitive Biomarker Discovery in Plasma Yields Novel Candidates for Early Myocardial Injury. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **14**, 2375–2393 (2015).
145. Nice, E. Biomarker discovery and validation: the tide is turning. *Expert Rev. Proteomics* **10**, 505–507 (2013).
146. Barbier, Y. *Les Immunodosages : De la théorie à la pratique.* (Les Éd. de l'ACOMEN, 1989).
147. Yalow, R. S. & Berson, S. A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* **184 (Suppl 21)**, 1648–1649 (1959).
148. Féraudet-Tarisse, C. *et al.* Highly sensitive sandwich immunoassay and immunochromatographic test for the detection of Clostridial epsilon toxin in complex matrices. *PloS One* **12**, e0181013 (2017).
149. Kantha, S. S. A centennial review; the 1890 tetanus antitoxin paper of von Behring and Kitasato and the related developments. *Keio J. Med.* **40**, 35–39 (1991).
150. Yel, L. Selective IgA deficiency. *J. Clin. Immunol.* **30**, 10–16 (2010).
151. Hiramoto, E. *et al.* The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. *Sci. Adv.* **4**, eaau1199 (2018).
152. Sir Frank Macfarlane Burnet 1899–1985. *Nat. Immunol.* **8**, 1009 (2007).

Références

153. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 2453–2455 (2005).
154. Kringelum, J. V., Nielsen, M., Padkjær, S. B. & Lund, O. Structural analysis of B-cell epitopes in antibody:protein complexes. *Mol. Immunol.* **53**, 24–34 (2013).
155. Amit, A. G., Mariuzza, R. A., Phillips, S. E. & Poljak, R. J. Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. *Science* **233**, 747–753 (1986).
156. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–874 (1971).
157. Stevens, P. W., Hansberry, M. R. & Kelso, D. M. Assessment of adsorption and adhesion of proteins to polystyrene microwells by sequential enzyme-linked immunosorbent assay analysis. *Anal. Biochem.* **225**, 197–205 (1995).
158. Konstantinou, G. N. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). in *Food Allergens: Methods and Protocols* (eds. Lin, J. & Alcocer, M.) 79–94 (Springer New York, 2017). doi:10.1007/978-1-4939-6925-8_7.
159. Bradlow, H. L., Sepkovic, D. W., Klug, T. & Osborne, M. P. Application of an improved ELISA assay to the analysis of urinary estrogen metabolites. *Steroids* **63**, 406–413 (1998).
160. Faupel-Badger, J. M. *et al.* Comparison of liquid chromatography-mass spectrometry, radioimmunoassay, and enzyme-linked immunosorbent assay methods for measurement of urinary estrogens. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **19**, 292–300 (2010).
161. Schubert-Ullrich, P. *et al.* Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 69–81 (2009).
162. Lehmann, S., Dupuy, A., Beaudoux, J.-L. & Lizard, G. [Multiplexed analysis for identification and evaluation of novel biomarkers in biological fluids, tissue and cell extracts]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **67**, 381–393 (2009).

Références

163. Guigue, N., Menotti, J., Hamane, S., Derouin, F. & Garin, Y. J.-F. Performance of the BioPlex 2200 flow immunoassay in critical cases of serodiagnosis of toxoplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **21**, 496–500 (2014).
164. Salmons, M., Delarue, S., Delaugerre, C., Simon, F. & Maylin, S. Clinical evaluation of BioPlex 2200 HIV Ag-Ab, an automated screening method providing discrete detection of HIV-1 p24 antigen, HIV-1 antibody, and HIV-2 antibody. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 103–107 (2014).
165. Ellington, A. A., Kullo, I. J., Bailey, K. R. & Klee, G. G. Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. *Clin. Chem.* **56**, 186–193 (2010).
166. Pla-Roca, M. *et al.* Antibody colocalization microarray: a scalable technology for multiplex protein analysis in complex samples. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, M111.011460 (2012).
167. Method of the Year 2012. *Nat. Methods* **10**, 1 (2013).
168. van de Merbel, N. C. Protein quantification by LC-MS: a decade of progress through the pages of Bioanalysis. *Bioanalysis* **11**, 629–644 (2019).
169. Smith, L. M., Kelleher, N. L. & Consortium for Top Down Proteomics. Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat. Methods* **10**, 186–187 (2013).
170. Qing, G. *et al.* New Opportunities and Challenges of Smart Polymers in Post-Translational Modification Proteomics. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **29**, (2017).
171. Chait, B. T. Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down? *Science* **314**, 65–66 (2006).
172. Han, X., Aslanian, A. & Yates, J. R. Mass Spectrometry for Proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 483–490 (2008).
173. Doerr, A. Mass spectrometry-based targeted proteomics. *Nat. Methods* **10**, 23 (2013).
174. Angel, T. E. *et al.* Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 3912–3928 (2012).
175. Marx, V. Targeted proteomics. *Nat. Methods* **10**, 19–22 (2013).
176. Gallien, S., Duriez, E., Demeure, K. & Domon, B. Selectivity of LC-MS/MS analysis: implication for proteomics experiments. *J. Proteomics* **81**, 148–158 (2013).

Références

177. Peterson, A. C., Russell, J. D., Bailey, D. J., Westphall, M. S. & Coon, J. J. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, 1475–1488 (2012).
178. Gallien, S. *et al.* Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, 1709–1723 (2012).
179. Olsen, J. V. *et al.* Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat. Methods* **4**, 709–712 (2007).
180. Shi, T. *et al.* Advances in targeted proteomics and applications to biomedical research. *Proteomics* **16**, 2160–2182 (2016).
181. Schilling, B. *et al.* Multiplexed, Scheduled, High-Resolution Parallel Reaction Monitoring on a Full Scan QqTOF Instrument with Integrated Data-Dependent and Targeted Mass Spectrometric Workflows. *Anal. Chem.* **87**, 10222–10229 (2015).
182. Nguyen, T. T. T. N. *et al.* Investigating the utility of minimized sample preparation and high-resolution mass spectrometry for quantification of monoclonal antibody drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **159**, 384–392 (2018).
183. Aebersold, R. & Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198–207 (2003).
184. Kelstrup, C. D. *et al.* Performance Evaluation of the Q Exactive HF-X for Shotgun Proteomics. *J. Proteome Res.* **17**, 727–738 (2018).
185. Gillet, L. C. *et al.* Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, O111.016717 (2012).
186. Purvine, S., Eppel, J.-T., Yi, E. C. & Goodlett, D. R. Shotgun collision-induced dissociation of peptides using a time of flight mass analyzer. *Proteomics* **3**, 847–850 (2003).
187. Meyer, J. G. & Schilling, B. Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques. *Expert Rev. Proteomics* **14**, 419–429 (2017).
188. Kang, Y., Burton, L., Lau, A. & Tate, S. SWATH-ID: An instrument method which combines identification and quantification in a single analysis. *Proteomics* **17**, e1500522 (2017).

Références

189. Liu, Y. *et al.* Quantitative variability of 342 plasma proteins in a human twin population. *Mol. Syst. Biol.* **11**, (2015).
190. Egertson, J. D., MacLean, B., Johnson, R., Xuan, Y. & MacCoss, M. J. Multiplexed peptide analysis using data-independent acquisition and Skyline. *Nat. Protoc.* **10**, 887–903 (2015).
191. Moving Target | The Scientist Magazine®. <https://www.the-scientist.com/lab-tools/moving-target-37405>.
192. Hoffman, M. A., Fang, B., Haura, E. B., Rix, U. & Koomen, J. M. Comparison of Quantitative Mass Spectrometry Platforms for Monitoring Kinase ATP Probe Uptake in Lung Cancer. *J. Proteome Res.* **17**, 63–75 (2018).
193. Kuster, B., Schirle, M., Mallick, P. & Aebersold, R. Scoring proteomes with proteotypic peptide probes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 577–583 (2005).
194. Brownridge, P. & Beynon, R. J. The importance of the digest: proteolysis and absolute quantification in proteomics. *Methods San Diego Calif* **54**, 351–360 (2011).
195. Tsiatsiani, L. & Heck, A. J. R. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J.* **282**, 2612–2626 (2015).
196. Rodriguez, J., Gupta, N., Smith, R. D. & Pevzner, P. A. Does Trypsin Cut Before Proline? *J. Proteome Res.* **7**, 300–305 (2008).
197. Wu, C. *et al.* A Protease for Middle Down Proteomics. *Nat. Methods* **9**, 822–824 (2012).
198. Swaney, D. L., Wenger, C. D. & Coon, J. J. Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. *J. Proteome Res.* **9**, 1323–1329 (2010).
199. Taouatas, N., Drugan, M. M., Heck, A. J. R. & Mohammed, S. Straightforward ladder sequencing of peptides using a Lys-N metalloendopeptidase. *Nat. Methods* **5**, 405–407 (2008).
200. Trevisiol, S. *et al.* The use of proteases complementary to trypsin to probe isoforms and modifications. *Proteomics* **16**, 715–728 (2016).
201. Lebert, D. *et al.* DIGESTIF: a universal quality standard for the control of bottom-up proteomics experiments. *J. Proteome Res.* **14**, 787–803 (2015).
202. Cristobal, A. *et al.* Toward an Optimized Workflow for Middle-Down Proteomics. *Anal. Chem.* **89**, 3318–3325 (2017).

Références

203. Laskay, Ü. A., Srzentić, K., Monod, M. & Tsybin, Y. O. Extended bottom-up proteomics with secreted aspartic protease Sap9. *J. Proteomics* **110**, 20–31 (2014).
204. Srzentić, K. *et al.* Advantages of extended bottom-up proteomics using Sap9 for analysis of monoclonal antibodies. *Anal. Chem.* **86**, 9945–9953 (2014).
205. Holt, M. V., Wang, T. & Young, N. L. One-Pot Quantitative Top- and Middle-Down Analysis of GluC-Digested Histone H4. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2019) doi:10.1007/s13361-019-02219-1.
206. Li, F., Schmerberg, C. M. & Ji, Q. C. Accelerated tryptic digestion of proteins in plasma for absolute quantitation using a protein internal standard by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **23**, 729–732 (2009).
207. Anderson, N. L. & Anderson, N. G. The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 845–867 (2002).
208. Hortin, G. L., Jortani, S. A., Ritchie, J. C., Valdes, R. & Chan, D. W. Proteomics: a new diagnostic frontier. *Clin. Chem.* **52**, 1218–1222 (2006).
209. Hortin, G. L., Sviridov, D. & Anderson, N. L. High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the top 4 logs of polypeptide abundance. *Clin. Chem.* **54**, 1608–1616 (2008).
210. States, D. J. *et al.* Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study. *Nat. Biotechnol.* **24**, 333–338 (2006).
211. Gillette, M. A. & Carr, S. A. Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nat. Methods* **10**, 28–34 (2013).
212. Ouyang, Z. *et al.* Pellet digestion: a simple and efficient sample preparation technique for LC–MS/MS quantification of large therapeutic proteins in plasma. *Bioanalysis* **4**, 17–28 (2012).
213. Proc, J. L. *et al.* A quantitative study of the effects of chaotropic agents, surfactants, and solvents on the digestion efficiency of human plasma proteins by trypsin. *J. Proteome Res.* **9**, 5422–5437 (2010).
214. Liu, T. *et al.* Evaluation of multiprotein immunoaffinity subtraction for plasma proteomics and candidate biomarker discovery using mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **5**, 2167–2174 (2006).

Références

215. Gundry, R. L., Fu, Q., Jelinek, C. A., Van Eyk, J. E. & Cotter, R. J. Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. *Proteomics Clin. Appl.* **1**, 73–88 (2007).
216. Barthélemy, N. R. *et al.* Tau Protein Quantification in Human Cerebrospinal Fluid by Targeted Mass Spectrometry at High Sequence Coverage Provides Insights into Its Primary Structure Heterogeneity. *J. Proteome Res.* **15**, 667–676 (2016).
217. Chan, K. C. & Issaq, H. J. Fractionation of peptides by strong cation-exchange liquid chromatography. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1002**, 311–315 (2013).
218. Whiteaker, J. R., Zhao, L., Anderson, L. & Paulovich, A. G. An automated and multiplexed method for high throughput peptide immunoaffinity enrichment and multiple reaction monitoring mass spectrometry-based quantification of protein biomarkers. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **9**, 184–196 (2010).
219. Whiteaker, J. R. *et al.* Sequential multiplexed analyte quantification using peptide immunoaffinity enrichment coupled to mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, M111.015347 (2012).
220. Dupré, M. *et al.* Multiplex Quantification of Protein Toxins in Human Biofluids and Food Matrices Using Immunoextraction and High-Resolution Targeted Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **87**, 8473–8480 (2015).
221. Brun, V. *et al.* Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **6**, 2139–2149 (2007).
222. Brun, V., Masselon, C., Garin, J. & Dupuis, A. Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics. *J. Proteomics* **72**, 740–749 (2009).
223. Chen, Y.-T. *et al.* Quantitative analysis of prostate specific antigen isoforms using immunoprecipitation and stable isotope labeling mass spectrometry. *Anal. Chem.* **87**, 545–553 (2015).
224. Anderson, N. L. *et al.* Mass Spectrometric Quantitation of Peptides and Proteins Using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *J. Proteome Res.* **3**, 235–244 (2004).
225. Kuhn, E. *et al.* Interlaboratory evaluation of automated, multiplexed peptide immunoaffinity enrichment coupled to multiple reaction monitoring mass spectrometry for quantifying proteins in plasma. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, M111.013854 (2012).

Références

226. Ippoliti, P. J. *et al.* Automated Microchromatography Enables Multiplexing of Immunoaffinity Enrichment of Peptides to Greater than 150 for Targeted MS-Based Assays. *Anal. Chem.* **88**, 7548–7555 (2016).
227. Hüttenhain, R., Malmström, J., Picotti, P. & Aebersold, R. Perspectives of targeted mass spectrometry for protein biomarker verification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 518–525 (2009).
228. Kuzyk, M. A. *et al.* Multiple reaction monitoring-based, multiplexed, absolute quantitation of 45 proteins in human plasma. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **8**, 1860–1877 (2009).
229. Keshishian, H., Addona, T., Burgess, M., Kuhn, E. & Carr, S. A. Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **6**, 2212–2229 (2007).
230. Nicol, G. R. *et al.* Use of an immunoaffinity-mass spectrometry-based approach for the quantification of protein biomarkers from serum samples of lung cancer patients. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **7**, 1974–1982 (2008).
231. Kuhn, E. *et al.* Developing Multiplexed Assays for Troponin I and Interleukin-33 in Plasma by Peptide Immunoaffinity Enrichment and Targeted Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **55**, 1108–1117 (2009).
232. Megger, D. A., Bracht, T., Meyer, H. E. & Sitek, B. Label-free quantification in clinical proteomics. *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 1581–1590 (2013).
233. Zhang, R., Sioma, C. S., Wang, S. & Regnier, F. E. Fractionation of isotopically labeled peptides in quantitative proteomics. *Anal. Chem.* **73**, 5142–5149 (2001).
234. Ong, S.-E. *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **1**, 376–386 (2002).
235. Geiger, T., Cox, J., Ostasiewicz, P., Wisniewski, J. R. & Mann, M. Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nat. Methods* **7**, 383–385 (2010).
236. Thompson, A. *et al.* Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* **75**, 1895–1904 (2003).

Références

237. Ross, P. L. *et al.* Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **3**, 1154–1169 (2004).
238. Worboys, J. D., Sinclair, J., Yuan, Y. & Jørgensen, C. Systematic evaluation of quantotypic peptides for targeted analysis of the human kinome. *Nat. Methods* **11**, 1041–1044 (2014).
239. Lange, V., Picotti, P., Domon, B. & Aebersold, R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **4**, (2008).
240. Calderón-Celis, F., Encinar, J. R. & Sanz-Medel, A. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **37**, 715–737 (2018).
241. Picotti, P. & Aebersold, R. Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions. *Nat. Methods* **9**, 555–566 (2012).
242. Barr, J. R. *et al.* Isotope dilution--mass spectrometric quantification of specific proteins: model application with apolipoprotein A-I. *Clin. Chem.* **42**, 1676–1682 (1996).
243. Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W. & Gygi, S. P. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6940–6945 (2003).
244. Beynon, R. J., Doherty, M. K., Pratt, J. M. & Gaskell, S. J. Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides. *Nat. Methods* **2**, 587–589 (2005).
245. Pratt, J. M. *et al.* Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat. Protoc.* **1**, 1029–1043 (2006).
246. Zeiler, M., Straube, W. L., Lundberg, E., Uhlen, M. & Mann, M. A Protein Epitope Signature Tag (PrEST) library allows SILAC-based absolute quantification and multiplexed determination of protein copy numbers in cell lines. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **11**, O111.009613 (2012).
247. Shuford, C. M. *et al.* Absolute Protein Quantification by Mass Spectrometry: Not as Simple as Advertised. *Anal. Chem.* **89**, 7406–7415 (2017).
248. Dinges, M. M., Orwin, P. M. & Schlievert, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 16–34 (2000).

Références

249. Oeckl, P., Steinacker, P. & Otto, M. Comparison of Internal Standard Approaches for SRM Analysis of Alpha-Synuclein in Cerebrospinal Fluid. *J. Proteome Res.* **17**, 516–523 (2018).
250. Grant, R. P. & Hoofnagle, A. N. From Lost in Translation to Paradise Found: Enabling Protein Biomarker Method Transfer by Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **60**, 941–944 (2014).
251. Féraud, G., Pontet, F., Giroud, C. & Dumontet, M. [Introducing the new international vocabulary of metrology]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **67**, 591–594 (2009).
252. Abbatiello, S. E. *et al.* Large-Scale Interlaboratory Study to Develop, Analytically Validate and Apply Highly Multiplexed, Quantitative Peptide Assays to Measure Cancer-Relevant Proteins in Plasma. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **14**, 2357–2374 (2015).
253. Collins, B. C. *et al.* Multi-laboratory assessment of reproducibility, qualitative and quantitative performance of SWATH-mass spectrometry. *Nat. Commun.* **8**, 291 (2017).
254. Clouet-Foraison, N., Gillery, P. & Delatour, V. Letter to the Editor regarding ‘Achieving comparability with IFCC reference method for the measurement of hemoglobin A1c by use of an improved isotope-dilution mass spectrometry method’. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 5789–5790 (2017).
255. Bargnoux, A.-S. *et al.* Multicenter Evaluation of Cystatin C Measurement after Assay Standardization. *Clin. Chem.* **63**, 833–841 (2017).
256. Captur, G. *et al.* Identification of a Multiplex Biomarker Panel for Hypertrophic Cardiomyopathy using Quantitative Proteomics and Machine Learning. *Mol. Cell. Proteomics MCP* (2019) doi:10.1074/mcp.RA119.001586.
257. Burgess, M. W., Keshishian, H., Mani, D. R., Gillette, M. A. & Carr, S. A. Simplified and efficient quantification of low-abundance proteins at very high multiplex via targeted mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **13**, 1137–1149 (2014).
258. Rougemont, B. *et al.* Scout-MRM: Multiplexed Targeted Mass Spectrometry-Based Assay without Retention Time Scheduling Exemplified by *Dickeya dadantii* Proteomic Analysis during Plant Infection. *Anal. Chem.* **89**, 1421–1426 (2017).
259. Gallien, S., Kim, S. Y. & Domon, B. Large-Scale Targeted Proteomics Using Internal Standard Triggered-Parallel Reaction Monitoring (IS-PRM). *Mol. Cell. Proteomics MCP* **14**, 1630–1644 (2015).

Références

260. Zhang, Q. *et al.* Multiplex Immuno-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Parallel Reaction Monitoring (LC-MS-PRM) Quantitation of CD8A, CD4, LAG3, PD1, PD-L1, and PD-L2 in Frozen Human Tissues. *J. Proteome Res.* **17**, 3932–3940 (2018).
261. Jiang, H. *et al.* HST-MRM-MS: A Novel High-Sample-Throughput Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometric Method for Multiplex Absolute Quantitation of Hepatocellular Carcinoma Serum Biomarker. *J. Proteome Res.* **18**, 469–477 (2019).
262. Zolg, D. P. *et al.* Building ProteomeTools based on a complete synthetic human proteome. *Nat. Methods* **14**, 259–262 (2017).
263. Pruitt, K. D., Tatusova, T. & Maglott, D. R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**, D61–D65 (2007).
264. Schlüter, H., Apweiler, R., Holzhütter, H.-G. & Jungblut, P. R. Finding one's way in proteomics: a protein species nomenclature. *Chem. Cent. J.* **3**, 11 (2009).
265. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* **293**, 1074–1080 (2001).
266. Pagel, O., Lorocho, S., Sickmann, A. & Zahedi, R. P. Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Rev. Proteomics* **12**, 235–253 (2015).
267. Lee, I. & Hüttemann, M. Energy crisis: the role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 1579–1586 (2014).
268. de Haan, N. *et al.* Differences in IgG Fc Glycosylation Are Associated with Outcome of Pediatric Meningococcal Sepsis. *mBio* **9**, (2018).
269. Akutsu, M., Dikic, I. & Bremm, A. Ubiquitin chain diversity at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 875–880 (2016).
270. Silva, A. M. N., Vitorino, R., Domingues, M. R. M., Spickett, C. M. & Domingues, P. Post-translational modifications and mass spectrometry detection. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 925–941 (2013).
271. Stadtman, E. R. & Levine, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* **25**, 207–218 (2003).

Références

272. Bartlett, R. K. *et al.* Oxidation of Met144 and Met145 in calmodulin blocks calmodulin dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry* **42**, 3231–3238 (2003).
273. Grune, T., Merker, K., Sandig, G. & Davies, K. J. A. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 709–718 (2003).
274. Abdulmahdi, W. *et al.* HMGB1 redox during sepsis. *Redox Biol.* **13**, 600–607 (2017).
275. Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H. E. & Stamler, J. S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 150–166 (2005).
276. Nakamura, T. *et al.* Aberrant protein S-nitrosylation contributes to the pathophysiology of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* **84**, 99–108 (2015).
277. Nakamura, T. *et al.* Aberrant protein s-nitrosylation in neurodegenerative diseases. *Neuron* **78**, 596–614 (2013).
278. Seth, D. & Stamler, J. S. The SNO-proteome: causation and classifications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 129–136 (2011).
279. Winkler, M. S. *et al.* Markers of nitric oxide are associated with sepsis severity: an observational study. *Crit. Care* **21**, (2017).
280. Savidge, T. C. *et al.* Host S-nitrosylation inhibits clostridial small molecule-activated glucosylating toxins. *Nat. Med.* **17**, 1136–1141 (2011).
281. Murn, J. & Shi, Y. The winding path of protein methylation research: milestones and new frontiers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 517–527 (2017).
282. Beaver, J. E. & Waters, M. L. Molecular Recognition of Lys and Arg Methylation. *ACS Chem. Biol.* **11**, 643–653 (2016).
283. Tendl, K. A. *et al.* DNA methylation pattern of CALCA in preterm neonates with bacterial sepsis as a putative epigenetic biomarker. *Epigenetics* **8**, 1261–1267 (2013).
284. Dhas, B. B., Antony, H. A., Bhat, V., Newton, B. & Parija, S. C. Global DNA methylation in neonatal sepsis. *Indian J. Pediatr.* **82**, 340–344 (2015).

Références

285. Arnesen, T. *et al.* Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8157–8162 (2009).
286. Ree, R., Varland, S. & Arnesen, T. Spotlight on protein N-terminal acetylation. *Exp. Mol. Med.* **50**, (2018).
287. Hwang, C.-S., Shemorry, A. & Varshavsky, A. N-Terminal Acetylation of Cellular Proteins Creates Specific Degradation Signals. *Science* **327**, 973–977 (2010).
288. Trexler, A. J. & Rhoades, E. N-terminal acetylation is critical for forming α -helical oligomer of α -synuclein. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **21**, 601–605 (2012).
289. Venereau, E. *et al.* Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J. Exp. Med.* **209**, 1519–1528 (2012).
290. Venereau, E. *et al.* HMGB1 as biomarker and drug target. *Pharmacol. Res.* **111**, 534–544 (2016).
291. Barthélemy, N. R., Mallipeddi, N., Moiseyev, P., Sato, C. & Bateman, R. J. Tau Phosphorylation Rates Measured by Mass Spectrometry Differ in the Intracellular Brain vs. Extracellular Cerebrospinal Fluid Compartments and Are Differentially Affected by Alzheimer’s Disease. *Front. Aging Neurosci.* **11**, 121 (2019).
292. Tape, C. J. *et al.* Reproducible automated phosphopeptide enrichment using magnetic TiO₂ and Ti-IMAC. *Anal. Chem.* **86**, 10296–10302 (2014).
293. Nesvizhskii, A. I. & Aebersold, R. Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **4**, 1419–1440 (2005).
294. Razavi, M., Leigh Anderson, N., Pope, M. E., Yip, R. & Pearson, T. W. High precision quantification of human plasma proteins using the automated SISCAPA Immuno-MS workflow. *New Biotechnol.* **33**, 494–502 (2016).
295. Savaryn, J. P., Catherman, A. D., Thomas, P. M., Abecassis, M. M. & Kelleher, N. L. The emergence of top-down proteomics in clinical research. *Genome Med.* **5**, 53 (2013).
296. Toby, T. K., Fornelli, L. & Kelleher, N. L. Progress in Top-Down Proteomics and the Analysis of Proteoforms. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* **9**, 499–519 (2016).

Références

297. Chen, B., Brown, K. A., Lin, Z. & Ge, Y. Top-Down Proteomics: Ready for Prime Time? *Anal. Chem.* **90**, 110–127 (2018).
298. Anderson, L. C. *et al.* Identification and Characterization of Human Proteoforms by Top-Down LC-21 Tesla FT-ICR Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **16**, 1087–1096 (2017).
299. Cleland, T. P. *et al.* High-Throughput Analysis of Intact Human Proteins Using UVPD and HCD on an Orbitrap Mass Spectrometer. *J. Proteome Res.* **16**, 2072–2079 (2017).
300. Compton, P. D., Zamdborg, L., Thomas, P. M. & Kelleher, N. L. On the scalability and requirements of whole protein mass spectrometry. *Anal. Chem.* **83**, 6868–6874 (2011).
301. Riley, N. M. *et al.* Enhanced Dissociation of Intact Proteins with High Capacity Electron Transfer Dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **27**, 520–531 (2016).
302. Wang, E. H., Appulage, D. K., McAllister, E. A. & Schug, K. A. Investigation of Ion Transmission Effects on Intact Protein Quantification in a Triple Quadrupole Mass Spectrometer. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**, 1977–1986 (2017).
303. Ntai, I. *et al.* Precise characterization of KRAS4b proteoforms in human colorectal cells and tumors reveals mutation/modification cross-talk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 4140–4145 (2018).
304. Lanshoeft, C., Cianféroni, S. & Heudi, O. Generic Hybrid Ligand Binding Assay Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry-Based Workflow for Multiplexed Human Immunoglobulin G1 Quantification at the Intact Protein Level: Application to Preclinical Pharmacokinetic Studies. *Anal. Chem.* **89**, 2628–2635 (2017).
305. Schaffer, L. V. *et al.* Identification and Quantification of Proteoforms by Mass Spectrometry. *Proteomics* **19**, e1800361 (2019).
306. Liu, Z., Wang, R., Liu, J., Sun, R. & Wang, F. Global Quantification of Intact Proteins via Chemical Isotope Labeling and Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **18**, 2185–2194 (2019).
307. Davis, R. G. *et al.* Top-Down Proteomics Enables Comparative Analysis of Brain Proteoforms Between Mouse Strains. *Anal. Chem.* **90**, 3802–3810 (2018).
308. Durbin, K. R. *et al.* Quantitation and Identification of Thousands of Human Proteoforms below 30 kDa. *J. Proteome Res.* **15**, 976–982 (2016).

Références

309. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301–305 (2002).
310. Pruenster, M., Vogl, T., Roth, J. & Sperandio, M. S100A8/A9: From basic science to clinical application. *Pharmacol. Ther.* **167**, 120–131 (2016).
311. Moore, B. W. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 739–744 (1965).
312. Edgeworth, J., Gorman, M., Bennett, R., Freemont, P. & Hogg, N. Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 7706–7713 (1991).
313. Vog, T., Roth, J., Sorg, C., Hillenkamp, F. & Strupat, K. Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 detected by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 1124–1130 (1999).
314. Strupat, K., Rogniaux, H., Van Dorsselaer, A., Roth, J. & Vogl, T. Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 are confirmed by electrospray ionization-mass analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **11**, 780–788 (2000).
315. Vogl, T., Leukert, N., Barczyk, K., Strupat, K. & Roth, J. Biophysical characterization of S100A8 and S100A9 in the absence and presence of bivalent cations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1763**, 1298–1306 (2006).
316. Voganatsi, A., Panyutich, A., Miyasaki, K. T. & Murthy, R. K. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 130–134 (2001).
317. Lemarchand, P., Vaglio, M., Mauël, J. & Markert, M. Translocation of a small cytosolic calcium-binding protein (MRP-8) to plasma membrane correlates with human neutrophil activation. *J. Biol. Chem.* **267**, 19379–19382 (1992).
318. Vogl, T. *et al.* Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* **13**, 1042–1049 (2007).
319. Pietzsch, J. & Hoppmann, S. Human S100A12: a novel key player in inflammation? *Amino Acids* **36**, 381–389 (2009).

Références

320. Guignard, F., Mael, J. & Markert, M. Identification and characterization of a novel human neutrophil protein related to the S100 family. *Biochem. J.* **309**, 395–401 (1995).
321. Donato, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc. Res. Tech.* **60**, 540–551 (2003).
322. Foell, D., Wittkowski, H. & Roth, J. Mechanisms of disease: a ‘DAMP’ view of inflammatory arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **3**, 382–390 (2007).
323. Lorenz, E. *et al.* Different expression ratio of S100A8/A9 and S100A12 in acute and chronic lung diseases. *Respir. Med.* **102**, 567–573 (2008).
324. Leach, S. T. *et al.* Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **42**, 1321–1331 (2007).
325. Foell, D. *et al.* Expression of S100A12 (EN-RAGE) in cystic fibrosis. *Thorax* **58**, 613–617 (2003).
326. Donato, R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. *Curr. Mol. Med.* **7**, 711–724 (2007).
327. Yang, Z. *et al.* Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 986–994 (2001).
328. Gao, S., Yang, Y., Fu, Y., Guo, W. & Liu, G. Diagnostic and prognostic value of myeloid-related protein complex 8/14 for sepsis. *Am. J. Emerg. Med.* **33**, 1278–1282 (2015).
329. van Zoelen, M. A. D. *et al.* Expression and role of myeloid-related protein-14 in clinical and experimental sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 1098–1106 (2009).
330. Achouiti, A. *et al.* S100A12 and Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products Levels During Human Severe Sepsis: *Shock* **40**, 188–194 (2013).
331. Payen, D. *et al.* Gene profiling in human blood leucocytes during recovery from septic shock. *Intensive Care Med.* **34**, 1371–1376 (2008).
332. Ikemoto, M. *et al.* New ELISA system for myeloid-related protein complex (MRP8/14) and its clinical significance as a sensitive marker for inflammatory responses associated with transplant rejection. *Clin. Chem.* **49**, 594–600 (2003).

Références

333. Grassi, J. *et al.* Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 alpha and -1 beta. Development of two enzyme immunometric assays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media. *J. Immunol. Methods* **123**, 193–210 (1989).
334. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88–95 (1961).
335. Billiau, A. & Matthys, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 849–860 (2001).
336. Vogl, T., Roth, J., Sorg, C., Hillenkamp, F. & Strupat, K. Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 detected by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 1124–1130 (1999).
337. Lim, S. Y. *et al.* S-Nitrosylated S100A8: Novel Anti-Inflammatory Properties. *J. Immunol.* **181**, 5627–5636 (2008).
338. Lim, S. Y., Raftery, M. J., Goyette, J. & Geczy, C. L. S-glutathionylation regulates inflammatory activities of S100A9. *J. Biol. Chem.* **285**, 14377–14388 (2010).
339. van den Bos, C., Roth, J., Koch, H. G., Hartmann, M. & Sorg, C. Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2+)-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **156**, 1247–1254 (1996).
340. Yasar, O., Akcay, T., Obek, C. & Turegun, F. A. Significance of S100A8, S100A9 and calprotectin levels in bladder cancer. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **77**, 437–441 (2017).
341. Gao, J., Meyer, K., Borucki, K. & Ueland, P. M. Multiplex Immuno-MALDI-TOF MS for Targeted Quantification of Protein Biomarkers and Their Proteoforms Related to Inflammation and Renal Dysfunction. *Anal. Chem.* **90**, 3366–3373 (2018).
342. Hansbauer, E.-M. *et al.* Rapid Detection of Abrin Toxin and Its Isoforms in Complex Matrices by Immuno-Extraction and Quantitative High Resolution Targeted Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **89**, 11719–11727 (2017).
343. Dycka, F., Bobal, P., Mazanec, K. & Bobalova, J. Rapid and efficient protein enzymatic digestion: an experimental comparison. *Electrophoresis* **33**, 288–295 (2012).

Références

344. Sellar, G. C. & Whitehead, A. S. Localization of four human serum amyloid A (SAA) protein superfamily genes to chromosome 11p: characterization of a fifth SAA-related gene sequence. *Genomics* **16**, 774–776 (1993).
345. Sack, G. H. Serum amyloid A - a review. *Mol. Med. Camb. Mass* **24**, 46 (2018).
346. Garcia-Obregon, S. *et al.* Identification of a panel of serum protein markers in early stage of sepsis and its validation in a cohort of patients. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **51**, 465–472 (2018).
347. Yu, M.-H. *et al.* Prognostic value of the biomarkers serum amyloid A and nitric oxide in patients with sepsis. *Int. Immunopharmacol.* **62**, 287–292 (2018).
348. Cui, N., Zhang, H., Chen, Z. & Yu, Z. Prognostic significance of PCT and CRP evaluation for adult ICU patients with sepsis and septic shock: retrospective analysis of 59 cases. *J. Int. Med. Res.* **47**, 1573–1579 (2019).
349. Gragnano, F. *et al.* The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. *Mediators Inflamm.* **2017**, (2017).
350. Vischer, U. M., Barth, H. & Wollheim, C. B. Regulated von Willebrand factor secretion is associated with agonist-specific patterns of cytoskeletal remodeling in cultured endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 883–891 (2000).
351. Bernardo, A., Ball, C., Nolasco, L., Moake, J. F. & Dong, J. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* **104**, 100–106 (2004).
352. Cataland, S. R. & Wu, H. M. Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: new therapeutic options and their optimal use. *J. Thromb. Haemost. JTH* **13 Suppl 1**, S223-229 (2015).
353. Claus, R. A., Bockmeyer, C. L., Sossdorf, M. & Lösche, W. The balance between von-Willebrand factor and its cleaving protease ADAMTS13: biomarker in systemic inflammation and development of organ failure? *Curr. Mol. Med.* **10**, 236–248 (2010).
354. Kayal, S., Jaïs, J. P., Aguni, N., Chaudière, J. & Labrousse, J. Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 776–784 (1998).

Références

355. Hyseni, A. *et al.* Active von Willebrand factor predicts 28-day mortality in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Blood* **123**, 2153–2156 (2014).
356. Alayash, A. I., Andersen, C. B. F., Moestrup, S. K. & Bülow, L. Haptoglobin: the hemoglobin detoxifier in plasma. *Trends Biotechnol.* **31**, 2–3 (2013).
357. Andersen, C. B. F. *et al.* Haptoglobin. *Antioxid. Redox Signal.* **26**, 814–831 (2017).
358. Miller, Y. I., Altamentova, S. M. & Shaklai, N. Oxidation of low-density lipoprotein by hemoglobin stems from a heme-initiated globin radical: antioxidant role of haptoglobin. *Biochemistry* **36**, 12189–12198 (1997).
359. Yang, F. *et al.* Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**, L402-409 (2003).
360. Arredouani, M. S. *et al.* Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo. *Immunology* **114**, 263–271 (2005).
361. Janz, D. R. *et al.* Association between haptoglobin, hemopexin and mortality in adults with sepsis. *Crit. Care* **17**, R272 (2013).
362. Ceciliani, F. & Pocacqua, V. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Curr. Protein Pept. Sci.* **8**, 91–108 (2007).
363. Flower, D. R., North, A. C. & Sansom, C. E. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 9–24 (2000).
364. Hochepped, T., Berger, F. G., Baumann, H. & Libert, C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 25–34 (2003).
365. Frantz, M., Jung, M. L., Ribereau-Gayon, G. & Anton, R. Modulation of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins cytotoxicity by carbohydrates and serum glycoproteins. *Arzneimittelforschung.* **50**, 471–478 (2000).
366. Moore, D. F., Rosenfeld, M. R., Gribbon, P. M., Winlove, C. P. & Tsai, C. M. Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. *Inflammation* **21**, 69–82 (1997).

Références

367. Muchitsch, E. M., Auer, W. & Pichler, L. Effects of alpha 1-acid glycoprotein in different rodent models of shock. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **12**, 173–181 (1998).
368. Barroso-Sousa, R. *et al.* Decreased levels of alpha-1-acid glycoprotein are related to the mortality of septic patients in the emergency department. *Clinics* **68**, 1134–1139 (2013).
369. Triantafilou, M. & Triantafilou, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* **23**, 301–304 (2002).
370. Lengacher, S. *et al.* Reactivity of murine and human recombinant LPS-binding protein (LBP) within LPS and gram negative bacteria. *J. Inflamm.* **47**, 165–172 (1995).
371. Grunwald, U. *et al.* Monocytes can phagocytose Gram-negative bacteria by a CD14-dependent mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **157**, 4119–4125 (1996).
372. Prucha, M. *et al.* Significance of lipopolysaccharide-binding protein (an acute phase protein) in monitoring critically ill patients. *Crit. Care* **7**, R154 (2003).
373. Opal, S. M. *et al.* Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J. Infect. Dis.* **180**, 1584–1589 (1999).
374. Schmidt, A. M. *et al.* Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.* **267**, 14987–14997 (1992).
375. Neeper, M. *et al.* Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 14998–15004 (1992).
376. Leclerc, E., Fritz, G., Vetter, S. W. & Heizmann, C. W. Binding of S100 proteins to RAGE: An update. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1793**, 993–1007 (2009).
377. Taguchi, A. *et al.* Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* **405**, 354–360 (2000).
378. Malherbe, P. *et al.* cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells co-expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **71**, 159–170 (1999).

Références

379. Galichet, A., Weibel, M. & Heizmann, C. W. Calcium-regulated intramembrane proteolysis of the RAGE receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**, 1–5 (2008).
380. Raucci, A. *et al.* A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* **22**, 3716–3727 (2008).
381. Zhang, L. *et al.* Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **283**, 35507–35516 (2008).
382. Katakami, N. *et al.* Endogenous secretory RAGE but not soluble RAGE is associated with carotid atherosclerosis in type 1 diabetes patients. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **5**, 190–197 (2008).
383. Bopp, C. *et al.* sRAGE is Elevated in Septic Patients and Associated With Patients Outcome. *J. Surg. Res.* **147**, 79–83 (2008).
384. Yamagishi, S. *et al.* Positive association between serum levels of advanced glycation end products and the soluble form of receptor for advanced glycation end products in nondiabetic subjects. *Metabolism.* **55**, 1227–1231 (2006).
385. Papapetropoulos, A. *et al.* Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **79**, 213–223 (1999).
386. Maisonpierre, P. C. *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55–60 (1997).
387. Aird, W. C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* **101**, 3765–3777 (2003).
388. Peters, K., Unger, R. E., Brunner, J. & Kirkpatrick, C. J. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc. Res.* **60**, 49–57 (2003).
389. Huang, Y. Q. *et al.* Angiopoietin-1 increases survival and reduces the development of lung edema induced by endotoxin administration in a murine model of acute lung injury. *Crit. Care Med.* **36**, 262–267 (2008).

Références

390. David, S. *et al.* Angiopoietin-2 may contribute to multiple organ dysfunction and death in sepsis*: *Crit. Care Med.* **40**, 3034–3041 (2012).
391. Fang, Y. *et al.* Prognostic significance of the angiopoietin-2/angiopoietin-1 and angiopoietin-1/Tie-2 ratios for early sepsis in an emergency department. *Crit. Care* **19**, (2015).
392. Liu, Q. & Nilsen-Hamilton, M. Identification of a new acute phase protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 22565–22570 (1995).
393. Singer, E. *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **207**, 663–672 (2013).
394. Mori, K. *et al.* Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* **115**, 610–621 (2005).
395. Md Ralib, A., Mat Nor, M. B. & Pickering, J. W. Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin diagnosed acute kidney injury in patients with systemic inflammatory disease and sepsis: Plasma NGAL for AKI in SIRS and sepsis. *Nephrology* **22**, 412–419 (2017).
396. Otto, G. P., Busch, M., Sossdorf, M. & Claus, R. A. Impact of sepsis-associated cytokine storm on plasma NGAL during acute kidney injury in a model of polymicrobial sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* **17**, 419 (2013).
397. Bao, G. *et al.* Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 602–609 (2010).
398. Meheus, L. A. *et al.* Identification by microsequencing of lipopolysaccharide-induced proteins secreted by mouse macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **151**, 1535–1547 (1993).
399. Berger, T. *et al.* Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1834–1839 (2006).
400. Otto, G. P. *et al.* Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is Primarily Related to Inflammation during Sepsis: A Translational Approach. *PLOS ONE* **10**, e0124429 (2015).
401. Bagshaw, S. M. *et al.* Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin in septic versus non-septic acute kidney injury in critical illness. *Intensive Care Med.* **36**, 452–461 (2010).

Références

402. Kim, H. *et al.* Proenkephalin, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, and Estimated Glomerular Filtration Rates in Patients With Sepsis. *Ann. Lab. Med.* **37**, 388–397 (2017).
403. Carosella, E. D. *et al.* HLA-G Molecules: from Maternal–Fetal Tolerance to Tissue Acceptance. in *Advances in Immunology* vol. 81 199–252 (Academic Press, 2003).
404. Carosella, E. D., Rouas-Freiss, N., Roux, D. T.-L., Moreau, P. & LeMaoult, J. Chapter Two - HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. in *Advances in Immunology* (ed. Alt, F. W.) vol. 127 33–144 (Academic Press, 2015).
405. Hunt, J. S. & Geraghty, D. E. Soluble HLA-G isoforms: technical deficiencies lead to misinterpretations. *Mol. Hum. Reprod.* **11**, 715–717 (2005).
406. Colonna, M. *et al.* A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* **186**, 1809–1818 (1997).
407. Ober, C. *et al.* Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 1425–1435 (2003).
408. Deschaseaux, F. *et al.* HLA-G in organ transplantation: towards clinical applications. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **68**, 397–404 (2011).
409. Schütt, P. *et al.* Prognostic relevance of soluble human leukocyte antigen-G and total human leukocyte antigen class I molecules in lung cancer patients. *Hum. Immunol.* **71**, 489–495 (2010).
410. Monneret, G. *et al.* Soluble human leukocyte antigen-G5 in septic shock: Marked and persisting elevation as a predictor of survival: *Crit. Care Med.* **35**, 1942–1947 (2007).
411. Assis, D. N. *et al.* The role of macrophage migration inhibitory factor in autoimmune liver disease: Assis *et al.* *Hepatology* **59**, 580–591 (2014).
412. Wu, G. *et al.* Relationship between elevated soluble CD74 and severity of experimental and clinical ALI/ARDS. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
413. Kim, B.-S. *et al.* The clinical significance of the MIF homolog d-dopachrome tautomerase (MIF-2) and its circulating receptor (sCD74) in burn. *Burns* **42**, 1265–1276 (2016).
414. Cazalis, M.-A. *et al.* Decreased HLA-DR antigen-associated invariant chain (CD74) mRNA expression predicts mortality after septic shock. *Crit. Care* **17**, R287 (2013).

Références

415. Kessenbrock, K. *et al.* Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J. Clin. Invest.* **118**, 2438–2447 (2008).
416. Eriksen, J. L. & Mackenzie, I. R. A. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. *J. Neurochem.* **104**, 287–297 (2008).
417. Zhu, J. *et al.* Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* **111**, 867–878 (2002).
418. Kittel-Schneider, S. *et al.* Further evidence for plasma progranulin as a biomarker in bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* **157**, 87–91 (2014).
419. Berasain, C. & Avila, M. A. Amphiregulin. *Semin. Cell Dev. Biol.* **28**, 31–41 (2014).
420. Zaiss, D. M. W., Gause, W. C., Osborne, L. C. & Artis, D. Emerging Functions of Amphiregulin in Orchestrating Immunity, Inflammation, and Tissue Repair. *Immunity* **42**, 216–226 (2015).
421. Berasain, C. *et al.* Amphiregulin: An early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* **128**, 424–432 (2005).
422. Liu, Q. *et al.* Amphiregulin Stimulates Liver Regeneration after Small-for-Size Mouse Liver Transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **12**, 2052–2061 (2012).
423. Yamane, S. *et al.* Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients. *J. Inflamm. Lond. Engl.* **5**, 5 (2008).
424. Katoh, Y. & Katoh, M. Canonical WNT signaling pathway and human AREG. *Int. J. Mol. Med.* **17**, 1163–1166 (2006).
425. Wang, B. *et al.* Abnormal amphiregulin expression correlates with gastric cancer prognosis. *Oncotarget* **7**, 76684–76692 (2016).
426. Bianchi, M. E. & Agresti, A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 496–506 (2005).
427. Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191–195 (2002).

Références

428. Lu, B. *et al.* Molecular Mechanism and Therapeutic Modulation of HMGB1 Release and Action: An Updated Review. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 713–727 (2014).
429. Gibot, S. *et al.* High-mobility group box 1 protein plasma concentrations during septic shock. *Intensive Care Med.* **33**, 1347–1353 (2007).
430. Karlsson, S. *et al.* HMGB1 as a predictor of organ dysfunction and outcome in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* **34**, 1046–1053 (2008).
431. Meeter, L. H. H. *et al.* Progranulin Levels in Plasma and Cerebrospinal Fluid in Granulin Mutation Carriers. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord. Extra* **6**, 330–340 (2016).
432. Peterson, E. A. *et al.* Evaluation of serum Amphiregulin levels in breast cancer patients and cancer-free controls. *Exp. Hematol. Oncol.* **2**, 25 (2013).
433. Anderson, L. & Hunter, C. L. Quantitative mass spectrometric multiple reaction monitoring assays for major plasma proteins. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **5**, 573–588 (2006).
434. Pieper, R. *et al.* Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome. *Proteomics* **3**, 422–432 (2003).
435. Lee, B.-S., Huang, J.-S., Jayathilaka, L. P., Lee, J. & Gupta, S. Antibody Production with Synthetic Peptides. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1474**, 25–47 (2016).
436. Whiteaker, J. R. *et al.* Peptide Immunoaffinity Enrichment and Targeted Mass Spectrometry Enables Multiplex, Quantitative Pharmacodynamic Studies of Phospho-Signaling. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **14**, 2261–2273 (2015).
437. Schoenherr, R. M. *et al.* Automated screening of monoclonal antibodies for SISCAPA assays using a magnetic bead processor and liquid chromatography-selected reaction monitoring-mass spectrometry. *J. Immunol. Methods* **353**, 49–61 (2010).
438. Hsiao, Y.-C. *et al.* Development of a Multiplexed Assay for Oral Cancer Candidate Biomarkers Using Peptide Immunoaffinity Enrichment and Targeted Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **16**, 1829–1849 (2017).
439. Whiteaker, J. R. *et al.* Evaluation of large scale quantitative proteomic assay development using peptide affinity-based mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **10**, M110.005645 (2011).

Références

440. Volland, H., Pradelles, P., Taran, F., Buscarlet, L. & Creminon, C. Recent developments for SPIE-IA, a new sandwich immunoassay format for very small molecules. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34**, 737–752 (2004).
441. Becher, F. *et al.* A simple and rapid LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of cetuximab: a GPCO-UNICANCER proof of concept study in head-and-neck cancer patients. *Sci. Rep.* **7**, 2714 (2017).
442. Paulus, P., Jennewein, C. & Zacharowski, K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* **16 Suppl 1**, S11-21 (2011).
443. Cicarelli, D. D., Vieira, J. E. & Benseñor, F. E. M. Comparison of C-Reactive Protein and Serum Amyloid A Protein in Septic Shock Patients. *Mediators Inflamm.* **2008**, 1–5 (2008).
444. Piagnerelli, M., Boudjeltia, K. Z., Vanhaeverbeek, M. & Vincent, J.-L. Red blood cell rheology in sepsis. *Intensive Care Med.* **29**, 1052–1061 (2003).
445. Natanson, C., Kern, S. J., Lurie, P., Banks, S. M. & Wolfe, S. M. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *JAMA* **299**, 2304–2312 (2008).
446. Melamed-Frank, M. *et al.* Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* **98**, 3693–3698 (2001).
447. Pope, M. E., Soste, M. V., Eyford, B. A., Anderson, N. L. & Pearson, T. W. Anti-peptide antibody screening: selection of high affinity monoclonal reagents by a refined surface plasmon resonance technique. *J. Immunol. Methods* **341**, 86–96 (2009).
448. De Marchi, T. *et al.* Targeted MS Assay Predicting Tamoxifen Resistance in Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancer Tissues and Sera. *J. Proteome Res.* **15**, 1230–1242 (2016).
449. Ahn, Y. H. *et al.* Identification of Low-Abundance Cancer Biomarker Candidate TIMP1 from Serum with Lectin Fractionation and Peptide Affinity Enrichment by Ultrahigh-Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **84**, 1425–1431 (2012).

Références

450. Yang, X. *et al.* Mass Spectrometric Quantitation of Tubulin Acetylation from Pepsin-Digested Rat Brain Tissue Using a Novel Stable-Isotope Standard and Capture by Anti-Peptide Antibody (SISCAPA) Method. *Anal. Chem.* **90**, 2155–2163 (2018).
451. Vialaret, J. *et al.* Nano-flow vs standard-flow: Which is the more suitable LC/MS method for quantifying hepcidin-25 in human serum in routine clinical settings? *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **1086**, 110–117 (2018).
452. Schmidt, A., Karas, M. & Dülcks, T. Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in nano-ESI MS, or: when does ESI turn into nano-ESI? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 492–500 (2003).
453. Liu, X.-W. *et al.* Sustained increase in angiopoietin-2, heparin-binding protein, and procalcitonin is associated with severe sepsis. *J. Crit. Care* **45**, 14–19 (2018).
454. S. Wilm, M. & Mann, M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **136**, 167–180 (1994).
455. Pritchard, C., Quaglia, M., Ashcroft, A. E. & O'Connor, G. Considering the advantages and pitfalls of the use of isotopically labeled protein standards for accurate protein quantification. *Bioanalysis* **3**, 2797–2802 (2011).
456. Greiner, M., Pfeiffer, D. & Smith, R. D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* **45**, 23–41 (2000).

Titre : Confirmation de biomarqueurs pour le pronostic du sepsis et développement de tests rapides

Mots clés : biomarqueur, sepsis, ELISA, spectrométrie de masse, quantification, multiplexe

Résumé : Le sepsis est la 3^{ème} cause de mortalité dans les pays occidentaux, avec un taux de mortalité entre 20 et 50% selon la sévérité. La « prédiction » du devenir clinique du patient est essentielle pour établir le traitement le plus adéquat. Quelques protéines marqueurs de l'inflammation ou d'une infection (CRP, procalcitonine) sont citées pour le suivi des patients en clinique mais manquent de spécificité pour le sepsis. D'autre part, les études « omiques » ont permis de générer des listes de biomarqueurs potentiels du pronostic vital du sepsis. En revanche, aucun n'a encore été validé et/ou confirmé en fonction de la gravité du sepsis et du devenir du patient. Il faut pour cela accéder non seulement à des cohortes de patients parfaitement caractérisées et également disposer de méthodes quantitatives robustes et validées. La spectrométrie de masse apporte une capacité de spécificité et de multiplexage à haut niveau qui permettait de confirmer l'intérêt d'une ou plusieurs de ces protéines dans le cas du

pronostic du sepsis. Les dosages immunologiques apportent quant à eux en plus de la sensibilité et de la spécificité, une mise en œuvre en routine clinique simple et rapide. Dans un premier temps, une liste de biomarqueurs identifiés avec des cohortes de patients a été établie d'après la littérature. Puis, des méthodes de quantification de ces biomarqueurs ont été développées. Nous nous sommes intéressés d'une part à quantifier les calgranulines dans le plasma en développant des ELISA et des méthodes de spectrométrie de masse par des approches *bottom-up* et *top-down*. D'autre part, deux méthodes de quantification multiplexes ont été développées par spectrométrie de masse avec et sans étape d'immunopurification en fonction des concentrations des protéines présentes dans le plasma afin de vérifier la pertinence de la liste de biomarqueurs potentiels. Toutes ces méthodes ont été appliquées à une cohorte de 49 patients atteints de choc septique.

Title : Confirmation of prognostic biomarker of sepsis and development of rapid tests

Keywords : biomarker, sepsis, ELISA, mass spectrometry, quantification, multiplex

Abstract : Sepsis is the 3rd cause of death in Western countries, with a mortality rate between 20 and 50% depending on the severity. The "prediction" of the patient's clinical outcome is essential to establish the most appropriate treatment. Some inflammation or infection marker proteins (CRP, procalcitonin) are cited for clinical follow-up of patients but lack specificity for sepsis. On the other hand, "omics" studies have generated lists of potential biomarkers of sepsis prognosis. However, none have yet been validated and/or confirmed based on the severity of the sepsis and the patient's fate. This requires access not only to fully characterized patient cohorts but also to robust and validated quantitative methods. Mass spectrometry provides a high level of specificity and high multiplex capacity and that would allow to confirm the interest of one or more of

these proteins for sepsis prognosis. Immunological assays provide, in addition to sensitivity and specificity, a simple and rapid routine clinical implementation. First, a list of biomarkers identified with patient cohorts was established from the literature. Then, methods to quantify these candidate biomarkers were developed. On the one hand, we have been interested in quantifying calgranulins in plasma by developing ELISAs and mass spectrometry methods using bottom-up and top-down approaches. On the other hand, two multiplex quantification methods by mass spectrometry with and without immunopurification step according to protein concentrations have been developed to verify the relevance of the list of potential biomarkers. All these methods were applied to a cohort of 49 patients with septic shock.