



HAL
open science

Evaluation de l'affinité et de la sélectivité vis-à-vis de l'uranium de différentes classes de peptides, par chromatographie d'interaction hydrophile couplée aux spectrométries de masse élémentaire et moléculaire

Lana Abou Zeid

► To cite this version:

Lana Abou Zeid. Evaluation de l'affinité et de la sélectivité vis-à-vis de l'uranium de différentes classes de peptides, par chromatographie d'interaction hydrophile couplée aux spectrométries de masse élémentaire et moléculaire. Chimie analytique. Sorbonne Université, 2022. Français. ⟨NNT : 2022SORUS025⟩. ⟨tel-03960837⟩

HAL Id: tel-03960837

<https://theses.hal.science/tel-03960837v1>

Submitted on 28 Jan 2023

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.



HAL Authorization

Sorbonne Université

Ecole doctorale 388

Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre

Laboratoire de développement Analytique, Nucléaire, Isotopique et Élémentaire (LANIE)

Evaluation de l'affinité et de la sélectivité vis-à-vis de l'uranium de différentes classes de peptides par chromatographie d'interaction hydrophile couplée aux spectrométries de masse élémentaire et moléculaire

Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur en
Chimie physique et chimie analytique

Par Lana ABOU ZEID

Dirigée par Carole BRESSON et Pascale DELANGLE

Présentée et soutenue publiquement le 27 janvier 2022,
devant le jury composé de :

Sandra MOUNICOU	Chargée de Recherche CNRS, HDR, Université de Pau et des Pays de l'Adour	Rapportrice
Christophe DEN AUWER	Professeur des Universités, Université Côte d'Azur	Rapporteur
Diane BEAUCHEMIN	Professeure des Universités, Queen's University, Canada	Examinatrice
Michel SCHLEGEL	Directeur de Recherche CEA, Université Paris Saclay, CEA Centre de Saclay	Examineur
Nicolas DELSUC	Chargé de Recherche CNRS - Maître de Conférences attaché à l'ENS, HDR, Sorbonne Université	Examineur
Pascale DELANGLE	Directrice de Recherche CEA, Université Grenoble Alpes, CEA Grenoble	Co-directrice de thèse
Carole BRESSON	Docteur HDR, Université Paris Saclay, CEA Centre de Saclay	Encadrante et Co-directrice de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Développement Analytique Nucléaire, Isotopique et Élémentaire (LANIE) au sein du département de Physico-Chimie (DPC) de la Direction des Energies (DES), au Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives (CEA) de Saclay.

Je tiens tout d'abord à remercier Lionel GOSMAIN, le chef du Service d'Études Analytiques et de Réactivité des Surfaces (SEARS) de m'avoir permis de réaliser ma thèse au CEA. Je remercie également Thomas VERCOUTER, ancien responsable du LANIE, et son successeur Wilfried PACQUENTIN de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et d'avoir mis à disposition les instruments et le matériel nécessaires pour mener à bien mon projet de recherche.

Je souhaite remercier les membres du jury : Mme Sandra MOUNICOU et M. Christophe DEN AUWER qui ont accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs mais également Mme Diane BEAUCHEMIN, M. Michel SCHLEGEL et M. Nicolas DELSUC qui ont participé au jury en tant qu'examineurs. Je tiens à exprimer toute mon appréciation pour la discussion scientifique très intéressante et enrichissante que j'ai eue avec chacun d'eux lors de ma soutenance.

Je tiens à remercier très chaleureusement mes directrices de thèse Carole BRESSON et Pascale DELANGLE pour la confiance qu'elles m'ont accordée et de m'avoir offert l'opportunité de travailler sur ce sujet tellement passionnant. Je vous remercie pour toutes les discussions scientifiques très intéressantes, que ce soit au niveau analytique avec Carole ou au niveau bio-inorganique avec Pascale, pour votre disponibilité et pour vos conseils. La complémentarité de vos connaissances et vos expertises m'a été particulièrement utile dans l'avancée de mon travail de thèse mais aussi dans l'enrichissement de mes connaissances dans les deux domaines. Très spécialement et avec beaucoup d'émotions, je remercie Carole de m'avoir accompagnée pendant tous les moments de la thèse, que ce soit les moments de succès ou d'échec et jusqu'au dernier jour. Merci pour ta disponibilité, ton soutien, ton encouragement, ton caractère agréable, ton dynamisme et ta bonne humeur. Merci pour tout ce que tu m'as appris, au niveau scientifique et au niveau personnel et merci pour tous les moments et les aventures qu'ont partagés ensemble. Je garderai toujours de beaux souvenirs avec toi, même lors de la rédaction du manuscrit qui est toujours un moment compliqué de la thèse et qui impliquait pas mal de « sauts au plafond ».

Je remercie Frédéric CHARTIER, pour son soutien, son encouragement et d'avoir accepté de donner son point de vue très précieux pour moi sur les différentes étapes du travail. Merci à Hélène ISNARD et Marta GARCIA CORTES, les grandes ICP-Mistes du LANIE, pour leur disponibilité, leur aide et les

discussions scientifiques très enrichissantes qu'on a eues ensemble. Merci de m'avoir transmis vos connaissances et votre passion pour l'analyse élémentaire qui m'accompagnera pendant toute ma carrière scientifique. Merci Hélène pour ton dynamisme, ton enthousiasme et ta joie de vivre et pour toutes les aventures qu'on a eues ensemble que ce soit au CEA ou en randonnée à 2000 m d'altitude. Merci Marta pour toutes les discussions sans limite qu'on a échangées ensemble que ce soit à la pause cigarette ou dans le bureau et pour tout ce que tu m'as appris. Tu étais une véritable inspiration pour moi. Merci pour tes idées brillantes et ta bonne humeur et d'avoir partagé avec moi les différentes étapes de mon travail expérimental et surtout les galères de nettoyage de l'uranium.

Je tiens à remercier particulièrement Albert PELL LORENTE, Théo TYTUS et Marina AMARAL SARAIVA qui ont partagé avec moi les aventures de mon projet de thèse, particulièrement Albert qui m'a accompagnée pendant deux ans. Merci Albert pour tout ce que tu m'as appris, pour ta bonne humeur ton soutien et pour les bons moments qu'on a passés ensemble. Merci Marina et Théo pour votre gentillesse, votre aide, votre soutien et pour tout ce que vous avez apporté à ce projet. On a fait tous les quatre une fantastique équipe et je vous dois en grande partie cette belle réussite.

Je souhaite également remercier très chaleureusement le personnel des laboratoires LANIE et LRMO, particulièrement : Sébastien MIALLE, Céline CRUCHET, Michel AUBERT, Anthony NONELL, Michel TABARANT, Céline CAUSSIGNAC, Delphine DURAND, Denis DOIZI, Antoine DUPREY et Nadège CARON pour leur accueil et leur gentillesse.

Je tiens à remercier mes collègues, les pigeons, avec qui j'ai partagé ou pas le bureau, je pense particulièrement à Erwan DUPUIS et Mouheb CHEBBI (anciens pigeons qui ont récemment rejoint les chefs), Hanna OHER, Anne-Sophie DE ALMAEIDA, Anthony MALAAB, Takwa SAIDI, Thibault VITAL, Chemming SHANG et récemment Julie STEVENIN et Sandra BARHOUM. Merci à tous pour les beaux moments qu'on a partagés ensemble, que ce soit au travail ou lors des sorties.

Je souhaite remercier ma très chère amie Maria MASRY qui m'a toujours accompagnée pendant les différentes étapes de mon parcours depuis nos études universitaires. Merci pour ton soutien, tes conseils et des belles discussions scientifiques qu'on a échangées ensemble malgré la distance qui nous sépare.

Mes plus profonds remerciements vont à mes parents et à ma famille qui m'ont toujours soutenue et encouragée tout le long de mon parcours.

Finalement, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loins à la réalisation de ce travail.

Table des matières

Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	XIV
Liste des abréviations	XVI
Liste des notations	XVIII
Liste des acides aminés naturels	XX
Introduction générale	1
Chapitre I : Etude bibliographique	7
1. Uranium, généralités et toxicité.....	9
1.1. Généralités	9
1.2. Toxicité	15
2. Interactions de l'UO_2^{2+} avec des ligands d'intérêt biologique.....	17
2.1. Les protéines	18
2.2. Les peptides biomimétiques.....	22
2.3. Les molécules décorporantes.....	25
2.4. Les petits ligands organiques et inorganiques	31
3. Techniques basées sur la spectrométrie de masse pour l'analyse des complexes d'UO_2^{2+} ...	33
3.1. Par spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS).....	33
3.2. Par spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS)	39
4. Techniques séparatives des complexes d'UO_2^{2+}	46
4.1. Techniques chromatographiques.....	46
4.2. L'électrophorèse capillaire	49
5. La chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC), technique prometteuse pour séparer les complexes d'UO_2^{2+}	51
5.1. Caractéristiques.....	51
5.2. Applications de la chromatographie d'interaction hydrophile	54
Chapitre II : Techniques de spectrométrie de masse	61
1. Spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS)	63
1.1. Source d'ionisation et processus électrospray.....	63
1.2. Analyseurs et détecteurs.....	65
1.3. Paramètres de source et d'acquisition de l'ESI-MS QqQ	69
2. Spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS).....	70
2.1. Système d'introduction de l'échantillon	71
2.2. Source d'ionisation	72
2.3. Système d'extraction et de focalisation des ions.....	73
2.4. Cellule de collision/réaction (collision/reaction cell, CRC).....	73
2.5. Analyseur et détecteur	74

2.6. Introduction de solvants organiques/hydro-organiques dans les sources ICP	75
3. Complémentarité des spectromètres de masse à sources ESI et ICP	76
Chapitre III : Séparation des peptides et de leurs isomères de position par HILIC couplée à l'ESI-MS	79
Introduction	81
1. Sélectivité de différentes phases stationnaires polaires.....	82
2. Effet de la composition de la phase mobile sur la sélectivité de séparation	88
3. Comportement en HILIC des cyclodécapeptides multiphosphorylés	91
4. Impact de la position des acides aminés phosphorylés sur la rétention	94
Conclusion	95
Chapitre IV : Détermination de l'échelle d'affinité des peptides pour l'UO₂²⁺ par couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS	97
Introduction	99
1. Identification des complexes UO ₂ ²⁺ -peptides par ESI-MS	100
2. Description du couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS et du système d'étude	103
3. Faisabilité de la séparation de complexes UO ₂ ²⁺ -peptides par HILIC.....	105
4. Détermination de la distribution quantitative de l'UO ₂ ²⁺ parmi les peptides.....	109
4.1. Définition des conditions de séparation par HILIC des complexes d'UO ₂ ²⁺ contenant des peptides avec différents degrés de phosphorylation.....	109
4.2. Mise au point d'une méthode d'identification et de quantification des complexes UO ₂ ²⁺ -peptides par HILIC-ESI-MS/ICP-MS.....	113
4.3. Détermination de l'échelle d'affinité de l'uranium pour les peptides multiphosphorylés	116
5. Effet de la structure des peptides sur l'affinité pour l'UO ₂ ²⁺	121
5.1. Définition des conditions de séparation	121
5.2. Evaluation de l'effet de la structure du peptide tétraphosphorylé sur son pouvoir complexant pour l'UO ₂ ²⁺ par HILIC-ESI-MS/ICP-MS	124
Conclusion	130
Chapitre V : Evaluation de la sélectivité du peptide cyclique tétraphosphorylé vis-à-vis de l'UO₂²⁺ en présence d'ions compétiteurs endogènes (Ca²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺)	133
Introduction	135
1. Sélection du Sr ²⁺ comme modèle représentatif du Ca ²⁺	137
2. Identification des complexes métaux-peptides par ESI-MS.....	138
3. Evaluation de l'effet compétiteur du Sr ²⁺ et de l'UO ₂ ²⁺ vis-à-vis de la complexation de pS3168.....	141
3.1. Mise au point des conditions de séparation des complexes de Sr ²⁺ et d'UO ₂ ²⁺	142
3.2. Détermination de la distribution quantitative de l'UO ₂ ²⁺ et du Sr ²⁺ dans les différents complexes de ces éléments par HILIC-ESI-MS/ICP-MS.....	143
4. Evaluation de la sélectivité de pS3168 vis-à-vis de l'UO ₂ ²⁺ en présence de Cu ²⁺ , Zn ²⁺ et Sr ²⁺	149
Conclusion	153

Conclusion générale et perspectives.....	155
Références.....	161
Annexes.....	177

Liste des figures

Figure 1 : Distribution des éléments essentiels et non essentiels dans le tableau périodique [2].	1
Figure 2 : Structure des peptides cycliques biomimétiques développés au CIBEST. Avec X ₁ , X ₃ , X ₆ et X ₈ : glutamate (Glu) ou phosphosérine (pSer) dont les chaînes latérales sont dirigées vers le plan équatorial de l'UO ₂ ²⁺ et X ₂ : arginine (Arg) ou Glu.	2
Figure 3 : Représentation schématique du couplage simultané de la séparation chromatographique de complexes peptidiques avec l'ESI-MS et l'ICP-MS.	3
Figure 4 : Distribution mondiale des ressources d'uranium récupérables pour un coût inférieur à 130 USD/kg U, au 1 ^{er} janvier 2019 [15].	9
Figure 5 : Géométrie du cation uranyle UO ₂ ²⁺ . Les flèches indiquent le positionnement des ligands dans le plan équatorial [8].	12
Figure 6 : Géométries de coordination des différents cations appartenant à la catégorie des acides durs de Lewis. Adapté de [8,21].	12
Figure 7: Sphères de solvatation du cation uranyle (adapté de Rizkalla and Chopin [23]).	13
Figure 8 : Spéciation et solubilité de l'uranyle en fonction du pH en milieu aqueux avec [UO ₂ ²⁺] = (a) 1 μmol L ⁻¹ et (b) 1 mmol L ⁻¹ . La ligne en pointillé représente la limite de solubilité des espèces [30].	14
Figure 9 : Répartition de l'UO ₂ ²⁺ dans le sang. Adapté de Ansoborlo et al. [37].	16
Figure 10 : Biodistribution de l'UO ₂ ²⁺ parmi 13 protéines sériques du sérum humain, calculée à partir des constantes apparentes de dissociation obtenues par SPR. FETUA : fétuine-A ; ALBU : albumine ; HPT : haptoglobuline ; TRFE : transferrine ; A2MG : α-2-macroglobuline ; APA1 : apolipoprotéine A1 ; CO3 : complément sérum 3 ; IgG : immunoglobuline ; HEMO : hémopexine ; TTHY : transthyretine ; CERU : céruloplasmine ; A1AH : α-1-glycoprotéine ; CO4 : complément sérum 4. Seule la FETUA est issue du sérum bovin et a été purifiée, les autres protéines sont commerciales [6].	21
Figure 11: Structure des cyclodécapeptides biomimétiques de protéines affines pour l'UO ₂ ²⁺ [68].	23
Figure 12 : Structure des cyclodécapeptides cycliques, à nombre croissant de groupements pSer	24
Figure 13 : Constantes de stabilité conditionnelle des complexes UO ₂ ²⁺ -peptides à pH = 7,4 en fonction du nombre de groupements pSer [9].	24
Figure 14 : Site de coordination du cation uranyle proposé pour l'OPN [71].	25
Figure 15 : Différentes familles de molécules potentielles pour la décorporation de l'uranyle <i>in vivo</i> .	27
Figure 16 : Structure chimique du monomère du PEI-MP.	30
Figure 17 : Spectres de masse des ions produits de [UO ₂ (ACN) ₄] ²⁺ après fragmentations multiples par CID (a) MS ² , (b) MS ³ , (c) MS ⁴ , et (d) MS ⁵ .	34
Figure 18 : (a) Spectre de masse ESI-MS (-) du complexe [UO ₂ (CH ₃ COO) ₃] ⁻ enregistré en mode full scan, (b) Spectre de masse du complexe [UO ₂ (CH ₃ COO) ₃] ⁻ enregistré en mode MS ² , (c) Voies de fragmentation proposées pour l'ion précurseur [UO ₂ (CH ₃ COO) ₃] ⁻ .	35
Figure 19 : Spectres de masse des complexes UO ₂ -cyclodécapeptides enregistrés en mode full scan (a) UO ₂ (A), avec A contenant 0 pSer, (b) UO ₂ (pS16), avec pS16 contenant 2pSer et (c) UO ₂ (pS1368), avec pS1368 contenant 4 pSer en milieu acétate d'ammonium 20 mmol L ⁻¹ .	35

Figure 20 : (a) Electrophérogrammes des complexes (1) UO_2^{2+} -OPN, (2) UO_2^{2+} -FETUA et (3) élution de la fraction libre de l' UO_2^{2+} adsorbée sur le capillaire et éluee, obtenus par ICP-MS en suivant le signal de l' ^{238}U et du ^{31}P (b) distribution quantitative de l' U dans chaque espèce	42
Figure 21 : En haut, profil d'élution de l' U acquis par SEC-ICP-MS. En bas, la représentation de la distribution quantitative relative de l' U parmi les fractions protéiques calculée en réalisant le rapport des aires des pics.....	43
Figure 22 : Fractionnement isotopique de l' ^{nat}U dans les cellules neuronales exposées à 1, 10, 125 et 250 μM d' ^{nat}U	44
Figure 23 : (a) Profils d'élution par UV-VIS des complexes UO_2^{2+} -FETUA (rouge) et UO_2^{2+} -LIHOPO (noir pointillé) après addition de 1 jusqu'à 6 équivalents de LIHOPO, (b) Distribution quantitative de l' U entre la FETUA (trait plein noir) et le LIHOPO (gris pointillé) en fonction du rapport [HOPO]/[FETUA]. Phase mobile : 50 mM TRIS avec 150 mM NaCl (pH =7,4) [82].	47
Figure 24 : Profils d'élution obtenus en ligne par SEC-UV-ICP-MS d'un extrait protéique de femelle contaminée reproduite. (A-E) profils d'élutions de ^{238}U , ^{31}P , ^{56}Fe , ^{63}Cu et ^{66}Zn enregistré par ICP-MS et (F) profil d'élution des extraits protéiques acquis par UV à 280 nm.	48
Figure 25 : Illustration de l'immobilisation de l' UO_2^{2+} sur un support par l'intermédiaire d'un groupement aminophosphonate et son interaction sélective avec une protéine cible.	49
Figure 26 : Electrophérogrammes obtenus par : (1) UV-VIS et ICP-MS dans des échantillons UO_2^{2+} -protéines standards.....	50
Figure 27 : Types d'interactions caractéristiques du mode de rétention en HILIC, adapté de [138]. ..	52
Figure 28: Chromatogrammes de la séparation de peptides multiphosphorylés et de leurs isomères de position mono-et di-phosphorylés acquis par HILIC-ESI-MS, avec une phase stationnaire aminopropyl. Elution en mode gradient avec une phase mobile composée de ACN/H ₂ O + ammonium formate 5mM, (A) pH =3,2 et (B)-(C) pH = 2. pSer correspond à un site de phosphorylation sur la sérine, pThr sur la Thréonine. 0 correspond aux peptides non-phosphorylés. (') permet de caractériser les isomères multiphosphorylés [151].	55
Figure 29 : Emploi du mode HILIC selon la nature des analytes, depuis 2015 (effectué le 10/07/2020).	56
Figure 30 : Profils d'élutions obtenu des complexes de Cu-EDTA et Cu-DTPA enregistré par ESI-MS r couplée à la RPLC (à gauche) et à l'HILIC (à droite).....	57
Figure 31 : Profils d'élutions des complexes Cu-Histidine acquis par HILIC-ESIMS. Phases stationnaires à fonction (a) diol, (b) amide, (c) zwitterionique. Elution en mode gradient avec une phase mobile composée d'acétonurie et d'eau+ 10 mmol L ⁻¹ acétate d'ammonium [12].....	58
Figure 32 : Principales composantes d'un spectromètre de masse à source d'ionisation électrospray. Adapté de S. Banerjee and S. Mazumdar [167].	63
Figure 33: Processus de génération d'ions en phase gazeuse par une source électrospray. Adapté de [169].	64
Figure 34: Principales composantes du TSQ quantum.....	66
Figure 35 : (a) Photo d'un quadripôle du spectromètre TSQ quantum (b) Schéma d'un quadripôle et ses deux paires de barres métalliques soumises à des potentiels opposés [166].	66
Figure 36 : Diagramme de stabilité d'ions de masses différentes $m_1 < m_2 < m_3$ en fonction de U et V. (a) Mode full scan (FS). (b) mode Single Ion monitoring (SIM). Adapté de [166] et [171].	67

Figure 37 : Eléments pouvant être analysés par ICP-MS et leurs limites de détection [173].	70
Figure 38 : Principales composantes d'un ICP-MS-Q X série II – Thermo Fisher Scientific. Adapté de [174].	71
Figure 39: Principales composantes du système d'introduction d'échantillon dans une source ICP d'un spectromètre de masse de type X série II – Thermo Fisher Scientific.	71
Figure 40 : Représentation d'une source d'ionisation à plasma d'argon d'un ICP-MS [175].	72
Figure 41 : Multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes fonctionnant en mode analogique ou en mode comptage d'impulsions ioniques. Adapté de [183].	75
Figure 42: Structure des cyclodécapeptides synthétiques et de leurs isomères de position. Le nom des peptides est fonction du nombre et de la position des résidus pSer.	81
Figure 43 : Superposition des chromatogrammes des peptides obtenus par détection ESI-MS (mode SIM), avec une phase mobile composée de 70/30 ACN/H ₂ O v/v + 20 mmol L ⁻¹ NH ₄ CH ₃ COO. Débit : 300 µL min ⁻¹ en élution isocratique. Les peptides ont été détectés sous leur forme dichargée [M-2H] ²⁻ avec les rapports <i>m/z</i> : (a) pS0 (<i>m/z</i> = 582,3), (b) pS8 et (b') pS1 (<i>m/z</i> = 601,2), (c) pS18 et (c') pS16 (<i>m/z</i> = 620,2), (d) pS168 (<i>m/z</i> = 625,7), (e) pS1368 (<i>m/z</i> = 644,6).	83
Figure 44: (A) Profils d'élution des peptides obtenus par détection ESI-MS (mode SIM) en utilisant les colonnes Acclaim HILIC-10, YMC-Triart Diol, ZIC-pHILIC et YMC-Pack SIL à différentes compositions de phase mobile. Débit: 300 µL min ⁻¹ , élution isocratique. (a) pS0, (b) pS8, (b') pS1, (c) pS18, (c') pS16, (d) pS168, (e) pS1368. (B) Variation des facteurs de rétention des peptides avec le pourcentage d'ACN dans la phase mobile.	89
Figure 45: Variation des facteurs de rétention <i>k'</i> en fonction du nombre de résidus pSer dans les peptides. La composition de la phase mobile a été choisie de façon à obtenir des facteurs de rétention <i>k'</i> inférieurs à 30.	92
Figure 46 : Spectre de masse de UO ₂ ²⁺ en milieu non complexant acquis en mode balayage complet (Full scan) sur une gamme de masse 200-800. Echantillon [UO ₂ ²⁺] = 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ dans l'échantillon de travail préparé par dilution d'une solution intermédiaire dans ACN/H ₂ O 70/30 + 20 mmol L ⁻¹ NH ₄ CH ₃ COO. Débit d'introduction 10 µL min ⁻¹ .	100
Figure 47: Spectres de masses des complexes UO ₂ ²⁺ -peptides acquis en mode balayage complet (full scan). Gamme de masse comprise entre 400 et 1500. [UO ₂ ²⁺] = 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ et [peptide]/[UO ₂ ²⁺] = 2 dans l'échantillon de travail préparé par dilution de la solution de contact dans ACN/H ₂ O 70/30 + 20 mmol L ⁻¹ NH ₄ CH ₃ COO. Débit d'introduction 10 µL min ⁻¹ .	101
Figure 48: Schéma du dimensionnement du couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS	103
Figure 49 : Procédure de préparation des solutions de contact et des échantillons de travail.	104
Figure 50: Système d'étude constitué du cation UO ₂ ²⁺ en présence des isomères de position du peptide cyclique diphosphorylé dans les proportions UO ₂ ²⁺ -pS16-pS18 2-10-10 avec [UO ₂ ²⁺] = 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ dans l'échantillon de travail préparé par dilution de la solution de contact dans ACN/H ₂ O 70/30 + 20 mmol L ⁻¹ NH ₄ CH ₃ COO.	105
Figure 51 : Chromatogrammes acquis par ESI-MS en mode MS, en mode (a) balayage complet (gamme de masse 400-1500) et en modes SIM pour un suivi ciblé des rapports <i>m/z</i> des (b) peptides non complexés (c) complexes UO ₂ (pS16)/(pS18) avec une fenêtre d'isolation Δ <i>m</i> = 1. (d) En ICP-MS, le signal de ²³⁸ U est enregistré avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillon : UO ₂ ²⁺ -pS16-pS18 2-10-10. Colonne Acquity BEH amide 100 x 2,1 mm ; 1,7 µm. Phase mobile : 70/30 ACN/H ₂ O v/v +20 mmol L ⁻¹ NH ₄ CH ₃ COO. Débit 300 µL min ⁻¹ , élution en mode isocratique, V _{inj} = 3 µL.	106

Figure 52: Chromatogrammes acquis par (a-b) ESI-MS en mode SIM pour un suivi ciblé des rapports m/z de (a) complexe $UO_2(pS16)$ et (b) complexe $UO_2(pS1368)$ avec une fenêtre d'isolation de $\Delta m = 1$, et par (c) ICP-MS pour un suivi du signal de ^{238}U avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillon : $2UO_2^{2+}$ -0,5pS1368-20pS16. Colonne : Acquity BEH amide 100 x 2,1 mm ; 1,7 μm . Phase mobile : 70/30 ACN/H₂O v/v +20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO. Débit 300 μL min⁻¹, élution en mode isocratique, $V_{inj} = 3 \mu L$ 110

Figure 53: Chromatogrammes acquis par (a-b) ESI-MS en mode SIM pour un suivi ciblé des rapports m/z de (a) pS16 libre et (b) complexe $UO_2(pS1368)$ avec une fenêtre d'isolation de $\Delta m = 1$, et par (c) ICP-MS pour un suivi du signal de ^{238}U avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillon : $2UO_2^{2+}$ -0,5pS1368-20pS16. Colonne : YMC Triart Diol 100 x 2,1 mm ; 1,9 μm . Phase mobile : 72/28 ACN/H₂O v/v +20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO. Débit 300 μL min⁻¹, élution en mode isocratique, $V_{inj} = 3 \mu L$ 111

Figure 54: Superposition des chromatogrammes enregistrés par ESI-MS en mode d'acquisition SIM, centré sur le rapport m/z des espèces $[UO_2(pS1368)-4H]^2$, $[(UO_2)_2(pS1368)-6H]^2$ et $[pS1368-2H]^2$. A, B et C représentent les spectres de masse extraits des différentes régions du chromatogramme enregistré en mode balayage complet (Full scan) sur une gamme de masse comprise entre 400 et 1500. Echantillon : $2UO_2^{2+}$ -6pS1368. Colonne : YMC triart Diol 100 x 2,1 ; 1,9 μm , phase mobile 72/28 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO, $V_{inj} = 3 \mu L$, Débit = 300 μL min⁻¹. 112

Figure 55 : Signaux transitoires des solutions étalons d'U obtenu par ICP-MS. Phase mobile : 72/28 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO, débit 300 μL min⁻¹, $V_{inj} = 3 \mu L$. Le signal continu correspond à celui de l'étalon interne, le Bi (10 ng mL⁻¹) introduit en amont du T mélangeur. Les signaux de ^{209}Bi et ^{238}U ont été enregistrés avec un temps d'intégration de 90 ms. 114

Figure 56: Droite d'étalonnage représentant la valeur moyenne des aires des pics d'U en fonction de la concentration d'U dans chaque solution étalon (μg mL⁻¹) injectée en triplicat. Phase mobile : 68/32 ACN/H₂O v/v + 20 mM NH₄CH₃COO, débit 300 μL min⁻¹, $V_{inj} = 3 \mu L$. Les barres verticales correspondent à l'écart type des valeurs obtenues en triplicat pour chaque niveau de concentration. 115

Figure 57 : Chromatogramme des complexes $UO_2(pS1368)$ et $UO_2(pS16)$, obtenu par ICP-MS en suivant le signal de ^{238}U . Echantillon $2UO_2^{2+}$ -0,5pS1368-20pS16. Colonne YMC Triart diol 100 x 2 mm; 1,9 μm . Phase mobile 72/28 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO, débit 300 μL min⁻¹, mode d'élution isocratique. $V_{inj} = 3 \mu L$ 115

Figure 58 : Chromatogrammes acquis par (a-c) ESI-MS en mode d'acquisition SIM, pour un suivi ciblé des rapports m/z de (a) pS16, (b) pS1368, ET (c) le complexe $UO_2(pS1368)$, et par (d) ICP-MS en suivant le signal de ^{238}U avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillons UO_2^{2+} -xpS1368-ypS16. Colonne YMC Triart Diol 100 x 2 mm ; 1,9 μm . Phase mobile 72/28 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO. Elution en mode isocratique. Débit 300 μL min⁻¹, $V_{inj} = 3 \mu L$ 117

Figure 59 : Distribution quantitative de l'U parmi les espèces $UO_2(pS1368)$, $UO_2(pS16)$ et U libre. (a) concentration de l'U dans chaque espèce, déterminée par étalonnage externe. Les pourcentages en vertical expriment l'écart relatif entre les valeurs de concentrations obtenues en duplicat (b) Distribution quantitative de l'U parmi les différentes espèces en fonction de la concentration en pS1368 et des proportions de chaque échantillon. 119

Figure 60 : Représentation schématique des structures cyclique (pS1368) et linéaire (linS1368) du peptide tétraphosphorylé en compétition pour complexer le cation UO_2^{2+} 121

Figure 61 : Chromatogrammes des complexes $UO_2(pS1368)$ et $UO_2(linS1368)$, acquis par ICP-MS en enregistrant le signal de ^{238}U par ICP-MS avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillon : mélange équimolaire de deux solutions de contact $UO_2(pS1368)_2$ et $UO_2(linS1368)_2$. Colonne (a) Acquity BEH amide 100 x 2,1 ; 1,7 μm , (b) YMC Triart Diol 100 x 2 mm ; 1,9 μm , (c) Acquity BEH HILIC 100 x 2,1 ; 1,7 μm . Phase mobile ACN/H₂O + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO contenant (a) 65 % ACN, (b) 72 % ACN et (c) 68

% ACN. (a') variation de k' en fonction du % ACN. Elution en mode isocratique. Débit $300 \mu\text{L min}^{-1}$, $V_{inj} = 3 \mu\text{L}$ 122

Figure 62: Superposition des chromatogrammes enregistrés par (a-b) ESI-MS en mode d'acquisition SIM, centré sur le rapport m/z des (a) peptides pS1368 et linS1368 et (b) des complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{linS1368})$, et par (c) ICP-MS en suivant le signal de ^{238}U avec un temps d'intégration de 90 ms. 125

Figure 63 : (a) Profils d'élution en 3D des complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ identifiés par ESI-MS et obtenus en ICP-MS pour les échantillons contenant des proportions différentes UO_2^{2+} -x pS1368-ylinS1368. Distribution quantitative de l'U parmi les espèces $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ et U libre. (a) concentration de l'U dans chaque espèce, déterminée par étalonnage externe. Les pourcentages en vertical expriment l'écart relatif entre les valeurs de concentrations obtenues en duplicat (b) Distribution quantitative de l'U parmi les différentes espèces $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ et U libre en fonction de la concentration en linS1368 et des proportions de chaque échantillon..... 126

Figure 64: Suivi de la fluorescence de pS1368 en présence de 10000 équivalents de Ca^{2+} et du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ suite à l'addition de 500 à 10000 équivalents de Ca^{2+} . L'échantillon contient $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ d' UO_2^{2+} et/ou $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pS1368 en milieu HEPES (20 mmol L^{-1}), NaCl (0.1 mol L^{-1}) à pH 7,4. 135

Figure 65: Rayons ioniques de cations divalents en fonction de leur nombre de coordination. Ca^{2+} et Sr^{2+} surlignés en bleu et en rouge respectivement. Adapté de [199]. 137

Figure 66 : Spectres de masse du Sr^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} en milieu non complexant enregistrés en mode d'acquisition balayage complet. Gamme de masse comprise entre 70 et 700 pour Sr^{2+} et 200 et 300 pour Cu^{2+} et Zn^{2+} . Echantillon $[\text{M}] = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, préparé par dilution d'une solution intermédiaire dans 70/30 ACN/ H_2O + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Débit d'introduction $10 \mu\text{L min}^{-1}$ 139

Figure 67 : Spectres de masse des complexes $\text{Sr}(\text{pS1368})$, $\text{Cu}(\text{pS1368})$ et $\text{Zn}(\text{pS1368})$ enregistrés en mode d'acquisition balayage complet. Gammes de masse : 200-1500 pour $\text{Sr}(\text{pS1368})$ et $\text{Zn}(\text{pS1368})$ et 600-1500 pour $\text{Cu}(\text{pS1368})$. Echantillon $[\text{M}] = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ préparé par dilution d'une solution contact dans 70/30 ACN/ H_2O + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Débit d'introduction $10 \mu\text{L min}^{-1}$ 140

Figure 68 : Superposition des profils d'élution enregistrés par (a-b) ESI-MS en mode SIM, centré sur les rapports m/z caractéristiques des espèces (a) $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et (b) $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ et par (c) ICP-MS en enregistrant le signal de ^{238}U et de ^{88}Sr , avec un temps d'intégration de 90 ms. Colonne YMC Triart diol, $100 \times 2 ; 1,9 \mu\text{m}$. Phase mobile 72/28 ACN/ H_2O v/v + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, débit $300 \mu\text{L min}^{-1}$, $V_{inj} = 3 \mu\text{L}$. Echantillon 1 : 1UO_2^{2+} -2pS1368, échantillon 2 : 1Sr^{2+} - 2pS1368 avec $[\text{UO}_2^{2+}] = [\text{Sr}^{2+}] = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Le décalage de t_R entre les chromatogrammes enregistrés par ESI-MS et ICP-MS a été pris en compte et corrigé. 142

Figure 69: Procédure de préparation des échantillons $\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + x \text{Sr}^{2+}$ 143

Figure 70: A gauche, les signaux transitoires des solutions d'étalons d'U et de Sr auxquelles a été ajouté pS1368. Les signaux stationnaires en rouge et jaune correspondent au ^{209}Bi et ^{89}Y à 10 ng mL^{-1} utilisés comme étalons internes et introduits en continu. Phase mobile 72/28 ACN/ H_2O v/v + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, débit $300 \mu\text{L min}^{-1}$, $V_{inj} = 3 \mu\text{L}$. A droite, les droites d'étalonnages correspondant au ^{88}Sr et ^{238}U 144

Figure 71 : Chromatogrammes acquis par (a-c) ESI-MS en mode SIM, centré sur les rapports m/z des ions caractéristiques de (a) complexe $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$, (b) de la fraction libre du peptide pS1368, (c) du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et par (d) ICP-MS en enregistrant le signal de ^{238}U (trait plein) et du ^{88}Sr (trait pointillé) avec un temps d'intégration de 90 ms. Colonne YMC Triart Diol $100 \times 2 \text{ mm} ; 1,9 \mu\text{m}$. Phase mobile : 72/28 ACN/ H_2O v/v + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, débit $300 \mu\text{L min}^{-1}$, $V_{inj} = 3 \mu\text{L}$. Le décalage de t_R entre les chromatogrammes enregistrés en ESI-MS et ICP-MS a été pris en compte et corrigé. 146

Figure 72: Chromatogrammes enregistrés par (a-b) ESI-MS en mode d'acquisition SIM, centré sur les rapports m/z des espèces (a) $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ en noir, $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})$ en rouge et pS1368 en orange pointillé, (b) $\text{UO}_2(\text{Sr})(\text{pS1368})$ et par (c) ICP-MS en suivant simultanément les signaux des isotopes ^{238}U et ^{88}Sr . Le décalage de t_R entre les chromatogrammes enregistrés en ESI-MS et ICP-MS a été pris en compte et corrigé..... 147

Figure 73 : Proportions d' UO_2^{2+} et de Sr^{2+} engagées dans les espèces $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})$ et $\text{UO}_2(\text{Sr})(\text{pS1368})$ pour les différents échantillons $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + x\text{Sr}^{2+}$, avec $x = 0-8$. L'écart relatif entre les proportions d'espèces d' UO_2^{2+} et de Sr^{2+} déterminées pour chaque réplique est indiqué verticalement. 148

Figure 74 : Procédure de préparation de l'échantillon modèle $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 1\text{Sr}^{2+} + 1\text{Cu}^{2+} + 1\text{Zn}^{2+}$ 150

Figure 75 : Chromatogrammes acquis par (a-d) ESI-MS en mode SIM, centré sur les rapports m/z des ions caractéristiques des complexes (a) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_3$, (b) $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$, (c) $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et (d) la fraction libre de pS1368 . et (e) superposition des profils d'éluion enregistrés simultanément par ICP-MS en suivant le signal des isotopes ^{238}U , ^{88}Sr , ^{63}Cu et ^{64}Zn avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillon : $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 1\text{Sr}^{2+} + 1\text{Cu}^{2+} + 1\text{Zn}^{2+}$. Colonne YMC Triart Diol 100 x 2 mm ; 1,9 μm . Phase mobile 72/28 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, débit 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, $V_{\text{inj}} = 3\mu\text{L}$. Le décalage de t_R entre les chromatogrammes enregistrés en ESI-MS et ICP-MS a été pris en compte et corrigé. 151

Figure 76: Proportions des éléments E, avec $E = \text{Zn}^{2+}$, UO_2^{2+} , Sr^{2+} et Cu^{2+} engagés dans les différentes espèces $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ et $\text{Cu}(\text{NO}_3)_3 + \text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ issues de la séparation. *la proportion du Zn est obtenue indirectement après récupération du Zn adsorbé sur la colonne avec de l'EDTA. L'écart relatif entre les proportions d'espèces déterminées pour chaque réplique est indiqué verticalement. 152

Liste des tableaux

Tableau 1 : Abondance naturelle, période radioactive et activité massique des isotopes de l'uranium naturel [19].	11
Tableau 2 : Acides et des bases durs selon la théorie HSAB [20].	12
Tableau 3 : Principales cibles protéiques de l' UO_2^{2+} et informations obtenues par différentes techniques spectroscopiques sur l'interaction de l' UO_2^{2+} avec ces protéines en termes de rapport UO_2^{2+} /protéine, de groupements impliqués dans la coordination, de modification structurale de la protéine et de constante de stabilité. Les protéines marquées en rouge sont des protéines caractérisées par leur taux de phosphorylation élevé. (*) SPR = Résonance plasmonique de surface. (#) Electrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif ICP-MS	19
Tableau 4 : Principaux petits ligands inorganiques et organiques se liant aux actinides et leur concentration (mol L^{-1}) dans quelques compartiments biologiques [22].	31
Tableau 5 : Récapitulatif des études de caractérisations de complexes d' UO_2^{2+} par ESI-MS	36
Tableau 6 : Récapitulatif des phases stationnaires employées en HILIC [141]	53
Tableau 7 : Différentes configurations de balayages employés en mode MS/MS. Adapté de [172].	68
Tableau 8 : Paramètres de source de l'ESI-MS et leur rôle.	69
Tableau 9 : Principales interférences polyatomiques observées lors de l'analyse de métaux endogènes [180].	74
Tableau 10 : Spécificités complémentaires des techniques ESI-MS et ICP-MS.	76
Tableau 11: Spécifications des colonnes : Charge/fonctionnalisation, nom commercial, matériau de base, % de carbone, surface spécifique ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) et dimensions (longueur x diamètre interne)	82
Tableau 12 : Paramètres chromatographiques (k' , A_s , et R_s) calculés pour la séparation des peptides obtenus avec des phases stationnaires greffées par différents groupes fonctionnels polaires, avec une phase mobile composée de 70/30 ACN/ H_2O + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$.	84
Tableau 13: Récapitulatif des rapports m/z observés dans les spectres de masse des complexes $\text{UO}_2(\text{P})$ avec $\text{P} = \text{pS0, pS16, pS1368}$ et linS1368 et attribution des espèces associées.	102
Tableau 14 : Facteur de rétention (k'), largeur à mi-hauteur du pic (FWHM), sélectivité (α) et résolution (R_s), calculés à partir du profil d'élution des isomères pS16 et pS18 non complexés obtenu par ESI-MS et à partir des profils d'élution des complexes $\text{UO}_2(\text{pS16})/(\text{pS18})$, acquis simultanément par ESI-MS et ICP-MS	107
Tableau 15 : Constantes de stabilité des complexes UO_2^{2+} -peptides déterminées par fluorescence à pH 7,4 [9,69,113,192].	109
Tableau 16 : Proportions UO_2^{2+} - xpS1368-ypS16 visées, avec x et y les stœchiométries des peptides par rapport à l' UO_2^{2+} .	116
Tableau 17 : Concentration totale en U dans les échantillons $[\text{U}]_t$, écart relatif* des valeurs mesurées en 2 répliques, concentration des peptides dans l'échantillon, calculée par pesée à partir de celle de la solution stock dosée par HILIC-UV et proportion UO_2^{2+} - xpS1368-ypS16 expérimentale	117
Tableau 18: Bilan de masse calculé pour chaque échantillon analysé en duplicat. Ecart relatif entre les valeurs obtenues pour chaque réplique.	118
Tableau 19 : Proportions UO_2^{2+} - xpS1368-ylinS1368 visées.	124

Tableau 20: Concentration totale $[U]_t$ dans les échantillons déterminée par étalonnage pour deux répliquats, écart relatif (%) entre les valeurs des concentrations mesurées pour chaque réplique, concentration en peptides pS1368 et linS1368 dans l'échantillon, calculée par pesée à partir de celle de la solution stock dosée par HILIC-UV et proportions expérimentales UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368..	124
Tableau 21 : Bilan de masse calculé pour les échantillons UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368 injectés en duplicat. Ecart relatif (%) entre les valeurs obtenues pour chaque réplique.	126
Tableau 22 : Récapitulatif des espèces M(pS1368) identifiées par ESI-MS, avec M = Sr^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+}	141
Tableau 23 : Composition des différents échantillons dans lesquels des équivalents croissants de Sr^{2+} ont été ajoutés à de l' UO_2^{2+} et du pS1368 en concentrations fixes.....	144
Tableau 24: Concentration totale en U et en Sr dans les échantillons déterminée hors ligne en ICP-MS par étalonnage externe et en mode FIA, écart relatif (%) des valeurs obtenues pour deux répliques, concentration de pS1368 mesurée par HILIC-UV et proportions expérimentales $U+2pS1368 + xSr$.	145

Liste des abréviations

A

ACN : acétonitrile
AChE : Acétylcholine estérase
apoTf : apoTransferrine

B

BEH : Ethylene Bridged Hybrid
BIN : binaphtyle

C

Calix : calixarene
CaM : calmoduline
CAM : catécholamides
CAMS : sulfocatécholamides
CD : dichroïsme circulaire
CID : Collision Induced Dissociation
CE : électrophorèse capillaire
CSD : Cambridge Structural Database
CRC : Collision Reaction Cell
CRP : C-Reactive Protein

D

DBP : dibutyl phosphate
DCP : dicarboxyphénanthroline
DTPA : acide diéthylène triamine pentaacétique
DFT : Density Functional Theory
DHIP : 2,6-dihydroxyiminopiperidine
DHPD : N1,N5-dihydroxypentanediiimidamide
DHED : N1,N2-dihydroxyethanediimidamide

E

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
ESI : ElectroSpray Ionisation
ESIMS : ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry
EXAFS : Extended X-Ray Absorption Fine Structure

F

FIA : Flow Injection Analysis
FWHM : Full Width at Half Maximum
FT-IR : Spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier
FS : Full scan

H

H-ESI : Heated ElectroSpray Ionization
HEDP : acide 1-hydroxyéthane-1,1'-diphosphonique
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIBA : acide α -hydroxyisobutyrique
HILIC : Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HSA : albumine de sérum humain
HSAB : Hard and Soft Acids and Bases principe
HOPO : hydroxypyridinones

I

IC : Ion Chromatography
IDA : acide iminodiacétique
IMAC : chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés
IR : infra-rouge
ITC : titration calorimétrique isotherme
ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP-OES : Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
i.d. : diamètre interne

L

LA-ICP-MS : Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
LC : Liquid Chromatography
LIT : Linear Ion Trap

M

MA : Acide Mandélique
MS : spectrométrie de Masse Simple
MS² ou MSⁿ: spectrométrie de masse en tandem

N

NPLC : Normal-Phase Liquid Chromatography

O

OPN : ostéopontine

P

PAI :Peak Area Integration
PDB : Protein Data Bank
pSer : phosphosérine
pH : potentiel hydrogène
PEI-MP : polyéthylènimines-éthylphosphonate

Q

Q : quadripôle
QqQ : triple quadripôle

R

RPLC : Reversed Phase Liquid Chromatography
RMN : résonance magnétique nucléaire
RSD : Relative Standard Deviation
RP : Resolving Power

S

SCP : sulfochlorophénol
SEC : chromatographie d'exclusion stérique
SIM : Single Ion Monitoring
SRM : Single Reaction Monitoring

T

TBP : tributyl phosphate
Tf : transférine

U

UHPLC : Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV : ultra-violet

V

Vtg : Vitellogénine

Liste des notations

As : facteur d'asymétrie

d.i. : diamètre interne (μm)

k' : facteur de rétention

L : longueur de colonne (mm)

m : masse (g)

M : masse molaire ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

t₀ : temps mort (min)

t_r : temps de rétention (min)

α : sélectivité

R_i : Facteur de réponse en ESI-MS d'une espèce métallique i

R_s : résolution

R² : coefficient de corrélation

pK_a : constante d'acidité logarithmique

UO₂²⁺ : cation uranyle

v/v : volume sur volume

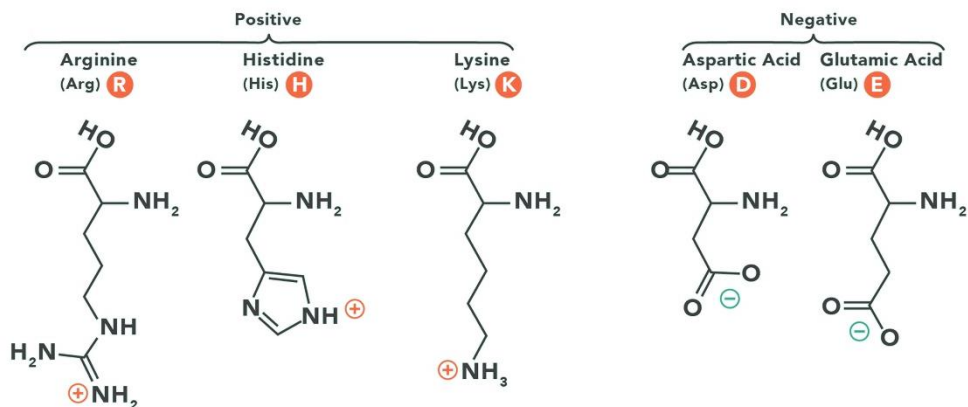
δ : Fractionnement isotopique

Δm : la largeur à mi-hauteur du pic

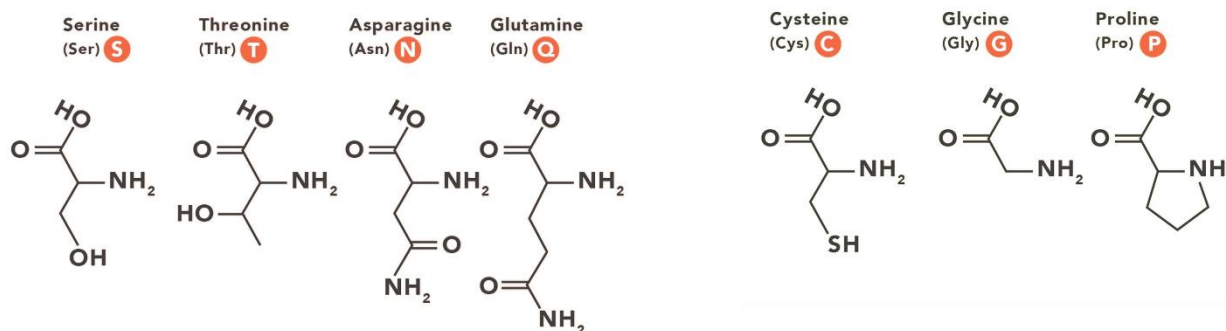
Δm : Fenêtre d'isolation en mode SIM

Liste des acides aminés naturels

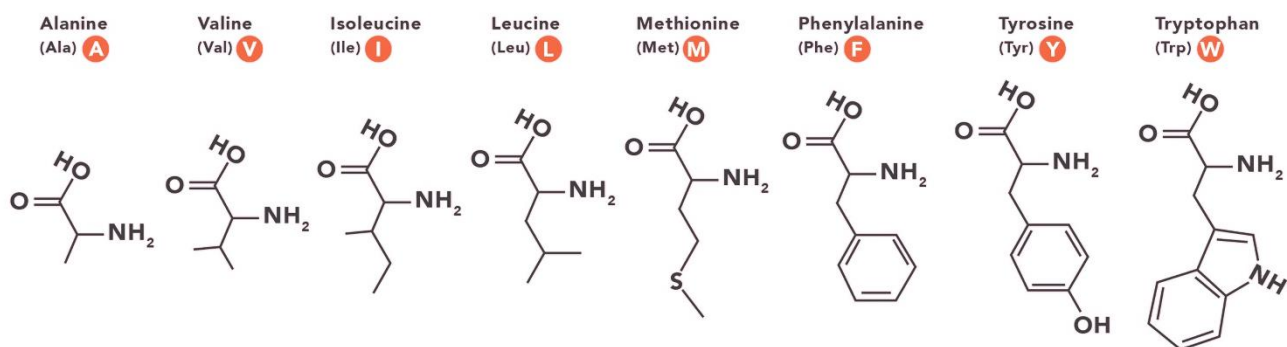
A. Acides aminés à chaîne latérale chargée



B. Acides aminés à chaîne latérale polaire et neutre



C. Acides aminés à chaîne latérale hydrophobe



Introduction générale

A l'interface entre la chimie et la biologie, l'étude du comportement des cations métalliques dans les milieux biologiques et de leur toxicité est une thématique d'importance. En effet, certains métaux sont essentiels pour l'organisme, d'autres n'ont aucun rôle biologique connu et présentent une certaine toxicité qui dépend de la nature de l'élément et de sa spéciation [1]. La spéciation d'un élément étant sa distribution quantitative selon différentes espèces chimiques définies dans un système [1].

Parmi les éléments essentiels intrinsèquement présents dans l'organisme, on distingue ceux en quantité relativement abondante, tels que Na, K, Mg, Ca, P, S, Cl, avec une teneur de l'ordre du mg g^{-1} et ceux à l'état de trace comme les métaux tels que Fe, Mn, Co, Cu, Zn, Mo, avec une concentration de l'ordre du $\mu\text{g g}^{-1}$ (Figure 1) [2]. Environ la moitié des enzymes et des protéines de l'organisme humain sont liées à un métal pour former une structure stable et assurer leur fonction [2]. La compréhension du mode d'interaction des métaux avec les biomolécules, du rôle des métaux dans la fonction de ces dernières et l'élucidation de leur spéciation est donc d'intérêt majeur et a donné lieu à l'émergence d'une nouvelle discipline : la métallomique [3].

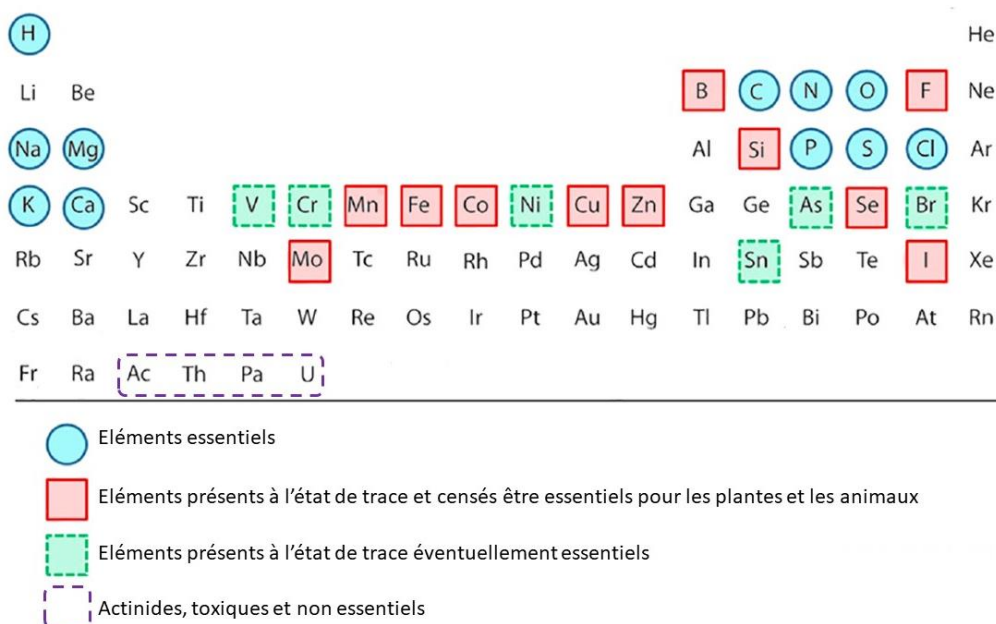


Figure 1 : Distribution des éléments essentiels et non essentiels dans le tableau périodique [2].

Les actinides, éléments dont la couche électronique 5f est partiellement remplie, sont radiotoxiques pour l'homme et pour l'environnement. En particulier, l'uranium naturel présente une toxicité chimique plutôt que radiologique. Il s'agit de l'élément le plus lourd naturellement présent à la surface de la terre avec une teneur moyenne de l'ordre de $2,3 \mu\text{g g}^{-1}$ [4]. Sa présence dans l'environnement est également due à des activités humaines comme l'exploitation minière, l'industrie agricole avec l'utilisation d'engrais phosphatés riches en uranium ou encore les activités militaires [5]. L'homme est

donc susceptible d'être exposé à différentes teneurs d'uranium à travers diverses sources naturelles et anthropogéniques. En cas de contamination, la biocinétique et la biodistribution de l'uranyle (UO_2^{2+}), forme chimique prépondérante de l'uranium en milieux biologiques, sont assez bien connues à l'échelle de l'organisme humain entier [5]. L'identification des biomolécules cibles *in vivo* et *in vitro* liant spécifiquement l' UO_2^{2+} et la caractérisation des modes d'interaction sont des informations essentielles pour mieux décrire les mécanismes de toxicité de l' UO_2^{2+} aux échelles cellulaire et moléculaire, encore mal connus. Quelques protéines cibles de l' UO_2^{2+} ont été identifiées, les plus affines étant la Fétuine-A (FETUA)[6] et l'ostéopontine (OPN)[7]. Néanmoins, les sites de coordination responsables de cette forte affinité ne sont toujours pas connus.

La conception rationnelle de peptides contenant des séquences bien choisies, dont le rôle est de mimer la structure des protéines est un moyen efficace pour identifier les paramètres clés à l'origine de cette affinité et proposer des sites de coordination de l' UO_2^{2+} dans ses protéines cibles [8]. Les avantages de cette approche biomimétique sont notamment de rendre l'acquisition de données structurales et thermodynamiques plus aisée qu'avec des protéines et de faciliter la mise au point d'agents décorporants par chélation *in vivo* [8].

Dans ce cadre, l'équipe CIBEST du laboratoire SyMMES au CEA Grenoble développe depuis plusieurs années des cyclodécapeptides mimant les sites de liaison de l' UO_2^{2+} dans ses protéines cibles. Ces peptides ont une structure préorganisée, avec quatre acides aminés orientés vers le plan équatorial de l'uranyle pour une coordination efficace et sélective (Figure 2).

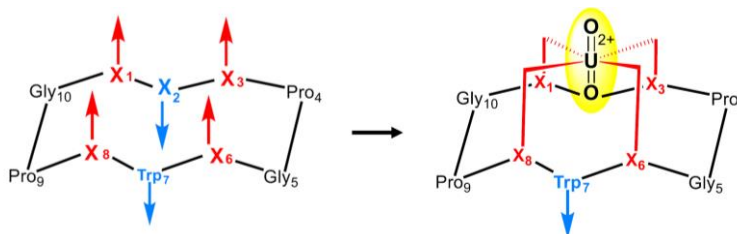


Figure 2 : Structure des peptides cycliques biomimétiques développés au CIBEST. Avec X_1 , X_3 , X_6 et X_8 : glutamate (Glu) ou phosphosérine (pSer) dont les chaînes latérales sont dirigées vers le plan équatorial de l' UO_2^{2+} et X_2 : arginine (Arg) ou Glu.

Etant donné que l' UO_2^{2+} présente une affinité très forte pour les groupements phosphates, les protéines phosphorylées sont des cibles privilégiées de cet actinide, comme par exemple l'ostéopontine (OPN) [7]. La conception de peptides biomimétiques de l'OPN a donc consisté à augmenter progressivement le nombre de résidus phosphorylés dans le squelette peptidique, pour évaluer leur influence sur l'affinité de ces peptides pour l' UO_2^{2+} [9]. L'étude des complexes d' UO_2^{2+} formés avec ces peptides est généralement réalisée de façon séquentielle avec des techniques classiques de chimie en solution comme la spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS), le dichroïsme circulaire (CD), la spectroscopie de fluorescence, mais aussi par spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) [9]. La combinaison de ces techniques a permis d'acquérir

des données complémentaires structurales et thermodynamiques, pour apporter en continu des connaissances sur les modes d'interaction de l' UO_2^{2+} à l'échelle moléculaire. Cependant, les analyses réalisées en séquentiel sont consommatrices de temps et de matière, d'autant plus que la synthèse de ces peptides est très délicate. Le développement de méthodes analytiques permettant de comprendre les interactions UO_2^{2+} -peptides, à savoir d'identifier les différentes espèces chimiques dans lesquels il est impliqué et de les quantifier en une analyse unique, tout en réduisant les quantités impliquées constitue alors un enjeu majeur.

Dans cette optique, ce travail de thèse vise à développer une méthode analytique, permettant d'établir en une analyse unique, l'échelle d'affinité de peptides biomimétiques pour l' UO_2^{2+} . Cette méthode doit pouvoir également être appliquée à l'évaluation de la sélectivité de ces peptides par rapport aux ions compétiteurs endogènes (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}). Ce paramètre est fondamental pour évaluer la pertinence des sites proposés dans les protéines cibles *in vivo* mais aussi pour affiner le design des décorporants par chélation. Pour répondre à ces objectifs, la stratégie analytique repose sur la mise en œuvre d'un couplage simultané d'une séparation chromatographique à des techniques de spectrométrie de masse moléculaire (ESI-MS) et élémentaire (ICP-MS : Inductively coupled plasma mass spectrometry), pour d'une part identifier les complexes peptidiques et d'autre part les quantifier [10] (Figure 3).

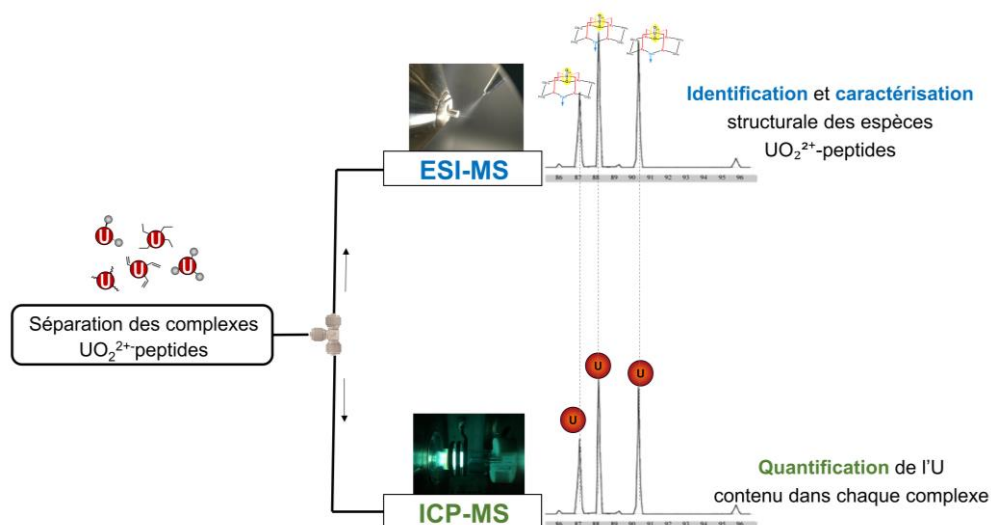


Figure 3 : Représentation schématique du couplage simultané de la séparation chromatographique de complexes peptidiques avec l'ESI-MS et l'ICP-MS

Un des défis majeurs étant la préservation de l'intégrité des complexes UO_2^{2+} -peptides lors de la séparation [11], la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) a été sélectionnée. Cette technique séparative est dédiée à la séparation de composés polaires, hydrophiles, neutres ou chargés et est décrite comme étant adaptée à la séparation de complexes métalliques, même labiles [12]. Grâce à la mise en œuvre du double couplage (Figure 3), les complexes d' UO_2^{2+} préalablement séparés sont identifiés en ligne par ESI-MS et la distribution quantitative de l' UO_2^{2+} parmi les complexes,

simultanément déterminée en ligne par ICP-MS. A l'issue de cette étape, une échelle d'affinité des peptides pour l' UO_2^{2+} pourra être établie et ce, en une analyse unique.

Ce manuscrit est divisé en cinq chapitres. Le premier fait l'objet d'un point bibliographique décrivant dans un premier volet les propriétés chimiques et nucléaires du cation UO_2^{2+} et sa toxicité à l'échelle de l'organisme humain. Les mécanismes de toxicité étant gouvernés par les interactions de l' UO_2^{2+} avec des biomolécules cibles, les études et techniques associées pour caractériser ces interactions sont recensées. Dans un deuxième volet, l'état de l'art sur la caractérisation de complexes d' UO_2^{2+} par ESI-MS et par ICP-MS est présenté, ainsi que sur les techniques séparatives employées pour la séparation de ces complexes. Finalement, les études impliquant l'HILIC comme technique séparative des complexes métalliques sont passées en revue.

Le deuxième chapitre décrit le principe de fonctionnement des techniques de spectrométrie de masse utilisées dans ce travail et leur spécificités complémentaires.

La séparation des complexes UO_2^{2+} -peptides étant une étape très délicate, il est indispensable de définir au préalable les conditions de séparation par HILIC des peptides multiphosphorylés cycliques à $\text{pH} = 7,4$, paramètre clef reflétant des conditions biologiques pertinentes en toxicologie. Le troisième chapitre est donc dédié à la mise au point de la séparation par HILIC-ESI-MS des peptides biomimétiques multiphosphorylés dans ces conditions, y compris des isomères de positions [13]. La sélectivité de plusieurs phases stationnaires greffées par différents groupements polaires et l'effet de la composition de la phase mobile sur ce paramètre ont été évalués. Les mécanismes de séparation des peptides par HILIC sont également discutés.

Le quatrième chapitre est consacré au développement d'une méthode de quantification par la mise en œuvre du couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS pour déterminer en ligne par ICP-MS la distribution quantitative de l'U parmi les espèces UO_2^{2+} -peptides préalablement séparées et simultanément identifiées par ESI-MS. Dans un premier temps, les conditions de séparation des complexes d' UO_2^{2+} par HILIC ont été mises au point, en exploitant les résultats du chapitre précédent. Dans un deuxième temps, une échelle d'affinité des peptides cycliques multiphosphorylés vis-à-vis de l' UO_2^{2+} a été établie à l'issue de la quantification de l' UO_2^{2+} dans les différentes espèces UO_2^{2+} -peptide. Cette approche a été appliquée à l'évaluation de l'effet de la structure cyclique ou linéaire du peptide tétraphosphorylé sur son affinité pour l' UO_2^{2+} .

Dans le dernier chapitre, cette démarche a été étendue à l'évaluation de la sélectivité du peptide tétraphosphorylé vis-à-vis de l' UO_2^{2+} en présence des cations compétiteurs endogènes (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}). A cette fin, la distribution quantitative de l' UO_2^{2+} et de ces métaux parmi les complexes peptidiques séparés par HILIC et identifiées par ESI-MS, a été mesurée simultanément en ligne par ICP-MS. Finalement, une conclusion générale sur ces travaux ainsi que les perspectives sont présentées.

Chapitre I : Etude bibliographique

1. Uranium, généralités et toxicité

1.1. Généralités

Bien que découvert par Martin Heinrich Klaproth en 1789, ça n'est qu'après la découverte de ses propriétés nucléaires vers le milieu du XXe siècle que l'uranium (U) occupe une place centrale dans les activités humaines, notamment dans le domaine de l'énergie [14].

1.1.1. Ressources et répartition

L'uranium est un élément naturellement présent dans l'environnement. Il s'agit de l'élément naturel le plus lourd dans la croûte terrestre, à une teneur moyenne de $2,3 \mu\text{g g}^{-1}$ [4].

Les ressources en uranium sont classées par l'Agence Nucléaire de l'Energie (NEA) et l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA) en 2 catégories : les ressources conventionnelles et non conventionnelles. Les ressources conventionnelles sont définies comme des ressources à partir desquelles l'uranium est récupérable en tant que produit primaire, coproduit ou sous-produit important. Ce sont principalement les mines, majoritairement exploitées pour la production d'énergie nucléaire. Les ressources non conventionnelles sont des ressources à partir desquelles l'uranium n'est récupérable qu'en tant que sous-produit mineur. Ce sont principalement l'eau de mer et les roches phosphatées.

Géologiquement répandus, des ressources conventionnelles d'uranium sont répertoriées dans de nombreuses régions du monde, et classées par la NEA et l'IAEA en fonction de leur coût de récupération comme illustré dans la Figure 4.

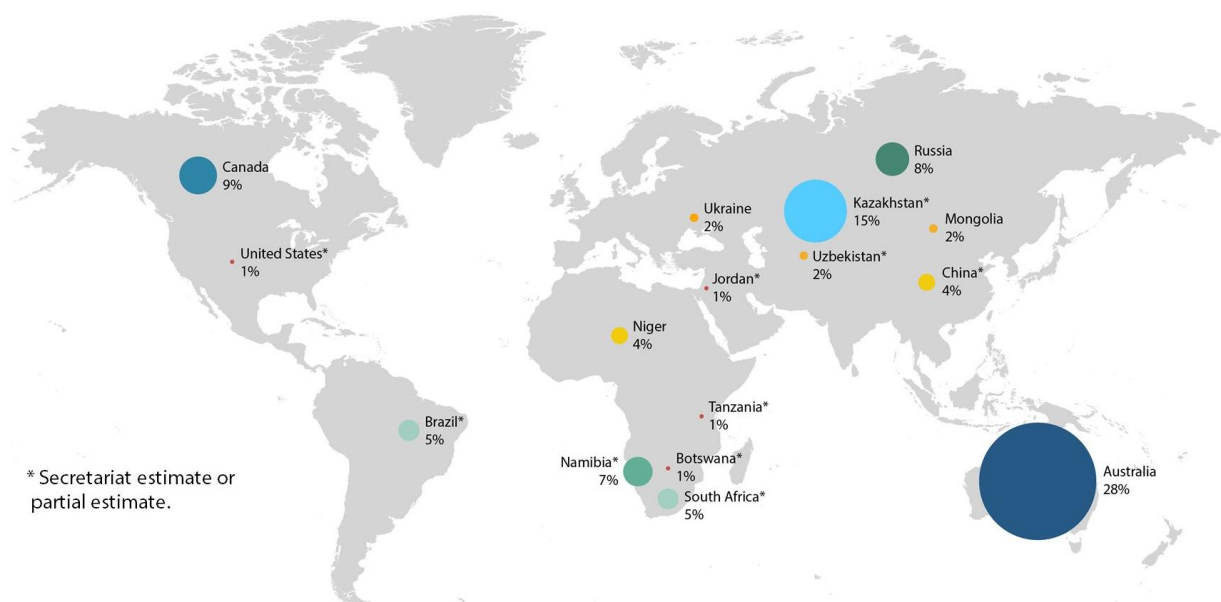


Figure 4 : Distribution mondiale des ressources d'uranium récupérables pour un coût inférieure à 130 USD/kg U, au 1^{er} janvier 2019 [15].

D'après la Figure 4, seize pays sont dotés de 95% des ressources conventionnelles mondiales en uranium, dont 52% sont distribués dans 3 pays : Australie (28%), Kazakhstan (15%) et Canada (9%). La production mondiale d'uranium a diminué de près de 11% de 2017 à 2018, mais a connu une légère augmentation de 1% en 2019 avec une production mondiale qui a atteint 54 224 tonnes d'U. Les principaux pays producteurs sont le Canada et le Kazakhstan d'après les statistiques reportées par la NEA et l'IAEA en 2020.

1.1.2. Propriétés chimiques et nucléaires

➤ *Propriétés chimiques*

L'uranium est un métal gris blanc malléable et ductile de densité 19 g cm^{-3} [16]. De numéro atomique $Z = 92$, l'uranium appartient à la famille des actinides (An) dans la classification périodique des éléments.

Les actinides en plus des lanthanides (Ln) sont les seuls éléments à posséder une sous-couche électronique nf partiellement remplie, avec $n = 4$ pour les Ln et $n = 5$ pour les An. On les appelle les éléments f. L'uranium a pour configuration électronique : $[\text{Rn}] 5f^3 6d^1 7s^2$.

Contrairement aux lanthanides, les actinides ont un comportement hétérogène le long de la série et sont par conséquent divisés en deux catégories [17] :

1. Les actinides légers (actinium jusqu'à américium), y compris l'uranium
2. Les actinides lourds (curium jusqu'à lawrencium)

Les actinides légers sont caractérisés par l'hybridation des orbitales $5f$ avec les orbitales $6d$ et $5s$, leurs niveaux d'énergie étant proches. Les électrons f sont donc relativement disponibles, conduisant à des états d'oxydation multiples variant entre +III et +VIII. L'uranium présente des états d'oxydation entre +III et +VI et les plus fréquents dans la nature sont les degrés +IV et +VI. La disponibilité des électrons $5f$ confère également aux actinides légers une tendance à être engagés dans des liaisons covalentes pour former notamment des ions oxo de type MO_2^+ et MO_2^{2+} , comme le cation uranyle UO_2^{2+} [18], comportement comparable à celui des éléments de transition. Au-delà de l'américium, les orbitales $5f$ deviennent plus localisées et plus basses en énergie par rapport aux orbitales $6d$, ce qui confère aux actinides lourds des propriétés chimiques proches de celles des lanthanides. Les actinides lourds sont essentiellement présents à l'état d'oxydation +III en solution aqueuse et leur rayon atomique diminue quand le numéro atomique augmente le long de la série, à l'instar du phénomène de « contraction lanthanidique ».

➤ Propriétés nucléaires

Généralement, les isotopes des actinides sont instables et se désintègrent en émettant des rayonnements ionisants pour revenir à des états plus stables, ils sont appelés radio-isotopes. L'uranium naturel (^{nat}U) est constitué d'un mélange de trois radio-isotopes ^{238}U , ^{235}U et ^{234}U . Ces derniers subissent des désintégrations spontanées sur une longue échelle de temps. La demi-vie de chaque isotope ou la période radioactive, étant la période de temps à l'issue de laquelle la moitié de la population isotopique s'est spontanément désintégrée, est différente pour chaque isotope de l'U. L'activité massique exprimée en Becquerel par gramme (Bq g^{-1}) est le nombre de désintégrations par unité de masse de chaque isotope. L'activité, exprimée en pourcent (%), représente la contribution de chaque isotope à l'activité, en tenant compte de leur abondance et leur activité massique. Elles sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Abondance naturelle, période radioactive et activité massique des isotopes de l'uranium naturel [19].

Isotopes	Abondance naturelle (% en masse)	Période radioactive (années)	Activité massique (Bq g^{-1})	Activité (%)
^{238}U	99,275	$4,47 \times 10^9$	$1,24 \times 10^4$	48,3
^{235}U	0,719	$7,04 \times 10^8$	$8,00 \times 10^4$	2,3
^{234}U	0,0057	$2,5 \times 10^5$	$2,30 \times 10^8$	49,5

Les formes enrichies ou appauvries de l'uranium proviennent des proportions variables des différents isotopes et notamment celui de ^{235}U . L'uranium « enrichi » contient une proportion importante d' ^{235}U : un pourcentage excédant 90% est utilisé pour des applications militaires et un pourcentage de 3-5% est nécessaire à la fabrication combustible alimentant les réacteurs nucléaires civils. Un pourcentage d' ^{235}U inférieur à son abondance naturelle définit l'U « appauvri ». Il est utilisé par exemple comme contrepoids dans les avions, comme protection contre les rayonnements dans le matériel médical pour les radiothérapies et dans les conteneurs servant aux transports des matières radioactives.

1.1.3. Le cation uranyle

En milieu aqueux, la forme la plus stable de l'uranium est le cation uranyle UO_2^{2+} , dans lequel l'uranium est au degré d'oxydation +VI. Moins fréquemment, il peut se trouver à l'état d'oxydation +V sous forme d' UO_2^+ et +IV dans certains milieux réducteurs. La stabilité relative de ces différents états d'oxydation dépend fortement du pH du milieu. En milieux biologiques, l'état d'oxydation prédominant est +VI. Le cation uranyle UO_2^{2+} est caractérisé par sa géométrie linéaire atypique, en forme de bâtonnet, dans laquelle les deux atomes d'oxygène sont en position trans ($\text{O}=\text{U}=\text{O}$). L' UO_2^{2+} est engagé dans cinq à six liaisons dans le plan équatorial perpendiculaire à l'axe formé par les deux

oxygènes, ce qui lui confère une structure bipyramidale. La distance U-O axiale est comprise entre 1,7 et 1,9 Å et l'angle O-U-O est de 180° [18] (Figure 5).

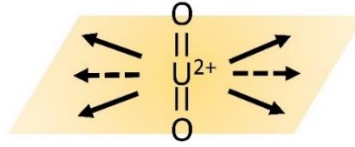


Figure 5 : Géométrie du cation uranyle UO_2^{2+} . Les flèches indiquent le positionnement des ligands dans le plan équatorial [8].

Le cation UO_2^{2+} est classé parmi les acides durs dans la théorie de Pearson ou théorie HSAB (Hard and Soft Acids and Bases) [20] et établit donc des interactions préférentielles avec des bases dures (Tableau 2).

Tableau 2 : Acides et des bases durs selon la théorie HSAB [20].

Acides durs	H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Be^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Sn^{2+} , Al^{3+} , Se^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+} , La^{3+} , Cr^{3+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , As^{3+} , Ir^{3+} , Si^{4+} , Ti^{4+} , Zr^{4+} , Th^{4+} , Pu^{4+} , VO^{2+} , UO_2^{2+} , ...
Bases dures	H_2O , HO^- , F^- , CH_3CO_2^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cl^- , CO_3^{2-} , ClO_4^- , NO_3^- , ROH , RO^- , R_2O , NH_3 , RNH_2 , N_2H_4

Les bases dures possédant des donneurs oxygénés, comme l'hydroxyde, les carboxylates et carbonates ou encore les phosphates présentent les plus fortes affinités pour l' UO_2^{2+} . Les interactions de l' UO_2^{2+} avec ces ligands sont de type électrostatique et souvent décrites comme labiles [16]. La labilité est la capacité d'un complexe à s'engager dans une réaction de substitution rapide d'un ou plusieurs de ses ligands de sa sphère de coordination. Ces caractéristiques rendent la sélection d'un mode de séparation des complexes d' UO_2^{2+} très délicate, qui doit permettre de préserver au maximum l'intégrité de la structure des complexes d' UO_2^{2+} le long du processus de séparation [11].

Dans la classification des acides durs (Tableau 2), certains cations présentent des comportements similaires malgré des différences importantes dans leurs géométries de coordination, ce qui est le cas pour les paires $\text{UO}_2^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ et $\text{Pu}^{4+}/\text{Fe}^{3+}$ (Figure 6).

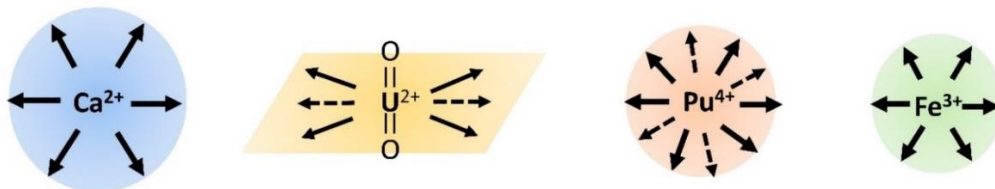


Figure 6 : Géométries de coordination des différents cations appartenant à la catégorie des acides durs de Lewis. Adapté de [8,21].

Des études d'analogies peuvent être intéressantes afin de substituer un radioélément par un homologue non radioactif pour mimer son comportement. Par exemple, les constantes de stabilité des complexes de plutonium (Pu) ont été tracées en fonction de celles des complexes de Fer (Fe)

formés avec les mêmes ligands. Une corrélation linéaire a été obtenue, en accord avec une similitude remarquable entre les propriétés de transport et de distribution chimiques et biologiques du Pu^{4+} et du Fe^{3+} [22]. Par ailleurs, l' UO_2^{2+} présente des similitudes de comportement avec le Ca^{2+} et tend à remplacer ce dernier dans les os en cas de contamination [17]. En revanche, aucune corrélation linéaire entre les constantes de stabilité des complexes d' UO_2^{2+} et de Ca^{2+} n'a été obtenue. Le cation uranyle est donc particulier et le Ca^{2+} ne peut pas être utilisé comme analogue non radioactif de l' UO_2^{2+} , malgré les similitudes de comportement observées en milieux biologiques.

➤ Sphère d'hydratation

Un modèle sphérique délimité en quatre zones décrit les différentes sphères de solvation du cation UO_2^{2+} en milieu aqueux [23], comme montre la Figure 7 :

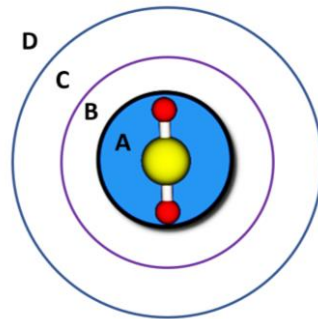


Figure 7: Sphères de solvation du cation uranyle (adapté de Rizkalla and Chopin [23])

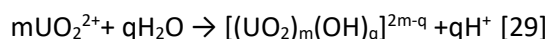
La zone A est appelée la première sphère de coordination ou sphère interne de solvation, dans laquelle les molécules d'eau sont directement liées au cation UO_2^{2+} par liaison ionique. La zone B définit la sphère externe de solvation, dans laquelle un nombre supplémentaire de molécules d'eau sont liées indirectement au cation uranyle et fortement influencées par le champ électrostatique généré par le cation. Le nombre de molécules d'eau dans cette zone dépend donc de la densité de charge du cation. La zone C est moins ordonnée que la zone B et les molécules d'eau subissent peu d'influence du cation. La dernière zone correspond à la zone D, où le cation n'a aucune influence sur les molécules d'eau [23].

Des études par différentes techniques spectroscopiques (EXAFS [24], RMN [25], IR et Raman[26]), de diffraction par rayons X [27] et de modélisation par des calculs *ab initio* [28] ont montré qu'en solution aqueuse, le cation UO_2^{2+} est coordonné à cinq molécules d'eau dans sa sphère interne de coordination, sous la forme $[\text{UO}_2(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$. En outre, les études de modélisation ont montré qu'une à deux molécules d'eau pouvaient être présentes dans la sphère externe de coordination, principalement orientées par une forte interaction électrostatique avec l' UO_2^{2+} et une interaction faible par liaison hydrogène avec deux molécules d'eau de la sphère interne [28]. Par conséquent, même lorsque le cation UO_2^{2+} est complexé, des molécules d'eau peuvent être présentes dans sa sphère de coordination externe, selon

l'encombrement stérique du ligand et son nombre de coordination, ce qui pourra avoir une influence sur les propriétés hydrophiles des complexes et donc sur leur séparation.

➤ Hydrolyse

En absence de molécule complexante, l'hydrolyse domine largement la spéciation de l'uranyle. La formation des produits d'hydrolyse se fait selon la réaction suivante :



Avec $m = 1, 2, 3$ et 4 et $q = 1, 2, 5$ et 7 .

La spéciation et la solubilité du cation uranyle varient en fonction de la concentration de ce dernier, de la composition du milieu, de la force ionique et du pH. Les diagrammes de spéciation théoriques de l' UO_2^{2+} présentés dans la Figure 8 montrent la spéciation de l' UO_2^{2+} à deux concentrations en milieu aqueux, en fonction du pH.

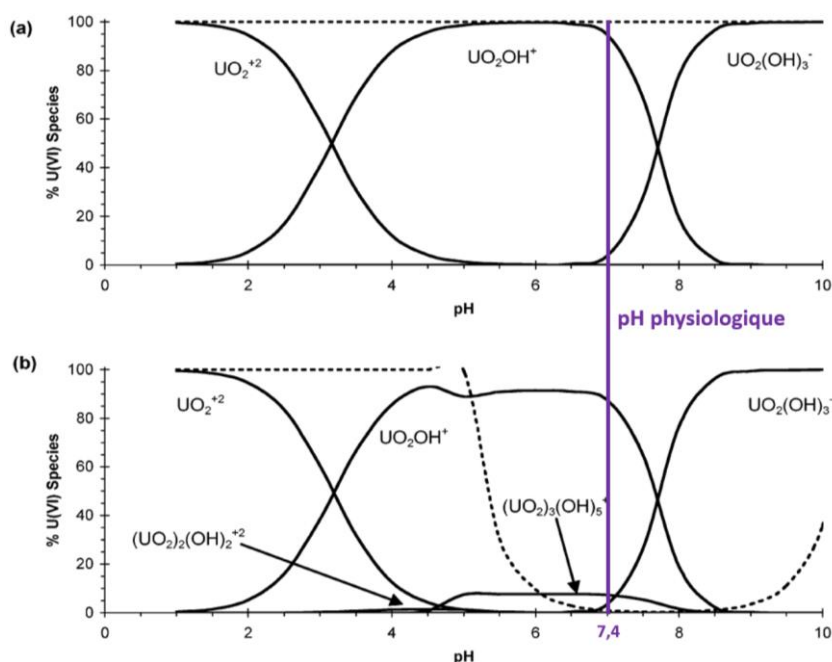


Figure 8 : Spéciation et solubilité de l'uranyle en fonction du pH en milieu aqueux avec $[\text{UO}_2^{2+}] = (a) 1 \mu\text{mol L}^{-1}$ et (b) 1 mmol L^{-1} . La ligne en pointillé représente la limite de solubilité des espèces [30].

Lorsque $[\text{UO}_2^{2+}] = 1 \mu\text{mol L}^{-1}$, l'hydrolyse apparaît à environ $\text{pH} = 3$ et est dominée par la formation d'hydroxydes monomériques tels que $[\text{UO}_2(\text{OH})]^+$ et $[\text{UO}_2(\text{OH})_3]^-$ (Figure 8). Lorsque $[\text{UO}_2^{2+}] = 1 \text{ mmol L}^{-1}$, des dimères $[(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2]^{2+}$ et des trimères $[(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5]^+$ se forment en plus des monomères et précipitent à partir de $\text{pH} 6$. Par conséquent, lors des études de spéciation en conditions biologiques, ce phénomène doit être considéré. Afin d'éviter l'hydrolyse de l' UO_2^{2+} , des ligands protecteurs tels que l'acide iminodiacétique (IDA) ou le carbonate qui forment des complexes avec l' UO_2^{2+} peuvent être ajoutés dans le milieu.

1.2. Toxicité

Faisant partie de la famille des actinides, l'uranium n'a aucune fonction biologique connue et présente une double toxicité chimique et radiologique. Sa toxicité radiologique dépend de sa composition isotopique, c'est-à-dire de son degré d'enrichissement en ^{235}U . L'uranium naturel, majoritairement sous forme ^{238}U , présente une toxicité principalement chimique liée aux interactions de sa forme UO_2^{2+} *in vivo* avec les biomolécules cibles. C'est par l'intermédiaire de ces interactions que l' UO_2^{2+} est transporté dans ses organes cibles où il va exercer des effets délétères. La distribution et la biocinétique de l' UO_2^{2+} à l'échelle de l'organisme humain entier sont bien décrites [5]. Cependant, ses mécanismes de toxicité au niveau cellulaire et moléculaire sont moins connus. Ce paragraphe résume les mécanismes de toxicité de l' UO_2^{2+} au niveau de l'organisme humain et au niveau cellulaire.

1.2.1. Sources et voies d'exposition

L'homme est exposé à diverses sources naturelles et anthropogéniques de contamination à l'uranium. L'uranium naturellement présent ($^{\text{nat}}\text{U}$) dans les roches et les minerais peut être transféré dans le sol et dans l'air en raison de phénomènes d'érosion. La concentration moyenne d'uranium a été estimée à $2,8 \text{ mg kg}^{-1}$ dans le sol, $0,1 \text{ ng m}^{-3}$ dans l'air ambiant et $3,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ dans l'eau de mer par le Comité Scientifique des Nations Unies sur les effets des rayonnements ionisants (UNSCEAR) [31]. Dans les minerais uranifères, l' $^{\text{nat}}\text{U}$ est présent sous forme insoluble à l'état d'oxydation +IV. Il est susceptible de s'oxyder en U (+VI) et de former des complexes solubles avec des ligands qui favorisent sa mobilité et son transfert dans les milieux aquatiques en particulier l'eau souterraine, dans laquelle la concentration en uranium a été évaluée de $0,1 - 10\,000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ [5]. Par conséquent, l'homme est exposé en continu à une faible concentration en uranium, principalement par ingestion. L'eau potable et la nourriture constituent donc des sources d'exposition chronique de l'homme à l'uranium. L'apport quotidien par l'eau et par la nourriture est compris entre $0,9$ et $1,5 \text{ } \mu\text{g/jour}$ [32]. Une exposition à des concentrations plus importantes peut avoir lieu dans des sites géographiques spécifiques [33]. Ainsi, la qualité de l'eau potable est soumise à des réglementations émanant de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avec une concentration maximale tolérée en uranium fixée à $15 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ en 2004 [34] et relevée à $30 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ depuis 2011 [32].

Les expositions humaines à des concentrations plus importantes sont dues à des sources anthropogéniques telles que les industries minières et l'agriculture avec l'emploi d'engrais phosphatés. Les utilisations militaires de l'uranium appauvri constituent également une source d'exposition de l'homme à l'uranium, mais concernent quasiment exclusivement les populations blessées lors de conflits.

1.2.2. Comportement de l' UO_2^{2+} dans l'organisme

Quelle que soit la source d'exposition, l'uranium peut pénétrer dans le corps humain par inhalation, ingestion ou par contact cutané. Après contamination, l' UO_2^{2+} , en association avec des biomolécules, transite par le sang et se répartit dans ses organes cibles où il va exercer ses effets délétères. Une fraction importante est excrétée dans les urines, environ la moitié éliminée dès le premier jour de contamination, 70% dans les 10 jours et 85% après 3 mois [35]. La fraction restante est transférée principalement vers deux cibles majeures : les os (10 – 15%) et les reins (12 - 25%). Une partie beaucoup plus faible, environ 5%, se trouve dans les tissus mous [22]. Le cerveau a été également identifié comme une autre cible sensible de l' UO_2^{2+} [36].

➤ *Compartiment sanguin*

Quelle que soit la voie d'entrée, l' UO_2^{2+} se distribue dans le sang comme montré sur la [Figure 9](#) [37] :

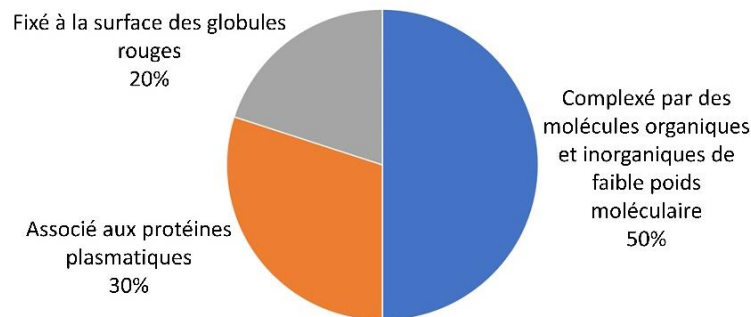


Figure 9 : Répartition de l' UO_2^{2+} dans le sang. Adapté de Ansozorlo et al. [37].

D'après la [Figure 9](#), 50% de l' UO_2^{2+} sont complexés par des molécules à faible poids moléculaire, 20% sont fixés à la surface des globules rouges et 30% associés aux protéines [37]. Ce compartiment assure un rôle de transit et de transport de l' UO_2^{2+} jusqu'à ses organes cibles.

➤ *Compartiment rénal*

Le rein constitue le compartiment de stockage de l' UO_2^{2+} à court terme et est le siège de sa toxicité, dont les effets dépendent de la quantité et de la durée d'exposition. En cas de contamination aiguë, l' UO_2^{2+} induit des néphropathies sévères [35]. En cas de contamination chronique, pour des apports quotidiens principalement dus à la consommation d'eau potable contaminée, l' UO_2^{2+} induit une altération de la fonction rénale. Cela a été observée chez une population consommant de l'eau potable dont la concentration en UO_2^{2+} variait entre 1 et 845 $\mu\text{g L}^{-1}$ [38].

➤ *Compartiment osseux*

Le squelette constitue le site majeur d'accumulation de l' UO_2^{2+} sur le long terme avec une demi-vie de rétention allant de 300 à 5 000 jours [35]. Par conséquent, les cellules osseuses y sont significativement exposées, induisant des effets délétères sur le tissu osseux. *In vivo*, l' UO_2^{2+} favorise la résorption osseuse et inhibe la formation des os [17]. Lors d'une étude concernant une population

contaminée de façon chronique *via* l'eau potable contenant $100 \mu\text{g L}^{-1}$ d'uranium, des altérations du métabolisme osseux ont été mises en évidence à travers la hausse des marqueurs biologiques de remodelage osseux [39]. Par ailleurs, un déficit important de la densité minérale osseuse a été observé chez les vétérans qui avaient un taux élevé d'uranium dans les urines [40].

➤ *Compartiment cérébral*

Le cerveau a plus récemment été démontré comme étant une autre cible potentielle de la toxicité de l' UO_2^{2+} chez l'homme [36]. Une diminution des capacités cognitives des vétérans de la guerre du Golfe a été observée plusieurs années après exposition à l'uranium appauvri *via* des blessures [41]. Chez les rats, des études ont montré qu'une faible quantité d'uranium s'accumulait au niveau de l'hippocampe et du thalamus après exposition chronique à de solutions aqueuses d'uranium appauvri de 40 mg L^{-1} pendant toute leur vie adulte, avec une exposition journalière de $0,97 \pm 0,15 \text{ mg d'uranium/animal/jour}$ [42]. Cette accumulation est généralement associée à une altération des fonctions neurologiques et des capacités cognitives des rats [43].

1.2.3. L' UO_2^{2+} dans les modèles cellulaires

Si la distribution et la biocinétique de l'uranium à l'échelle de l'organisme entier sont relativement bien décrites, les mécanismes de toxicité mis en jeu à l'échelle cellulaire et moléculaire doivent être caractérisés plus finement. Dans cette optique, des études *in vitro* ont été menées sur des lignées cellulaires représentatives des compartiments cibles de l'uranium, dans différentes conditions d'exposition à différentes formes d'U. Ces études ont montré que l' UO_2^{2+} induisait des effets génotoxiques et des lésions d'ADN, dans des cellules rénales [44,45]. Dans des cellules osseuses, une diminution de la capacité de minéralisation des ostéoblastes a été reportée [46], ce qui est cohérent avec le déficit de la densité osseuse observée *in vivo* par défaut de minéralisation. Les études des effets de l'U sont beaucoup moins répandues dans des cellules neuronales. Une lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y exposée à de faibles concentrations 1 et $10 \mu\text{M}$ incorpore préférentiellement l'isotope ^{235}U par rapport à l'isotope ^{238}U alors qu'aucun fractionnement de l'U n'a été observé pour les concentrations plus élevées de 125 et $250 \mu\text{M}$. Ces informations ont permis d'accéder à des informations importantes sur les voies métaboliques de l'incorporation de l' UO_2^{2+} [47].

2. Interactions de l' UO_2^{2+} avec des ligands d'intérêt biologique

La toxicité de l' UO_2^{2+} est principalement gouvernée par ses interactions avec les molécules biologiques. L'identification des sites de coordination de l' UO_2^{2+} dans les biomolécules et en particulier dans les protéines cibles est donc cruciale pour élucider les mécanismes responsables de la toxicité de l' UO_2^{2+} de l'échelle cellulaire à celle de l'organisme entier. Ces informations mécanistiques au niveau moléculaire serviront également pour concevoir des agents décorporants sélectifs visant à éliminer

l' UO_2^{2+} de l'organisme en cas de contamination. Plusieurs approches théoriques et expérimentales ont été entreprises afin d'étudier les interactions de l' UO_2^{2+} avec des molécules d'intérêt biologique telles que les protéines, les peptides biomimétiques, les molécules décorporantes et les petits ligands organiques et inorganiques et sont détaillées dans les paragraphes suivants.

2.1. Les protéines

L'identification des protéines cibles et la caractérisation de leurs interactions avec l' UO_2^{2+} ont été réalisées par des approches théoriques impliquant des outils bio-informatiques, et expérimentales par diverses techniques spectroscopiques.

L'approche théorique consiste en un criblage bio-informatique à grande échelle de structures protéiques issues de banques de données comme la PDB (Protein Data Bank) ou la CSD (Cambridge Structural Database) dans le but d'identifier à priori des cibles de l' UO_2^{2+} et de prédire ses sites d'interaction dans ces protéines [21,48–50]. Ces études de criblage ont montré que l' UO_2^{2+} interagissait avec les protéines *via* les chaînes latérales des acides aminés portant des donneurs oxygénés comme les carboxylates des aspartates et des glutamates [21,48] et le phénolate de la tyrosine [21], en adéquation avec la théorie HSAB [20]. Les données structurales acquises ont permis de proposer une structure des complexes UO_2^{2+} -protéines. Par exemple, la protéine CRP « C-Reactive Protein » a été sélectionnée, dans laquelle un site de fixation de l' UO_2^{2+} a été identifié au voisinage de celui du Ca^{2+} naturellement lié à cette protéine et dont la présence est primordiale pour son fonctionnement [49]. Toutefois, ces informations nécessitent d'être validées par des approches expérimentales.

La caractérisation des interactions de l' UO_2^{2+} avec des protéines a été entreprise par diverses techniques spectroscopiques et calorimétriques conventionnelles et en mode séquentiel. Les données en découlant permettent de déterminer la stœchiométrie des complexes formés, d'identifier l'impact de l'interaction avec l' UO_2^{2+} sur la structuration de la protéine et de calculer les constantes de stabilité thermodynamiques associées. Les techniques les plus employées sont les techniques spectroscopiques telles que l'absorption UV-VIS, la spectroscopie infrarouge (IR), fluorescence résolue ou non dans le temps (TRFLS), l'absorption des rayons X (XAS) ou EXAFS, le dichroïsme circulaire (CD), la résonance magnétique nucléaire (RMN), les techniques calorimétriques comme la calorimétrie isotherme (ITC) et les techniques spectrométrie de masse à source électrospray (ESI-MS). L'ensemble de ces techniques donne des informations complémentaires sur l'interaction de l' UO_2^{2+} avec nombreuses protéines dont les principaux résultats sont recensés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Principales cibles protéiques de l' UO_2^{2+} et informations obtenues par différentes techniques spectroscopiques sur l'interaction de l' UO_2^{2+} avec ces protéines en termes de rapport UO_2^{2+} /protéine, de groupements impliqués dans la coordination, de modification structurale de la protéine et de constante de stabilité. Les protéines marquées en rouge sont des protéines caractérisées par leur taux de phosphorylation élevé. (*) SPR = Résonance plasmonique de surface. (#) Electrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif ICP-MS

	Localisation	MM (kDa)	[C] gL^{-1}	Fonction	Structure native	Cation(s) métallique(s) associé(s)	Technique(s) de caractérisation	Rapport UO_2^{2+} /protéine	Effet de l' UO_2^{2+} sur la structure/ fonction de la protéine	Groupements impliqués dans la coordination	Log K UO_2^{2+} -protéine	Rôle dans le transport/internalisation de l' UO_2^{2+}	Réf.
Fetuline-A (FETUA)	Sérum humain	48	0,4-0,9	Apport de phosphates de calcium dans les os	3 domaines dont 2 présentent une hélice α et des feuillets β	Ca^{2+}	Quenching fluorescence, CD, SPR*, EC-ICP/MS #	3/1	Pas d'effet	ND Hypothèse : Asp et Glu	11,4	Principale responsable du transport de l' UO_2^{2+} dans le sang et peut mener à son dépôt dans les os	[6,51]
apoTransferrine (apoTf)	Sérum humain	80	2,5	Régulation de l'homéostasie du fer	2 domaines (lobes) structurés	$1Fe^{3+}$ /lobe	TRFLS, CD, UV, FT-IR, TIC Quenching de fluorescence	2/1	Perte de structure native et de fonction	2 Tyr/site (FT-IR), probablement Asp et carbonate	site 1: 12,4, site 2 : 11,4 site 1 : 7,7 site 2 : 4,6	Transport de l' UO_2^{2+} dans le sang	[52–54]
Albumine (HSA)	Sérum humain	69	30–50	Maintien de la pression osmotique Tampon du pH sanguin Transport des ions Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}	Hélicoïdale (Hélice α)	Ca^{2+}	TRFLS, FTIR, CD, UV Quenching fluorescence	5/1	Perte de structure native et de fonction	Groupements carbonyle et amide	10,8 1 UO_2^{2+} -1HSA : 6,1 2 UO_2^{2+} -1HSA : 4,8	Transport de l' UO_2^{2+} dans le sang	[52,54–56]
Ostéopontine (OPN)	Os, peau, urine, lait et sang humain	60	ND	Inhibition de la minéralisation des os	Non structurée	Ca^{2+} 10 sites Ca^{2+} probablement non phosphorylés (Asp, Glu).	CD, SPR, UV, ICP-MS, EC-ICP-MS	6-9/1	Structuration lors de la complexation	ND probablement au moins 1 oxygène des groupements phosphates	11,5	Transport de l' UO_2^{2+} dans le sang	[7,57]

Calmoduline (CaM)	Ubiquitaire	17	ND	Régulation du Ca ²⁺ dans le corps humain	2 domaines CAM1 et CAM 2, contenant 2 motifs EF-Hand en Hélice α	Ca ²⁺ 2 sites de Ca ²⁺ / EF-Hand	EXAFS, UV-VIS, FTIR, TRFLS	ND	ND	2 carboxylates bidente et monodente +1 carbonyle + H ₂ O ou OH ⁻ selon le pH	5	ND	[58–60]
Phosvitine	Jaune d'œuf, fragment hyperphosphorylé de la vitellogénine	35	ND	Stockage du Fe ³⁺ , du Ca ²⁺ et du Mg ²⁺	ND	Fe ³⁺ , Cu ²⁺ et Mg ²⁺	FTIR, UV-VIS, TRFLS, absorption des rayons X (XAS)	ND	ND	Groupements phosphorylés monodentes + carboxylates	ND	ND	[73, 74]
Métallothionine	Ubiquitaire	6-10	ND	Homeostasie des métaux endogènes Détoxification de métaux lourds	ND	Métaux endogènes tels que Cu ²⁺ et Zn ²⁺	Quenching de fluorescence	3/2	ND	ND	Site 1 : 6,5 Site 2 : 5,6	ND	[54]
Vitellogénine (Vtg)	Jaune d'œuf	400	ND	Précurseur des protéines du jaune d'œuf	ND	Métaux endogènes	Quenching de fluorescence	714/1	ND	ND	Site 1 : 5,7 Site 2 : 4,9	ND	[63]
Acétylcholine estérase (AChE)	Enzyme membranaire dans l'organisme humain	68	ND	Transmission de l'influx nerveux à travers les synapses cholinergiques	ND	Zn ²⁺	Quenching de fluorescence	694/1	ND	ND	Site 1 : 8,1 Site 2 : 6,6	ND	[63]

De ce tableau, il ressort que lorsque les atomes engagés dans la complexation de l' UO_2^{2+} ont pu être identifiés, ces derniers sont principalement des oxygènes des groupements phosphates, carboxylates ou carbonyles issus des aspartates et des glutamates, en adéquation avec la théorie HSAB et les prédictions bio-informatiques. Par ailleurs, l'interaction de l' UO_2^{2+} avec les protéines semble modifier la structure native de certaines d'entre-elles et donc altérer leur fonction, comme c'est le cas pour l'apotransferrine (apoTf), l'albumine (HSA) et l'ostéopontine (OPN). Cependant, aucune perte de fonction n'a été observée avec la Féтуine-A (FETUA) [6]. De plus, la phosphorylation des protéines joue un rôle important dans la complexation de l' UO_2^{2+} , ce qui est le cas pour l'OPN piégeant 6 à 9 ions uranyles [7], et la Vitellogenine contenant un fragment phosphovitine hyperphosphorylé [63]. La phosphorylation a également un impact sur l'interaction de l' UO_2^{2+} avec la calmoduline [58].

En plus de ces techniques, un criblage des protéines cibles de l' UO_2^{2+} par résonance plasmonique de surface (SPR) a été mis au point. Cette approche consiste à injecter un échantillon contenant un complexe UO_2^{2+} -protéine dans un canal microfluidique sur lequel un anticorps monoclonal jouant le rôle d'un biocapteur est immobilisé. La fraction d' UO_2^{2+} non complexé interagit avec ce biocapteur. De la dicarboxyphénanthroline (DCP) est éluée dans le canal pour se lier à l' UO_2^{2+} piégé et pour agir comme sonde amplifiant les variations d'indice de réfraction, directement proportionnelles à la concentration d' UO_2^{2+} libre [64]. Cette stratégie indirecte a permis de mesurer les constantes de dissociations apparentes de complexes UO_2^{2+} -protéines et d'identifier les protéines cibles potentielles de l' UO_2^{2+} . Cette approche a été adoptée pour évaluer la biodistribution de l' UO_2^{2+} dans le sérum humain et a permis d'identifier la FETUA comme cible majeure de ce cation (Figure 10) [6].

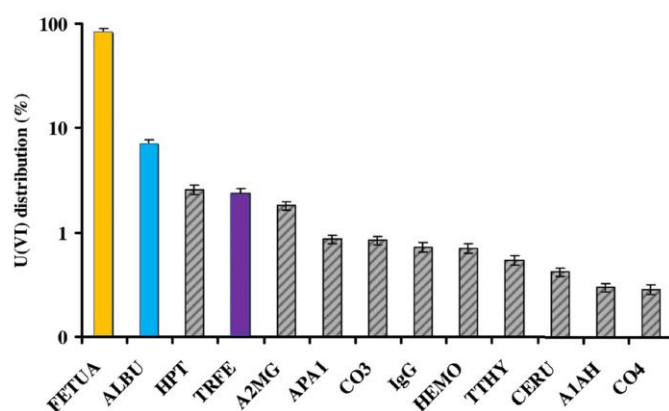


Figure 10 : Biodistribution de l' UO_2^{2+} parmi 13 protéines sériques du sérum humain, calculée à partir des constantes apparentes de dissociation obtenues par SPR. FETUA : féтуine-A ; ALBU : albumine ; HPT : haptoglobuline ; TRFE : transferrine ; A2MG : α -2-macroglobuline ; APA1 : apolipoprotéine A1 ; CO3 : complément sérum 3 ; IgG : immunoglobuline ; HEMO : hémopexine ; TTHY : transthyretine ; CERU : céruloplasmine ; A1AH : α -1-glycoprotéine ; CO4 : complément sérum 4. Seule la FETUA est issue du sérum bovin et a été purifiée, les autres protéines sont commerciales [6].

Malgré l'ensemble des informations obtenues, la nature, le nombre et la localisation des sites d'interactions de l' UO_2^{2+} restent dans certains cas inconnus. Or, ces informations sont cruciales pour

mieux comprendre les mécanismes de toxicité de l' UO_2^{2+} et développer des agents décorporants sélectifs.

2.2. Les peptides biomimétiques

Les peptides étant les briques de construction des protéines, ce sont des modèles simples qui peuvent être utilisés pour reproduire ou « mimer » les sites probables d'interaction de l' UO_2^{2+} dans ses protéines cibles *in vivo* [8]. Ces peptides biomimétiques sont des outils efficaces permettant de caractériser finement la coordination de l' UO_2^{2+} dans les protéines, de déterminer les paramètres clés à l'origine de la haute affinité de l' UO_2^{2+} pour ses protéines cibles et par extension d'apporter des éléments pour le développement d'agents de décorporation par chélation.

➤ *Les peptides linéaires*

Généralement, les peptides linéaires sont utilisés pour mimer des fragments spécifiques d'une protéine, afin de mesurer l'impact de certains acides aminés sur la complexation avec un métal d'intérêt. Ces peptides sont flexibles, ne présentent en général aucune structure définie et se structurent lors de la complexation à l' UO_2^{2+} [8]. A titre d'exemple, la séquence pSDEpSDE, identifiée comme site actif dans l'OPN, inhibiteur de croissance calcique, a été proposée comme un site potentiel d'interaction de l' UO_2^{2+} dans cette protéine. L'hexapeptide linéaire H8V mimant cette séquence a été synthétisé et son interaction avec l' UO_2^{2+} étudiée par TRFLS, FTIR, EXAFS et ITC en combinaison avec des calculs DFT pour vérifier cette hypothèse [65]. L'implication d'un groupement phosphate dans la première sphère de coordination de l' UO_2^{2+} en plus d'un groupement carboxylate bidentate et de deux molécules d'eau a été démontrée par EXAFS de façon similaire à l'interaction de l' UO_2^{2+} avec l'OPN [65]. L'effet de la phosphorylation a été également étudié par l'intermédiaire d'un peptide représentatif du site 1 de la calmoduline par fluorescence, FTIR et ESI-MS. La phosphorylation de la thréonine de ce site a induit une augmentation des constantes d'affinité des complexes d' UO_2^{2+} , mesurées par fluorescence, d'un facteur de 5 à pH 6 et de 15 à pH 7 [66]. L'implication des groupements phosphates dans la coordination de l' UO_2^{2+} a été également mise en évidence avec des peptides synthétiques représentatifs d'une séquence spécifique de la β -caséine, protéine du lait bovin, par TRFLS et par titrage potentiométrique. Une affinité plus importante pour l' UO_2^{2+} a été obtenue avec les peptides modèles phosphorylés par rapport à leurs homologues non-phosphorylés [67]. Ces études soulignent l'importance du rôle des groupements phosphates dans la complexation de l' UO_2^{2+} par les protéines. Cependant, des peptides linéaires mimant une courte séquence peptidique de la protéine ne reflètent pas sa contribution globale dans la coordination, c'est à dire quand des résidus d'une autre séquence éloignée sont impliqués dans la complexation [8]. Ainsi, une

autre approche a été entreprise, à travers la conception et synthèse de peptides cycliques, dans le but de proposer des structures pertinentes des sites de coordination de l' UO_2^{2+} dans les protéines.

➤ Les peptides cycliques

Contrairement aux peptides linéaires, les peptides cycliques ont une structure organisée et pré-orientée, adaptée à la géométrie de l' UO_2^{2+} pour une coordination efficace dans son plan équatorial [8]. Les contraintes liées à la réorganisation structurale du peptide lors de sa complexation sont ainsi réduites, impliquant une augmentation de la stabilité des complexes. Lebrun *et al.* [68] ont conçu et synthétisé des peptides biomimétiques des sites de coordination de l' UO_2^{2+} dans l'OPN en adoptant une structure cyclique comprenant une séquence de dix acides aminés naturels, avec quatre chaînes latérales orientées vers le plan équatorial de l' UO_2^{2+} (Figure 11).

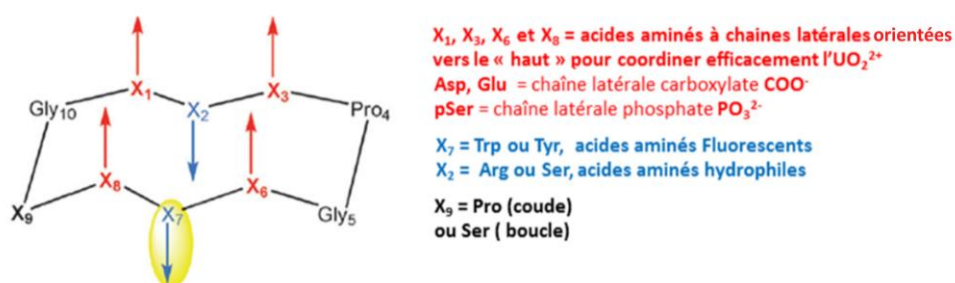


Figure 11: Structure des cyclodécapeptides biomimétiques de protéines affines pour l' UO_2^{2+} [68].

Ces peptides définissent deux faces distinctes :

- La première présentant les chaînes latérales de quatre acides aminés dans les positions X = 1, 3, 6 et 8, orientés vers le plan de coordination de l'uranyle (en rouge).
- La deuxième comportant les chaînes latérales du tryptophane (Trp) ou de la tyrosine (Tyr) dans la position 7 et de l'arginine (Arg) ou de la sérine (Ser) dans la position 2 (en bleu). Les acides aminés aromatiques Trp et Tyr sont utilisés comme sondes de fluorescence pour suivre la réaction de complexation de l' UO_2^{2+} . Les acides aminés Arg et Ser hydrophiles favorisent la solubilisation du peptide en milieu aqueux.

Dans les positions 4-5 et 9-10 (Figure 11), deux séquences prolyglycine (Pro-Gly) assurent l'organisation de la structure en feuillet β . Afin d'examiner l'effet de la phosphorylation sur la complexation de l' UO_2^{2+} , les 4 résidus Glu des positions 1, 3, 6 et 8 ont été progressivement remplacés par des résidus phosphosérines (pSer) (Figure 12).

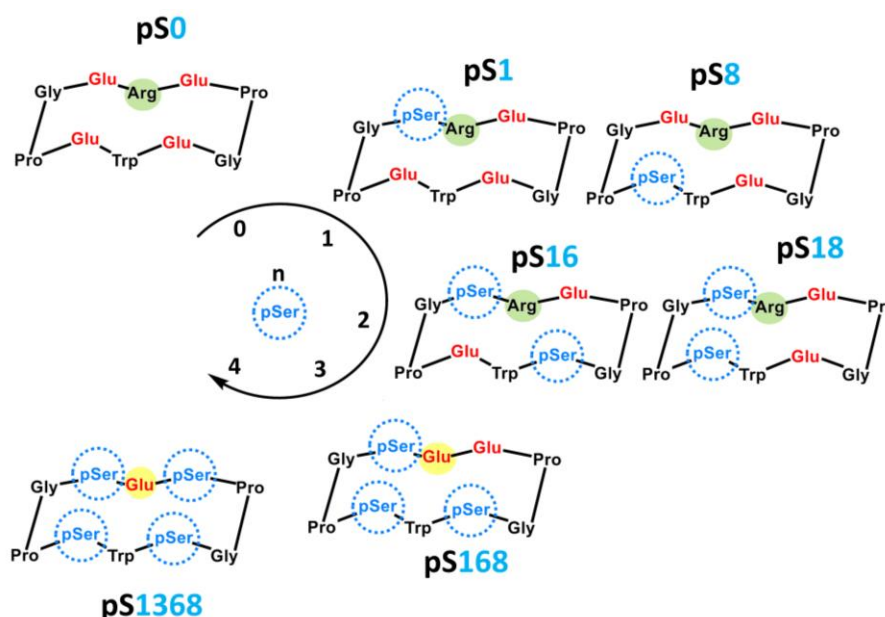


Figure 12 : Structure des cyclodécapeptides cycliques, à nombre croissant de groupements pSer

Les complexes d' UO_2^{2+} formés avec ces peptides ont été caractérisés par ESI-MS en milieu acétate d'ammonium 20 mmol L^{-1} , dichroïsme circulaire dans l'eau à pH 7,4 et spectroscopie de fluorescence en milieu HEPES 20 mmol L^{-1} + NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ en présence de l'acide iminodiacétique (IDA) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Les complexes contenant pS0, pS1 et pS18 sont uniquement stœchiométrie 1-1 lorsque l' UO_2^{2+} et les peptides sont en mélange équimolaire. Les peptides pS16, pS168 et pS1368 conduisant à la formation de complexes de stœchiométrie 2-1, attribués à la possibilité de coordination de deux ions UO_2^{2+} par des phosphates pontant. Par ailleurs, la localisation des résidus pSer dans le squelette peptidique des isomères de position mono- (pS1, pS8) et di-phosphorylés (pS16, pS18), n'a pas montré d'impact significatif sur la stabilité des complexes, mais influence leur structuration en feuillet β . Finalement, l'introduction progressive des groupements pSer induit une augmentation linéaire de la constante de stabilité conditionnelle des complexes à pH = 7,4 mesurée par extinction de fluorescence du tryptophane suite à l'ajout progressive de l'uranium [9,68–70] comme le montre la Figure 13.

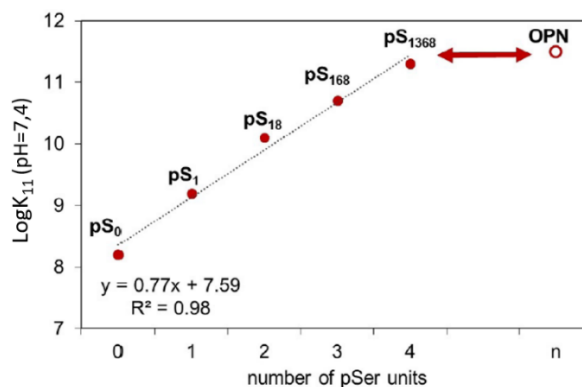


Figure 13 : Constantes de stabilité conditionnelle des complexes UO_2^{2+} -peptides à pH = 7,4 en fonction du nombre de groupements pSer [9].

La constante de stabilité du complexe d' UO_2^{2+} avec le peptide pS1368, contenant quatre résidus pSer est $\log K^{\text{pH}=7,4}(\text{UO}_2(\text{pS1368})) = 11,3$, similaire à celle avec l'OPN qui est de 11,5 [51]. Ce peptide peut donc être considéré comme un modèle pertinent du site de coordination du cation uranyle dans l'OPN. Bien que l'OPN présente une structure aléatoire, les résultats obtenus avec ce peptide suggèrent que la forte affinité de l'OPN pour UO_2^{2+} provient de sa capacité à organiser les quatre groupements phosphates des résidus phosphosérines autour du cation, comme illustré dans la Figure 14.

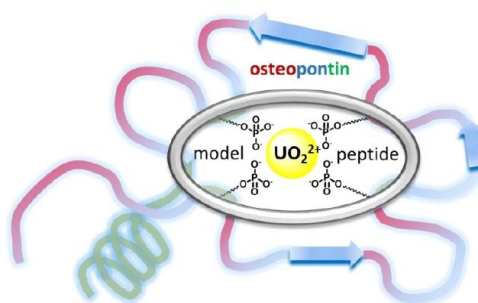


Figure 14 : Site de coordination du cation uranyle proposé pour l'OPN [71].

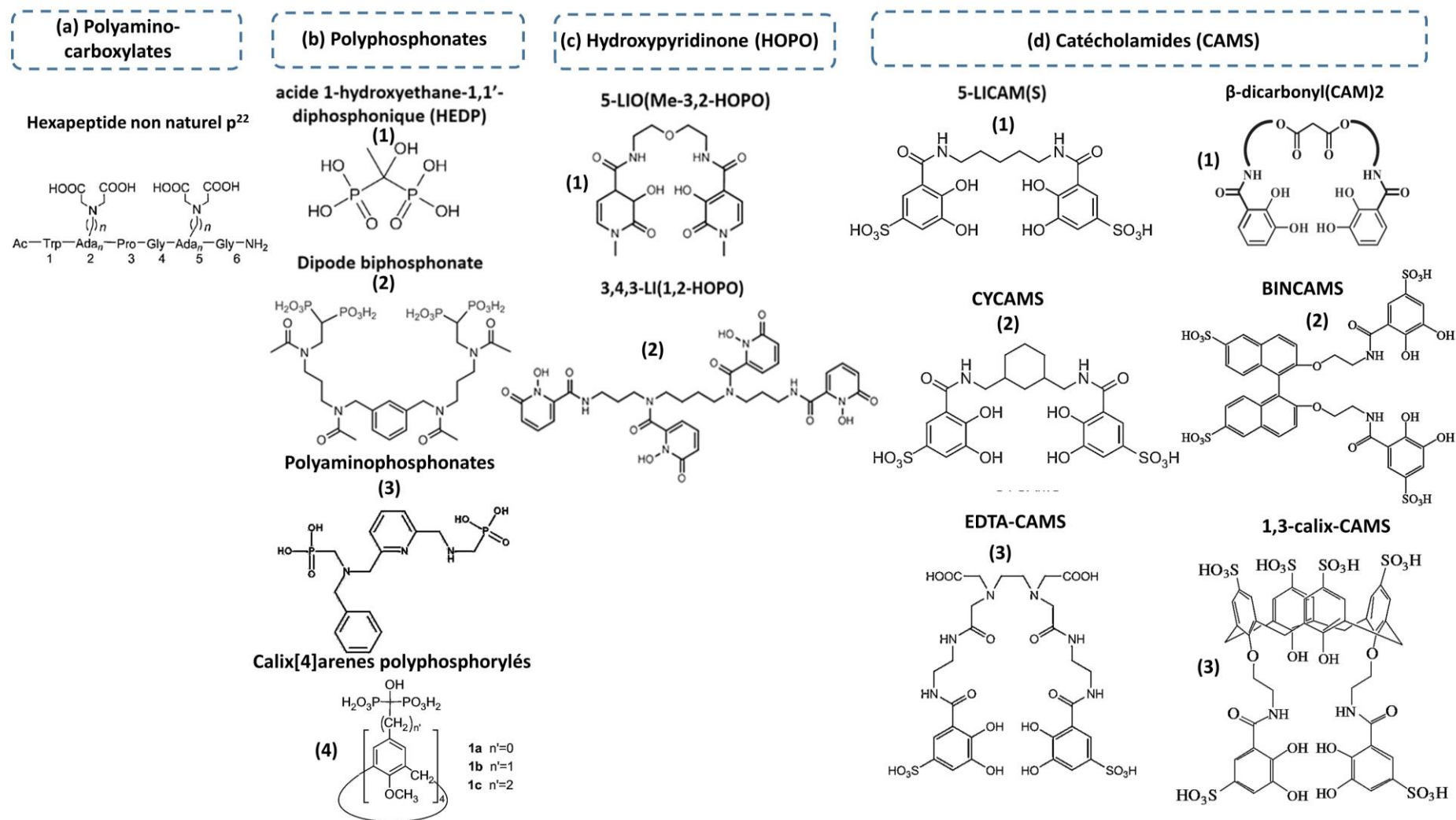
Cette approche biomimétique a donc permis de proposer des sites de coordination de l' UO_2^{2+} dans l'OPN et de rationaliser le rôle des fonctions phosphates dans la coordination de ce dernier.

La sélectivité des cyclodécapeptides pour l' UO_2^{2+} a été évaluée en présence du Ca^{2+} , par compétition directe ou par comparaison des constantes de stabilité $\log K$ des complexes de Ca^{2+} et d' UO_2^{2+} avec les peptides à $\text{pH} = 7,4$. Elles sont de 10^4 pour $\text{Ca}(\text{pS0})$ et de 10^2 pour $\text{Ca}(\text{pS1368})$ alors que $\log K^{\text{pH}=7,4}(\text{UO}_2(\text{pS1368})) = 11,3$ [9]. Par conséquent, le peptide pS1368 présente une haute sélectivité vis-à-vis de l' UO_2^{2+} , rendant sa structure comme point de départ prometteur pour la conception d'agents de décorporation sélectifs de l' UO_2^{2+} . La structure de ces peptides cycliques phosphorylés a été récemment adoptée par Zhang *et al.* [72] mais sous forme de cyclohexapeptides, afin de comprendre l'impact d'une structure phosphorylée plus compacte comportant 1 à 2 groupements phosphates, sur l'affinité pour l' UO_2^{2+} . L'effet de la phosphorylation de ces petites structures peptidiques sur la complexation de l'uranyle a été examiné par ESI-MS, FTIR, fluorescence, EXAFS et par des calculs théoriques DFT. Les résultats ont montré que le degré de phosphorylation n'avait pas d'impact significatif sur la stabilité et la stœchiométrie des complexes d' UO_2^{2+} , contrairement à ce qui a été observé pour les cyclodécapeptides. En effet, la structure compacte de ces hexapeptides empêche la convergence des groupes phosphates vers le métal montrant l'importance de la structure du peptide sur son interaction avec l' UO_2^{2+} [72].

2.3. Les molécules décorporantes

Suite à une contamination par l'uranium, un traitement potentiel consiste en une thérapie par chélation, qui vise à complexer le cation UO_2^{2+} par un agent décorporant, étant une molécule chimique

permettant de former un complexe très stable afin de favoriser son excrétion. A ce jour, seul le carbonate est utilisé comme agent décorporant mais présente une efficacité limitée aux reins [73]. Par conséquent, différentes familles de molécules décorporantes potentielles de l' UO_2^{2+} ont été explorées, notamment leur mode d'interaction avec l' UO_2^{2+} . Les principales reportées dans la littérature sont recensées dans la Figure 15.


 Figure 15 : Différentes familles de molécules potentielles pour la décoration de l'uranyle *in vivo*.

➤ *Les polyaminocarboxylates*

L'acide Diéthylène Triamine Penta Acétique (DTPA) est largement utilisé pour la décorporation *in vivo* des métaux et des actinides en cas de contamination, mais son efficacité pour la décorporation de l' UO_2^{2+} est limitée [74]. En effet, la taille et la géométrie particulière de l' UO_2^{2+} ne permettent pas la coordination des atomes donneurs du DTPA dans le plan équatorial du cation UO_2^{2+} [74]. Certains groupes se sont alors orientés vers la modification de la structure du DTPA mais également de l'acide Éthylène Diamine Tétra Acétique (EDTA), afin de les rendre plus adaptés aux contraintes stériques imposées par la géométrie de l' UO_2^{2+} . Un hexapeptide comportant des acides aminés non naturels (Ada_n) à fonctions iminodiacétate, dans une séquence peptidique naturelle a été développé initialement pour la décorporation des lanthanides, issus des agents de contraste employés pour l'imagerie médicale, et été ensuite évalué pour le cation UO_2^{2+} [71,75] (Figure 15-a). Les propriétés de complexation du peptide P^{22} avec l' UO_2^{2+} ont été étudiées par ESI-MS, dichroïsme circulaire et spectroscopie de fluorescence. L'addition croissante d'équivalents d' UO_2^{2+} à une solution de P^{22} à pH 7,4 a conduit uniquement à un complexe de stœchiométrie 1-1. La constante de stabilité du complexe $\text{UO}_2(\text{P}^{22})$ a été mesurée par fluorescence à $10^{9,5}$, soit 25 fois plus importante que celle du complexe $\text{UO}_2(\text{EDTA})$ dans les mêmes conditions. L'espaceur peptidique Pro-Gly, plus flexible que l'espaceur alkyl de l'EDTA, permet aux deux fonctions aminodiacétates de se positionner dans le plan équatorial de l' UO_2^{2+} avec moins de contraintes stériques que celles imposées par l'EDTA [71]. Ces résultats reflètent l'influence de la structure du ligand chélateur et de sa flexibilité sur la stabilité des complexes d' UO_2^{2+} .

➤ *Les polyphosphonates*

L' UO_2^{2+} présentant une affinité importante pour les groupements phosphates, des molécules polyphosphorylées commerciales comme l'acide 1-hydroxyéthane-1,1'-diphosphonique (HEDP) [76] (Figure 15-b,1) ou synthétiques à base de dipodes phosphorylés [77,78], de pyridine [79] et de macrocycles calixarènes [80] (Figure 15-b,2,3 et 4) ont été considérées pour la décorporation de l' UO_2^{2+} *in vivo*. L'interaction de l' UO_2^{2+} avec les molécules multiphosphorylées a été caractérisée généralement par des techniques spectroscopiques comme la fluorescence, l'infrarouge et la RMN et aussi par de spectrométrie de masse (ESI-MS). L'HEDP forme des complexes d' UO_2^{2+} de stœchiométrie 1-1 pour des faibles concentrations en UO_2^{2+} , inférieures à 10^{-4} mol L^{-1} , et de stœchiométrie 1-2 à des concentrations plus élevées, de l'ordre de 10^{-2} mol L^{-1} . Une constante de stabilité : $\log K(\text{UO}_2(\text{HEDP})) = 7,7$ à pH 7 et une bonne sélectivité vis-à-vis de l' UO_2^{2+} en présence de K^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} ont été obtenues par TRFLS. Cette sélectivité est moins importante en présence du Fe^{3+} et du Zn^{2+} mais ne semble pas être problématique puisque ces métaux sont moins abondants que les autres métaux *in vivo* et sont donc moins susceptibles d'entrer en compétition avec l' UO_2^{2+} pour se complexer à l'HEDP [76].

Une approche basée sur l'UV-VIS a été entreprise dans le but de cribler les propriétés complexantes de bibliothèques de molécules phosphorylées vis-à-vis de l' UO_2^{2+} . La stratégie repose sur la compétition de ces molécules phosphorylées avec le sulfochlorophénol (SCP) contenant des groupements SO_3^- et qui forme un complexe coloré avec l' UO_2^{2+} dont la constante de stabilité est $\log K^{7,4} = 19,7$. Le déplacement du ligand SCP par les ligands phosphorylés, entraîne une disparition de la couleur caractéristique du complexe avec le SCP et peut donc être suivi par UV-Vis [77].

En adoptant la même approche, les bisphosphonates dipodes (Figure 15-b,2) ont montré une affinité remarquable pour l' UO_2^{2+} , avec une constante de stabilité allant jusqu'à $\log K^{\text{pH}=7,4} = 17$, tout comme les dérivés phosphorylés à base de pyridine [79] et de macrocycles calixarènes [80] avec $\log K^{\text{pH}=7,4} = 17$ et d'environ 17,4 respectivement.

Des études *in vivo* chez les rats et *in vitro* ont été menées respectivement avec le dipode bisphosphonate [78] et le dérivé phosphorylé de pyridine [79]. Le dipode bisphosphonate a entraîné une augmentation de 10% du taux d'excrétion de l' UO_2^{2+} et une diminution de la déposition de ce dernier dans les reins, chez des rats ayant subi une injection intraveineuse de $30 \mu\text{mol kg}^{-1}$ de $^{233}\text{UO}_2^{2+}$ -bisphosphonate [77,78]. Les études préliminaires *in vitro* réalisées par TRFLS par compétition entre le dérivé de pyridine phosphorylé et la calmoduline (CaM) vis-à-vis de la complexation de l' UO_2^{2+} à pH 5,5 montrent la capacité de cette molécule à déplacer l' UO_2^{2+} du complexe l' $\text{UO}_2(\text{CaM})$ et donc sa sélectivité vis-à-vis de cet élément [79]. L'ensemble de ces résultats montrent que les molécules dipodes bisphosphonates et les dérivés de pyridine phosphorylés sont des candidats potentiels pour la décorporation de l' UO_2^{2+} , mais des études de toxicité plus approfondies sont encore indispensables.

➤ Les sidérophores

Au cours des dernières décennies, des agents chélatants contenant des groupements appartenant à la famille des hydroxypyridinones (HOPO) ou des catécholamides (CAM) ont été conçus, synthétisés et leurs modes d'interaction avec l' UO_2^{2+} caractérisés par des techniques spectroscopiques classiques. Dans la famille HOPO, les ligands 5-LIO(Me-3,2-HOPO) et 3,4,3-LI (1,2-HOPO), (Figure 15-c), des études antérieures ont montré la potentialité de ces molécules en tant qu'agents décorporants [81]. Le 3,4,3-LI (1,2-HOPO) comportant 4 hydroxypyridinones, a été le plus étudié et ses interactions avec l' UO_2^{2+} ont été caractérisées par UV-Vis, Infrarouge et EXAFS. L' UO_2^{2+} forme des complexes de stœchiométrie 1-1 et 2-1 quand le rapport $[\text{UO}_2^{2+}]/[\text{HOPO}]$ augmente et que le nombre de coordination dans le plan équatorial de l'uranyle est 6 [82]. L'efficacité de ce ligand en tant qu'agent décorporant de l' UO_2^{2+} a été déterminée plus finement par une approche impliquant la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) combinée à une quantification hors ligne par spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS), qui sera détaillée ultérieurement. Le 3,4,3-LI (1,2-HOPO), en compétition avec la FETUA pour la complexation de l' UO_2^{2+} , a limité la formation de complexes $\text{UO}_2(\text{FETUA})$, en

complexant la totalité de l' UO_2^{2+} même lorsqu'il est en léger excès, notamment dès les proportions UO_2^{2+} -HOPO-FETUA 1-1,5-1. Ce ligand est un agent de chélation prometteur de l' UO_2^{2+} *in vivo* [82]. Dans la famille CAM, différentes structures ont été synthétisées, contenant deux sulfocatécholamides (CAMS) séparés par des espaceurs de nature et de structures différentes, notamment les espaceurs polyaminocarboxylates à base d'EDTA [83], diamine cyclique (CY) ou linéaire (LI) [84], macrocycles calixarene (Calix) [85] ou binaphtyle (BIN) [86] ou contenant deux catécholamines (CAM) séparés par un espaceur dicarboxyle [72,87] (voir Figure 15-d). Les constantes de stabilité avec l' UO_2^{2+} ont été calculées principalement par UV-Vis à pH 7,4, selon l'approche par compétition avec le chromophore SCP complexé à l' UO_2^{2+} , comme décrit en amont. Les données obtenues montrent que le ligand CYCAMS contenant un espaceur cyclique présente la plus forte affinité pour l'uranyle avec $\log K(\text{UO}_2(\text{CYCAMS})) = 17,5$, suivi par le 5-LICAMS contenant un espaceur linéaire avec $\log K(\text{UO}_2(\text{LICAMS})) = 17$, soulignant l'impact de la structure de l'espaceur sur la stabilité des complexes [84]. Par ailleurs, des études de toxicologie *in vivo* réalisées sur des souris ont montré que le 5-LICAMS favorisait l'excrétion de l'uranium déposé dans les os uniquement lorsqu'il était injecté rapidement, 5 à 30 min après contamination [74].

Malgré les propriétés de chélation intéressantes de certains ligands de la famille des sidérophores, mettant en valeur leur potentialité en tant qu'agents décorporants, des études de toxicologie *in vitro* et *in vivo* plus approfondies sont encore nécessaires.

➤ Les polyéthylènimines

Les macromolécules polymériques, notamment les polyéthylènimines-méthylphosphonate (PEI-MP), peuvent être considérées comme une nouvelle famille de molécules décorporantes (Figure 16).

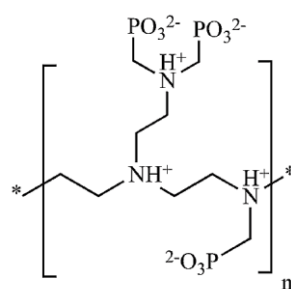


Figure 16 : Structure chimique du monomère du PEI-MP.

L'emploi de ces macromolécules pour la décorporation présente l'avantage d'une capacité de chargement en UO_2^{2+} très importante contrairement aux ligands assez petits pour lesquels les stœchiométries UO_2^{2+} -ligands sont principalement 1-2. L'interaction de l' UO_2^{2+} avec les PEI-MP a été caractérisée par spectroscopie d'émission optique à source plasma à couplage inductif (ICP-OES), titrage colorimétrique, EXAFS et FT-IR. Les résultats obtenus par la combinaison de ces techniques ont

montré que le PEI-MP était capable de piéger entre 0,56 and 0,80 mg d' UO_2^{2+} / mg PEI-MP et que la sphère de coordination de l' UO_2^{2+} , sondée par EXAFS et FT-IR, était entièrement occupée par des groupements phosphates monodentes issus des chaînes du polymère. Ces macromolécules peuvent donc être des outils intéressants pour la décorporation de l'uranium *in vivo* [88].

2.4. Les petits ligands organiques et inorganiques

Des approches expérimentales impliquant des techniques spectroscopiques, particulièrement la TRFLS [89] et théoriques par des calculs à partir de bases de données thermodynamiques [30], ont été entreprises dans le but d'identifier les petits ligands organiques et inorganiques liés à l' UO_2^{2+} dans différents milieux. Les ligands se complexant principalement aux actinides en milieux biologiques sont classifiés par famille et recensés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Principaux petits ligands inorganiques et organiques se liant aux actinides et leur concentration (mol L^{-1}) dans quelques compartiments biologiques [22].

Compartiments	Sang	Salive	Suc gastrique	
pH	7,4	5,6 - 7,6	1,5 - 5,5	
Inorganiques	Carbonate	$2,5 \times 10^{-2}$	$6,6 \times 10^{-3}$	
	Phosphate	$1,1 \times 10^{-3}$	$3,7 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^{-3}$
	SCN^-		$2,1 \times 10^{-3}$	
	F^-		$7,3 \times 10^{-6}$	
	SO_4^{2-}	$3,3 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-4}$	
	Cl^-	$9,0 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$
	NH_4^+		$2,6 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^{-3}$
Organiques	Ascorbate		$8,0 \times 10^{-6}$	$4,7 \times 10^{-5}$
	Citrate	$1,6 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-5}$	
	Lactate	$1,5 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-4}$
	Oxalate	$9,2 \times 10^{-6}$		
	Urée		$3,0 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-4}$

Concernant le compartiment sanguin, les carbonates sont les plus abondants, après les ions Cl^- , et ont une concentration d'environ $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (Tableau 4). Les calculs thermodynamiques ont montré que l' UO_2^{2+} est majoritairement complexé aux carbonates dans des milieux biologiques simulés sous forme $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ et $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ dont les constantes de stabilité respectives sont $\log K = 16,61$ et $21,84$ [29,30]. Une fraction moins importante est complexée aux phosphates et aux citrates, dont les concentrations respectives sont environ 25 et 100 fois moins importante que celle des carbonates dans compartiment sanguin (Tableau 4). La complexation de l' UO_2^{2+} avec les phosphates dans un sérum de rat commercial a été mise en évidence pour la première fois par TRFLS [89]. L'étude de l'interaction de l' UO_2^{2+} avec les citrates, Cl^- et SO_4^- en milieux aqueux occupe une place plus importante dans les applications environnementales et industrielles et est généralement menées par des techniques classiques d'analyse directe comme la FT-IR, l'ESI-MS [90] et l'EXAFS [91].

Le mode d'interaction de l'uranium sous sa forme UO_2^{2+} avec des ligands d'intérêt biologique notamment les protéines, les peptides biomimétiques, les molécules décorporantes et les petits ligands organiques et inorganiques est caractérisé principalement par les techniques spectroscopiques classiques (UV-VIS), infrarouge (IR), fluorescence résolue ou non dans le temps (TRFLS), absorption de rayons X (EXAFS), Dichroïsme circulaire (CD) et RMN [92]. Des approches théoriques basées sur des calculs DFT « Density Functional Theory », sur des données thermodynamiques, sur des algorithmes de criblage de protéines dans les « protéine data bank » ont également été employées individuellement ou en soutien à des approches expérimentales. La combinaison de ces techniques a permis de sonder la sphère de coordination de l' UO_2^{2+} et donc d'identifier le nombre et la nature des atomes ainsi que le type des liaisons engagées dans la coordination, et de déterminer la stœchiométrie et la stabilité des complexes formés. L'ensemble de ces données sont primordiales pour approfondir la biocinétique et la biodistribution de l' UO_2^{2+} dans l'organisme humain, élucider les mécanismes de toxicité dans lesquels il est impliqué à l'échelle moléculaire et développer des agents décorporants sélectifs. Comme détaillé dans les paragraphes précédents, ces techniques ont été souvent employées pour l'analyse en séquentiel de complexes d' UO_2^{2+} et souvent avec des échantillons modèles simplifiés et sans séparation préalable. Les techniques basées sur la spectrométrie de masse à source électrospray (ESI) ou plasma à couplage inductif (ICP) hors ligne ou en ligne par couplage à une technique séparative, sont beaucoup moins employées dans ces études bien qu'elles offrent des possibilités plus larges pour la caractérisation structurale et élémentaire des espèces d' UO_2^{2+} .

3. Techniques basées sur la spectrométrie de masse pour l'analyse des complexes d' UO_2^{2+}

De par leurs caractéristiques, les techniques basées sur la spectrométrie de masse avec une source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et avec une source plasma à couplage inductif (ICP-MS) sont adaptées à la caractérisation structurale et élémentaire d'espèces métalliques. Elles peuvent être utilisées hors ligne ou en ligne, couplées à une technique séparative en vue d'isoler les différents constituants d'un échantillon en amont de leur analyse. Les différentes études de caractérisation et de quantification de complexes d' UO_2^{2+} ont été réalisées dans un contexte toxicologique, environnemental ou nucléaire avec ces deux techniques sont détaillées dans les paragraphes qui suivent.

3.1. Par spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS)

L'ESI-MS est traditionnellement utilisée pour l'analyse des composés organiques, notamment dans les domaines de la protéomique et de la métabolomique [3]. Son processus d'ionisation peu énergétique offre la possibilité de pouvoir préserver au maximum la structure des espèces et donc d'étudier les interactions métal-ligands [93–96]. Des informations sur la spéciation du métal et son état d'oxydation ainsi que sur la stœchiométrie métal/ligand sont ainsi accessibles [97]. Cependant, cette technique présente des limitations, notamment concernant la corrélation entre les espèces formées en phase gazeuse avant détection et celles en solutions, ce qui nécessite bien souvent de confirmer les données avec celles obtenues par d'autres techniques. De plus, elle souffre d'effets de matrices pouvant engendrer dans certains cas des phénomènes de suppressions du signal. Finalement, la réponse en ESI-MS est dépendante de la structure des analytes, leur charge et leurs propriétés physico-chimiques, rendant la quantification des complexes métalliques par cette technique très délicate [94]. L'ESI-MS a néanmoins été employée pour la caractérisation de complexes d' UO_2^{2+} dans diverses applications et plusieurs approches ont été proposées pour les quantifier.

3.1.1. Caractérisation structurale

Les travaux de caractérisation des complexes d' UO_2^{2+} par ESI-MS peuvent être divisés en deux grandes catégories (i) les études fondamentales pour explorer la réactivité de l' UO_2^{2+} en phase gazeuse et sonder sa sphère d'hydratation et (ii) les études de caractérisation structurale de complexes en solution. Lorsqu'un métal présente plusieurs isotopes, ses complexes sont aisément identifiables dans les spectres de masse grâce à son motif isotopique. L'abondance de l'isotope ^{238}U de l' $^{\text{nat}}\text{U}$ étant supérieure à 99%, il ne présente pas de signature isotopique caractéristique et peut être considéré comme mono-isotopique. Par conséquent, l'identification de complexes contenant de l' $^{\text{nat}}\text{U}$ est plus délicate, sachant qu'ils n'ont pas de signature isotopique caractéristique.

Concernant les études fondamentales, des fragmentations multiples par « Collision Induced Dissociation » (CID) de complexes d' UO_2^{2+} contenant des ligands inorganiques comme les ions nitrate (NO_3^-) ou organiques comme l'acétate (CH_3COO^-) ou l'acétonitrile (CH_3CN), ont été réalisées en milieu aqueux ou hydro-organique en utilisant un spectromètre de masse muni d'un analyseur à trappe ionique linéaire (LIT) [98–102]. A titre d'exemple, les fragmentations successives du complexe $[\text{UO}_2(\text{ACN})_4]^{2+}$ ont conduit à l'obtention de l'uranyle libre UO_2^{2+} , permettant de sonder sa sphère de coordination [100] (Figure 17).

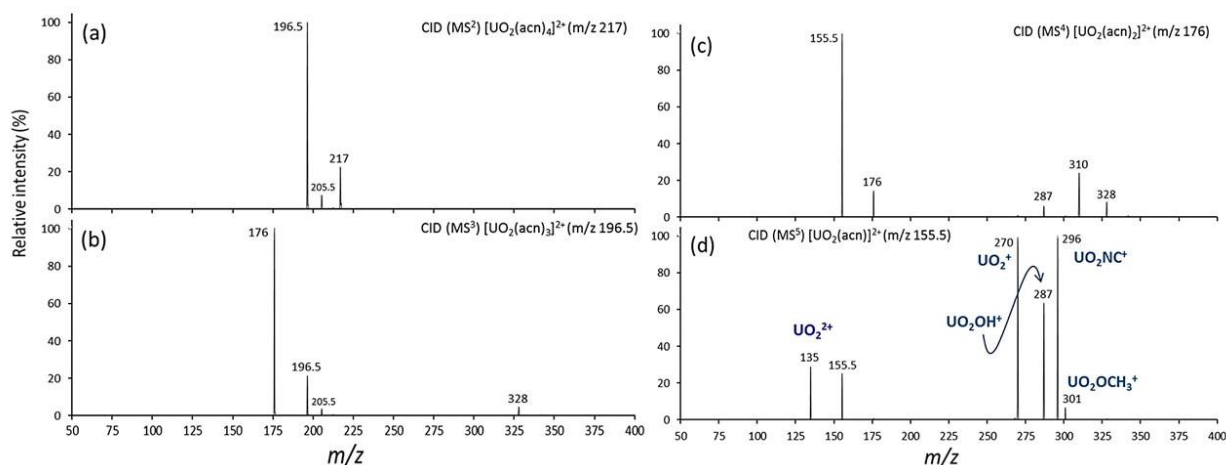


Figure 17 : Spectres de masse des ions produits de $[\text{UO}_2(\text{ACN})_4]^{2+}$ après fragmentations multiples par CID (a) MS^2 , (b) MS^3 , (c) MS^4 , et (d) MS^5

Les expériences en mode MS^n permettent également de sonder la sphère d'hydratation du cation UO_2^{2+} . Les résultats expérimentaux combinés à des calculs de modélisation par DFT ont montré que le taux d'hydratation du cation UO_2^{2+} est influencé par la nature du ligand. La tendance relative des complexes UO_2^{2+} -ligand à former des complexes monohydratés suit l'ordre suivant : acétate (CH_3COO^-) > nitrate (NO_3^-) > hydroxyde (OH^-) [103].

L'ESI-MS permet également de caractériser les complexes d' UO_2^{2+} en solution et d'accéder à la spéciation de cet élément dans divers domaines d'applications. Par exemple, des complexes d' UO_2^{2+} formés avec des ligands de type amidoxime (DHIP, DHPD et DHED) pour l'extraction de l' UO_2^{2+} de l'eau de mer [104], d'acide α -hydroxyisobutyrique (HIBA) et mandélique (MA) [105,106] ou encore de di- et tri-butylphosphate (DBP et TBP) [107] pour la mise au point de méthodes analytiques ou d'extraction liquide/liquide dans le domaine du nucléaire ont été caractérisés par cette technique.

Dans le but de quantifier par l' UO_2^{2+} dans les eaux naturelles dopées avec de l'acide acétique pour complexer l' UO_2^{2+} sous forme de $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})$, ce dernier a été caractérisé mode balayage complet (Full scan) et par fragmentation MS^3 , ce qui a conduit à la formation de l'ion produit UO_3^- [108] (Figure 18).

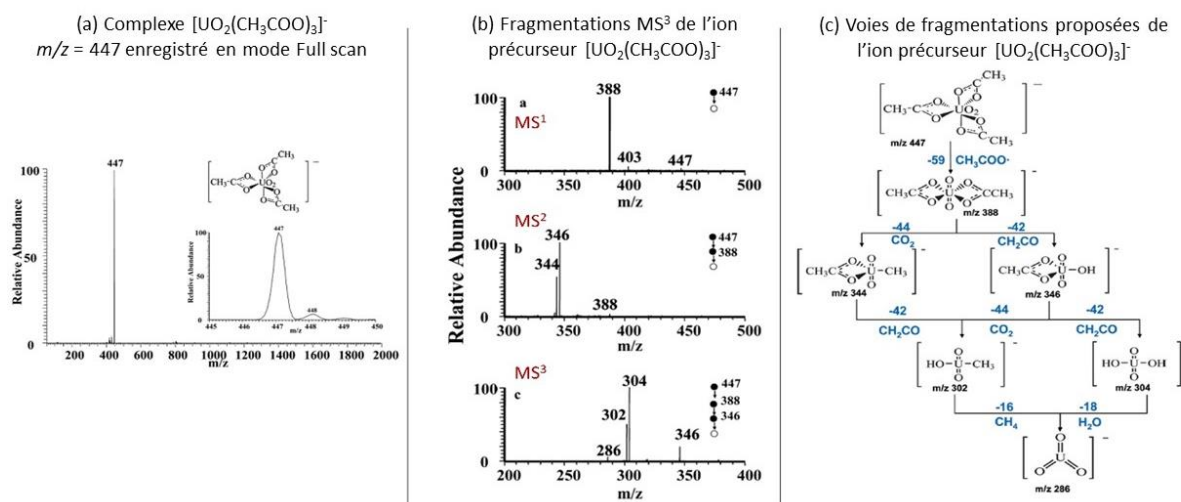


Figure 18 : (a) Spectre de masse ESI-MS (-) du complexe $[\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3]^-$ enregistré en mode full scan, (b) Spectre de masse du complexe $[\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3]^-$ enregistré en mode MS^2 , (c) Voies de fragmentation proposées pour l'ion précurseur $[\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3]^-$.

Dans le cadre d'applications biologiques, l'interaction de l' UO_2^{2+} a été également étudiée avec l'acide 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonique (HEDP) pour la décorporation de l' UO_2^{2+} *in vivo* [76] et avec des cyclodécapptides biomimétiques pour explorer les sites de coordination de l' UO_2^{2+} dans l'ostéopontine [9,68,70,109]. On constate que les peptides avec 0 et 1 résidus pSer forment exclusivement des complexes d' UO_2^{2+} de stœchiométrie 1-1 alors que des complexes de stœchiométrie 2-1 sont également formés à partir de deux résidus pSer dans les peptides (Figure 19).

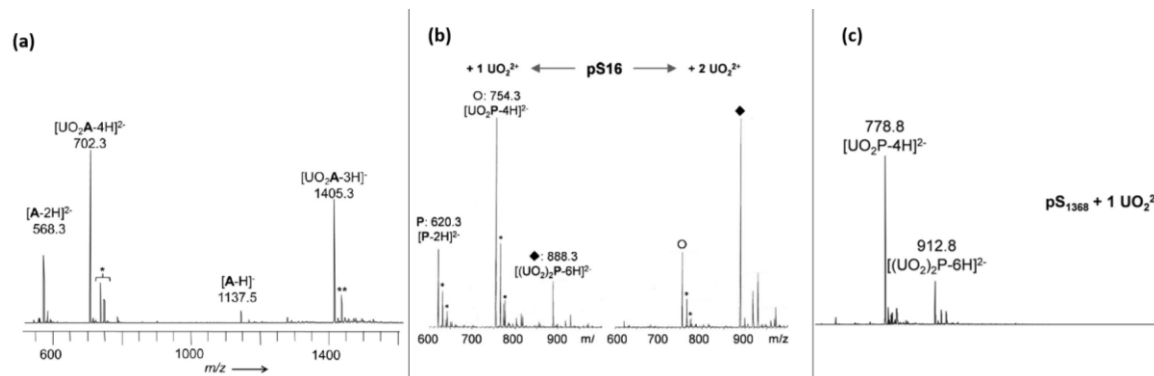


Figure 19 : Spectres de masse des complexes UO_2 -cyclodécapptides enregistrés en mode full scan (a) $\text{UO}_2(\text{A})$, avec A contenant 0 pSer, (b) $\text{UO}_2(\text{pS16})$, avec pS16 contenant 2pSer et (c) $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, avec pS1368 contenant 4 pSer en milieu acétate d'ammonium 20 mmol L^{-1} .

Du ligand libre est également observé dans les spectres de masse des complexes d' UO_2^{2+} formés avec les peptides à 0 et 2 résidus pSer, permettant de suggérer qu'une complexation partielle a eu lieu avec ces deux ligands. Pour un nombre de résidus pSer supérieur ou égal à deux, la complexation est considérée comme totale puisqu'on n'observe pas de ligand libre, ce qui montre une affinité plus importante de l' UO_2^{2+} pour les peptides à un degré de phosphorylation élevé.

L'ensemble de ces études est résumé dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Récapitulatif des études de caractérisations de complexes d' UO_2^{2+} par ESI-MS

		Système d'étude	Analyseur	Information	Réf
Etude du comportement de UO_2^{2+} en phase gazeuse		$\text{UO}_2(\text{NO}_3)$	3D quadripole ion trap (QIT)	Etude en phase gazeuse du comportement des complexes d' UO_2^{2+}	[98–100]
		$\text{UO}_2(\text{NO}_3)$	Fourier transform ioncyclotron resonance (FT-ICR)		
		$\text{UO}_2(\text{ACN})$	Trappe ionique linéaire 2D (LIT)		
		$\text{UO}_2(\text{NO}_3)$	Triple quadripole (QQQ)	Caractérisation des espèces $\text{UO}_2(\text{NO}_3)$ par MS^n en mode CID : - Etude du processus d'hydratation des complexes dans la phase gazeuse - Détermination du nombre de NO_3 coordonnés à UO_2^{2+} - Etude de la corrélation entre les espèces en phase gazeuse et en solution	[110]
		$\text{UO}_2(\text{citrate})$	Trappe ionique 3D et FT-ICR	- Etude du comportement des complexes $\text{UO}_2(\text{citrate})$ en phase gazeuse, caractérisation des complexes en mode MS/MS par CID, détermination de la stœchiométrie des complexes, comparaison des résultats obtenus avec les deux analyseurs	[111]
		$(\text{UO}_2\text{A})^+$ avec $\text{A} = \text{CH}_3\text{COO}^-$, NO_3^- , ou OH^-	Trappe ionique	Etude de l'interaction de l'U avec les molécules de solvant Etude de l'hydratation de UO_2^{2+} par CID	[103]
Etude de la spéciation de UO_2^{2+}	Molécules phosphorylées	$\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})$	Trappe ionique linéaire (LIT)	Caractérisation des espèces par MS^n , Quantification des espèces d' UO_2^{2+} dans l'eau naturelle, Mesure du rapport isotopique de UO_2^{2+} dans les espèces détectées	[108]
		$\text{UO}_2(\text{DBP})$, et $\text{UO}_2(\text{TBP})$	Quadripole time-of-flight (Q-TOF)	Etude de spéciation de UO_2^{2+} avec TBP et DBP par MS et MS^2	[107]
			Triple quadripole (QQQ)		
		UO_2 - Amidophosphonate	Q-TOF	Caractérisation structurale; identification des complexes formés, détermination de la stœchiométrie U/ligands	[112]
		$\text{UO}_2(\text{HEDP})$	Triple quadripole (QQQ)	Caractérisation des espèces d' UO_2^{2+} à différents pH et concentrations d'HEDP	[76]
				Détermination des stœchiométries et des constantes de stabilité des complexes $\text{UO}_2(\text{HEDP})$	
UO_2 -cyclodécapeptides multiphosphorylés	Trappe ionique linéaire (LIT)	Caractérisation structurale en mode MS : détermination des stœchiométries des complexes UO_2 -peptides à pH 7,4	[9,68,69,113]		

		UO ₂ -phenylphosphonate	Orbitrap	Détermination des stœchiométries et des constantes de stabilité des complexes l'UO ₂ -phenylphosphonate dans des matrices environnementales	[114]
Acides hydroxycarboxyliques		UO ₂ -Acide mandélique	Quadriple time-of-flight (TOF)	Détermination de la stœchiométrie des complexes d'UO ₂ ²⁺ avec l'acide mandélique	[106]
		UO ₂ - acide α-hydroxyisobutyric (HIBA)		Détermination de la stœchiométrie des complexes d'UO ₂ ²⁺ avec l'HIBA	[105]
Ligands amidoxime		UO ₂ -amidoxime (DHIP), (DHPD), (DHED)	Trappe ionique	Etude de spéciation de l'U en présence de ligands amidoximes comme agents extractant de l' d'UO ₂ ²⁺ dans l'eau de mer	[104]
Diamides		UO ₂ - diamide phenanthroline	Trappe ionique	Etude de la spéciation d'UO ₂ ²⁺ dans les complexes d'UO ₂ -phenanthrolines et d'UO ₂ -diamides. Caractérisation des complexes par MS et MSn	[115]
		UO ₂ - diamide	Trappe ionique		[116]

3.1.2. Méthodes de quantification

Très peu de travaux ont été reportés sur la quantification de complexes d' UO_2^{2+} par ESI-MS. La limitation réside dans l'efficacité du processus d'ionisation qui est dépendant de l'espèce. Ainsi, facteur de réponse (R), liant la concentration de l'espèce métallique $[\text{ML}_n]$ en solution avec l'intensité de son signal (I_M): $[M] = R \cdot I_M$ est différent pour chaque espèce. Cette différence est susceptible d'affecter l'interprétation quantitative des résultats par exemple en sous estimant la concentration de l'espèce d'intérêt si son processus d'ionisation est faible [93]. L'ajout d'un étalon interne dans l'échantillon peut être envisagé pour compenser les variations du signal dû à cet effet. Cet étalon interne doit présenter une structure et une charge les plus proches possibles de celles de l'espèce à quantifier, afin d'obtenir des facteurs de réponse similaires [93].

Galindo et Del Nero [114] ont caractérisé les espèces d' UO_2^{2+} formées avec l'acide phénylphosphonique (H_2PhPO_3) et déterminé les constantes de stabilité associées, dans le cadre de l'évaluation du rôle des phosphores aromatiques contenus dans des substances humiques vis-à-vis la complexation de l' UO_2^{2+} . Le H_3PO_4 a été utilisé comme étalon interne. Le rapport des intensités du ligand libre HPhPO_3^- et de l'étalon interne H_2PO_4^- a été appliqué pour corriger les différences entre les facteurs de réponses des complexes d' UO_2^{2+} correspondant $\text{UO}_2(\text{H}_2\text{PhPO}_3)$ et $\text{UO}_2(\text{H}_3\text{PO}_4)$. Ensuite, les solutions ont été dopées avec une concentration fixe en H_3PO_4 , qui entre en compétition avec H_2PhPO_3 pour la complexation de l' UO_2^{2+} . Des complexes ternaires $\text{UO}_2^{2+}\text{-H}_2\text{PhPO}_3\text{-H}_3\text{PO}_4$ ont été formés, à partir desquels la constante de stabilité $\text{UO}_2^{2+}\text{-H}_2\text{PhPO}_3$ a été déterminé de l'ordre de $\log K = 7,1$ [114]. Dans d'autres études, le facteur de réponse a été considéré identique pour toutes les espèces et donc la concentration des espèces directement proportionnelle à l'intensité du signal. Ainsi, le rapport des intensités a permis de déterminer les concentrations du complexe $\text{UO}_2(\text{HEDP})$ et de UO_2^{2+} libre selon le rapport suivant :

$$\frac{I_{\text{UO}_2(\text{HEDP})}}{I_{\text{UO}_2^{2+}}} = \frac{[\text{UO}_2(\text{HEDP})]}{[\text{UO}_2^{2+}]_{\text{libre}}}$$

Ces données ont permis de calculer la constante de stabilité à $\text{pH}=2$ dont la valeur $\log K = 4,2$ est proche de celle obtenue par TRFLS avec $\log K = 4,7$, ce qui a permis de valider cette approche [76].

Une approche quantitative classique par étalonnage externe a été employée pour quantifier l' UO_2^{2+} dans l'eau naturelle [108]. Pour ce faire, les échantillons d'eau ont été dopés avec de l'acide acétique pour complexer l' UO_2^{2+} sous forme d'un complexe $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})$. La quantification de l' UO_2^{2+} sous forme de $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})$ a été réalisée en mode SRM « single reaction monitoring » en suivant un ion produit spécifique de ce complexe, de rapport $m/z = 346$. La droite d'étalonnage a été obtenue en traçant l'intensité de l'ion produit $m/z = 346$ en fonction des concentrations des solutions étalons, composées d'acétate d'uranyle dans l'eau.

Le suivi du signal de l'ion produit pour établir la droite d'étalonnage a donné une corrélation linéaire $R^2 = 0,978$ entre l'intensité et la concentration des solutions étalons. Cependant, une bonne répétabilité des injections a été obtenue avec un écart type relatif (RSD) de 5%, une gamme dynamique comprise entre 10^{-1} et 10^{-3} ng L⁻¹ et une limite de détection d'environ 10^{-3} ng L⁻¹ [108].

L'ESI-MS permet de caractériser les complexes d' UO_2^{2+} rencontrés dans diverses applications et d'accéder à des informations sur la stœchiométrie des complexes, leur comportement en phase gazeuse ainsi que la nature des molécules impliquées dans la coordination. L'utilisation de l'ESI-MS pour quantifier des complexes et déterminer leurs constantes de stabilité a été également décrite, mais présente des limitations liées aux spécificités intrinsèques à cette technique, notamment un facteur de réponse à l'ionisation propre à chaque espèce. Ce phénomène peut être corrigé avec un étalon interne ou peut être négligé, mais dans ce cas les résultats doivent être comparés à ceux obtenus avec d'autres techniques pour les valider. Le développement de méthodes de quantification basées sur un étalonnage externe reste le plus pertinent, tout en utilisant des solutions étalons de même nature que l'analyte d'intérêt.

3.2. Par spectrométrie de masse à source plasma à couplage inductif (ICP-MS)

En raison de ses très faibles limites de détection, de ses capacités multi-élémentaires et isotopiques, l'ICP-MS a été employé pour des études de quantification de l'U dans les complexes UO_2^{2+} -biomolécules et de fractionnement isotopique. Les principaux travaux décrits se focalisent sur les complexes UO_2^{2+} -protéines et sont menés généralement hors ligne en aval d'une technique séparative. A notre connaissance, aucune étude n'est reportée dans la littérature sur les complexes UO_2^{2+} -peptides.

3.2.1. Développement de méthodes de quantification multi-élémentaires

Contrairement à l'ESI-MS, le processus énergétique à haute température de la source ICP-MS engendre une destruction quasi-complète des analytes, les réduisant à l'état élémentaire. Ainsi, l'U contenu dans les complexes UO_2^{2+} -biomolécules mais aussi les éléments constitutifs des protéines tels que le soufre (S), le phosphore (P) et le sélénium (Se) peuvent être analysés, selon le type d'analyseur. Diverses méthodes de quantification peuvent être entreprises et parmi ces dernières la quantification par étalonnage externe. Elle consiste à mesurer l'intensité du signal de solutions standards de concentrations croissantes connues, et qui peuvent être spécifiques ou non de l'analyte d'intérêt. Un étalon interne de concentration fixe peut être ajouté aux solutions standards et à l'échantillon afin de corriger toute instabilité potentielle du signal ou de la réponse de l'instrument. La méthode de

quantification par ajouts dosés peut être également entreprise. Elle consiste à ajouter des concentrations croissantes de l'élément d'intérêt dans l'échantillon à doser ou dans un matériau de référence certifié (MRC) correspondant à la matrice de l'échantillon pour établir la droite d'étalonnage. Ainsi, la concentration de l'élément dans l'échantillon est déterminée à partir de l'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses. Cette méthode est employée afin de s'affranchir des effets de matrices rencontrés dans des échantillons complexes et est souvent adoptée pour la quantification de l'U dans des matrices environnementales [117].

Les méthodes de quantification de l'U dans les complexes UO_2^{2+} -protéines basées sur un étalonnage externe, reportées dans la littérature sont le plus souvent mises au point hors ligne en aval d'une technique séparative. L'objectif est de déterminer la distribution quantitative de l'U parmi des populations protéiques [118] et d'identifier la ou les stœchiométries U/protéine [6,7,82]. Dans le cas d'une analyse hors ligne, l'échantillon est introduit directement dans l'ICP-MS, produisant un signal continu dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'élément d'intérêt. A titre d'exemple, la teneur en U dans des protéines du sérum humain incubées en présence d' UO_2^{2+} puis fractionnées par chromatographie bidimensionnelle, a été déterminée sur la base d'un étalonnage externe et d'un étalon interne, le bismuth ^{209}Bi , après minéralisation et injection directe des échantillons. Cette approche, combinée à une étude protéomique a permis d'identifier plusieurs protéines uranophiles dans le sérum, incluant la transferrine et l'albumine [118]. Par ailleurs, grâce au suivi simultané de l'U, du P et du S étant des éléments constitutifs des protéines, les stœchiométries U/protéine, particulièrement U/FETUA [6] et U/OPN [7], ont pu être déterminée après isolement par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) des complexes UO_2^{2+} -protéines dans des échantillons modèles. La détermination du rapport $[\text{U}]/[\text{protéine}]$ a permis de déterminer le nombre de sites de coordination d' UO_2^{2+} dans ces protéines et que la FETUA piègeait $3 \pm 0,5$ atomes d'U, alors que l'OPN piège $6-9 \pm 1$ atomes d'U, avec 26 ± 2 sites de phosphorylation [6,7]. Ces informations ont permis de souligner l'impact de la phosphorylation de l'OPN sur son affinité pour l' UO_2^{2+} . La même approche a été adoptée pour mesurer l'efficacité du LIHOPO en tant qu'agent de décorporation par chélation. Ce ligand a été mis en compétition avec la FETUA pour la complexation avec l' UO_2^{2+} dans un échantillon modèle. Les complexes d' UO_2^{2+} formés avec le LIHOPO et la FETUA isolés par SEC, puis récupérés ont été quantifiés, ce qui a permis de déterminer que la stœchiométrie UO_2^{2+} -LIHOPO-FETUA à partir de laquelle l' UO_2^{2+} était entièrement complexé par le LIHOPO, étant 1-1,5-1, confirmant l'intérêt de l'utiliser comme agent décorporant [82].

Dans le cas de la quantification de l'U dans des échantillons environnementaux, tels que l'eau de mer ou des sédiments [119,120], la méthode de quantification par ajouts dosés est généralement employée. A titre d'exemple, la teneur en U dans des eaux interstitielles de sédiments côtiers et dans

l'eau de mer a été déterminée par cette méthode en injection directe des échantillons préalablement dopés avec des teneurs d'U entre 0 et 60 ng.

La concentration d'U dans deux eaux de mer a été mesurée à environ $3 \mu\text{g Kg}^{-1}$, en adéquation avec la valeur reportée dans la littérature. Dans les eaux des sédiments, la teneur en U augmentait en fonction de la profondeur du site de collecte des échantillons, en lien avec l'oxydation de l'U(IV) en U(VI), plus mobile et plus diffusible dans les profondeurs [119]. La justesse de la méthode a été évaluée avec un écart relatif de 1 % entre la concentration certifiée d'une solution standard et celle déterminée par la droite d'étalonnage, montrant que cette méthode est adaptée à l'analyse de l'U dans ce type d'échantillons. La comparaison de cette méthode avec celle basée sur l'étalonnage externe a confirmé cette démarche méthodologique [120].

Le développement de méthodes de quantification de l'U dans des complexes UO_2^{2+} -protéines en ligne, par couplage de l'ICP-MS avec une technique séparative, est moins répandu. Dans ce cas, un signal transitoire de l'analyte est obtenu sous forme d'un pic, puisqu'un volume donné de l'échantillon est introduit dans l'instrument ou dans un support séparatif par l'intermédiaire d'une boucle d'injection. Le traitement de ce signal se fait généralement selon la méthode de l'intégration de l'aire du pic (PAI : Peak Area Integration) en considérant que l'aire du pic est proportionnelle à la concentration de l'analyte mesuré [121]. Selon la forme des pics, 90, 95 ou 100 % de leur aire est considéré.

Une méthode de quantification par étalonnage externe avec un ICP-MS à source à ablation laser (LA-ICP-MS), en combinaison avec une méthode séparative par électrophorèse sur gel en conditions non dénaturantes, a été développée pour la quantification *in vivo* de l'U dans des fractions protéiques cytosoliques extraites de glandes digestives d'écrevisses.[122]. Les solutions standards, composées de concentrations croissantes du complexe UO_2^{2+} -Albumine, ont été injectées par électrophorèse sur gel en condition non dénaturante couplée en ligne à l'ICP-MS. La droite d'étalonnage présentait une linéarité satisfaisante avec $R^2 = 0,96$. La limite de détection (LOD) a été mesurée à $4,6 \text{ ng L}^{-1}$. Le taux de récupération de l'U après élution sur gel a été déterminé de l'ordre de 64,4 %. En tenant compte de ce taux, l'U contenu dans deux fractions protéiques principales a été quantifié [122].

Dans d'autres travaux, la distribution quantitative de l'U parmi des ligands ou des protéines d'intérêt environnemental ou toxicologique a été déterminée par ICP-MS couplée en ligne à une technique séparative. La proportion relative d'U engagé dans chaque espèce est calculée en établissant le rapport entre l'aire du pic associé à l'espèce d'intérêt et la somme des aires de l'ensemble des pics du chromatogramme contenant de l'U, selon l'équation suivante :

$$\% \text{ U} = \frac{\text{Aire du pic d'U}_{\text{complexe U-ligand d'intérêt}}}{\sum \text{Aire totalité des pics du chromatogramme}}$$

Cette approche ne nécessite donc pas d'avoir recours à une droite d'étalonnage.

A titre d'exemple, cette approche a été employée pour déterminer la distribution quantitative de l'U parmi les protéines cibles du sérum humain [51] et en particulier entre la FETUA et l'OPN [57]. La méthode de quantification a été développée par couplage de l'électrophorèse capillaire (EC) en ligne avec l'ICP-MS, avec des échantillons modèles. Cette méthode a été tout d'abord validée par comparaison avec les résultats de quantification obtenus avec la méthode de résonance plasmonique de surface (SPR) [6] pour des standards commerciaux de complexes UO_2^{2+} -protéines de concentrations similaires à celles dans le sérum humain [51]. Ensuite elle a été appliquée à la détermination de la constante de stabilité du complexe $UO_2(OPN)$ à partir de celle du complexe $UO_2(FETUA)$ comme montre la Figure 20.

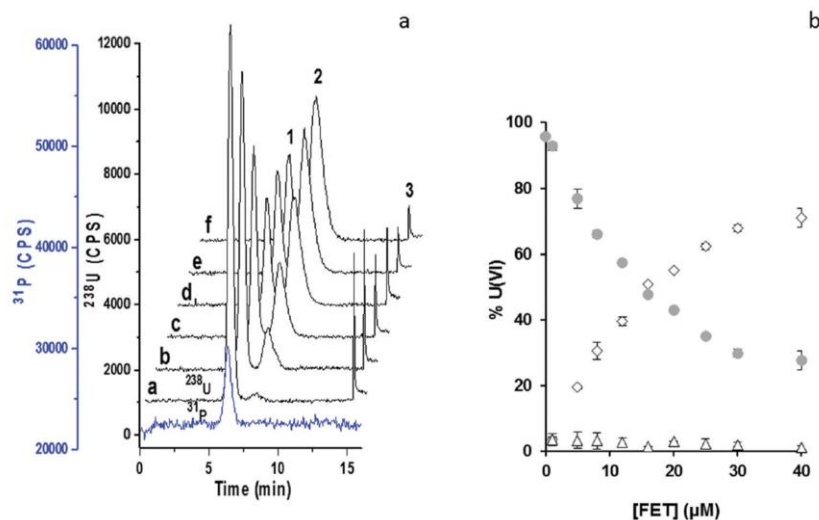


Figure 20 : (a) Electrophérogrammes des complexes (1) UO_2^{2+} -OPN, (2) UO_2^{2+} -FETUA et (3) élution de la fraction libre de l' UO_2^{2+} adsorbée sur le capillaire et éluée, obtenus par ICP-MS en suivant le signal de l' ^{238}U et du ^{31}P (b) distribution quantitative de l'U dans chaque espèce

Le suivi du signal du ^{31}P contenu dans l'OPN a permis de confirmer l'engagement de cette protéine dans le complexe $UO_2(OPN)$. La constante de stabilité $UO_2(FETUA)$ étant connue avec $\log K = 11,4$ [51], celle de l' $UO_2(OPN)$ a pu en être déduite et a été estimée à $\log K = 11,5$. Ces résultats ont permis de montrer que l'affinité de l' UO_2^{2+} pour l'OPN et la FETUA est très proche [57].

Par ailleurs, la distribution quantitative de l'U dans des extraits protéiques issue d'une lignée cellulaire neuronale humaine SH-SY5Y [123], de cytosols d'organes issus d'écrevisses [124] et d'ovaires de poissons [125,126] a été déterminée par en ligne cette approche, après avoir isolé par SEC les fractions protéiques riches en uranium. La quantification en ligne de l'U dans quatre fractions protéiques principales issues de la lignée SH-SY5Y a permis, en combinaison avec une approche protéomique, d'identifier des protéines affines pour l' UO_2^{2+} et de mieux comprendre ses mécanismes de toxicité à l'échelle moléculaire au niveau neuronal [123]. De même, la distribution quantitative de l'U parmi les fractions protéiques de cytosols de deux organes d'écrevisses [124] et des ovaires de poissons [125–

127] en plus de celle des métaux endogènes tels que Fe, Zn, Cu, P, Cd, Co et Mn a été mesurée par cette approche, (voir Figure 21 pour l'U).

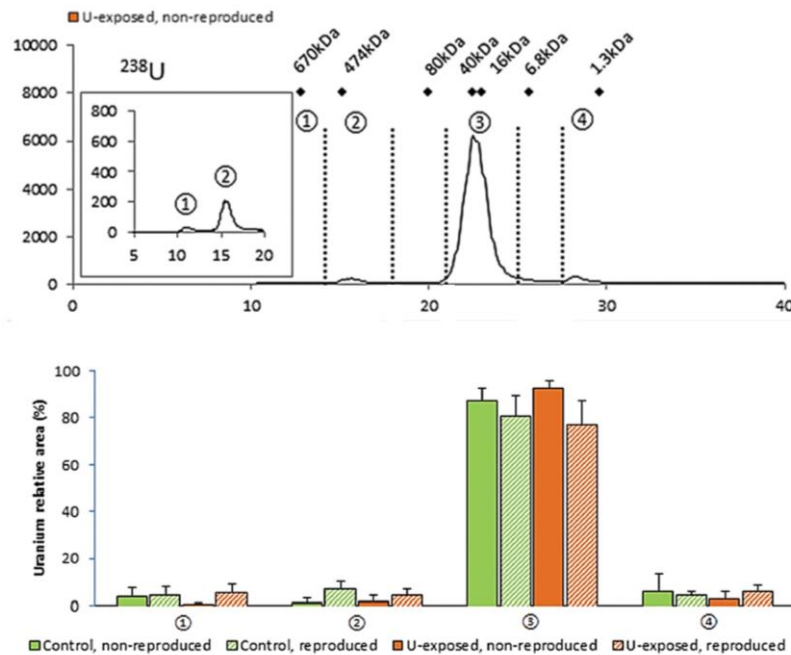


Figure 21 : En haut, profil d'élution de l'U acquis par SEC-ICP-MS. En bas, la représentation de la distribution quantitative relative de l'U parmi les fractions protéiques calculée en réalisant le rapport des aires des pics.

Une co-élution des pics d'U de Fe, Cu et Zn a été observée dans certaines fractions protéiques [124,127] suggérant une potentielle compétition entre l'U et ces métaux pour la complexation des mêmes biomolécules. Une co-élution des pic d'U et de P a été également observée dans une fraction protéique issue des ovaires de poissons zèbre, mettant en évidence la haute affinité de UO_2^{2+} pour les protéines phosphorylées, en accord avec la littérature [125,126]. En se basant sur ces résultats, des métalloprotéines cibles potentielles de UO_2^{2+} ont été proposées, et une approche protéomique a permis d'identifier 20 protéines candidates [125].

3.2.2. Analyse isotopique

L'analyse isotopique de haute précision des éléments endogènes dans les milieux biologiques est très prometteuse comme marqueur de métabolisme, outil de diagnostic et de suivi de patients [128]. Ce type d'analyse est moins répandue dans le domaine de la toxicologie, mais peut apporter des éléments de compréhension à l'étude des effets d'une exposition à des contaminants. C'est dans ce contexte que le fractionnement isotopique de ^{nat}U a été mesuré dans la lignée SHY5Y différenciée en neurones après exposition à de faibles concentrations de ^{nat}U [47,129]. L'ICP-MS muni d'un système à multi collection est la technologie de choix pour mesurer des variations de rapports isotopiques de très faible amplitude, imposant de développer des protocoles de préparation d'échantillons et de mesures avec une incertitude de l'ordre de 0,1%.

Le fractionnement isotopique δ , exprimé en pour mille ‰, est la différence relative entre le rapport isotopique $R^{238}\text{U}/^{235}\text{U}$ dans un échantillon et le même rapport dans un standard de référence certifié selon l'expression suivante :

$$\delta^{238}\text{U} (\text{‰}) = \frac{(R^{238}\text{U}/^{235}\text{U})_{\text{échantillon}} - (R^{238}\text{U}/^{235}\text{U})_{\text{standard}}}{(R^{238}\text{U}/^{235}\text{U})_{\text{standard}}} \times 1000$$

Les cellules incorporent préférentiellement l'isotope léger ^{235}U avec un fractionnement isotopique de l'ordre de 0,4‰ pour des concentrations d'exposition à 1 et 10 μM d' ^{nat}U alors que pour des concentrations plus élevées (125 et 250 μM) aucun fractionnement de l' ^{nat}U n'a été observé [47,129](Figure 22).

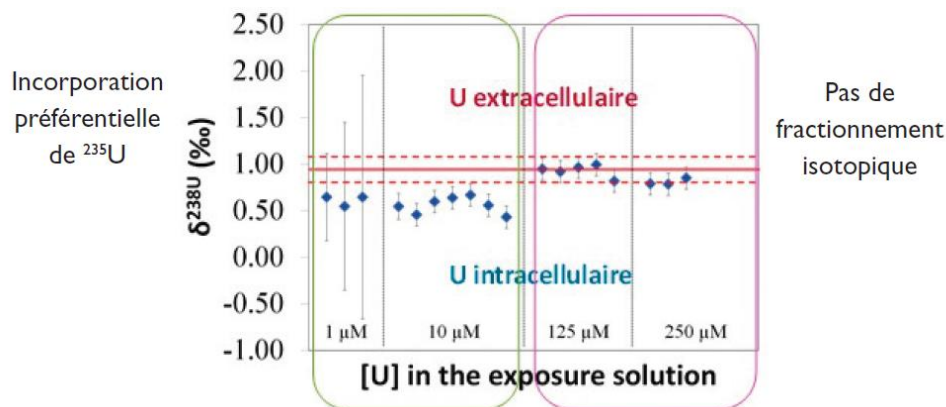


Figure 22 : Fractionnement isotopique de l' ^{nat}U dans les cellules neuronales exposées à 1, 10, 125 et 250 μM d' ^{nat}U . L'exposition des cellules à 125 et 250 μM d' ^{nat}U a induit une perturbation de l'homéostasie du Cu, du Fe et du Mn, mais la signature isotopique intracellulaire du Cu et du Zn n'a pas été modifiée quelle que soit les conditions d'exposition. Ces résultats ont permis de proposer deux voies, spécifique et non spécifique, d'incorporation de l' UO_2^{2+} , reflétant l'apport de l'analyse isotopique à l'élucidation des mécanismes de toxicité à l'échelle cellulaire et moléculaire [47,129].

L'ICP-MS s'avère indispensable pour la quantification de l'U dans des échantillons d'intérêt environnemental, biologique et nucléaire. Les méthodes de quantification de l'U par cette technique sont principalement basées sur l'étalonnage externe et généralement développées en aval d'une technique séparative, souvent hors ligne après collecte de fractions. Lors d'un couplage en ligne avec une technique séparative, souvent la SEC et l'EC, la distribution quantitative de l'U parmi les espèces séparées est déterminée en réalisant un rapport entre l'aire du pic de l'U associé à chaque espèce et la somme des aires de l'ensemble des pics du chromatogramme. Les études recensées dans ce paragraphe montrent le rôle crucial de l'ICP-MS dans l'étude des interactions UO_2^{2+} -protéines et plus particulièrement, pour déterminer de la distribution quantitative de l'U parmi ses protéines cibles. Son caractère multi-élémentaire permet de suivre simultanément le signal de l'U ainsi que celui des éléments constitutifs de protéines tels que S et P, permettant de déterminer la stœchiométrie U/protéines et donc le nombre de sites occupé par l'U dans ces biomolécules. Les constantes de stabilité des complexes UO_2^{2+} -protéines ont pu être obtenues par cette technique. Ces informations sont d'une importance majeure dans les études visant à élucider les mécanismes de toxicité de l'U à l'échelle moléculaire. De plus, le suivi multi-élémentaire de l'U ainsi que des métaux endogènes a permis d'explorer l'impact de l'exposition de l'U sur la biodistribution de ces métaux et de proposer des métalloprotéines cibles de l'uranyle. Le fractionnement isotopique de ^{nat}U et des métaux endogènes dans les cellules exposées à ^{nat}U a également mesuré.

Par revanche, l'ICP-MS présente des limitations liées au manque d'informations structurales sur les complexes UO_2^{2+} -protéines. Cette limitation a conduit à identifier les fractions protéiques contenant l'U par suivi du signal UV-VIS des protéines, ou à suivre le signal des éléments constitutifs des protéines tels que S ou P par ICP-MS. Ce moyen reste insuffisant pour obtenir des informations sur la structure du complexe formé, d'où l'intérêt du couplage de l'ICP-MS à une technique complémentaire permettant d'accéder à des données structurales telle que l'ESI-MS.

4. Techniques séparatives des complexes d' UO_2^{2+}

En raison des interactions UO_2^{2+} -ligands de type électrostatique et labile [11], le défi majeur pour séparer ces complexes réside dans la préservation maximale de l'intégrité de leur structure au cours du processus de séparation. Peu de modes de séparation sont par conséquent adaptés à la séparation de complexes d' UO_2^{2+} . L'essentiel des études reportées dans la littérature concerne des espèces UO_2^{2+} -protéines et implique la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), la chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC) et l'électrophorèse capillaire (EC). Les échantillons peuvent être des échantillon modèles dans une matrice simplifiée ou des échantillons réels issus de tissus ou d'extraits cellulaires. Dans ce dernier cas, la mise au point de protocoles de traitement de l'échantillon et de la combinaison de plusieurs techniques séparatives sont bien souvent nécessaires en amont de l'analyse.

4.1. Techniques chromatographiques

4.1.1. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Le principe de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est basé sur la séparation des analytes en fonction de leur volume hydrodynamique et elle est particulièrement adaptée pour isoler des populations protéiques en fonction de leur gamme de masse [130]. Cette technique est adaptée à la séparation des complexes UO_2^{2+} -protéines en raison des faibles interactions entre l'analyte et le support chromatographique. Un autre avantage de la SEC est lié à ses conditions de séparation (pH, force ionique, tampons) proches des conditions physiologiques. La SEC est généralement couplée à l'UV-VIS afin de suivre le signal des protéines et en série avec l'ICP-MS et l'UV-VIS dans des approches métallomiques [123,125,126]. L'inconvénient de ce mode de séparation est qu'il est peu résolutif, ce qui nécessite d'utiliser une autre technique séparative en seconde dimension lorsque la nature de l'analyte le permet. La SEC couplée en ligne à l'UV-VIS a été employée pour isoler les complexes $\text{UO}_2(\text{FETUA})$ et $\text{UO}_2(\text{OPN})$ de la fraction d' UO_2^{2+} non complexée dans des échantillons modèles. L'analyse hors ligne par ICP-MS de l'U, du P et du S dans les fractions collectées a permis de déterminer la stœchiométrie U/protéines [6,7]. La même démarche a été appliquée à la séparation des complexes $\text{UO}_2(\text{FETUA})$ et $\text{UO}_2(\text{LIHOPO})$ dans un échantillon modèle et la récupération de l' UO_2^{2+} libre adsorbé sur la colonne (Figure 23a) [82].

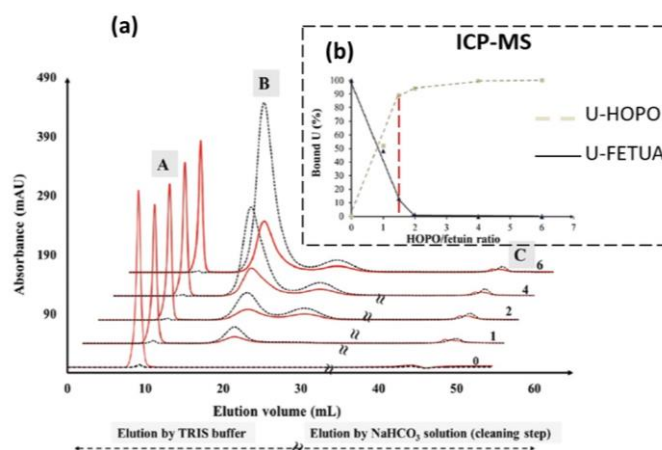


Figure 23 : (a) Profils d'éluion par UV-VIS des complexes UO_2^{2+} -FETUA (rouge) et UO_2^{2+} -LIHOPO (noir pointillé) après addition de 1 jusqu'à 6 équivalents de LIHOPO, (b) Distribution quantitative de l'U entre la FETUA (trait plein noir) et le LIHOPO (gris pointillé) en fonction du rapport $[\text{HOPO}]/[\text{FETUA}]$. Phase mobile : 50 mM TRIS avec 150 mM NaCl (pH =7,4) [82].

La distribution quantitative de l'U entre les deux complexes mesurée hors ligne par ICP-MS pour des concentrations croissantes de LIHOPO (Figure 23b) a permis de montrer que le LIHOPO déplace entièrement l' UO_2^{2+} du complexe $\text{UO}_2(\text{FETUA})$ pour une proportion UO_2^{2+} -LIHOPO-FETUA supérieure à 1-1,5-1, montrant ainsi le potentiel de cette molécule en tant qu'agent décorporant de l' UO_2^{2+} [82].

Par ailleurs, dans des approches métallomiques visant à identifier les protéines cibles de l'uranyle *in vitro* et *in vivo*, la SEC, couplée en série à l'UV-Vis et à l'ICP-MS a été employée pour le fractionnement d'extraits protéiques issus de cellules neuronales SH-SY5Y [123] et des ovaires de poissons [125]. A titre d'exemple, pour l'identification des protéines uranophiles dans les extraits protéiques des cellules neuronales, exposées à 10 μM d' ^{238}U dans un milieu tris carbonato, ces dernières ont été fractionnées par SEC. Le profil d'éluion par ICP-MS a montré trois fractions principales riches en U dont la gamme de masse est comprise entre 3 et 600 kDa, contenant chacune 40%, 50% et 10% d'U. La collecte et l'analyse hors ligne de ces fractions par nanochromatographie couplée à l'ESI-MS à haute résolution ont permis d'identifier des protéines cibles de l' UO_2^{2+} dans une approche protéomique [123]. Une approche similaire a été entreprise pour identifier les protéines cibles de l' UO_2^{2+} dans les extraits protéiques des ovaires de poissons zèbres [125]. Un suivi multiélémentaire des signaux des isotopes ^{238}U , ^{31}P , ^{56}Fe , ^{63}Cu et ^{66}Zn a été réalisé par ICP-MS et le signal des protéines a été réalisé en ligne par UV-VIS. Les chromatogrammes correspondant sont présentés dans la Figure 24.

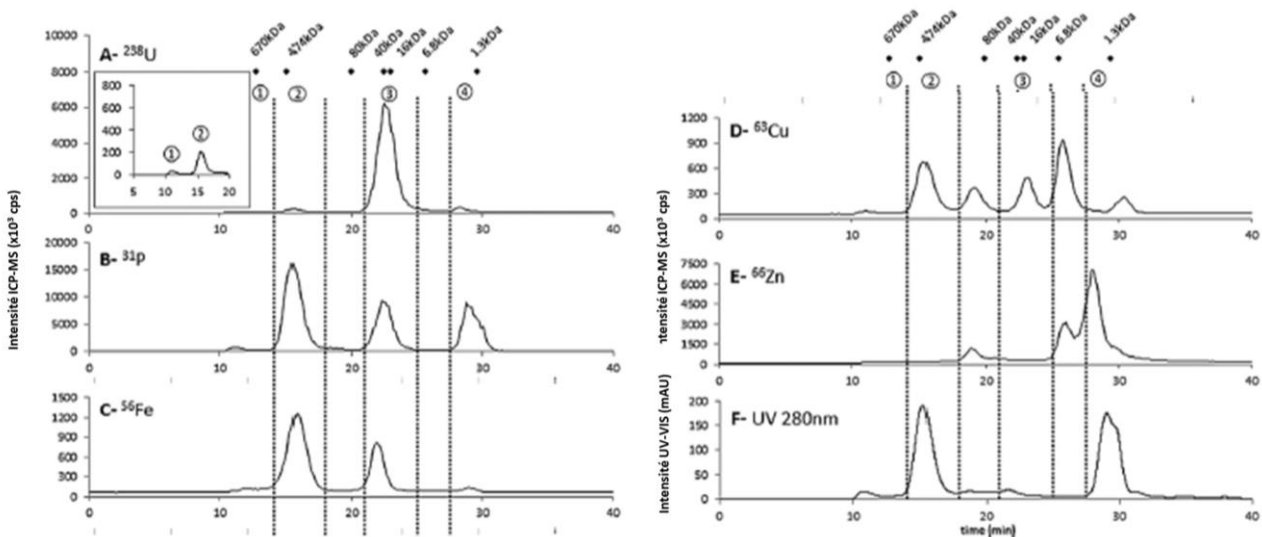


Figure 24 : Profils d'élution obtenus en ligne par SEC-UV-ICP-MS d'un extrait protéique de femelle contaminée reproduite. (A-E) profils d'élutions de ^{238}U , ^{31}P , ^{56}Fe , ^{63}Cu et ^{66}Zn enregistré par ICP-MS et (F) profil d'élution des extraits protéiques acquis par UV à 280 nm.

L'U est réparti dans 4 fractions protéiques (Figure 24), la plus riche en U étant celle dont la gamme de masse est comprise entre 10 et 40 kDa (Fraction 3). Dans cette fraction, des pics contenant du P, du Fe et du Cu sont co-élus avec ceux d'U. La co-elution avec les pics de P, d'ailleurs observée dans toutes les fractions contenant de l'U, permet de suggérer que les protéines qu'elles contiennent sont phosphorylées à des degrés différents, en accord avec la forte affinité de l' UO_2^{2+} pour ces dernières. En revanche, la faible résolution de la SEC et un décalage au niveau des apex des pics de l'U et des du Fe et Cu ont empêché de conclure sur une compétition potentielle entre l' UO_2^{2+} et ces métaux vis-à-vis de la complexation de métalloprotéines. Le même type d'informations a pu également être obtenu en appliquant la même approche à la détermination des protéines cibles de l' UO_2^{2+} dans les extraits protéiques de cytosols d'organes d'écrevisses [124] et d'ovaires de poissons [126,127], ainsi que dans du sérum bovin [131]. Compte tenu de la faible résolution de la SEC, une séparation par électrophorèse sur gel dans des conditions dénaturantes a été réalisée en seconde dimension afin d'améliorer la séparation des complexes UO_2^{2+} -protéines [125]. Les protéines des fractions issues de la séparation en deuxième dimension ont été caractérisées par une approche protéomique, ce qui a permis de proposer des protéines cibles de l' UO_2^{2+} . Une bonne corrélation a été obtenue avec les observations par SEC-ICP-MS réalisées en première dimension, montrant l'intérêt de ces deux approches combinées pour proposer des protéines cibles de UO_2^{2+} et mieux comprendre ses mécanismes de toxicité à l'échelle cellulaire et moléculaire [125].

Le couplage en série de la SEC à l'UV et l'ICP-MS permet de suivre le signal de l'U, des métaux endogènes et des protéines, rendant possible la prédiction de la nature des protéines engagées dans les fractions uranophiles et la compétition potentielle de l' UO_2^{2+} avec les métaux pour la complexation des protéines

candidates. Une approche combinée avec la protéomique est souvent nécessaire afin de caractériser les protéines cibles de l' UO_2^{2+} .

4.1.2. Chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC)

Le principe de cette technique séparative repose sur l'interaction sélective de molécules, souvent des protéines, avec un métal immobilisé à la surface d'une phase stationnaire par l'intermédiaire d'un groupement complexant. Ainsi, les protéines sont éluées de façon différentielle selon leur affinité pour le métal immobilisé. L'IMAC présente l'avantage d'être sélective, de conduire à des taux de récupération de protéines élevés et de travailler dans conditions expérimentales (pH, force ionique, tampons) proches des conditions physiologiques, favorisant ainsi le criblage de protéines dans des applications *in vivo* [132]. Cette technique a été appliquée à la capture de protéines sélectives de l' UO_2^{2+} dans le but de prédire les populations de protéines affines pour l' UO_2^{2+} . Pour ce faire, l' UO_2^{2+} est immobilisé sur des microbilles commerciales par l'intermédiaire de groupements aminophosphonates (Figure 25) avec lesquelles les protéines se lient sélectivement [56].

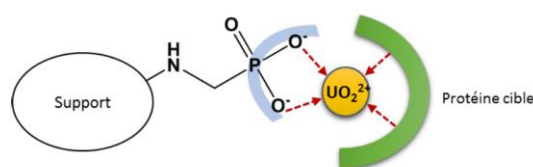


Figure 25 : Illustration de l'immobilisation de l' UO_2^{2+} sur un support par l'intermédiaire d'un groupement aminophosphonate et son interaction sélective avec une protéine cible.

Cette méthode a été mise au point et validée avec des fractions protéiques du sérum [56] et a été appliquée à l'identification de protéines cibles de l' UO_2^{2+} dans un extrait d'une lignée cellulaire rénale humaine HK-2 [133]. Les protéines ont été collectées puis analysées par une approche protéomique conduisant à l'identification de 64 protéines affines pour l' UO_2^{2+} [133]. La même approche a été étendue à la capture de protéines liant sélectivement l' UO_2^{2+} dans des extraits protéiques de la lignée cellulaire neuronale SH-SY5Y [123]. Cette approche, combinée à une approche par SEC-UV-ICPMS, a permis d'identifier 269 protéines communes affines pour l' UO_2^{2+} , l'uranoprotéome [123].

Cependant, cette technique présente des limitations liées à l'analyse de protéines ayant des constantes de stabilité inférieures à celle du complexe UO_2^{2+} -aminophosphonate, et ce afin d'éviter des phénomènes de compétition avec l'aminophosphonate vis-à-vis de l' UO_2^{2+} , ce qui peut conduire à la dissociation de l' UO_2^{2+} du support. Elle présente également des limitations liées à l'inaccessibilité des sites d'interactions de l' UO_2^{2+} immobilisé pour interagir avec les protéines et à des interactions protéines-protéines pouvant générer des mauvaises interprétations des résultats.

4.2. L'électrophorèse capillaire

Cette technique est mise en œuvre au sein d'un capillaire de quelques dizaines à centaines de micromètres de diamètre, rempli d'un électrolyte et requiert l'application d'un champ électrique

conduisant à la séparation des analytes en fonction de leur mobilité électrophorétique [134]. Le mécanisme de séparation mis en jeu est en théorie faiblement intrusif puisqu'il ne repose pas sur une interaction de l'analyte avec une phase stationnaire, rendant donc cette technique adaptée à la séparation de complexes d' UO_2^{2+} . Les premières études décrivant la séparation de complexes UO_2^{2+} -protéines par électrophorèse capillaire (EC) couplée à l'UV-VIS concernent les protéines sériques, notamment la transferrine, l'albumine et α , β et γ globuline dans le but d'étudier la spéciation de l' UO_2^{2+} dans un échantillon réel de sérum humain. L'ajout de l' UO_2^{2+} à l'échantillon protéique a causé un élargissement des pics de la HSA, qui a été attribué à la formation d'un complexe $\text{UO}_2(\text{HSA})$. Malgré le manque d'informations structurales sur les complexes UO_2^{2+} -protéines, ces travaux montrent la faisabilité de séparation des complexes UO_2^{2+} -protéines par EC [89]. Le couplage de l'EC à l'ICP-MS a été mis en œuvre et validé avec un échantillon modèle contenant les principales protéines cibles de l' UO_2^{2+} dans le sérum : la transferrine (Tf), la fétuine A (FETUA), l'ostéopontine (OPN) et la glycoprotéine (A1AH), avec des concentrations identiques à celles d'un échantillon réel de sérum. Dans ces conditions, une co-élution de HSA et FETUA a été reportée. La distribution quantitative de l'U parmi ces protéines a été mesurée dans deux échantillons contenant TF-HSA-A1AH et TF-FETUA-A1AH exposés à $1 \mu\text{M}$ d' UO_2^{2+} . Le couplage en série de l'EC à l'UV-Vis et l'ICP-MS a permis de suivre simultanément le signal des protéines et du ^{238}U (Figure 26-(1)).

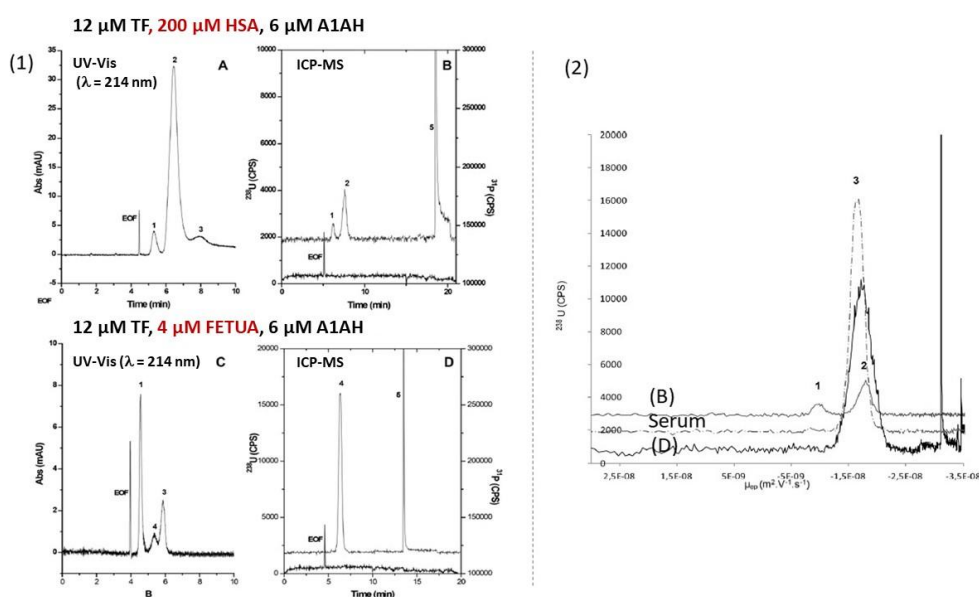


Figure 26 : Electrophérogrammes obtenus par : (1) UV-VIS et ICP-MS dans des échantillons UO_2^{2+} -protéines standards. (2) Comparaison des profils d'élution acquis par ICP-MS pour un échantillon réel de sérum et des échantillons modèles. Electrolyte composé de 10 mM Tris + 15 mM NaCl (pH 7,4). (1) TF, (2) HSA, (3) A1AH, (4) FETUA, (5) uranyle libre.

Les pics des complexes UO_2^{2+} -protéines observés par ICP-MS ont été identifiés en comparant la mobilité électrophorétique de ces complexes avec celle des protéines libres, déterminée par UV-VIS. La distribution quantitative de l'U parmi ces protéines a montré que la FETUA était la cible majeure de l' UO_2^{2+} avec 73% de l' UO_2^{2+} liée à cette dernière, en accord avec les données de la littérature [6]. La comparaison des électrophérogrammes d'échantillons modèles et réels de sérum humain obtenus dans les mêmes

conditions a conduit au même résultat Figure 26-(2), ce qui a permis de valider cette approche. Cette approche a été employée pour évaluer l'affinité de l' UO_2^{2+} pour la FETUA en compétition avec des carbonates [51] et pour l'OPN en compétition avec la FETUA [57]. Dans le premier cas, la constante de stabilité FETUA pour UO_2^{2+} -FETUA en présence de carbonates obtenue n'est pas en accord avec les données de la littérature [6]. Les auteurs l'ont expliqué par la formation de complexes ternaires UO_2^{2+} -FETUA-carbonate. Dans le deuxième cas, la constante de stabilité $\text{UO}_2(\text{OPN})$ a été déterminée avec succès par compétition avec la FETUA, montrant la pertinence de cette méthode pour l'étude des interactions UO_2^{2+} -protéines [57].

Le couplage de l'EC à l'ICP-MS a permis de déterminer la distribution quantitative de l' UO_2^{2+} parmi ces protéines et de déterminer les constantes de stabilités associées. Pour pallier l'absence de données structurales, le couplage à l'ESI-MS est incontournable mais reste délicat à mettre en œuvre.

Ce travail bibliographique a montré que peu de techniques séparatives existent pour séparer des complexes d' UO_2^{2+} , et ces dernières présentent un certain nombre de limitations. Ainsi, une technique séparative engageant des phases mobiles compatibles avec un couplage à l'ESI-MS et l'ICP-MS tout en donnant lieu à des d'interactions minimales entre la phase stationnaire et les complexes d' UO_2^{2+} , en plus d'une résolution suffisante s'avère indispensable.

5. La chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC), technique prometteuse pour séparer les complexes d' UO_2^{2+}

Le terme chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) a été introduit par Alpert lors de la mise au point de séparation de composés polaires, notamment des acides nucléiques et des peptides [135]. Il s'agit d'un mode de séparation combinant une phase stationnaire polaire comme en chromatographie de phase normale (NPLC : Normal Phase Liquid Chromatography), une phase mobile hydro-organique comme en chromatographie de phase inversée (RPLC : Reversed Phase Liquid Chromatography) et dédié à la séparation de composés hydrophiles, polaires, neutres mais aussi chargés comme en chromatographie ionique (IC Ion Chromatography).

5.1. Caractéristiques

5.1.1. Mécanismes de rétention

Malgré l'utilisation croissante de l'HILIC dans de nombreux domaines, son mécanisme de rétention est très complexe et fait toujours l'objet d'études [136]. La phase mobile étant composée d'eau et d'un modificateur organique, généralement l'acétonitrile, la phase stationnaire est plus polaire que la phase mobile. Ainsi, une fraction d'eau s'adsorbe alors à la surface de la phase stationnaire, formant une couche d'eau partiellement immobilisée et dont la proportion doit être au minimum 2-3 % pour donner lieu à cette couche [137]. Par conséquent, le mécanisme primaire de rétention repose sur le partage de l'analyte

entre cette couche d'eau immobilisée et la phase mobile riche en solvant organique, selon le caractère hydrophile de l'analyte (Figure 27).

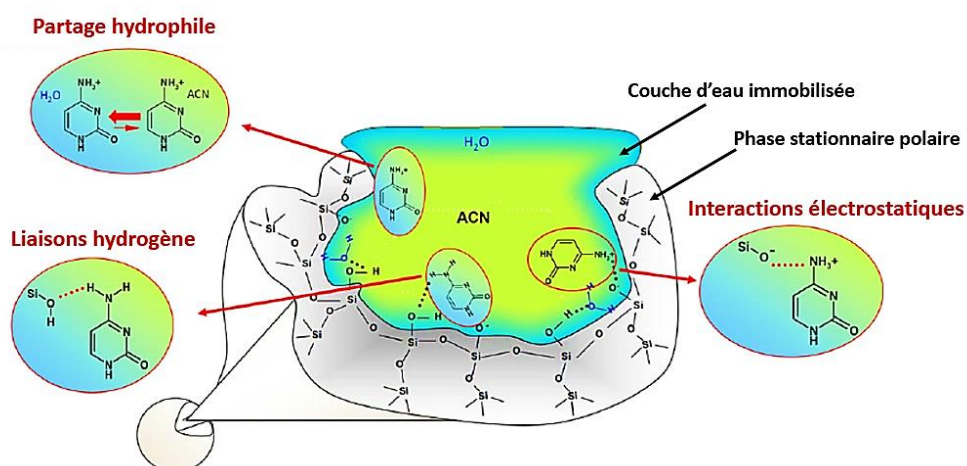


Figure 27 : Types d'interactions caractéristiques du mode de rétention en HILIC, adapté de [138].

Des interactions secondaires peuvent également contribuer à la rétention des analytes en HILIC, notamment par l'intermédiaire de liaisons hydrogène et/ou d'interactions électrostatiques, attractives ou répulsives, entre l'analyte et la phase stationnaire. Ces interactions dépendent de plusieurs paramètres, notamment la structure et la charge de l'analyte, la fonctionnalisation de la phase stationnaire, le pH et la composition de la phase mobile [139–142]. Le mécanisme de rétention est donc une combinaison du mécanisme primaire de partage hydrophile et des mécanismes secondaires régis par l'interaction de l'analyte avec la phase stationnaire. Généralement, les analytes polaires et hydrophiles sont les plus retenus. Toutefois, compte tenu de la complexité du mécanisme de rétention, il reste difficile de prévoir le comportement des analytes en HILIC, rendant nécessaire le criblage de diverses phases stationnaires et différentes compositions de phase mobile lors de mises au point de séparations en HILIC.

5.1.2. Paramètres influençant la sélectivité

Les paramètres les plus importants ayant un effet sur la sélectivité, sont la phase stationnaire qui peut induire, en plus du partage hydrophile, différents types d'interactions secondaires selon la fonction chimique greffée et la composition de la phase mobile en termes de proportion en solvant organique, de concentration en sel, de pH ainsi que de température qui contrôlent l'amplitude de ces interactions.

➤ *La phase stationnaire*

Les phases stationnaires habituellement utilisées en NPLC ont été initialement employées en HILIC, particulièrement les phases stationnaires de silice vierge et à fonction amine [139]. Depuis, de nombreuses phases stationnaires ont été conçues spécifiquement pour l'HILIC, fonctionnalisées par une variété de groupements polaires tels que les groupements amide, diol, zwitterioniques [140–142]. Les phases stationnaires classiques en HILIC peuvent être classées en trois catégories selon leur fonctionnalisation et leur charge comme le recense le Tableau 6 :

Tableau 6 : Récapitulatif des phases stationnaires employées en HILIC [141]

		Hydrophilie	Interactions électrostatiques	Liaisons hydrogène
Neutres				
Amide		+++	/	Donneur et accepteur d'hydrogène
Diol		++	/	Donneur et accepteur d'hydrogène
Diol réticulé		-	/	Donneur et accepteur d'hydrogène
Cyano		-	/	Accepteur d'hydrogène
Chargés				
Silice		++	Fortes (-) pH > 4-5	Donneur et accepteur d'hydrogène à pH < 4 Accepteur d'hydrogène à pH > 4-5
Amino		+++	Fortes (+)	Donneur d'hydrogène
Zwitterioniques				
Sulphobetaine		++	Faibles (-)	Accepteur d'hydrogène
Phosphorylcholine		++	Faibles (+)	Accepteur d'hydrogène

Cette diversité de fonctionnalisations et de charges engendre des interactions différentes selon la nature des analytes, et donc différentes sélectivités pour séparer des analytes.

➤ Composition de la phase mobile

L'acétonitrile (ACN) est le modificateur organique le plus couramment employé en HILIC. Ce dernier n'est ni accepteur ni donneur de protons. De ce fait, il n'entre pas en compétition avec l'eau pour former la couche d'eau à la surface de la phase stationnaire polaire. L'ordre d'élution des analytes se fait par ordre de polarité croissante, contrairement à la RPLC. En général, la proportion d'ACN varie entre 60 et 95% et a un impact majeur sur la rétention des analytes. Une augmentation de la proportion d'ACN induit une diminution de la polarité de la phase mobile et donc de la force éluante, et par conséquent une augmentation du facteur de rétention des analytes.

Des sels sont toujours ajoutés à la phase mobile pour contrôler l'interaction des analytes avec la phase stationnaire, principalement *via* des interactions électrostatiques secondaires. Les plus couramment utilisés sont l'acétate et le formiate d'ammonium. Ces sels sont solubles dans des phases mobiles avec des pourcentages de solvant organique élevés et sont volatiles, assurant ainsi une compatibilité de l'HILIC avec l'ESI-MS [141]. L'augmentation de la concentration en sels de la phase mobile induit une réduction des temps de rétention des analytes retenus *via* des interactions électrostatiques attractives avec la phase stationnaire et une augmentation des temps de rétention de ceux retenus *via* des interactions électrostatiques répulsives. De plus, l'augmentation de la concentration des sels dans la phase mobile

induit une augmentation de l'épaisseur de la couche d'eau à la surface de la phase stationnaire en raison de la solubilité plus importante des sels dans l'eau que dans l'ACN [143]. Dans ce cas, la rétention des composés neutres, retenus principalement par partage hydrophile est plus importante.

Le pH de la phase mobile est un paramètre important à considérer lorsqu'il n'est pas imposé par les conditions expérimentales. Il influence l'état de charge de l'analyte ainsi que celui des groupements fonctionnels ionisables de la phase stationnaire et même celui de la surface du support de greffage *via* les silanols résiduels [141,144]. Le pH a donc un effet sur les interactions électrostatiques entre l'analyte et la phase stationnaire et par conséquent sur le facteur de rétention des analytes.

La température de la phase mobile influence la viscosité de la phase mobile et donc la diffusion des analytes et leur enthalpie de transfert entre la phase mobile et la couche d'eau immobilisée à la surface de la phase stationnaire. On observe une diminution du temps de rétention en augmentant la température de la phase mobile [141], dans la mesure où le transfert des analytes hydrophiles de la phase mobile riche en acétonitrile vers la couche d'eau est un processus exothermique, favorisé à basse température [141].

En raison de ses caractéristiques et de la variété de greffages des phases stationnaires offrant différentes sélectivités, l'HILIC a été employée pour la séparation de molécules polaires de différente nature, comme les peptides, les acides aminés, les métabolites etc... [145]. Compte tenu de la nature polaire et hydrophile des analytes séparés par HILIC, cette dernière s'avère adaptée à la séparation de complexes métalliques. Les études reportant l'application de l'HILIC à la séparation des peptides et de complexes métalliques sont détaillées dans les paragraphes suivants.

5.2. Applications de la chromatographie d'interaction hydrophile

5.2.1. A la séparation de peptides

En raison de ses caractéristiques, l'HILIC a connu un essor ces dernières décennies pour séparer les acides aminés, les peptides, les métabolites et même les protéines [145]. Le mécanisme de séparation des peptides est très complexe en raison de la contribution potentielle de plusieurs acides aminés à la rétention selon la phase stationnaire. Ainsi, des algorithmes de prédiction ont été développés et ont permis de montrer en combinaison avec des expériences, l'impact de la nature, de la charge [146] et de la position [147] des acides aminés dans la séquence peptidique sur la rétention des peptides en HILIC. Gilar et Jaworski [146] ont évalué l'impact de la nature des acides aminés de peptides linéaires standards issus de digestats de protéines sur leur rétention à pH 4,5 avec trois colonnes de polarité différente : silice vierge, silice hybride et amide. Les résultats expérimentaux et théoriques ont montré que les résidus chargés positivement tels que l'histidine, l'arginine et la lysine favorisaient la rétention des peptides sur les phases stationnaires de silice vierge, probablement par interaction électrostatique attractive avec les silanols déprotonés à leur surface. Ces résultats montrent que même si la rétention des analytes en HILIC est gouvernée

principalement par le partage hydrophile, la charge des groupements fonctionnels et les silanols résiduels déprotonés de la phase stationnaire jouent un rôle et contribuent significativement à la rétention des peptides en fonction de la nature et de la charge des acides aminés dans leur séquence.

L'évaluation de la sélectivité de plusieurs colonnes dans le but de séparer des peptides linéaires non-phosphorylés ou multi-phosphorylés, dans des échantillons modèles ou issus de digestats de protéines, a fait l'objet de plusieurs études. A cette fin, diverses phases stationnaires polaires, principalement amide [148], zwitterionique [149] silice vierge [146,150], moins fréquemment amino [148,151] et diol [151,152], ont été employées. Dans la plupart de ces travaux, la séparation a été conduite dans des conditions acides, l'élution en mode gradient et en couplage avec l'ESI-MS. A titre d'exemple, dans une étude visant à séparer des peptides à 0, 1, 2 et 3 sites de phosphorylations dont les séquences correspondent à la protéine τ biomarqueur de la maladie d'alzheimer, la sélectivité de deux colonnes à greffage diol et aminopropyl a été évaluée pour séparer à pH 3,2 ces peptides ainsi que leurs isomères de position multiphosphorylés. Sur la colonne diol, la rétention des peptides augmente avec leur degré de phosphorylation, en adéquation avec le mécanisme HILIC, mais la sélectivité de cette colonne n'a pas été suffisante pour les séparer. Ces peptides ont pu être séparés sur la colonne aminopropyl comme le montre la Figure 28.

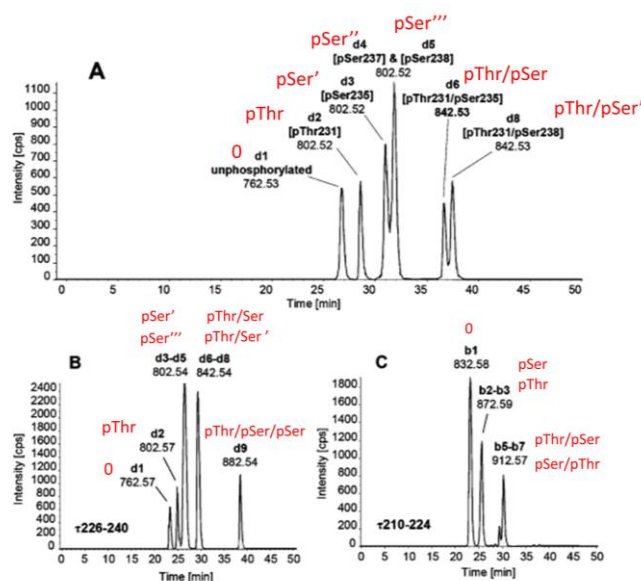


Figure 28: Chromatogrammes de la séparation de peptides multiphosphorylés et de leurs isomères de position mono-et di-phosphorylés acquis par HILIC-ESI-MS, avec une phase stationnaire aminopropyl. Elution en mode gradient avec une phase mobile composée de ACN/H₂O + ammonium formate 5mM, (A) pH =3,2 et (B)-(C) pH = 2. pSer correspond à un site de phosphorylation sur la sérine, pThr sur la Thréonine. 0 correspond aux peptides non-phosphorylés. (') permet de caractériser les isomères multiphosphorylés [151].

Dans les conditions A, une bonne séparation des peptides multiphosphorylés a été obtenue, même pour les isomères mono- et di-phosphorylés. Cependant, le peptide tri-phosphorylé d9 pThr/pSer/pSer n'a pas été élué dans ces conditions, probablement en raison de sa très forte interaction avec la phase stationnaire. Ce peptide a néanmoins pu être élué à pH 2, induisant une diminution de charge des groupements phosphates et donc des interactions électrostatiques attractives avec la phase stationnaire.

Toutefois, l'acidification a altéré la séparation des isomères de position. Bien que les conditions de séparation en milieu acide n'aient pas abouti à la séparation de l'ensemble des phosphopeptides, l'HILIC s'avère adaptée à la séparation des isomères des peptides multiphosphorylés, d'intérêt majeur en phosphoprotéomique [151].

L'HILIC a été combinée à une seconde technique séparative notamment la RPLC [150,153] et l'IMAC [154] dans des approches protéomiques et phosphoprotéomiques [155] pour séparer un mélange complexe de peptides non phosphorylés et multiphosphorylés, issus de digestats de protéines. En effet, elle permet de séparer en première dimension les peptides mutiphosphorylés de ceux non-phosphorylés. Les colonnes à fonction amide [154] et zwitterionique [153] ont été souvent employées en première dimension et ont permis de séparer les peptides phosphorylés avec une bonne résolution. Une résolution équivalente et même améliorée a été observée par rapport à la chromatographie échangeuse d'ions généralement employée en première dimension avant la RPLC [156].

5.2.2. A la séparation de complexes métalliques

Bien que les complexes métalliques soient polaires, très souvent chargés, et à caractère hydrophile selon la nature du ligand, le mode HILIC est relativement peu utilisé pour la séparation de ce type d'analytes. La [Figure 29](#) montre la répartition de l'utilisation de l'HILIC selon la nature des analytes depuis 2015.

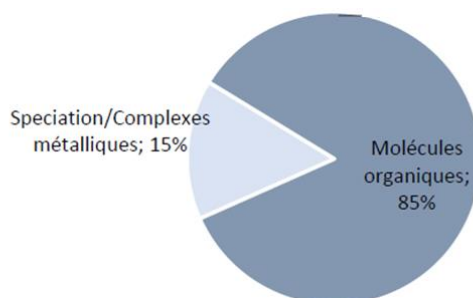


Figure 29 : Emploi du mode HILIC selon la nature des analytes, depuis 2015 (effectué le 10/07/2020).

L'utilisation de l'HILIC pour la séparation de complexes métalliques représente seulement 15% des activités malgré les avantages potentiels de cette technique séparative pour ce type d'analytes. Les travaux traitant l'utilisation de l'HILIC pour la séparation de complexes métalliques, ont été réalisés par couplage avec l'ESI-MS ou avec l'ICP-MS, et plus rarement, avec ces deux techniques simultanément. Parmi ces complexes, ceux à base de cisplatine employés en tant qu'agents anticancéreux [157], à base de lanthanides tels que les complexes Ln-EDTA et DTPA d'intérêt dans des applications nucléaires [10,158], à base de Gadolinium (Gd) employés comme agents de contraste pour les imageries médicales, dans des matrices de sang [159] et dans l'eau de surface et l'eau de mer dans le contexte de contamination de l'environnement par ces agents [160,161]. De plus, les complexes à base de Gd ont été également quantifiés en ligne par ICP-MS en aval de leur séparation par HILIC [159–161]. De plus, des complexes à base d'aluminium ont été également séparés par cette technique afin d'identifier les ligands responsables de la détoxification de cet élément dans les plantes [162] ainsi que les organométalliques à base de

sélénium afin d'identifier et de quantifier ces complexes dans des échantillons environnementaux [163]. Les phases stationnaires employées dans ces applications sont principalement à fonction amide, diol et zwitterionique qui ont montré de bonnes performances en terme de sélectivité et de résolution pour séparer les complexes métalliques d'intérêt.

L'utilisation de l'HILIC pour la séparation de complexes de métaux de transition est beaucoup moins répandue. La sélectivité de phases stationnaires polaires a été évaluée pour séparer des complexes de Cu avec les ligands polyaminocarboxylates, pour déterminer et quantifier ces ligands dans des eaux naturelles [164]. La séparation des complexes Cu-polyaminocarboxylates a été réalisée par HILIC avec une colonne amide et par RPLC, couplées à l'ESI-MS. La sélectivité de la séparation de ces complexes par HILIC, ainsi que la sensibilité de la détection ont été comparées avec celles obtenues en RPLC, et avec différents sels dans la phase mobile. La Figure 30 montre un exemple de profils d'élution des complexes de Cu avec l'EDTA et le DTPA, parmi huit ligands polyaminocarboxylates.

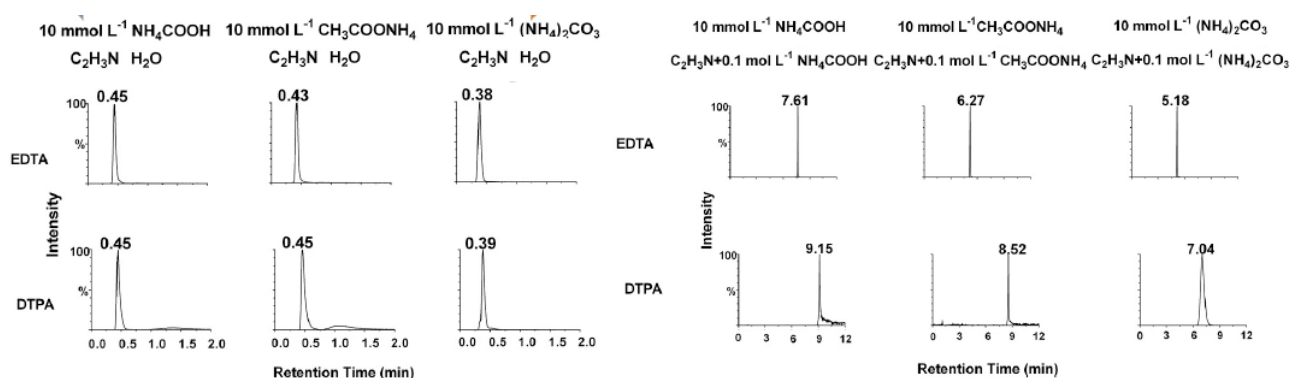


Figure 30 : Profils d'élutions obtenus des complexes de Cu-EDTA et Cu-DTPA enregistrés par ESI-MS couplée à la RPLC (à gauche) et à l'HILIC (à droite).

Comme attendu, on observe que les complexes sont plus retenus en HILIC qu'en RPLC. De plus, la sensibilité de la détection en ESI-MS est meilleure par couplage à l'HILIC par rapport à la RPLC, en raison de la proportion importante en modificateur organique. La nature du sel a influencé la sensibilité et l'allure des pics en RPLC comme en HILIC. Les meilleurs performances ont été obtenues avec le carbonate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ pour les deux modes de séparation [164].

Par ailleurs, lors de la séparation de complexes métalliques, il est important de prendre en compte leurs aspects cinétique et thermodynamique. La séparation de complexes métalliques peut être délicate et requiert des conditions de séparation permettant de préserver le plus possible l'intégrité de leur structure. De ce fait, l'analyse de complexes labiles par HILIC est très peu décrite malgré la potentialité de ce mode de séparation. A titre d'exemple, la sélectivité de deux colonnes à greffage zwitterionique (Tableau 6) a été évaluée pour séparer des complexes métalliques labiles de Cu, Ni et Zn avec plusieurs ligands, notamment des acides aminés, des phytosidérophores à $\text{pH} = 7,3$ [165]. Les deux colonnes zwitterioniques diffèrent par la nature du groupement chargé négativement et par l'arrangement des charges, ce qui affecte l'ordre d'élution et la sélectivité de séparation des ligands et des complexes

associés. Dans ces conditions de pH, la colonne à fonction phosphorylcholine semble être plus adaptée pour séparer des complexes labiles de Cu et de Ni que la sulfobetaine (Tableau 6). En effet, cette dernière présente des groupements SO_3^- accessibles qui peuvent subir des interactions électrostatiques attractives avec le Cu et le Ni chargés positivement, ce qui peut conduire à la dissociation des complexes. Cependant, avec la colonne à fonction phosphorylcholine, le groupement PO_4^- est moins disponible pour interagir avec les cations métalliques, ce qui permet de préserver leurs complexes lors de la séparation. Plusieurs phases stationnaires ont été testées pour séparer à pH 5,5 des complexes de Fe et de Cu avec des ligands citrate (Cit) et histidine (His), issus de plantes [12]. Les chromatogrammes acquis par ESI-MS pour la séparation des complexes Cu(His) standards avec les phases stationnaires à fonction diol, amide et zwitterionique sont présentés dans la Figure 31.

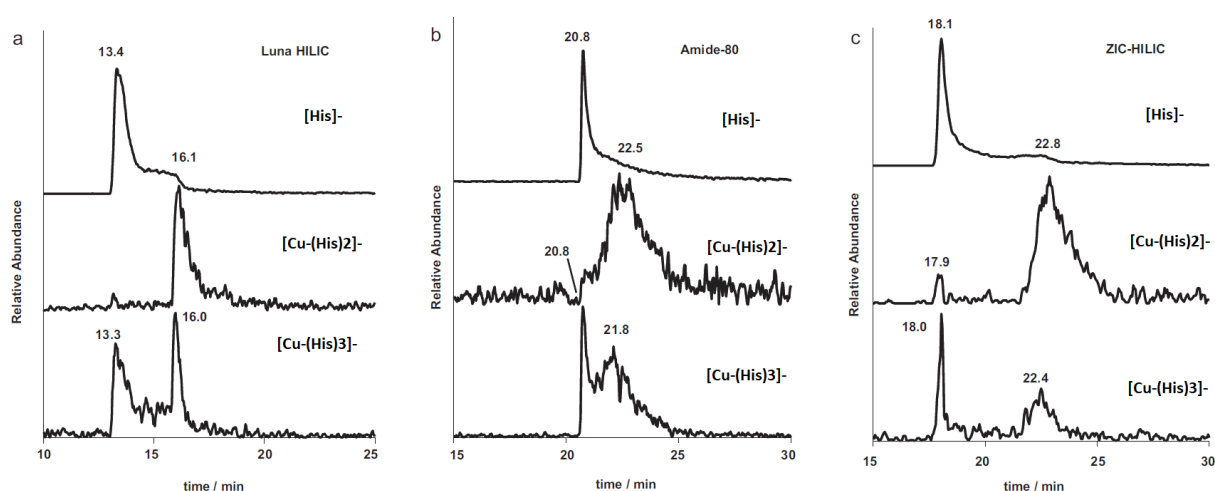


Figure 31 : Profils d'élutions des complexes Cu-Histidine acquis par HILIC-ESIMS. Phases stationnaires à fonction (a) diol, (b) amide, (c) zwitterionique. Elution en mode gradient avec une phase mobile composée d'acétonurie et d'eau+ 10 mmol L⁻¹ acétate d'ammonium [12].

La Figure 31 montre que la fraction non complexée de l'histidine est moins retenue que le complexe Cu(His) de stœchiométrie 1-2 avec les trois colonnes. Cette différence a été attribuée à l'hydratation plus importante du complexe Cu(His) par rapport à l'His, induisant une rétention plus importante du complexe *via* le partage hydrophile. Le profil d'élution du complexe Cu(His)₃ montre deux pics élués avec les mêmes temps de rétention que les deux espèces His et Cu(His)₂, la proportion relative de ces pics diffère avec les trois colonnes (Figure 31). Les auteurs soulignent que le complexe Cu(His)₃ n'est stable qu'en présence d'excès de ligand et suggèrent qu'il se dissocie partiellement lors de la séparation pour donner Cu(His)₂ et His libre, expliquant ainsi l'observation de deux pics. La différence des proportions relatives de ces deux pics avec les trois colonnes reflètent la contribution plus ou importante des modes d'interactions mis-en jeu au processus de dissociation [12]. En revanche, la structure du complexe Cu(His)₂ semble conservée au cours de la séparation avec les trois colonnes.

En conclusion, l'ensemble de ces études met en évidence la potentialité de l'HILIC pour séparer des complexes non covalents à caractère labile. Ainsi, elle apparaît comme une technique prometteuse pour séparer les complexes d' UO_2^{2+} . La compatibilité de l'HILIC avec les conditions de détection par ESI-MS et ICP-MS permet de mettre en œuvre un couplage simultané avec ces deux techniques, dans l'optique d'acquérir des informations complémentaires pour explorer l'interaction de l' UO_2^{2+} avec des molécules et de déterminer des échelles d'affinité de ces molécules pour l' UO_2^{2+} . A notre connaissance, l'emploi de l'HILIC pour séparer les complexes d' UO_2^{2+} n'a jamais été décrit dans la littérature.

Chapitre II : Techniques de spectrométrie de masse

Ce chapitre décrit le principe de fonctionnement des différentes techniques de spectrométrie de masse utilisées au cours de ce travail, ainsi que leurs spécificités complémentaires. Il s'agit des techniques à source d'ionisation électrospray (ESI-MS : ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry) et à source plasma à couplage inductif (ICPMS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).

1. Spectrométrie de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS)

Cette technique consiste à ioniser des analytes à pression atmosphérique à partir d'un échantillon liquide et à transférer les ions formés en phase gazeuse vers l'analyseur où ils sont séparés selon leur rapport masse/charge « m/z ». L'ESI-MS permet d'acquérir des données structurales d'analytes selon une approche ciblée ou non ciblée ainsi que des données quantitatives [166]. Un spectromètre de masse à source d'ionisation électrospray est constitué des composantes suivantes : source d'ionisation, analyseur et détecteur (voir Figure 32).

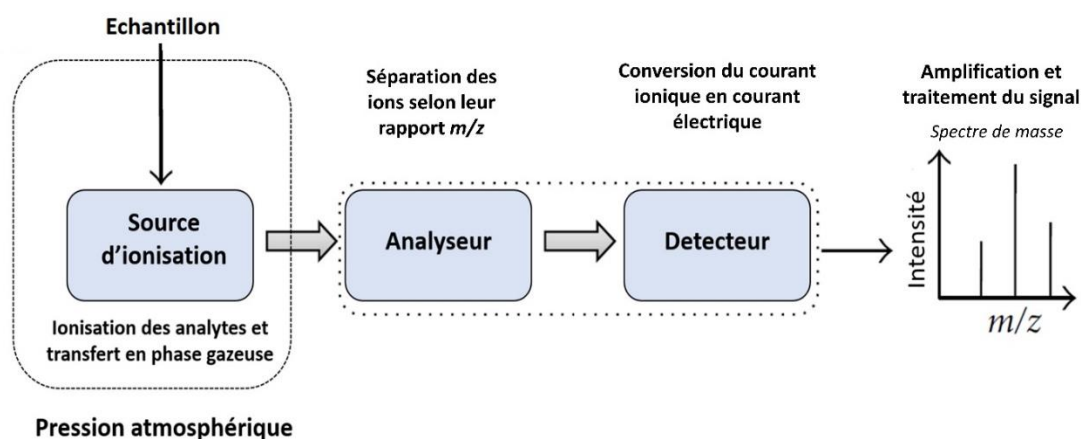


Figure 32 : Principales composantes d'un spectromètre de masse à source d'ionisation électrospray. Adapté de S. Banerjee and S. Mazumdar [167].

Le principe et le rôle de chaque composante sont brièvement décrits dans les paragraphes suivants.

1.1. Source d'ionisation et processus électrospray

La source d'ionisation électrospray permet de générer des ions en phase gazeuse et à pression atmosphérique par électro-nébulisation d'un échantillon en phase liquide. Il s'agit d'un processus peu énergétique, induisant très peu de fragmentations et donc permettant de préserver au maximum l'intégrité des espèces contenues dans l'échantillon, ce qui est particulièrement intéressant pour la caractérisation de complexes métalliques notamment, dans le domaine de la métallomique [168]. Ce mode d'ionisation offre également la possibilité de générer des ions mono- ou multiples chargés et ainsi d'observer des polymères ou des (métallo)protéines [168].

La source d'ionisation électrospray est composée d'une sonde classique ESI ou chauffée H-ESI contenant un capillaire d'introduction de l'échantillon, d'un tube de transfert chauffé, d'un tube lens

et d'un cône échantillonneur (skimmer). Le processus de génération d'ions, de leur désolvatation et de leur transfert en phase gazeuse dans l'analyseur est représenté dans la [Figure 33](#).

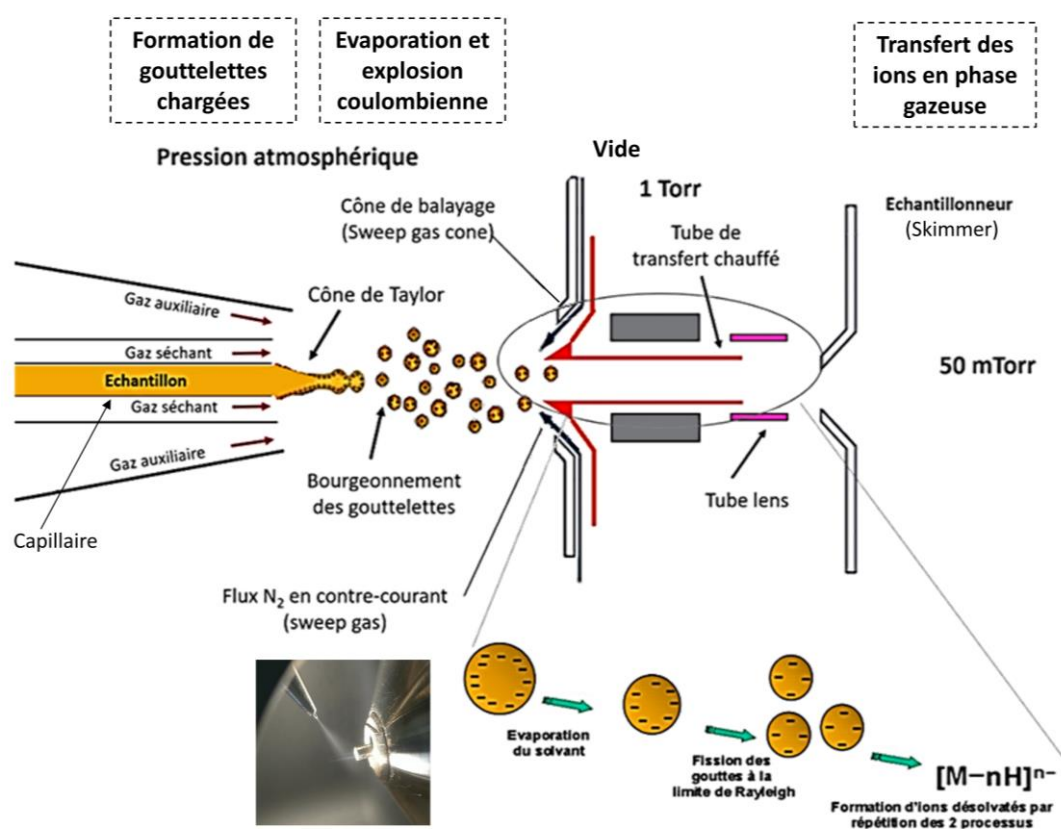


Figure 33: Processus de génération d'ions en phase gazeuse par une source électrospray. Adapté de [169].

L'échantillon en solution est introduit dans la source au moyen d'un capillaire, à un débit compris entre 1 et 1000 $\mu\text{L min}^{-1}$, par infusion directe avec un pousse seringue ou en aval d'une technique séparative, généralement la chromatographie liquide (LC). Deux flux d'azote concentriques assurent la désolvatation de l'échantillon et la formation d'un aérosol. Le rôle du gaz séchant (sheath gas) est d'évaporer le solvant au contact de l'échantillon, en formant une gaine autour de ce dernier. Le gaz auxiliaire permet d'assister la désolvatation et de focaliser l'aérosol pour les débits les plus élevés, ce qui est généralement le cas lors du couplage de l'ESI-MS avec la LC.

Une différence de potentiel (2,5-4 kV) appliquée entre l'extrémité du capillaire et le tube lens qui joue le rôle d'une contre électrode, induit une séparation des charges dans le liquide par un phénomène de migration électrophorétique des cations et des anions, puis une accumulation de charges de même signe à la surface du liquide, jusqu'à sa déstabilisation. Ainsi, des gouttelettes chargées sont créées et émises à l'extrémité du capillaire. L'évaporation progressive du solvant conduit à une réduction de la taille des gouttelettes et à une augmentation de la densité de charge surfacique. Lorsque le rayon critique atteint la limite de Rayleigh, les forces de répulsion électrostatique des charges deviennent prépondérantes par rapport à la tension superficielle des gouttelettes qui assure leur cohésion, une

cascade d'explosions coulombiennes se produit conduisant à la fission des gouttelettes et à la formation de gouttelettes plus petites (voir Figure 33). Ce processus d'évaporation/explosions coulombiennes se poursuit jusqu'à libération d'ions désolvatés et chargés en phase gazeuse. Les ions émis en phase gazeuse sont transférés vers l'échantillonneur sous l'influence d'un gradient de pression décroissant, combiné à un gradient de tension. Ils sont ensuite focalisés et transmis sous vide jusqu'à l'analyseur par l'optique ionique, constituée d'un jeu de lentilles et de quadripôles [166].

1.2. Analyseurs et détecteurs

1.2.1. L'analyseur quadripolaire QqQ

Une fois les ions produits en phase gazeuse, ils sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) dans l'analyseur. Plusieurs types d'analyseurs existent, dont le principe de séparation repose sur l'application de champs électriques (quadripôle, temps de vol, piège à ions, orbitrap) ou électromagnétiques (résonance cyclotronique ionique ICR), ou sur l'association de plusieurs analyseurs pour les hybrides, ex : quadripôle-temps de vol (Q-TOF) [170].

Les analyseurs se caractérisent par [170] :

- Le pouvoir de résolution RP (Resolving Power) défini pour un rapport m/z donné, traduit la capacité de l'analyseur à séparer deux ions de rapport m/z voisins et s'exprime par la relation :

$$RP = \frac{m}{\Delta m}$$

Avec m le rapport m/z de l'ion considéré et Δm la largeur à mi-hauteur du pic (FWHM : Full Width at Half Maximum). Une diminution de Δm engendre une augmentation du pouvoir de résolution.

- La résolution est communément exprimée par la largeur à mi-hauteur du pic Δm . Sa valeur est constante au cours de l'acquisition d'une gamme de masse.

Un analyseur performant présente une résolution faible et un pouvoir de résolution élevé.

- L'incertitude sur la mesure de la masse représente la différence relative entre la valeur de m/z théorique et celle obtenue expérimentalement. Elle est exprimée en partie par million (ppm)

L'instrument utilisé dans ce travail est un TSQ quantum ultra de Thermo Fischer Scientific à source H-ESI, muni d'un analyseur à triple quadripôles (QqQ) (Figure 34). Il s'agit d'un analyseur à basse résolution, se caractérisant par une résolution de l'ordre de l'unité et un pouvoir de résolution inférieur à 10 000. Cet analyseur présente une incertitude maximale sur la mesure de la masse aux alentours de 5 ppm.

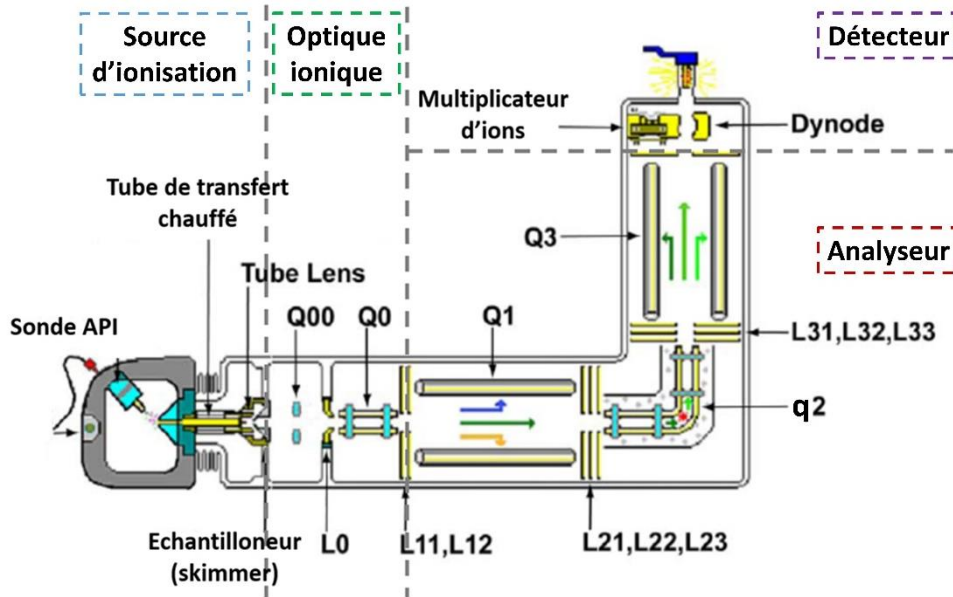


Figure 34: Principales composantes du TSQ quantum

Le TSQ quantum est muni d'une source d'ionisation électrospray chauffée (H-ESI), d'un système d'optique ionique constitué de lentilles L0, L11, L12 et des quadripôles Q00 et Q0 pour focaliser et transmettre les ions de la source vers l'analyseur. Ce dernier comprend trois quadripôles, dont Q1 et Q3 étant des analyseurs de masse séparés par q2, jouant le rôle d'une cellule de collision pour les réactions de fragmentations des ions.

Un quadripôle est formé de quatre barres métalliques connectées deux à deux, par paires et soumises à un potentiel opposé $\pm \phi_0 = \pm (U - V \cos(\omega t))$, Figure 35.

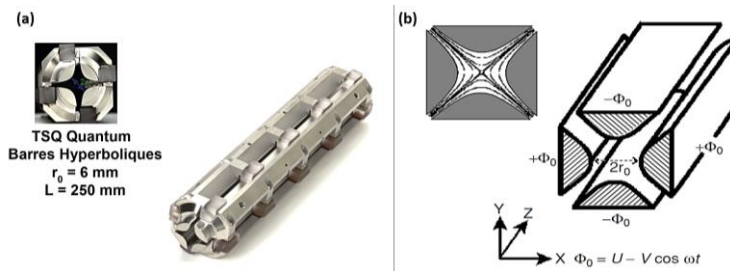


Figure 35 : (a) Photo d'un quadripôle du spectromètre TSQ quantum (b) Schéma d'un quadripôle et ses deux paires de barres métalliques soumises à des potentiels opposés [166].

ω est la fréquence angulaire en $ra\ s^{-1}$ où $\omega = 2\pi f$, et f la fréquence du champ radiofréquence, V l'amplitude de la composante sinusoïdale (RF) et U la tension continue (DC).

En appliquant une différence de potentiel entre les deux paires de barres alternativement, les ions se déplacent le long de l'axe du quadripôle avec une trajectoire oscillante sous l'influence d'un champ électrique résultant de la conjugaison d'un champ alternatif (RF) et d'un champ continu (DC). Un ion de rapport m/z donné aura une trajectoire stable uniquement pour un couple de valeurs de U et V , qui définissent la zone de stabilité de l'ion [166]. Ainsi, ce dernier pourra traverser le quadripôle et

atteindre le détecteur. Les ions de rapports m/z différents ont une trajectoire instable, ils entrent en contact avec les barres du quadripôle et n'atteignent pas le détecteur.

➤ **Fonctionnement du QqQ en mode spectrométrie de masse simple (MS)**

Pour $U = 0$, l'analyseur fonctionne uniquement en mode RF (RF only). Dans ce cas, tous les ions ont une trajectoire stable et traversent le quadripôle, qui a le rôle d'un guide d'ions. Une augmentation des valeurs de U et V , en conservant le rapport U/V constant selon $U=kV$, conduit donc à une progression successive des ions de masses m_1 , m_2 et m_3 dans l'analyseur. C'est le mode full scan (FS) ou balayage complet, qui permet de balayer une gamme de masse déterminée (Figure 36-a). Ce mode peut être appliqué au niveau de Q1 ou Q3. Le mode FS est utilisé dans le cas d'une approche non ciblée, puisqu'il offre la possibilité de cribler un nombre important d'ions, permettant l'identification de l'ensemble des molécules présentes dans un échantillon.

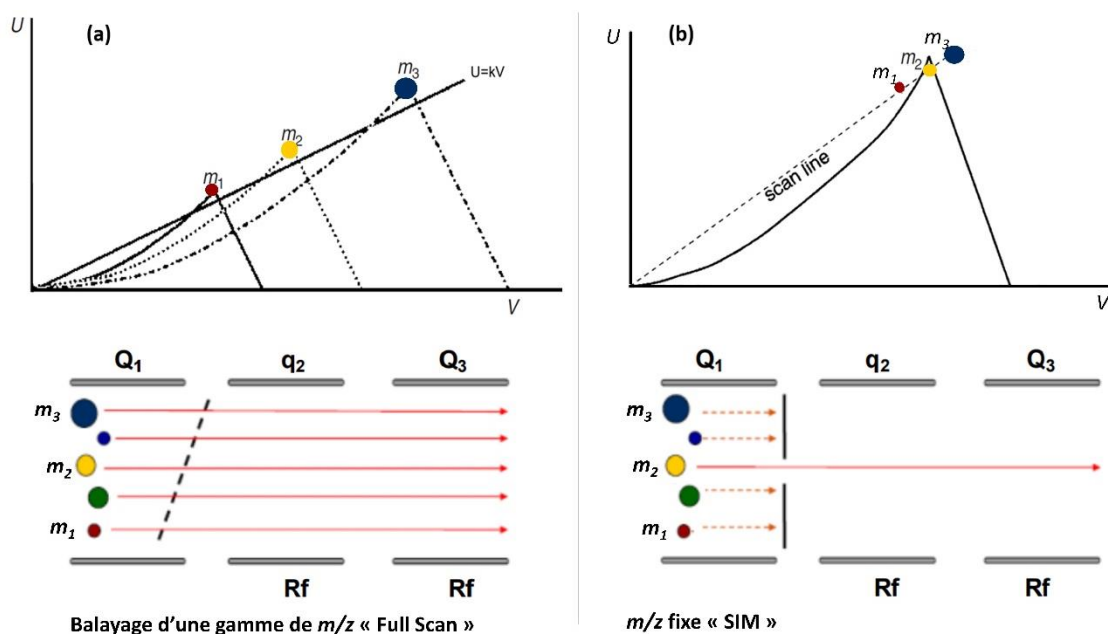


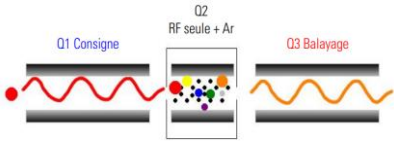
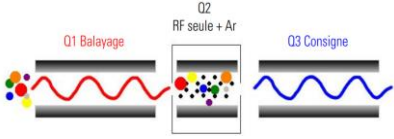
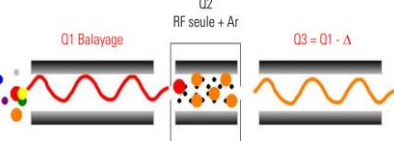
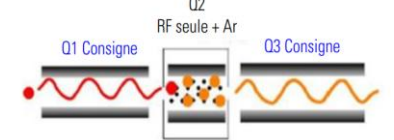
Figure 36 : Diagramme de stabilité d'ions de masses différentes $m_1 < m_2 < m_3$ en fonction de U et V . (a) Mode full scan (FS). (b) mode Single Ion monitoring (SIM). Adapté de [166] et [171].

Pour un rapport U/V fixé, correspondant à l'apex de la zone de stabilité d'un rapport m/z défini, l'analyseur joue le rôle d'un filtre de masse (Figure 36-b). Ainsi, seuls les ions ayant le rapport m/z correspondant sont transmis au détecteur. C'est le mode Single Ion Monitoring (SIM) ou suivi d'ions sélectionnés. Ce mode est utilisé dans une approche ciblée et les ions de rapport m/z dont les caractéristiques spectrales sont connues, sont collectés pendant une durée plus importante dans le détecteur par rapport au mode FS, impliquant une augmentation de la sensibilité d'un facteur 15 à 25. Le rapport m/z sélectionné peut être détecté avec une fenêtre d'isolation Δm ajustée selon le motif isotopique de l'analyte. Pour les molécules organiques ou les éléments mono-isotopiques, la fenêtre peut être restreinte à une valeur de $\Delta m = 1$.

➤ **Fonctionnement du QqQ en mode spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)**

Dans le cas de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), le quadripôle q2 fonctionne en mode « RF-only » et a pour rôle de fragmenter un ion précurseur présélectionné en plusieurs ions produits. Cette fragmentation est effectuée par activation énergétique et collision avec un gaz inerte introduit dans q2 (*collision induced dissociation*, CID). Q1 et Q3 jouent le rôle de guide d'ions ou de filtre de masse. Diverses configurations de balayages peuvent être réalisées en mode MS/MS selon l'information souhaitée. Elles sont représentées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Différentes configurations de balayages employés en mode MS/MS. Adapté de [172].

Modes de balayage	Q1 – q2 – Q3	Description
MS/MS produit		Un ion précurseur de masse m/z est sélectionné en Q1 puis fragmenté en q2 par CID. La gamme de masse des ions produits issus de cette collision est balayée en Q3. L'interprétation du spectre de masse des ions produits permet d'acquérir des informations structurales sur l'ion précurseur
MS/MS précurseur		Un ion produit de masse m/z est sélectionné en Q3. La gamme de masse correspondant aux ions précurseurs fragmentés en q2 est balayée en Q1. Ce mode permet d'identifier l'ion précurseur à l'origine de l'obtention des ions produits sélectionnés
MS/MS perte de neutre		Q1 et Q3 sont utilisés simultanément pour balayer des gammes de masse décalées d'une différence de masse Δm qui correspond à la perte d'une molécule neutre. Ce mode est souvent utilisé pour identifier les pertes de molécules d'eau en sélectionnant une différence de masse $\Delta m = 18$
SRM (Single Reaction Monitoring)		Un ion précurseur de masse m/z est sélectionné dans Q1 puis fragmenté dans q2. Des ions produits ciblés de rapports m/z spécifiques sont sélectionnés dans Q3. Ce mode permet une mesure spécifique de l'ion d'intérêt et est particulièrement employé lors de la quantification

1.2.2. Détecteur

Après avoir traversé l'analyseur, les ions sont transmis vers le détecteur où ils sont convertis en courant électrique mesurable. Le détecteur implanté dans le TSQ quantum est constitué d'une dynode de conversion et d'un multiplicateur d'électrons. Les ions issus de l'analyseur entrent en contact avec la dynode portée à un potentiel ± 15 kV selon le mode d'ionisation sélectionné. Ainsi, des particules secondaires de charge opposée sont générées puis accélérées par un gradient de tension vers le multiplicateur d'électrons. Chaque particule entrant en collision avec le multiplicateur d'électrons conduit à la génération d'un électron, qui ensuite est multiplié en cascade pour produire un courant électrique. Le facteur de conversion de la dynode, correspondant au nombre de particules secondaires émises pour un ion entrant et le facteur de multiplicateur d'électrons définissent la puissance d'amplification du détecteur. Le détecteur du TSQ quantum présente une puissance d'amplification

de l'ordre de 10^6 . Le courant électrique amplifié est ensuite numérisé par le système informatique pour être traduit sous forme d'un spectre de masse.

1.3. Paramètres de source et d'acquisition de l'ESI-MS QqQ

1.3.1. Paramètres de source

Les paramètres de la source doivent être optimisés afin d'assurer une ionisation efficace et obtenir un signal le plus intense et stable possible. Ces paramètres dépendent fortement du débit imposé par le mode d'introduction de l'échantillon. Ils sont listés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Paramètres de source de l'ESI-MS et leur rôle.

Paramètres de source	Rôle
Position de la sonde	Dépend du débit d'introduction de l'échantillon: pour un faible débit, elle doit être proche de l'orifice du tube de transfert et pour un débit élevé, elle doit en être éloignée
Tension du spray (V)	Dépend du débit, de la matrice et de la composition de l'échantillon Assure l'ionisation des analytes
Température de vaporisation (°C)	Dépend du débit, de la composition de la phase mobile et de l'échantillon Assure la désolvatation
Gaz séchant (unité arbitraire)	Dépendent du débit et de la composition de la phase mobile Assurent la désolvatation
Gaz auxiliaire (unité arbitraire)	
Température du capillaire (°C)	
Skimmer offset (V)	Tension appliquée au niveau du tube lens pour fragmenter les adduits dans la source

1.3.2. Paramètres d'acquisition

De même que pour les paramètres de source, les paramètres d'acquisition peuvent influencer la sensibilité du signal et doivent être optimisés. Ces paramètres sont listés ci-après.

- Le mode d'acquisition profil/centroïde : Le mode profil permet une représentation complète de la distribution des ions dans un spectre de masse. Cependant, le mode centroïde affiche un seul point centré pour chaque distribution d'ions dans un spectre
- Le mode de balayage en mode MS Full scan (FS)/Single Ion Monitoring (SIM) ou en mode MS/MS
- Résolution (Δm) : la valeur typiquement employée pour le TSQ Quantum est de 0,7 u
- Le temps de scan : représente le temps nécessaire pour balayer la gamme de masse consignée. Plus le temps de scan est important, plus le nombre d'ions collectés dans le détecteur et donc la sensibilité, sont importants. Le temps de scan du TSQ Quantum est compris entre 0,01 et 600 s.

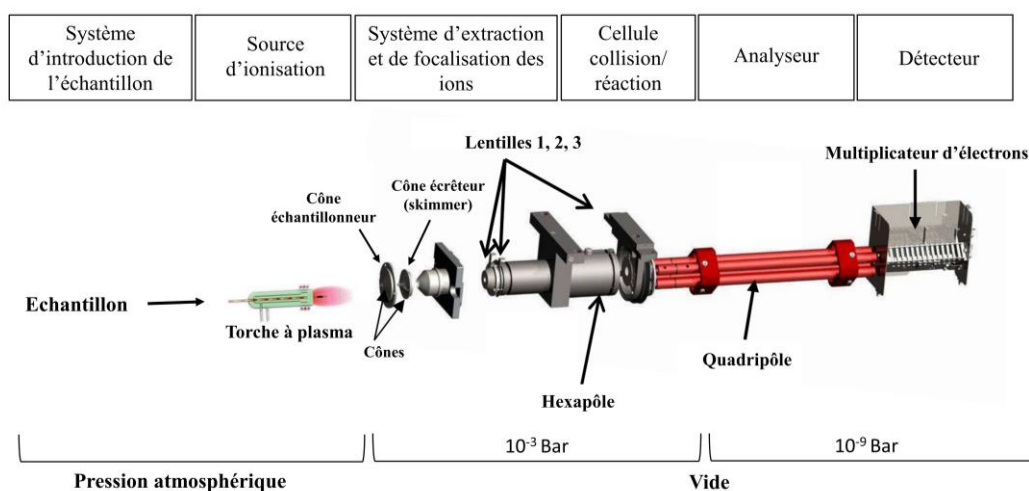


Figure 38 : Principales composantes d'un ICP-MS-Q X série II – Thermo Fisher Scientific. Adapté de [174].

Les différentes étapes suivies par l'analyte dès son introduction jusqu'à sa détection sont détaillées ci-après.

2.1. Système d'introduction de l'échantillon

Le système d'introduction de l'échantillon est composé d'un nébuliseur, d'une chambre de nébulisation et d'un injecteur (voir Figure 39).

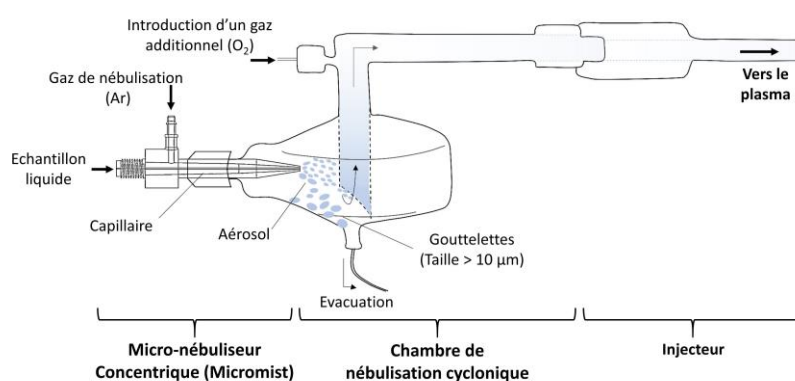


Figure 39: Principales composantes du système d'introduction d'échantillon dans une source ICP d'un spectromètre de masse de type X série II – Thermo Fisher Scientific.

L'échantillon liquide est introduit dans un nébuliseur au sein duquel il entre en contact avec un gaz inerte, souvent l'argon, pour générer un aérosol. Les nébuliseurs les plus fréquemment utilisés sont des micro-nébuliseurs avec un débit de fonctionnement compris entre 50 et 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ et des rendements de nébulisation compris entre 15 et 20% [175]. Une fois l'aérosol généré, les gouttelettes dont la taille est supérieure à 10 μm sont éliminées dans une chambre de nébulisation. La taille des gouttelettes conditionne l'efficacité des phénomènes qui se déroulent dans le plasma, notamment la désolvatation, la vaporisation, l'atomisation et l'ionisation des échantillons. La chambre de nébulisation permet de minimiser la quantité de solvant atteignant le plasma par effet de

condensation, en la refroidissant par effet Peltier [176]. Dans le cas d'une chambre cyclonique (Figure 39), cette dernière est équipée d'une entrée d'un gaz additionnel au gaz de nébulisation, souvent l'oxygène, en cas d'utilisation de solvants organiques. Enfin, les gouttelettes sélectionnées sont acheminées vers la torche à plasma *via* un injecteur.

2.2. Source d'ionisation

La source d'ionisation est un plasma d'argon, formé au niveau d'une torche en quartz par couplage inductif d'un champ électromagnétique radiofréquence et d'un flux d'argon dans lequel l'échantillon est ionisé Figure 40.

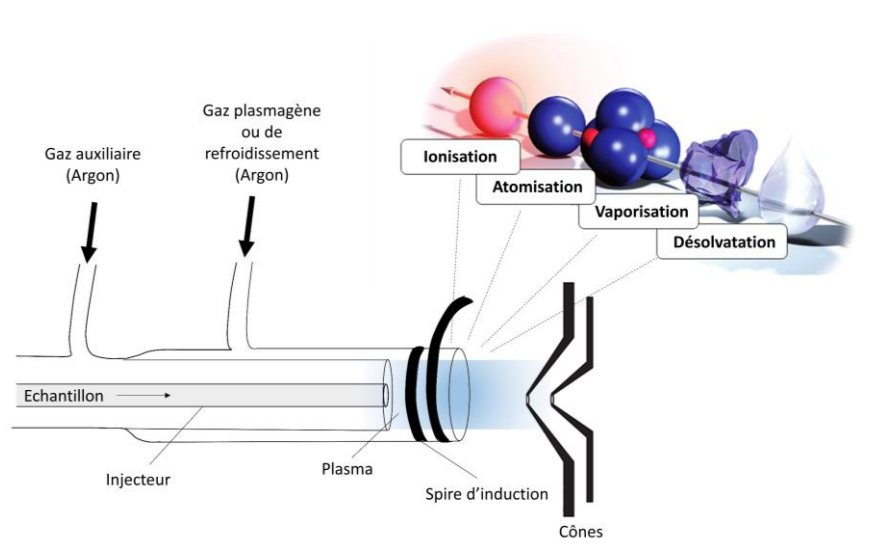


Figure 40 : Représentation d'une source d'ionisation à plasma d'argon d'un ICP-MS [175].

La spire d'induction entourant la torche est alimentée par un champ électrique produit par un générateur de radiofréquence, délivrant une puissance comprise entre 600 et 1700 W, générant de ce fait un champ magnétique. La torche est composée de trois tubes concentriques : un tube central nommé l'injecteur, un tube intermédiaire et un tube extérieur. Le gaz plasmagène, l'argon, est introduit dans ce champ avec un débit d'environ 15 L min^{-1} *via* le tube extérieur de la torche, déclenchant ainsi son ionisation par décharge électrique selon l'équation suivante $\text{Ar} \leftrightarrow \text{Ar}^+ + 1\text{e}^-$. Le plasma est alors généré puis entretenu par la circulation des électrons et des cations d' Ar^+ sous l'influence du champ magnétique. Le plasma d'argon est macroscopiquement électriquement neutre et très énergétique, avec des températures comprises entre 6 000 et 8 000 K [173]. L'énergie de première ionisation de l'argon particulièrement élevée (15,75 eV) permet d'ioniser la majorité des éléments du tableau périodique ($\approx 90 \%$). Le gaz auxiliaire introduit dans la torche par le tube intermédiaire à un débit compris entre $0,5$ et 2 L min^{-1} , permet de positionner le plasma par rapport à la spire d'induction et à l'extrémité du tube central. Ce dernier, nommé injecteur, assure l'introduction de l'échantillon sous forme d'aérosol au sein du plasma *via* le gaz de nébulisation. Le

plasma transfère son énergie à l'échantillon qui est désolvaté, vaporisé, atomisé, excité puis ionisé (Figure 40) [173,177].

2.3. Système d'extraction et de focalisation des ions

Une fois les ions générés dans le plasma à pression atmosphérique, ils sont extraits puis transmis dans l'analyseur maintenu sous vide par l'intermédiaire d'une interface formée d'une paire de cônes [173,176]: cône échantillonneur (sampler) et écrêteur (skimmer) (Figure 40).

Le cône échantillonneur permet d'extraire les ions du plasma *via* un orifice au contact de ce dernier. Le cône est donc fabriqué avec un matériau thermiquement résistant et chimiquement inerte, souvent le nickel ou le platine [178]. L'orifice de ce cône d'environ 1 mm permet un passage des ions de la pression atmosphérique vers une zone de vide à 10^{-3} Bar. Un jet supersonique se produit ainsi en aval de l'orifice du cône. Le cône écrêteur, fabriqué avec le même matériau que le cône échantillonneur, mais avec un orifice de diamètre plus petit (0,4 et 0,9 mm respectivement), extrait les ions du centre du jet supersonique. Les ions sont ensuite focalisés par des lentilles électrostatiques (voir Figure 38) puis dirigés vers l'analyseur où la pression est maintenue à environ 10^{-9} Bar avec une pompe associée à une ou plusieurs pompes turbomoléculaires [173].

2.4. Cellule de collision/réaction (collision/reaction cell, CRC)

Au sein du plasma, une combinaison de deux ou plusieurs atomes différents de l'élément à analyser peut avoir lieu, conduisant à la formation d'une espèce polyatomique de même masse. Il en résulte donc une surestimation de son signal. Un des moyens de s'affranchir des interférences polyatomiques est l'emploi de la cellule collision/réaction (CRC) située entre les lentilles et le quadripôle de l'ICP-MS (Figure 38). Elle permet d'introduire un gaz ou un mélange de gaz dans le but de réduire ces interférences par des processus de collision ou de réaction [179].

Lors du processus de collision avec un gaz chimiquement inerte, l'espèce polyatomique étant de taille supérieure à celle de l'analyte monoatomique, entre en collision de façon plus efficace avec le gaz, induisant une réduction de son énergie cinétique. En sortie de la CRC, les ions sont filtrés selon leur énergie cinétique permettant aux ions d'intérêt d'atteindre le détecteur sans les espèces interférentes. Lors du processus de réaction, le gaz réagit soit avec l'espèce polyatomique interférente soit avec l'ion d'intérêt. Il en résulte dans les deux cas deux espèces de masses différentes, permettant ainsi le transfert de l'ion d'intérêt dans l'analyseur sans être interféré par l'espèce polyatomique [178]. Les principales interférences polyatomiques qu'on peut rencontrer en analysant des métaux endogènes tels que Ca, Fe, Zn et Cu sont listées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Principales interférences polyatomiques observées lors de l'analyse de métaux endogènes [180].

Isotope	Abondance isotopique (%)	Interférences
⁴⁰ Ca	96,97	⁴⁰ Ar ⁺
⁵⁴ Fe	5,82	⁴⁰ Ar ¹⁴ N, ⁴⁰ Ca ¹⁴ N
⁵⁶ Fe	91,66	⁴⁰ Ar ¹⁶ O, ⁴⁰ Ca ¹⁶ O
⁵⁷ Fe	2,19	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺
⁶⁴ Zn	48,89	³² S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³² S ₂ ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺
⁶⁶ Zn	27,81	³⁴ S ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³² S ¹⁶ O ¹⁸ O ⁺ , ³² S ³⁴ S ⁺
⁶⁷ Zn	4,11	³⁵ Cl ¹⁶ O ₂ ⁺ , ³⁴ S ¹⁶ O ²¹ H ⁺
⁶⁸ Zn	18,57	⁴⁰ Ar ¹⁴ N ₂ ⁺ , ³⁴ S ₂ ⁺
⁶³ Cu	69,1	⁴⁰ Ar ²³ Na ⁺ , ¹⁶ O ¹² C ³⁵ Cl ⁺ , ¹⁴ N ¹² C ³⁷ Cl ⁺
⁶⁵ Cu	30,9	³² S ¹⁶ O ₂ ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ²⁵ Mg ⁺ , ⁴⁰ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺

Le gaz de collision le plus utilisé dans les CRC pour s'affranchir des interférences est l'Hélium (He) et les gaz de réaction utilisés fréquemment sont le dioxygène (O₂), l'ammoniac (NH₃) ou le méthane (CH₄) [181].

Les CRC opérant en mode collision ou en mode réaction sont très souvent employées lors des analyses élémentaires et isotopiques dans différentes applications nucléaires, géologiques ou environnementales où les interférences polyatomiques affectent la précision des mesures [179,182]. Malgré ces avantages, ces deux modes présentent quelques inconvénients liés à la perte d'intensité de l'analyte lors du processus de collision et à la formation de nouveaux interférents suite à la combinaison d'ions atomiques présents dans le plasma (ex. l'Ar) ou dans la matrice de l'échantillon avec le gaz de collision.

2.5. Analyseur et détecteur

L'ICP-MS utilisé dans ce travail est équipé d'un analyseur quadripolaire, dont le principe de fonctionnement est identique à celui décrit dans la section précédente pour l'ESI-MS. Le quadripôle joue le rôle d'un filtre de masse qui assure la progression des ions de rapports m/z sélectionnés selon une trajectoire stable avant d'atteindre le détecteur. Ce dernier est un multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes à deux étages qui assure la production d'un flux électronique à partir du flux cationique. Le détecteur peut fonctionner en deux modes : mode analogique et mode comptage d'impulsions ioniques (Figure 41).

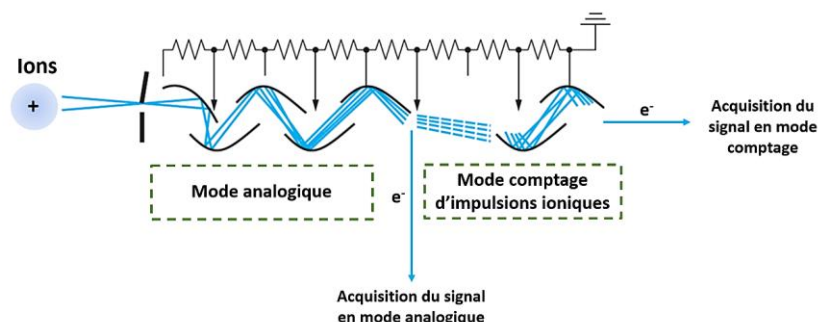


Figure 41 : Multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes fonctionnant en mode analogique ou en mode comptage d'impulsions ioniques. Adapté de [183].

Le mode comptage d'impulsions ioniques est très sensible et permet de détecter de faibles concentrations d'ions de l'ordre de quelques ng Kg^{-1} jusqu'à une dizaine de $\mu\text{g Kg}^{-1}$ selon l'élément, avec une intensité maximale de 2×10^6 coups par seconde (cps). Le mode analogique est moins sensible et permet de détecter des concentrations plus élevées, jusqu'à 100 mg Kg^{-1} , dont l'intensité est comprise entre 10^4 et 10^9 cps. La technologie de ce détecteur lui permet de fonctionner automatiquement en mode analogique ou en mode comptage en fonction d'un nombre seuil d'ions collectés par le multiplicateur d'ions secondaires.

2.6. Introduction de solvants organiques/hydro-organiques dans les sources ICP

Certaines analyses impliquent le couplage de l'ICP-MS à des techniques séparatives, imposant des phases mobiles hydro-organiques contenant de l'eau en plus d'un modificateur organique, souvent l'acétonitrile ou le méthanol avec parfois des sels. Or, l'introduction de ce type de matrice dans des sources ICP présente un impact sur les différentes étapes suivies par l'échantillon, de son introduction jusqu'à son ionisation [184]. L'introduction de phases mobiles hydro-organiques contenant souvent des sels peut causer (i) une instabilité du plasma, voire une extinction totale, (ii) un dépôt de sel dans les différents compartiments de l'ICP-MS du nébuliseur jusqu'aux cônes et (iii) un dépôt de carbone au niveau des cônes qui peut conduire à un bouchage physique [178]. Le couplage de la chromatographie à l'ICP-MS nécessite donc une adaptation du système d'introduction de l'échantillon pour minimiser la quantité de solvant organique atteignant le plasma, comme décrit ci-après [178,185]:

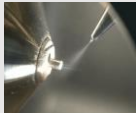

- Refroidissement de la chambre de nébulisation par effet Peltier afin de condenser les solvants
- Ajout d'oxygène dans la chambre de nébulisation (voir Figure 39) afin de favoriser la combustion du carbone en CO ou CO₂ et par suite éviter son dépôt sur les cônes
- Réduction du diamètre de l'injecteur

- Dilution post-colonne de la phase mobile en milieu nitrique pour obtenir des teneurs en sels et en solvants organiques tolérées par le plasma. Le facteur de dilution doit être choisi de sorte que la concentration de l'analyte soit en adéquation avec la sensibilité de l'instrument
- Remplacement des cônes en nickel par des cônes en platine plus résistants à l'oxydation induite par l'ajout d'oxygène

3. Complémentarité des spectromètres de masse à sources ESI et ICP

Comme montré dans le Tableau 10, les caractéristiques de l'ICP-MS sont complémentaires à celles de l'ESI-MS, permettant lorsque ces deux techniques de spectrométrie de masse sont couplées simultanément à une même technique séparative, d'acquérir des informations moléculaires, élémentaires et isotopiques en une seule analyse.

Tableau 10 : Spécificités complémentaires des techniques ESI-MS et ICP-MS.

ESI-MS 	ICP-MS 
Ionisation faiblement énergétique	Ionisation hautement énergétique
Liaisons chimiques préservées au maximum : identification d'espèces possible	Liaisons chimiques détruites : identification d'espèces impossible
Caractérisation structurale	Caractérisation multi-élémentaire
Analyse isotopique possible	Caractérisation isotopique
Ionisation très sensible aux effets de matrices	Ionisation peu sensible aux effets de matrices
Quantification dépendante du rendement d'ionisation des espèces chimiques	Quantification précise basée sur le signal des isotopes des éléments
Gamme dynamique restreinte pour les complexes métalliques	Large gamme dynamique
Couplage aisé avec des techniques chromatographiques	Couplage avec des techniques chromatographiques limité, nécessitant une adaptation du système d'introduction de l'échantillon selon la composition de la phase mobile

Chapitre III : Séparation des peptides et de leurs isomères de position par HILIC couplée à l'ESI-MS

Introduction

En raison de ses caractéristiques, l'HILIC est de plus en plus utilisée dans le domaine de la protéomique et la phosphoprotéomique [154,155] pour séparer des peptides, généralement de structure linéaire avec des séquences comportant des acides aminés non phosphorylés ou multiphosphorylés [145]. Ces séparations ont été entreprises majoritairement dans des conditions de pH acides à partir de digestats de protéines. En outre, quelques travaux ont été consacrés à des études de prédiction de la rétention en HILIC des peptides linéaires synthétiques ou issus de digestats de protéines [146,147,150]. Dans notre travail, les peptides considérés sont cycliques et pré-organisés, conçus spécifiquement pour mimer les sites de coordination du cation uranyle (UO_2^{2+}) dans ses protéines cibles, en particulier l'ostéopontine hautement phosphorylée (Figure 42) [9,69,113].

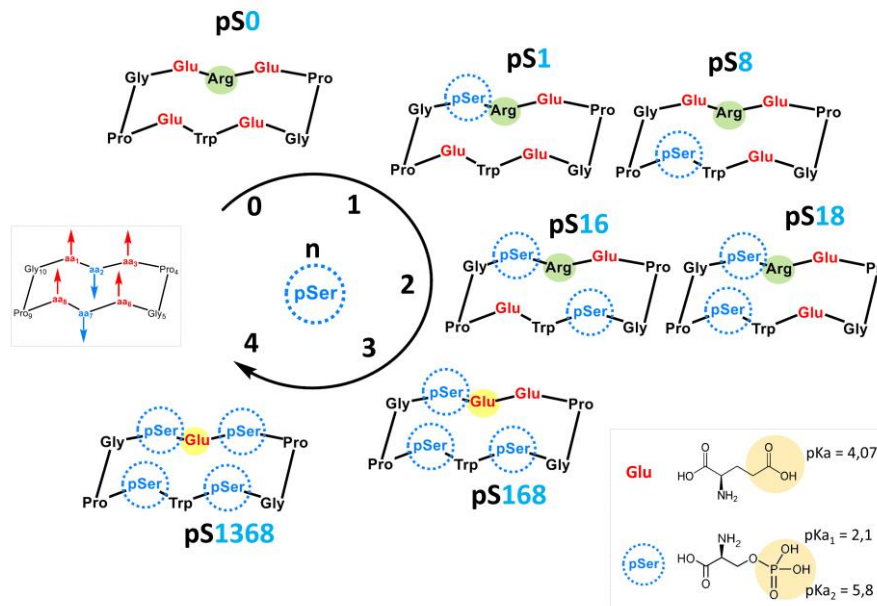


Figure 42: Structure des cyclodécapeptides synthétiques et de leurs isomères de position. Le nom des peptides est fonction du nombre et de la position des résidus pSer.

Avant de développer une méthode analytique dédiée à la détermination d'une échelle d'affinité de ces peptides vis-à-vis de l' UO_2^{2+} à pH physiologique (~ 7) par HILIC-ESI-MS/ICP-MS, l'investigation préalable des conditions de séparation et du comportement de ce type de peptides en HILIC et à ce pH, est essentielle. Le pH physiologique, n'étant pas fréquemment employé dans les études décrites dans la littérature, est un paramètre clef reflétant les conditions biologiques pertinentes en toxicologie, ce qui est d'une importance majeure pour les étapes suivantes visant à caractériser les interactions de l' UO_2^{2+} avec ces peptides.

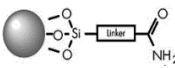
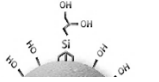
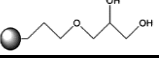
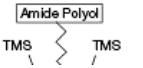
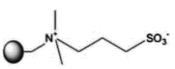
Ce chapitre décrit une étude des conditions chromatographiques à pH physiologique, en termes de phase stationnaire et de composition de phase mobile, pour séparer ces peptides y compris leurs isomères de position, par HILIC couplée à l'ESI-MS. A cette fin, la sélectivité de onze phases stationnaires polaires de colonnes provenant de différents fournisseurs a été évaluée dans une

première étape. L'effet de la composition de la phase mobile sur la sélectivité de séparation est ensuite décrit. Les mécanismes de séparation des peptides en HILIC sont enfin discutés dans une dernière partie, ainsi que l'impact de la nature et de la position des acides aminés dans la séquence peptidique sur la rétention des peptides.

1. Sélectivité de différentes phases stationnaires polaires

La sélectivité des onze colonnes (Tableau 11) pour séparer les cyclopeptides à pH physiologique a tout d'abord été évaluée en utilisant une phase mobile de référence, constituée de 70/30 ACN/H₂O (v/v) et contenant NH₄CH₃COO 20 mmol L⁻¹ [10]. Les chromatogrammes correspondants à chaque peptide ont été enregistrés en mode SIM, centré sur le rapport *m/z* caractéristique de l'espèce dichargée (Annexe III). La superposition des chromatogrammes de chaque peptide ainsi que les paramètres chromatographiques calculés pour chacun dans ces conditions, selon les équations présentées dans l'annexe IV, sont montrés dans la Figure 43 et le Tableau 12. Avec la colonne bioZen glycan, aucune élution des peptides n'a été observée, même en utilisant différentes compositions de phase mobile. Par conséquent, cette colonne a été retirée de l'étude dès cette étape.

Tableau 11: Spécifications des colonnes : Charge/fonctionnalisation, nom commercial, matériau de base, % de carbone, surface spécifique (m² g⁻¹) et dimensions (longueur x diamètre interne)

	Charge/ Fonctionnalisation	Nom commercial	Matériau de support	% Carbone	Surface spécifique m ² g ⁻¹	Groupe- ment fonctionnel	Taille des particules (μm)	Dimension (mm)
Neutres	Amide	Acquity UPLC BEH amide (Waters)	Silice hybride à ponts éthane (BEH)	12	185		1,7	100 x 2,1
	Propriétaire	Acclaim™ HILIC-10 (Thermo scientific)	Silice ultrapure	8	300	Propriétaire	3	150 x 2,1
	Diol	YMC-Triart Diol (YMC)	Silice hybride organique/inorganique	12	360		1,9	100 x 2,0
		Inertsil Diol (GL science)	Gel de silice ultrapure	20	450		3	150 x 2,1
Chargées	Silice hybride	Acquity UPLC BEH HILIC (Waters)	Silice BEH	Non greffé	185	/	1,7	100 x 2,1
		YMC-Triart SIL (YMC)	Silice organique/inorganique	Non greffé	330	/	3	100 x 2,0
	Silice vierge	Luna® Silica (phenomenex)	Silice ultrapure	Non greffé	400	/	3	100 x 2,1
		YMC-Pack SIL (YMC)	Silice ultrapure sans métaux	Non greffé	330	/	3	100 x 2,1
		Hypersil GOLD™ Silica (Thermo scientific)	Silice ultrapure désactivée	Non greffé	220	/	1,9	100 x 2,1
	Amide polyol	BioZen Glycan (phenomenex)	ND	ND	200		2,6	150 x 2,1
Zwittérionique	Sulfobetaine	ZIC-pHILIC (Merck)	Polymérique	ND	ND		5	150 x 2,1

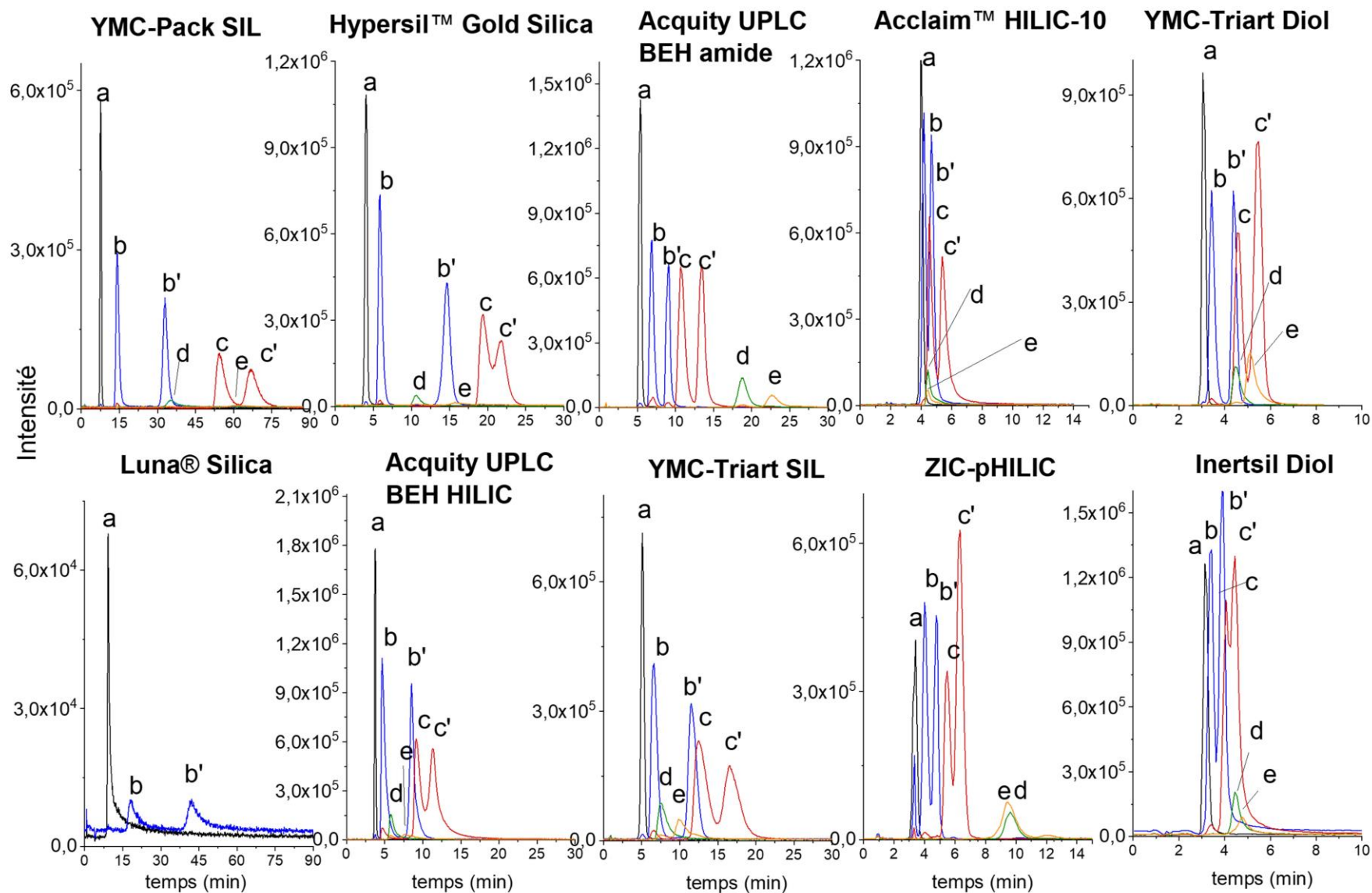


Figure 43 : Superposition des chromatogrammes des peptides obtenus par détection ESI-MS (mode SIM), avec une phase mobile composée de 70/30 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO. Débit : 300 μ L min⁻¹ en élution isocratique. Les peptides ont été détectés sous leur forme dichargée $[M-2H]^{2-}$ avec les rapports m/z : (a) pS0 (m/z = 582,3), (b) pS8 et (b') pS1 (m/z = 601,2), (c) pS18 et (c') pS16 (m/z = 620,2), (d) pS168 (m/z = 625,7), (e) pS1368 (m/z = 644,6).

Tableau 12 : Paramètres chromatographiques (k' , A_s , et R_s) calculés pour la séparation des peptides obtenus avec des phases stationnaires greffées par différents groupes fonctionnels polaires, avec une phase mobile composée de 70/30 ACN/H₂O + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO.

	Phases stationnaires chargées										Phases stationnaires neutres								Phase stationnaire zwitterionique		
	Silices vierges					Silices hybrides					Amide		Propriétaire		Diol						
	Luna silica		YMC pack Sil		Hypersil GOLD silica		YMC-Triart SIL		Acquity UPLC BEH HILIC		Acquity UPLC BEH amide		Acclaim HILIC-10		YMC triart Diol		Inertsil Diol		ZIC-pHILIC		
k' A_s		k' A_s		k' A_s		k' A_s		k' A_s		k' A_s		k' A_s		k' A_s		k' A_s		k' A_s			
pS0	9,3	7,8	6,6	1,4	2,7	0,8	4,7	1,3	3,2	1,0	5,7	1,0	2,1	1,5	2,8	2	1,8	1,5	2,4	0,7	
pS8	19,3	/	13,2	1,6	4,4	1,5	6,3	1,6	4,2	5,0	7,6	1,4	2,2	/	3,3	2	2,1	/	3,0	/	
pS1	45,8	/	31,9	1,6	12,3	1,1	11,8	1,7	8,4	2,4	10,4	0,8	2,6	/	4,5	2	2,5	/	3,8	/	
pS18	ND	/	53,3	2,9	16,6		12,9	/	9,2	/	12,4	2,0	2,5	/	4,6	/	2,7	/	4,6	/	
pS16	ND	/	65,7	2,0	18,8		17,4	/	11,6	/	15,9	1,1	3,2	/	5,9	1	3,0	/	5,4	/	
pS168	ND	/	33,9	/	8,7	3,2	7,3	3,7	5,4	5,3	22,4	1,7	2,4	5	4,5	3	3,0	6	8,7	1,8	
pS1368	ND	/	60,8	/	13,3		9,9	6,9	7,6	3,8	27,2	2,2	2,5	4,3	5,4	3	3,3	/	8,6	1,3	
α	$\alpha_{pS0-pS8}$	2,1	$\alpha_{pS0-pS8}$	2,0	$\alpha_{pS0-pS8}$	1,6	$\alpha_{pS0-pS8}$	1,4	$\alpha_{pS0-pS8}$	1,3	$\alpha_{pS0-pS8}$	1,3	$\alpha_{pS0-pS8}$	1,1	$\alpha_{pS0-pS8}$	1,2	$\alpha_{pS0-pS8}$	1,2	$\alpha_{pS0-pS8}$	1,2	
	$\alpha_{pS8-pS1}$	2,4	$\alpha_{pS8-pS1}$	2,4	$\alpha_{pS8-pS168}$	2,0	$\alpha_{pS8-pS168}$	1,2	$\alpha_{pS8-pS168}$	1,3	$\alpha_{pS8-pS1}$	1,4	$\alpha_{pS8-pS168}$	1,1	$\alpha_{pS8-pS1}$	1,4	$\alpha_{pS8-pS1}$	1,2	$\alpha_{pS8-pS1}$	1,3	
	/	$\alpha_{pS1-pS168}$	1,1	$\alpha_{pS168-pS1}$	1,4	$\alpha_{pS168-pS1368}$	1,3	$\alpha_{pS168-pS1368}$	1,4	$\alpha_{pS1-pS18}$	1,2	$\alpha_{pS168-pS1368}$	1,0	$\alpha_{pS1-pS168}$	1,0	$\alpha_{pS1-pS18}$	1,1	$\alpha_{pS1-pS18}$	1,1	$\alpha_{pS1-pS18}$	1,2
	/	$\alpha_{pS168-pS18}$	1,6	$\alpha_{pS1-pS1368}$	1,1	$\alpha_{pS1368-pS1}$	1,2	$\alpha_{pS1368-pS1}$	1,1	$\alpha_{pS18-pS16}$	1,3	$\alpha_{pS1368-pS18}$	1,0	$\alpha_{pS168-pS18}$	1,0	$\alpha_{pS18-pS16}$	1,1	$\alpha_{pS18-pS16}$	1,1	$\alpha_{pS18-pS16}$	1,2
	/	$\alpha_{pS18-pS1368}$	1,1	$\alpha_{pS1368-pS18}$	1,3	$\alpha_{pS1-pS18}$	1,1	$\alpha_{pS1-pS18}$	1,1	$\alpha_{pS16-pS168}$	1,4	$\alpha_{pS18-pS1}$	1,1	$\alpha_{pS18-pS1368}$	1,2	$\alpha_{pS16-pS168}$	1,0	$\alpha_{pS16-pS168}$	1,0	$\alpha_{pS16-pS1368}$	1,6
	/	$\alpha_{pS1368-pS16}$	1,1	$\alpha_{pS18-pS16}$	1,1	$\alpha_{pS18-pS16}$	1,4	$\alpha_{pS18-pS16}$	1,3	$\alpha_{pS168-pS1368}$	1,2	$\alpha_{pS1-pS16}$	1,2	$\alpha_{pS1368-pS16}$	1,1	$\alpha_{pS168-pS1368}$	1,1	$\alpha_{pS168-pS1368}$	1,1	$\alpha_{pS1368-pS168}$	1,0
R_s	$R_{SpS0-pS8}$	2,3	$R_{SpS0-pS8}$	4,1	$R_{SpS0-pS8}$	2,3	$R_{SpS0-pS8}$	1,4	$R_{SpS0-pS8}$	1,5	$R_{SpS0-pS8}$	1,7	$R_{SpS0-pS8}$	0,6	$R_{SpS0-pS8}$	0,9	$R_{SpS0-pS8}$	0,7	$R_{SpS0-pS8}$	1,1	
	$R_{SpS8-pS1}$	3,0	$R_{SpS8-pS1}$	6,5	$R_{SpS8-pS168}$	3,5	$R_{SpS8-pS168}$	0,5	$R_{SpS8-pS168}$	1,0	$R_{SpS8-pS1}$	2,2	$R_{SpS8-pS168}$	0,5	$R_{SpS8-pS1}$	2,4	$R_{SpS8-pS1}$	1,1	$R_{SpS8-pS1}$	1,4	
	/	$R_{SpS1-pS168}$	0,4	$R_{SpS168-pS1}$	2,2	$R_{SpS168-pS1368}$	0,9	$R_{SpS168-pS1368}$	0,5	$R_{SpS1-pS18}$	1,2	$R_{SpS168-pS1368}$	0,2	$R_{SpS1-pS168}$	0,0	$R_{SpS1-pS18}$	0,4	$R_{SpS1-pS18}$	1,1		
	/	$R_{SpS168-pS18}$	2,9	$R_{SpS1-pS1368}$	0,4	$R_{SpS1368-pS1}$	0,7	$R_{SpS1368-pS1}$	0,2	$R_{SpS18-pS16}$	1,8	$R_{SpS1368-pS18}$	0,0	$R_{SpS168-pS18}$	0,2	$R_{SpS18-pS16}$	0,5	$R_{SpS18-pS16}$	1,0		
	/	$R_{SpS18-pS1368}$	0,7	$R_{SpS1368-pS18}$	1,4	$R_{SpS1-pS18}$	0,4	$R_{SpS1-pS18}$	0,6	$R_{SpS16-pS168}$	2,8	$R_{SpS18-pS1}$	0,4	$R_{SpS18-pS1368}$	1,0	$R_{SpS16-pS168}$	0,0	$R_{SpS16-pS1368}$	2,8		
	/	$R_{SpS1368-pS16}$	0,4	$R_{SpS18-pS16}$	0,9	$R_{SpS18-pS16}$	1,1	$R_{SpS18-pS16}$	1,0	$R_{SpS168-pS1368}$	1,6	$R_{SpS1-pS16}$	1,0	$R_{SpS1368-pS16}$	0,6	$R_{SpS168-pS1368}$	0,4	$R_{SpS168-pS1368}$	0,1		

- **Phases stationnaires chargées**

Les colonnes avec une phase stationnaire en silice vierge, telles que la Luna Silica, YMC-Pack SIL et Hypersil GOLD Silica, sont très polaires et chargées négativement à pH 7 en raison des groupements silanols déprotonés à leurs surfaces. Bien que de même charge que la phase stationnaire, certains peptides sont retenus, ce qui reflète que le mécanisme de rétention principal est gouverné par le partage hydrophile par rapport aux répulsions électrostatiques, qui conduiraient uniquement à une rétention des peptides très faible ou nulle. La rétention d'analytes présentant la même charge que celle de la phase stationnaire est l'une des caractéristiques du mode HILIC par rapport à celui de la chromatographie d'échange d'ions [186]. Ainsi, les peptides seront d'autant plus retenus que la phase stationnaire est polaire, ce qui est constaté en particulier avec les colonnes Luna Silica et la YMC-Pack SIL, pour lesquelles les facteurs de rétention k' les plus importants ont été obtenus, avec des valeurs de k' atteignant par exemple 45,8 et 31,9 pour le peptide mono-phosphorylé pS1 (voir Tableau 12). La rétention est plus faible avec la colonne Hypersil GOLD silica, avec $k'=12,3$ pour pS1. On peut d'ailleurs noter qu'avec la colonne Luna Silica hautement rétentive, des pics larges ont été observés seulement pour pS0, pS1 et pS8 avec la phase mobile de référence, tandis que les autres peptides multiphosphorylés n'ont pas été élués. Par contre dans les mêmes conditions, tous les peptides ont été élués avec les colonnes YMC-Pack SIL et Hypersil GOLD Silica. Cette différence est attribuée à la surface spécifique des colonnes, variant comme suit : Hypersil GOLD Silica < YMC-Pack SIL < Luna Silica (Tableau 11) et conduisant par conséquent à une augmentation du temps de rétention des peptides pour les colonnes de plus grande surface spécifique. Avec les colonnes YMC-Pack SIL et Hypersil GOLD Silica, le peptide le plus retenu est le diphosphorylé pS16 avec $k' = 65,7$ et $18,8$, respectivement. On constate également que les isomères de position peuvent être séparés, ce qui n'est pas nécessairement le cas avec d'autres modes de séparation ou avec toutes les phases stationnaires en HILIC. A titre d'illustration, la séparation des isomères pS8-pS1 a été obtenue avec une bonne sélectivité pour les trois colonnes, avec des facteurs de sélectivité $\alpha = 2,4$ pour la Luna Silica et la YMC-Pack SIL et $\alpha = 2,8$ pour la Hypersil Gold Silica (Tableau 12).

Les colonnes Acquity UPLC BEH HILIC et YMC-Triart SIL contiennent également des phases stationnaires de silice non greffée, mais constituées de supports avec différentes technologies hybrides. Les supports hybrides BEH sont constitués de ponts éthylène qui recouvrent près d'un tiers des silanols de surface [187]. La technologie des supports de colonnes YMC-Triart SIL est basée sur des particules hybrides de silice organique/inorganique en multicouches [188]. Par rapport aux colonnes de silice vierge, les colonnes à supports hybrides présentent des phases stationnaires avec un taux inférieur de groupements silanols résiduels déprotonés et donc une polarité moins importante, ce qui entraîne logiquement une diminution des facteurs de rétention des peptides, comme le montrent la

Figure 43 et le Tableau 12. Par exemple, le facteur de rétention de pS1 est trois fois moins important avec la YMC- Triart SIL ($k' = 11,8$) qu'avec la YMC-Pack SIL ($k' = 31,9$). Comme observé précédemment, les peptides sont plus retenus sur les phases stationnaires dont la surface spécifique est plus élevée, dans ce cas la YMC-Triart SIL par rapport à l'Acquity UPLC BEH HILIC (Tableau 11). Néanmoins, il est à noter qu'avec la phase mobile de référence, le peptide diphosphorylé pS16 est le plus retenu sur les deux colonnes de silice hybrides.

Les autres colonnes sont à supports en silice vierge ou hybride, greffés par différents groupements fonctionnels polaires, classiquement rencontrés en HILIC.

- **Phases stationnaires neutres**

La colonne Acquity UPLC BEH amide contient un support de silice hybride, greffé par des groupements amide par l'intermédiaire d'un espaceur alkyle (Tableau 11). La phase stationnaire étant neutre, la rétention des analytes est gouvernée par le partage hydrophile qui est le mécanisme principal [142]. Les interactions secondaires de type liaisons hydrogène contribuent également à la rétention en raison de la capacité donneur/accepteur d'hydrogènes du groupement amide. Par conséquent, les facteurs de rétention des peptides augmentent en fonction de leur polarité et leur caractère hydrophile croissant, c'est à dire avec le nombre de résidus pSer dans le squelette peptidique (Figure 43 et Tableau 12). Avec la phase mobile de référence, la phase stationnaire amide a permis de séparer l'ensemble des cyclopeptides en mode d'élution isocratique (Figure 43) avec une sélectivité importante et une bonne résolution, y compris pour la séparation des isomères de position ($R_{s\ pS8-pS1} = 2,2$ et $R_{s\ pS18-pS16} = 1,8$ Tableau 12).

La phase stationnaire de la colonne Acclaim HILIC-10 est basée sur un support de silice vierge, greffée par un groupement fonctionnel hydrophile dont la structure n'a pas été donnée par le fournisseur. Les peptides sont faiblement retenus avec cette colonne, avec $2,1 < k' < 3,2$, conduisant à une co-élution de la plupart d'entre eux et donc à une faible résolution de base ($R_s < 1,5$ comme indiqué dans le Tableau 12). Ceci reflète la polarité insuffisante de ce groupement fonctionnel pour séparer ces peptides avec la phase mobile de référence.

Les colonnes YMC-Triart Diol et Inertsil Diol contiennent respectivement des supports de silice hybride et vierge, greffés par des groupements dihydroxypropyl neutres. Le mécanisme de séparation principal est basé sur le partage hydrophile, en combinaison avec des interactions secondaires de type liaisons hydrogène via le groupement OH. En utilisant la phase mobile de référence, les peptides sont faiblement retenus avec $2,8 < k' < 5,9$ pour YMC-Triart Diol et $1,8 < k' < 3,3$ pour inertsil diol et quasiment co-élus (voir Tableau 12), ce qui s'explique par le caractère faiblement polaire et hydrophile de ce type de phases stationnaires. Les facteurs de rétention des peptides obtenus avec les deux colonnes sont légèrement différents, bien que leurs phases stationnaires soient greffées par le

même groupement fonctionnel. Par exemple, $k'_{pS1} = 4,5$ avec la YMC-Triart Diol presque le double de celui obtenu avec la colonne Inertsil Diol ($k' = 2,5$). Malgré la présence d'un groupement dihydroxypropyl à la surface des phases stationnaires des deux colonnes à fonction diol, elles présentent des chaînes carbonées de longueur différente. La chaîne de l'Inertsil Diol est plus longue que celle de YMC-Triart Diol et comprend de plus un groupement éther dans sa chaîne (voir [Tableau 11](#)). Ces résultats illustrent bien que les colonnes de même fonction, mais provenant de différents fabricants présentent des variantes dans l'architecture du groupement fonctionnel, le taux de greffage et la technologie du matériau de support, conduisant à des temps de rétention différents pour un même analyte dans des conditions de phase mobile identiques.

- **Les phases stationnaires zwitterioniques**

La phase stationnaire de la colonne ZIC-pHILIC est constituée d'un matériau polymérique greffé par une chaîne sufoalkylbétaine zwitterionique, contenant à la fois un groupement acide sulfonique, chargé négativement et un ammonium quaternaire, chargé positivement (Tableau 11). Ces deux groupements sont séparés par un court espaceur alkyle et sont présents en rapport équimolaire, conférant une neutralité permanente à la phase stationnaire. Les colonnes zwitterioniques adsorbent fortement l'eau à la surface de leur phase stationnaire, par conséquent le partage hydrophile est le mécanisme principal de rétention des analytes. En outre, des interactions secondaires de type électrostatiques faibles et liaisons hydrogène, contribuent également à la rétention des analytes chargés [142]. En accord avec ces caractéristiques, la rétention des peptides augmente avec le nombre de leurs groupements pSer, même si avec cette composition de phase mobile, les pics sont assez mal résolus ($R_s < 1,5$) excepté pour pS16-pS1368 ($R_s = 2,8$) (voir [Tableau 12](#) et les peptides tri- et tétraphosphorylés pS168 et pS1368 sont co-élus ([Figure 43](#)).

Ce premier criblage de colonnes comportant différentes fonctions et polarités, pour séparer des peptides cycliques multiphosphorylés, en utilisant une composition de phase mobile de référence et à pH proche de la neutralité, a montré diverses sélectivités selon la fonctionnalisation des phases stationnaires. La colonne Acquity UPLC BEH amide s'avère être une bonne candidate pour la séparation de ces peptides avec une bonne performance chromatographique traduite par de bons facteurs de sélectivité et de résolution. Avec les autres colonnes, une étude plus approfondie de l'effet de la composition de la phase mobile sur la sélectivité de séparation des cyclopeptides phosphorylés est nécessaire.

2. Effet de la composition de la phase mobile sur la sélectivité de séparation

La force éluante de la phase mobile est un autre paramètre majeur influençant la sélectivité de séparation en HILIC [141]. Comme observé précédemment avec la phase mobile de référence, la colonne amide a montré une bonne sélectivité de séparation des peptides. Néanmoins, en vue de séparer les complexes que forment ces peptides avec le cation uranyle, et sachant que la nature des interactions UO_2^{2+} -peptides peut donner facilement lieu à la dissociation des complexes lors de la séparation, il est nécessaire de disposer d'un choix plus vaste de colonnes de différentes polarités. Par conséquent, l'impact de la force éluante sur la sélectivité de séparation des peptides a été évalué pour les colonnes qui ont montré une performance de séparation insuffisante avec la phase mobile de référence, en faisant varier le pourcentage d'acétonitrile dans cette dernière.

A titre d'exemple, la Figure 44 montre les chromatogrammes obtenus par détection ESI-MS (Figure 44A) et l'évolution des facteurs de rétention des peptides (Figure 44B) en fonction de la teneur en solvant organique dans la phase mobile, avec des colonnes de polarité croissante : Acclaim HILIC-10, diol (YMC-Triart Diol), Zwitterionique (ZIC-pHILIC) et silice vierge (YMC-Pack SIL). Dans tous les cas, la concentration en $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ dans la phase mobile a été maintenue à 20 mmol L^{-1} .

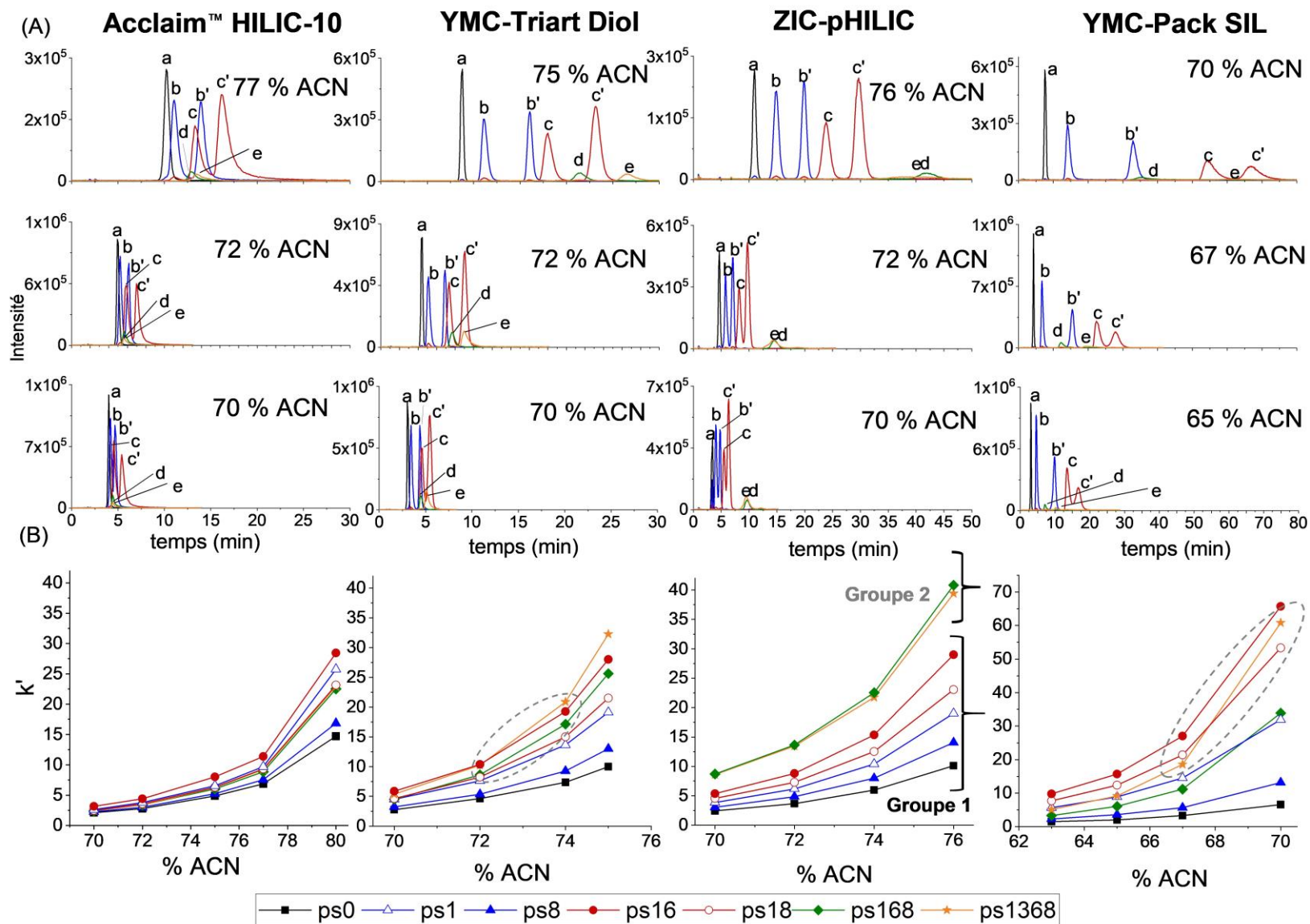


Figure 44: (A) Profils d'élution des peptides obtenus par détection ESI-MS (mode SIM) en utilisant les colonnes Acclaim HILIC-10, YMC-Triart Diol, ZIC-pHILIC et YMC-Pack SIL à différentes compositions de phase mobile. Débit: 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, élution isocratique. (a) pS0, (b) pS8, (b') pS1, (c) pS18, (c') pS16, (d) pS168, (e) pS1368. (B) Variation des facteurs de rétention des peptides avec le pourcentage d'ACN dans la phase mobile.

Avec la phase mobile de référence (70/30 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO) et comme observé précédemment, des facteurs de rétention trop importants ont été obtenus avec les colonnes de silice vierge, sachant que cette classe de phases stationnaires est très polaire et donc hautement rétentive. Afin de réduire les facteurs de rétention des peptides tout en évaluant la sélectivité de séparation, nous avons donc augmenté la force éluante de la phase mobile en diminuant sa teneur en ACN.

Avec la YMC-Pack SIL, une diminution des facteurs de rétention a été observée avec la réduction du pourcentage d'ACN à 67 et 65% pour l'ensemble des peptides, comme attendu (Figure 44A et B). A 67% d'ACN, les facteurs de rétention varient entre 3,3 pour pS0 et 27 pour pS16 (voir annexe V) ce qui est considéré comme acceptable par rapport à ceux obtenus avec 70% ACN (6,6 pour pS0 et 60,8 pour pS1368). La sélectivité de séparation n'est pas améliorée à 67% d'ACN en comparaison avec celle obtenue à 70% ACN sauf pour pS1 et pS168 avec un α et R_s de 1,3 et 1,5 à 67% ACN quant à 70% ACN, leurs valeurs étaient de 1,1 et 0,4 respectivement. Il est intéressant de noter que la modification de la force éluante de la phase mobile a induit un changement d'ordre d'élution des peptides pS168 et pS1368 et des peptides adjacents (Figure 44). Un comportement similaire a été observé avec la Hypersil Gold Silica, mais uniquement pour pS1368 (voir Tableau 12 et annexe V). Pour la colonne Luna silica la plus rétentive, la proportion d'ACN a été diminuée jusqu'à 40%. Malgré une augmentation significative de la force éluante, les peptides tri- et tétraphosphorylés pS168 et pS1368 n'ont pas pu être élués et les peptides diphosphorylés pS18 et pS16 ont été élués quasiment au niveau du temps mort, ce qui rend cette colonne non adaptée pour le reste de l'étude. Avec les colonnes de silice hybride YMC triart SIL et Acquity BEH HILIC (Tableau 11), la quantité d'ACN a été augmentée jusqu'à 74%, ce qui n'a pas permis d'améliorer la qualité de la séparation, avec des pics très larges et une co-élution de certains peptides (données non montrées).

Pour les colonnes moins polaires, la diminution de la force éluante de la phase mobile, en augmentant son taux de solvant organique, a conduit à une rétention accrue des peptides dans tous les cas.

Avec l'Acclaim HILIC-10, la teneur en ACN a été augmentée jusqu'à 77%, ce qui n'a pas permis d'obtenir une sélectivité suffisante pour séparer les peptides (Figure 44A). La qualité de la séparation n'a pas été améliorée pour 80% d'ACN, avec des facteurs de rétention atteignant 28,5 et des pics très larges.

Concernant la colonne YMC-Triart Diol, la teneur en ACN a été augmentée jusqu'à 75%, donnant des séparations avec une bonne sélectivité ($1,1 < \alpha < 1,5$) et une bonne résolution ($R_s > 1,5$), excepté pour les paires pS168/pS16 ($R_{s_{pS168-pS16}} = 0,9$) et pS1/pS18 ($R_{s_{pS1-pS18}} = 1,4$) (voir annexe V). Un changement d'ordre d'élution de pS168 et pS1368 et de leurs peptides voisins a également été observé pour 72% et 74% d'ACN respectivement (Figure 44A et B). Ces observations permettent de suggérer qu'un changement de mécanisme de rétention a eu lieu, avec une participation plus importante des interactions secondaires par l'intermédiaire de liaisons hydrogène des oxygènes accepteurs de protons

des groupements phosphates, étant plus importants pour les peptides tri- et tétraphosphorylés, avec les groupements hydroxyles de la phase stationnaire. Avec l'Inertsil Diol, l'augmentation de la teneur en ACN jusqu'à 75% a abouti à une amélioration de la sélectivité de séparation mais de façon encore insuffisante en raison des pics larges obtenus à ce pourcentage (voir annexe V pour les valeurs de FWHM des pics). Contrairement à la YMC-Triart Diol, l'ordre d'élution des peptides n'a pas changé avec la modification de la composition de la phase mobile.

Avec la colonne ZIC-pHILIC, les peptides ont été élués en deux groupes, quelle que soit la teneur en ACN (Figure 44). Le premier comprend les peptides avec 0, 1 et 2 résidus pSer et leurs isomères de position, qui ont été séparés avec une bonne sélectivité et une bonne résolution à 72% d'ACN ($1,5 < R_s < 2,4$ et $\alpha > 1$). Le second comprend les peptides tri- et tétraphosphorylés pS168 et pS1368, qui sont co-élués avec toutes les compositions de phase mobile.

Globalement, la modification de la force éluante de la phase mobile n'a pas conduit à une amélioration de la sélectivité de séparation pour toutes les colonnes sauf pour la YMC-Triart Diol, avec laquelle on a obtenu des facteurs de sélectivité et de résolution satisfaisants en augmentant la teneur en ACN jusqu'à 75%. Dans certains cas une inversion d'ordre d'élution uniquement des peptides tri- et tétraphosphorylés pS168 et pS1368 et de leurs peptides voisins a été observé. Ce résultat reflète que l'effet de la polarité de la phase mobile est plus important sur la rétention de pS168 et pS1368 que pour les autres peptides.

3. Comportement en HILIC des cyclodécapeptides multiphosphorylés

Il est connu qu'en HILIC, la rétention augmente avec la polarité de l'analyte [141,142]. Une rétention accrue des peptides est donc attendue en augmentant le nombre de résidus polaires phosphosérine (pSer) dans leur squelette peptidique. Néanmoins, les résultats décrits dans les sections précédentes ont montré que cette tendance n'était pas toujours respectée selon le greffage de la phase stationnaire.

Afin d'illustrer l'effet des groupements pSer sur la rétention des peptides et de comprendre leur comportement, les valeurs de leurs facteurs de rétention k' ont été tracées en fonction du nombre de résidus pSer dans leur séquence. Dans chaque cas, la composition de la phase mobile a été choisie pour obtenir k' inférieur à 30, tout en gardant une résolution et une sélectivité satisfaisantes (Figure 45).

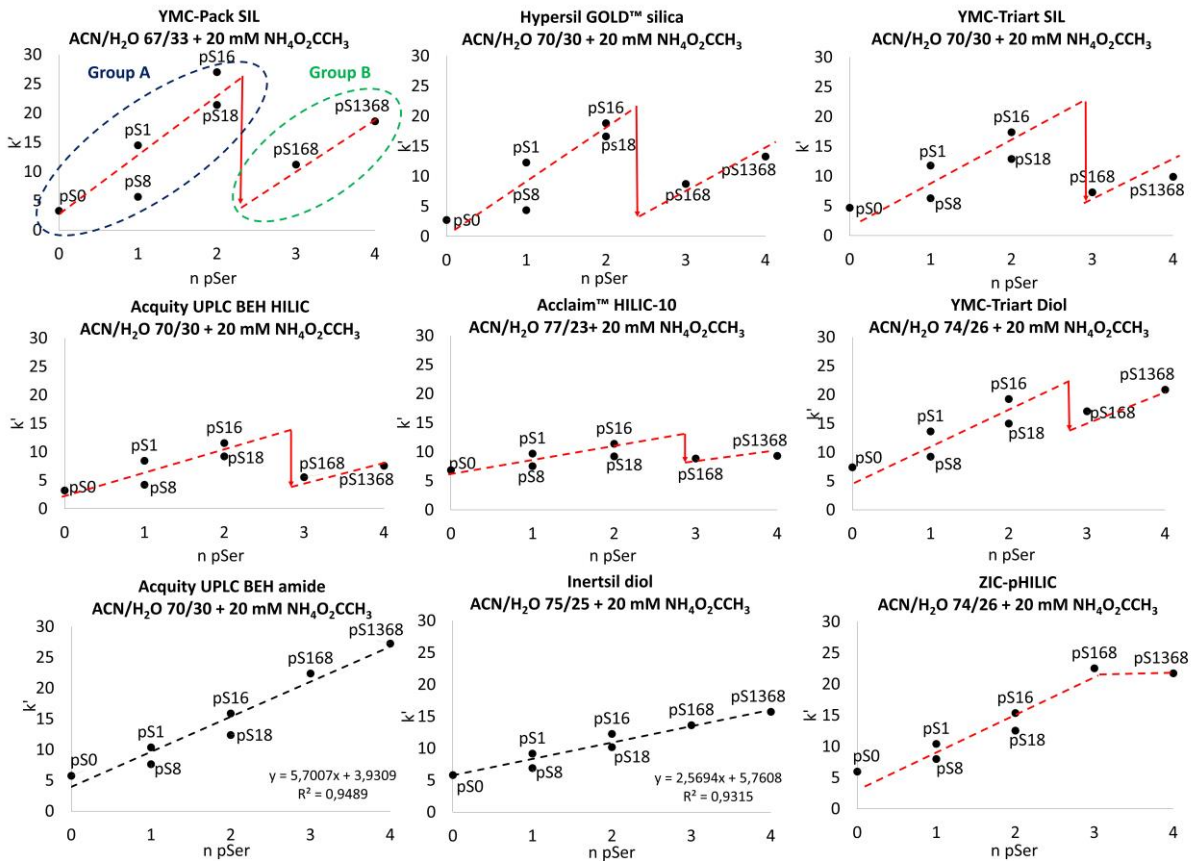


Figure 45: Variation des facteurs de rétention k' en fonction du nombre de résidus pSer dans les peptides. La composition de la phase mobile a été choisie de façon à obtenir des facteurs de rétention k' inférieurs à 30.

Avec les colonnes Acquity BEH amide et Inertsil Diol greffées avec des groupements neutres, on observe une augmentation des facteurs de rétention des peptides en fonction du nombre croissant des résidus pSer polaires, en accord avec le mécanisme classique en HILIC [142]. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Singer *et al.* [151] qui ont observé une augmentation de la rétention des peptides linéaires multiphosphorylés avec le nombre de résidus de phosphorylation, variant de 0 à 3, en utilisant une colonne à fonction diol réticulé (Luna HILIC) [151]. En plus, dans notre cas, une corrélation linéaire entre le facteur de rétention et le nombre de résidus pSer a été observée exclusivement en utilisant les colonnes amide ($R^2 = 0,9489$) et Inertsil Diol ($R^2 = 0,9315$). Yanagida *et al.* [189] ont également obtenu une corrélation linéaire entre $\log k'$ et le nombre croissant de groupements hydroxyles (-OH) dans les proanthocyanidines, en utilisant une colonne TSKgel Amide-80. Ils ont montré que ces résultats s'expliquaient par la prédominance des interactions secondaires de type liaisons hydrogène par rapport au mécanisme primaire de partage hydrophile [189].

Lorsqu'il s'agit de phases stationnaires impliquant des interactions électrostatiques avec les analytes, les peptides se comportent différemment. Avec les colonnes de silice vierge et hybride, chargées négativement (voir Tableau 11), les facteurs de rétention augmentent avec le nombre de résidus pSer pour pS0, pS1-pS8, pS18-pS16 (groupe A) puis diminuent pour pS168 et pS1368 (groupe B) (Figure 45).

Tous les peptides présentent une charge globale négative à un pH proche de la neutralité, du fait d'acides aminés chargés négativement dans leur squelette, tels que Glu (pKa = 4,07) et/ou pSer (pKa1 = 2,1 pKa2 = 5,8) en position 1, 3, 6 et 8 (Figure 42). Des acides aminés neutres Pro, Gly se trouvent en position 4, 5, 9, 10 et Trp en position 7, mais l'acide aminé en position 2 est Arg (pKa = 12,10 ; charge +1) pour le groupe A et Glu (pKa = 4,07 ; charge -1) pour le groupe B. Cette différence affecte la charge négative globale des peptides, donc la charge maximale à pH 7 augmente comme suit : pS0 (-3), pS8/1 (-4), pS18/16 (-5), pS168 (-8) et pS1368 (-9). Il est important de noter que les acides aminés situés en position 2 (Arg ou Glu) et 7 (Trp) sont orientés vers la « face inférieure » du squelette peptidique, contrairement à ceux en position 1, 3, 6 et 8. Des groupements de structure et de charges différentes sont par conséquent disponibles envers la surface de la phase stationnaire, ce qui est susceptible d'avoir un impact sur la rétention des peptides.

Étant donné que les colonnes de silice vierge et hybride présentent à leur surface des groupements silanols déprotonés chargés négativement (Tableau 11), des interactions électrostatiques avec ces groupements contribuent également à la rétention des peptides, en plus du mécanisme principal de rétention basé sur le partage hydrophile. Concernant les peptides du groupe A, on observe une augmentation de leur rétention, qui peut être attribuée aux interactions électrostatiques attractives entre les silanolates à la surface de la phase stationnaire chargés négativement et l'Arg dans le squelette peptidique. La chaîne latérale de l'arginine présente la face inférieure du peptide peut être assimilée à la « région de contact des peptides » en HILIC, région de ces derniers qui interagit préférentiellement avec la phase stationnaire, comme décrit par Alpert [135]. Par ailleurs Gilar et Jaworski, qui ont étudié le comportement HILIC de peptides linéaires non phosphorylés issus de digestion de protéines, ont discuté l'impact de l'Arg sur la rétention des peptides à pH 4,5 en utilisant des colonnes contenant des phases stationnaires de silice vierge, hybride et à fonction amide[146]. Leurs expériences, ainsi que leurs modèles de prédiction de rétention, ont montré que les résidus Arg chargés positivement favorisaient fortement la rétention des peptides sur des colonnes de silice vierge et hybride, *via* des interactions d'échange de cations avec des silanols déprotonés chargés négativement à la surface de leur phase stationnaire. Cette tendance était plus prononcée avec les colonnes de silice vierge par rapport à celles de silice hybride, en raison du taux de silanols déprotonés plus important à leur surface, ce qui est en accord avec nos résultats [146]. Les facteurs de rétention des peptides du groupe B, les peptides tri- et tetraphosphorylés, sont inférieurs à ceux des peptides du groupe A avec les colonnes de silice vierge et hybride (Figure 44). Ces deux peptides ne contiennent que des acides aminés chargés négativement dans nos conditions de pH et présentent la charge négative la plus élevée parmi les peptides, conduisant à des répulsions électrostatiques avec les silanols déprotonés de la phase stationnaire et donc à des peptides moins retenus que ceux contenant une arginine. Cette répulsion électrostatique peut expliquer le fait que ces peptides étaient plus

sensibles à la modification de la composition de la phase mobile que les autres peptides dans les résultats décrits dans le paragraphe précédent, ce qui s'est traduit par des changements d'ordre d'élution de ces peptides et de leurs voisins.

De façon surprenante, la différence de comportement entre les peptides du groupe A et du groupe B est aussi observée avec certaines colonnes neutres, telles que la YMC-Triart Diol et l'Acclaim-HILIC-10, mais de façon moins prononcée. Ces résultats reflètent le fait que les silanols résiduels déprotonés à la surface des phases stationnaires de ces colonnes sont suffisamment accessibles pour interagir avec les analytes et ainsi impacter leurs facteurs de rétention, malgré la présence de greffage de groupements fonctionnels neutres. Enfin, les peptides du groupe A ont montré un comportement similaire avec la colonne ZIC-pHILIC en comparaison avec les autres colonnes, montrant une augmentation du facteur de rétention des peptides en fonction du nombre croissant de résidus pSer, tandis que les peptides pS168 et pS1368 appartenant au groupe B sont co-élus. La combinaison des interactions électrostatiques faibles typiques des phases stationnaires zwitterioniques et du partage hydrophile n'a pas fourni une sélectivité suffisante pour séparer ces deux peptides, quelle que soit la composition de la phase mobile, comme observé dans la partie précédente. Ces derniers sont plus retenus que ceux du groupe A, ce qui signifie que la présence d'un résidu glutamate chargé négativement en position 2 au lieu d'un résidu arginine chargé positivement n'a pas un impact sur la rétention, comme observé pour les autres colonnes à l'exception de l'amide et l'inertsil diol.

4. Impact de la position des acides aminés phosphorylés sur la rétention

La structure des isomères de position des peptides mono- et di-phosphorylés ne diffère que par la position du/des résidu(s) pSer dans la séquence, comme on peut le voir dans pS1 c(pSREPGEWEPG) / pS8 c(EREPGEWpSPG) et pS16 c(pSREPGpSWEPEG) / pS18 c(pSREPGEWpSPG) (Figure 42). Ces isomères de position ont pu être séparés avec la plupart des colonnes, avec pS1 et pS16 systématiquement plus retenus que leurs isomères pS8 et pS18, montrant que la position du résidu pSer affecte significativement le comportement HILIC des peptides. Dans les peptides mono- et di-phosphorylés, le résidu pSer en position 8 est localisé entre les acides aminés Pro et Trp, tandis que dans leurs isomères de position, il se situe entre Gly et Arg pour pS1 et Gly et Trp pour pS16 (Figure 42). De plus, dans pS16, les deux résidus pSer sont situés à proximité des résidus Gly d'une part et Arg et Trp d'autre part. Les acides aminés Pro et Trp proches du résidu pSer en position 8 dans pS8 et pS18, induisent un encombrement stérique et une rigidité plus importants que ceux présents dans leurs isomères de position. Ceci suggère que ce résidu pSer dans pS8 et pS18 est donc moins disponible pour interagir avec la phase stationnaire, ce qui conduit à une rétention plus faible de ces derniers par rapport à pS1 et pS16 et donc à leur séparation. A notre connaissance, une seule étude reporte la séparation des

isomères de position de peptides linéaires multiphosphorylés à partir de digestats protéiques, en utilisant une phase stationnaire à fonction aminopropyl HILIC dans des conditions acide (pH 2)[151]. L'effet de la position des acides aminés dans la séquence peptidique sur la rétention des peptides en HILIC a également été reporté dans la littérature, sur la base de modèles de prédiction et de travaux expérimentaux [146,147,152], mais avec des peptides linéaires. Bien que les peptides de notre étude soient cycliques et structurés, nos résultats sont en accord avec ces travaux, montrant l'impact significatif de la position des acides aminés dans la séquence peptidique sur la rétention en HILIC.

Conclusion

L'objectif principal de ce chapitre était de mettre au point les conditions de séparation de cyclopeptides multiphosphorylés et de leurs isomères de position à pH physiologique, par HILIC couplée à l'ESI-MS et d'apporter des éléments de compréhension à leurs mécanismes de rétention. Ce travail a fait l'objet d'un article qui a été publié dans *Journal of chromatography B* [13]. En criblant plusieurs phases stationnaires polaires commerciales et plusieurs compositions de phases mobiles, les séparations avec les meilleures sélectivités et résolutions ont été obtenues en utilisant des colonnes greffées par des fonctions neutres amide (Acquity UPLC BEH amide) et diol (YMC-Triart Diol), avec des phases mobiles contenant 70 et 75% (v/v) d'ACN/H₂O + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO. Le comportement HILIC des peptides cycliques multiphosphorylés diffère en fonction de la nature des acides aminés chargés (Arg et Glu) de la face inférieure du squelette peptidique avec toutes les colonnes, à l'exception de l'amide et l'inertsil diol pour lesquelles les interactions secondaires avec les silanols résiduels déprotonés à la surface de la phase stationnaire ont un effet négligeable sur la rétention. Avec ces deux colonnes, une corrélation linéaire entre les facteurs de rétention et le nombre de résidus phosphorylés polaires a été obtenue avec une phase mobile composée de 70 et 75% (v/v) ACN/H₂O + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO pour l'amide et l'Inertsil Diol, respectivement. La position de l'acide aminé dans le squelette peptidique a également un impact sur la rétention des peptides, permettant la séparation des isomères de position pour les peptides mono- et di-phosphorylés avec une résolution satisfaisante. L'approche entreprise dans ce travail pour séparer les peptides cycliques selon le mode HILIC peut être intéressante pour la séparation de molécules de structure cyclique dans des applications pharmaceutiques, protéomiques et thérapeutiques. De plus, la sélectivité obtenue pour séparer les isomères de phosphopeptides ayant une masse moléculaire identique pourrait être particulièrement utile en protéomique, pour aider à identifier les sites de phosphorylation dans les protéines qui ont un rôle majeur pour le diagnostic de certaines pathologies. La prochaine étape porte sur la séparation des complexes d'uranyle formés avec ces peptides à pH physiologique, leur caractérisation et la quantification de l'uranyle complexé par ces peptides, en utilisant l'HILIC couplée à la spectrométrie de masse élémentaire et moléculaire.

Chapitre IV : Détermination de
l'échelle d'affinité des peptides
pour l' UO_2^{2+} par couplage
simultané
HILIC-ESI-MS/ICP-MS

Introduction

La conception de peptides biomimétiques mimant les sites de coordination de l'uranyle (UO_2^{2+}) dans des protéines requiert la validation de ces peptides en tant que modèles représentatifs des sites proposés. La caractérisation de l'interaction de l' UO_2^{2+} avec ces peptides et la détermination des constantes de stabilité thermodynamiques des complexes UO_2^{2+} -peptides sont des critères pertinents pour la validation de ces modèles. L'acquisition de données structurales et thermodynamiques repose généralement sur l'utilisation de techniques classiques de chimie en solution, telles que la fluorescence, l'EXAFS et le dichroïsme circulaire. Il a ainsi été démontré que l'affinité pour UO_2^{2+} augmentait avec le nombre de résidus phosphosérines (pSer) dans le squelette peptidique, avec une constante de stabilité du complexe UO_2^{2+} formé avec le peptide tétraphosphorylé (pS1368) de l'ordre de celle du complexe UO_2^{2+} -ostéopontine (OPN) [9]. Ces résultats ont permis de suggérer que pS1368 était représentatif des sites de coordination de l' UO_2^{2+} dans cette protéine et que ce dernier se liait à l'OPN *via* quatre groupements pSer. La caractérisation de l'interaction des complexes UO_2^{2+} -peptides par ces méthodes repose sur une analyse indépendante et en séquentiel de chaque complexe ce qui génère une certaine consommation de temps et de matière, d'autant plus que la synthèse de ces peptides est très délicate. Une méthode analytique permettant de caractériser les interactions de l' UO_2^{2+} avec ces peptides, d'identifier les différentes espèces chimiques dans lesquels il est impliqué et les quantifier en une étape unique tout en consommant des quantités réduites de matière s'avère donc cruciale.

L'objectif de ce chapitre est d'établir l'échelle d'affinité de ces peptides biomimétiques vis-à-vis de l' UO_2^{2+} en une analyse unique. La stratégie repose sur la mise en œuvre du couplage simultané de la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) avec l'ESI-MS et l'ICP-MS. La première étape essentielle a consisté à évaluer la faisabilité de séparation des complexes UO_2^{2+} -peptides par HILIC, ces complexes étant susceptibles d'être dissociés lors de la séparation. Dans un deuxième temps, une méthode de quantification dédiée a été mise au point afin de déterminer en ligne par ICP-MS la distribution quantitative de l' UO_2^{2+} parmi les complexes peptidiques préalablement séparés et simultanément identifiés par ESI-MS. Finalement, cette approche a été appliquée à l'évaluation de l'effet de la structure cyclique ou linéaire du peptide tétraphosphorylé sur son affinité pour l' UO_2^{2+} .

1. Identification des complexes UO_2^{2+} -peptides par ESI-MS

Compte tenu de son processus d'ionisation peu énergétique, l'ESI-MS a été employée pour identifier et caractériser les espèces d' UO_2^{2+} contenues dans les échantillons, à savoir leur stœchiométrie et leurs rapports m/z caractéristiques. Ces informations sont nécessaires pour identifier par la suite les espèces d'intérêt lors du couplage de l'HILIC à l'ESI-MS.

Les spectres de masse de l' UO_2^{2+} en milieu non complexant et de chaque complexe UO_2^{2+} -peptide ont été caractérisés indépendamment, en introduisant l'échantillon en continu dans l'instrument. Le mode d'ionisation négatif a été sélectionné en raison de la charge des complexes à pH physiologique ($\sim 7,4$), représentatif de conditions biologiques pertinentes en toxicologie. Les valeurs des paramètres de source et d'acquisition dans ces conditions ainsi que les étapes de préparation des échantillons sont données en annexe I. Le spectre de masse de UO_2^{2+} en milieu non complexant est présenté dans la Figure 46.

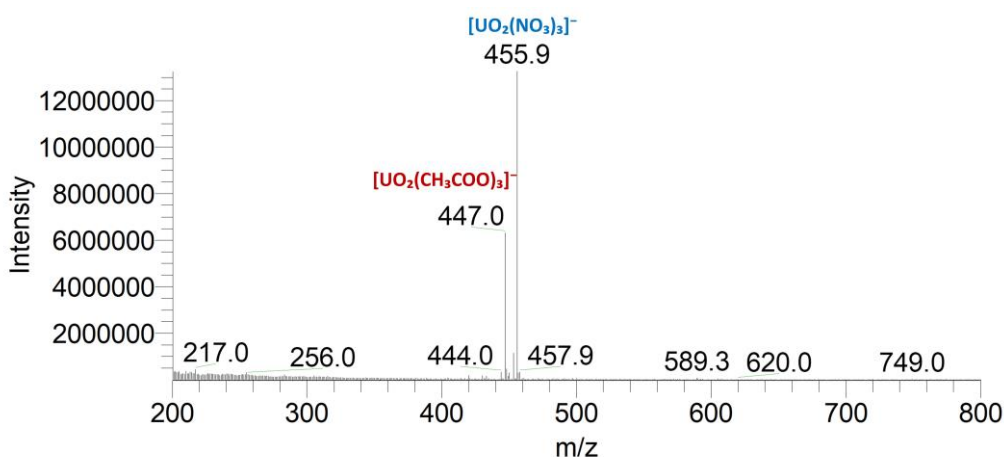


Figure 46 : Spectre de masse de UO_2^{2+} en milieu non complexant acquis en mode balayage complet (Full scan) sur une gamme de masse 200-800. Echantillon $[\text{UO}_2^{2+}] = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ dans l'échantillon de travail préparé par dilution d'une solution intermédiaire dans $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Débit d'introduction $10 \mu\text{L min}^{-1}$.

Le spectre de masse acquis en mode balayage complet montre deux espèces de rapport $m/z = 455,9$ et $m/z = 447,0$ correspondant respectivement aux ions monochargés $[\text{UO}_2(\text{NO}_3)_3]^-$ et $[\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3]^-$ (Figure 46). Ces complexes d' UO_2^{2+} sont potentiellement formés dans le milieu de préparation des échantillons. L'ion NO_3^- provient de la solution stock d' UO_2^{2+} conditionnée en acide nitrique HNO_3 et l'ion acétate CH_3COO^- de la dilution intermédiaire en acétate d'ammonium 20 mmol L^{-1} (annexe I). Les spectres de masse des complexes d' UO_2^{2+} formés avec les peptides pS0, pS16, pS1368 et son homologue linéaire tétraphosphorylé linS1368 sont présentés dans la Figure 47, les rapports m/z et les espèces associées sont recensés dans le Tableau 13.

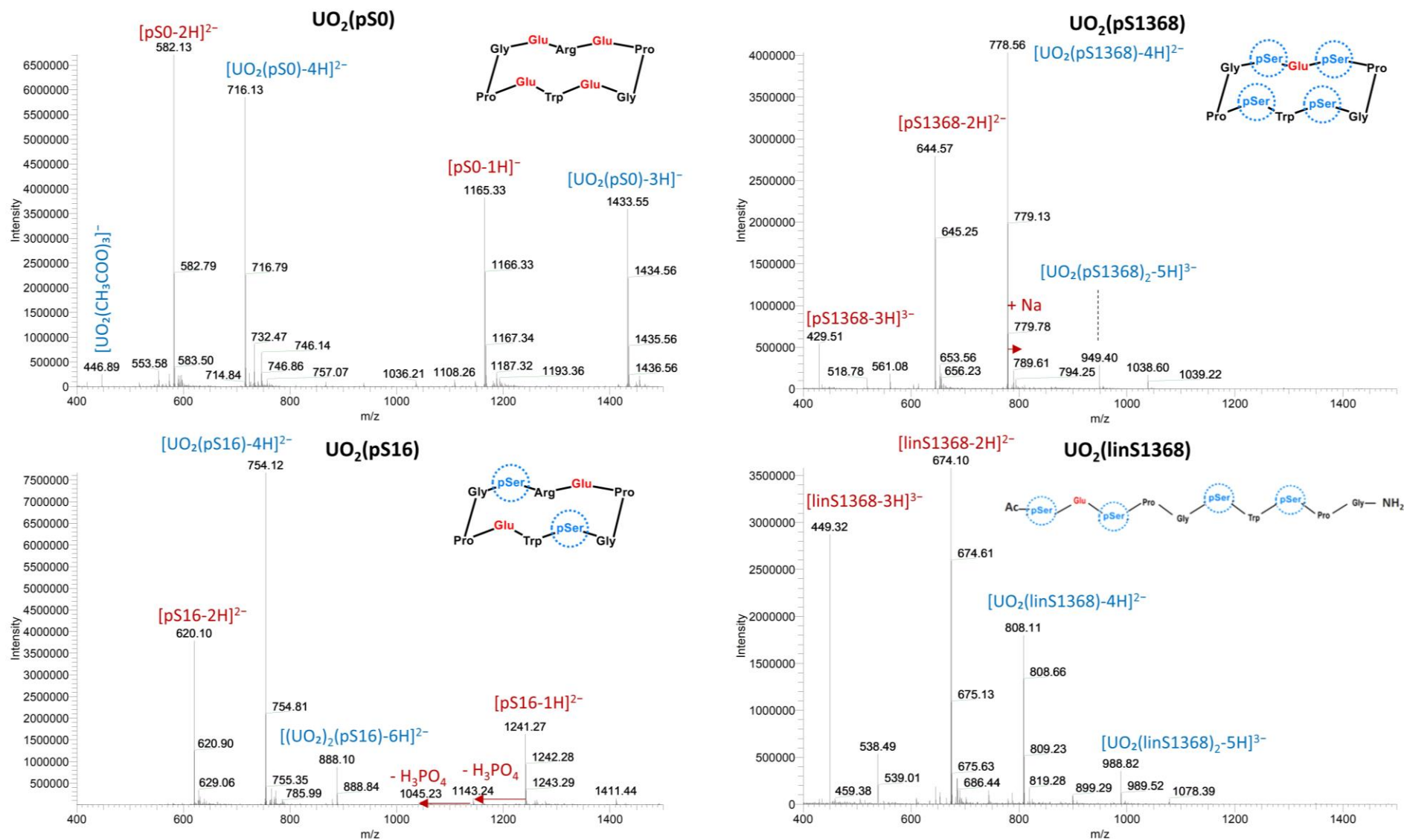


Figure 47: Spectres de masses des complexes UO_2^{2+} -peptides acquis en mode balayage complet (full scan). Gamme de masse comprise entre 400 et 1500. $[\text{UO}_2^{2+}] = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ et $[\text{peptide}]/[\text{UO}_2^{2+}] = 2$ dans l'échantillon de travail préparé par dilution de la solution de contact dans ACN/ H_2O 70/30 + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Débit d'introduction $10 \mu\text{L min}^{-1}$.

Tableau 13: Récapitulatif des rapports m/z observés dans les spectres de masse des complexes $\text{UO}_2(\text{P})$ avec $\text{P} = \text{pS0}$, pS16 , pS1368 et linS1368 et attribution des espèces associées.

Complexes $\text{UO}_2(\text{P})$	m/z	Espèces
$\text{UO}_2(\text{pS0})$	446,9	$[\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_3]^-$
	582,1	$[\text{pS0-2H}]^{2-}$
	716,1	$[\text{UO}_2(\text{pS0})\text{-4H}]^{2-}$
	1165,3	$[\text{pS0-1H}]^-$
	1433,5	$[\text{UO}_2(\text{pS0})\text{-3H}]^-$
$\text{UO}_2(\text{pS16})$	620,1	$[\text{pS16-2H}]^{2-}$
	754,1	$[\text{UO}_2(\text{pS16})\text{-4H}]^{2-}$
	888,1	$[(\text{UO}_2)_2(\text{pS16})\text{-6H}]^{2-}$
	1241,3	$[\text{pS16-1H}]^-$
$\text{UO}_2(\text{pS1368})$	429,5	$[\text{pS1368-3H}]^{3-}$
	644,6	$[\text{pS1368-2H}]^{2-}$
	778,6	$[\text{UO}_2(\text{pS1368})\text{-4H}]^{2-}$
	949,4	$[\text{UO}_2(\text{pS1368})_2\text{-5H}]^{3-}$
$\text{UO}_2(\text{linS1368})$	449,3	$[\text{linS1368-3H}]^{3-}$
	674,1	$[\text{linS1368-2H}]^{2-}$
	808,11	$[\text{UO}_2(\text{linS1368})\text{-4H}]^{2-}$
	988,8	$[\text{UO}_2((\text{linS1368})_2)\text{-5H}]^{3-}$

Dans ces conditions, l' UO_2^{2+} forme avec tous les peptides principalement des complexes de stœchiométrie 1-1, détectés sous forme dichargée. Avec pS16 , un complexe dichargé de stœchiométrie 2-1 est également observé, ce qui est en accord avec les travaux de Starck et *al.*[69]. Ces derniers ont attribué la capacité du pS16 à piéger deux ions UO_2^{2+} dans son squelette peptidique aux phosphates pontés dans les positions 1 et 6 les plus flexibles. Avec les peptides tétraphosphorylés cyclique (pS1368) et linéaire (linS1368), des complexes trichargés de stœchiométrie 1-2 ont été observés en plus des complexes de stœchiométrie 1-1. Dans la littérature, ces espèces n'ont pas été observées par ESI-MS pour un mélange UO_2^{2+} - pS1368 équimolaire, mais leur existence a été mise en évidence par dichroïsme circulaire [9]. Ces travaux reportent également la détection d'un complexe de stœchiométrie 2-1, qui devient l'espèce prédominante quand le nombre d'équivalents d' UO_2^{2+} augmente. Dans notre cas, l'utilisation d'un excès de peptides par rapport à l' UO_2^{2+} ne mène pas à la formation de cette espèce.

Ainsi, les espèces caractéristiques de l' UO_2^{2+} en milieu non complexant et sous forme de complexes UO_2^{2+} -peptides ont été identifiées. Ces informations sont nécessaires pour identifier par la suite les espèces qui seront séparées par chromatographie et inaccessibles par ICP-MS.

2. Description du couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS et du système d'étude

Le couplage de l'HILIC simultanément avec l'ESI-MS et l'ICP-MS a été dimensionné lors de travaux précédents menés en laboratoire conventionnel [10], en respectant les contraintes de distance imposées par un dispositif similaire de couplage intégré en boîte à gants pour l'analyse future d'échantillons radioactifs. Ce couplage simultané a été repris en apportant des améliorations et est représenté dans la Figure 48.

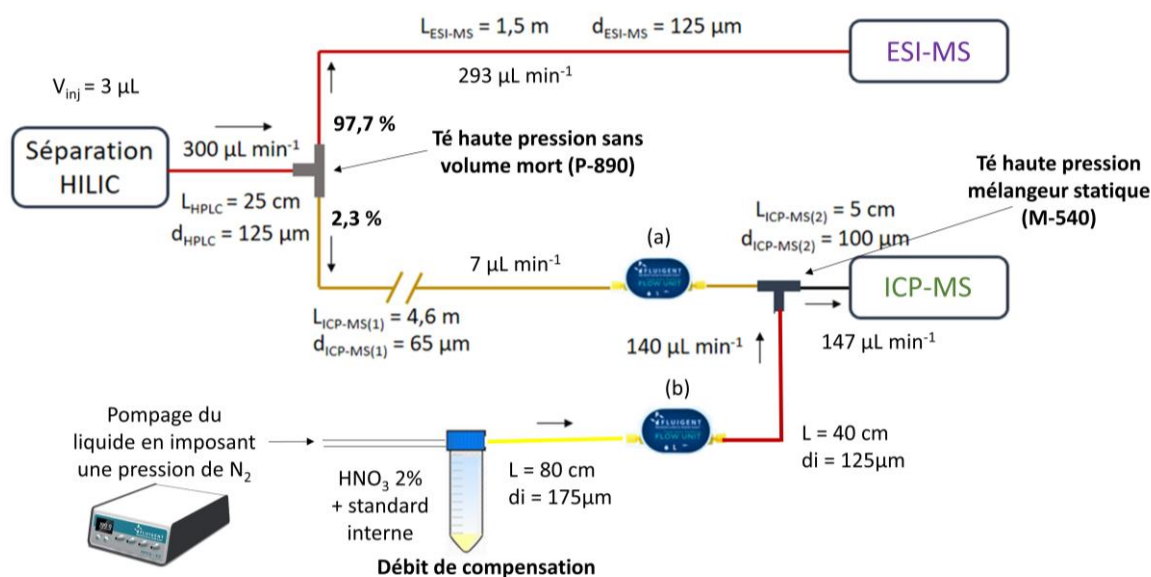


Figure 48: Schéma du dimensionnement du couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS

Les séparations ont été réalisées à un débit de $300 \mu\text{L min}^{-1}$ avec une phase mobile hydro-organique contenant un minimum de 70% d'acétonitrile. Le flux en sortie de la colonne a été divisé en deux fractions en utilisant un Té sans volume mort. Afin de compenser au maximum les volumes extra colonne générés par la longueur de la connectique reliée à l'ICP-MS, un diamètre interne de $65 \mu\text{m}$ a été utilisé. Ce dimensionnement génère un débit de $293 \mu\text{L min}^{-1}$ vers l'ESI-MS et de $7 \mu\text{L min}^{-1}$ vers l'ICP-MS, ce dernier étant mesuré précisément en ligne par un débitmètre (Figure 48-a). Ainsi, les mesures des débits ont permis de confirmer que 97,7 % du flux était dirigé vers l'ESI-MS et 2,3 % vers l'ICP-MS.

Le débit introduit dans l'ICP-MS a été compensé au niveau du T mélangeur avec une solution d'acide nitrique HNO_3 2% à un débit de $140 \mu\text{L min}^{-1}$, mesuré en continu par un débitmètre (Figure 48-b). Ce débit de compensation joue trois rôles : (i) répondre aux caractéristiques du nébuliseur dont le débit de consommation est de $200 \mu\text{L min}^{-1}$, (ii) diminuer par dilution la charge en solvant hydro-organique transférée au plasma et (iii) adapter la concentration des éléments de sorte que le détecteur opère en mode impulsion.

Au cours des analyses par ICP-MS, un étalon interne (^{209}Bi et/ou ^{89}Y à 10 ng mL^{-1}) a été ajouté à la solution de compensation. Le suivi en continu du signal de cet étalon permet de détecter les variations potentielles de stabilité du signal au cours du temps lors des analyses. Afin de réduire les contraintes liées à l'introduction de solvant organique dans la source ICP, des précautions ont été prises au niveau du système d'introduction de l'échantillon : (i) de l'oxygène a été ajouté dans la chambre de nébulisation afin de réduire le dépôt de carbone en favorisant sa combustion en CO_2 , (ii) des cônes en platine plus résistants à l'oxydation ont été utilisés, (iii) le diamètre interne de l'injecteur a été réduit et (iv) la chambre de nébulisation a été refroidie à 2°C par effet Peltier [184,185].

➤ *Système d'étude*

Un volume adéquat de la solution stock de nitrate d'uranyle $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ a été mis au contact du volume correspondant de la solution stock de peptide, selon le nombre d'équivalents visés. Les concentrations des solutions stocks d' UO_2^{2+} et de peptides ont été mesurées sur la base d'un étalonnage externe par ICP-MS et HILIC-UV (voir annexe I). Les étapes suivies lors de la préparation des solutions de contact UO_2^{2+} -peptides et des échantillons de travail sont présentées dans la Figure 49.

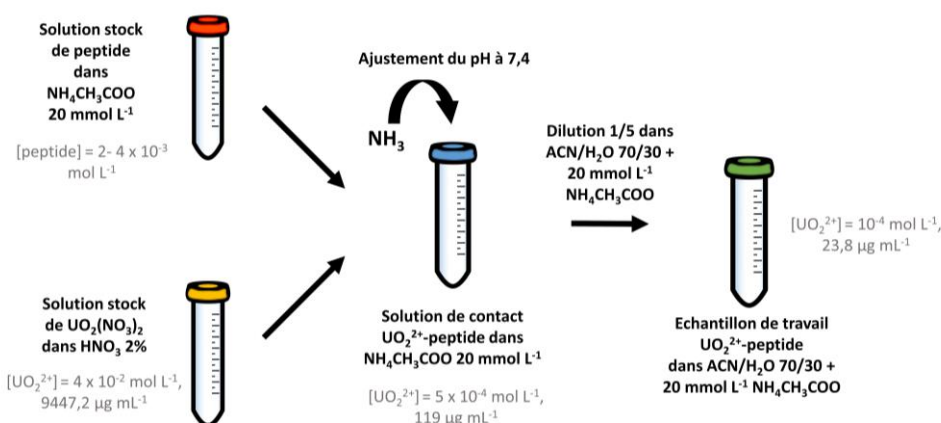


Figure 49 : Procédure de préparation des solutions de contact et des échantillons de travail.

En raison de la synthèse très délicate, longue et coûteuse des peptides, la préparation des solutions de contact tout en consommant le minimum de matière s'est avérée cruciale. Ainsi, des solutions de contact de volume total réduit à $125\text{-}250 \mu\text{L}$ ont été préparées, ce qui requiert d'ajouter un volume de $1,5 \mu\text{L}$ en moyenne de la solution stock d' UO_2^{2+} afin d'atteindre la concentration en UO_2^{2+} de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ dans la solution de contact. Tous les échantillons ont été préparés par pesée. Le pH de la solution de contact ainsi obtenu a été ajusté à 7,4 en ajoutant le volume nécessaire d'ammoniaque NH_3 . Une dilution d'un facteur 1/5 dans la phase mobile composée de 70/30 ACN/ H_2O v/v + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ est enfin réalisée pour obtenir l'échantillon de travail.

3. Faisabilité de la séparation de complexes UO_2^{2+} -peptides par HILIC

Comme indiqué dans la partie bibliographique, la séparation chromatographique de complexes d' UO_2^{2+} avec des protéines a été seulement décrite par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) dans des échantillons biologiques ou dans des milieux modèles simplifiés [82,123,125,126,131,190], et de façon indirecte par chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC) [133,191]. Bien que ces études soient focalisées sur l'interaction de l' UO_2^{2+} avec des protéines pour élucider les mécanismes de toxicité à l'échelle moléculaire, aucune n'a décrit à notre connaissance la séparation de complexes UO_2^{2+} -peptides dans ce contexte. Par ailleurs, la limitation de ces techniques séparatives réside dans leur faible résolution de séparation. Le développement de méthodes analytiques impliquant des techniques séparatives offrant une résolution satisfaisante tout en préservant l'intégrité de la structure des complexes d' UO_2^{2+} lors de la séparation est donc primordial. En raison de ses caractéristiques, l'HILIC semble prometteuse pour répondre à ces critères et a été sélectionnée dans notre travail pour séparer les complexes UO_2^{2+} -peptides. A ce jour, aucune étude décrivant la séparation de complexes d' UO_2^{2+} par HILIC n'a été reportée dans la littérature. L'évaluation de la faisabilité de la séparation des complexes UO_2^{2+} -peptides biomimétiques par HILIC est donc impérative, en préalable au développement d'une méthode analytique dédiée à la détermination en une étape unique de l'échelle d'affinité de ces peptides pour l' UO_2^{2+} . Cette étape de faisabilité a été effectuée avec les complexes d' UO_2^{2+} contenant les isomères des peptides diphosphorylés, pS16 et pS18 (Figure 50).

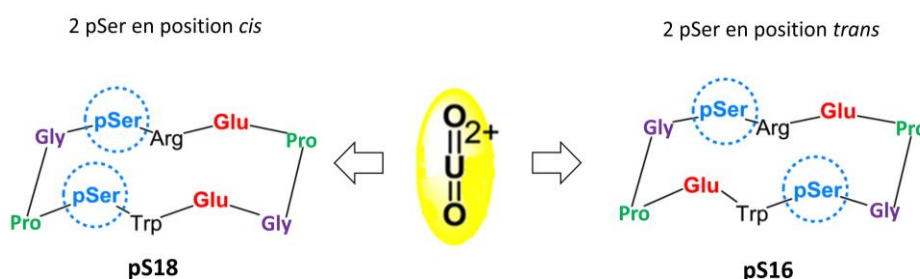


Figure 50: Système d'étude constitué du cation UO_2^{2+} en présence des isomères de position du peptide cyclique diphosphorylé dans les proportions UO_2^{2+} -pS16-pS18 2-10-10 avec $[\text{UO}_2^{2+}] = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ dans l'échantillon de travail préparé par dilution de la solution de contact dans ACN/ H_2O 70/30 + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$.

L' UO_2^{2+} a été mis en présence d'un excès de chaque peptide afin de favoriser sa complexation et la préparation des échantillons est détaillée dans l'annexe I.

La colonne Acquity BEH amide a précédemment montré une bonne sélectivité pour séparer les isomères de position pS18 et pS16 ($\alpha = 1,3$) avec une bonne résolution ($R_s = 1,8$), en utilisant une phase mobile composée de 70/30 ACN/ H_2O (v/v) et 20 mmol L^{-1} de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Ces conditions ont été retenues pour évaluer la faisabilité de la séparation des complexes d' UO_2^{2+} par HILIC. La colonne a été

couplée simultanément à l'ESI-MS pour l'identification structurale des complexes et à l'ICP-MS pour suivre en ligne le signal de l'uranium contenu dans chaque complexe. Les profils d'élution obtenus avec les deux spectromètres de masses sont présentés dans la Figure 51.

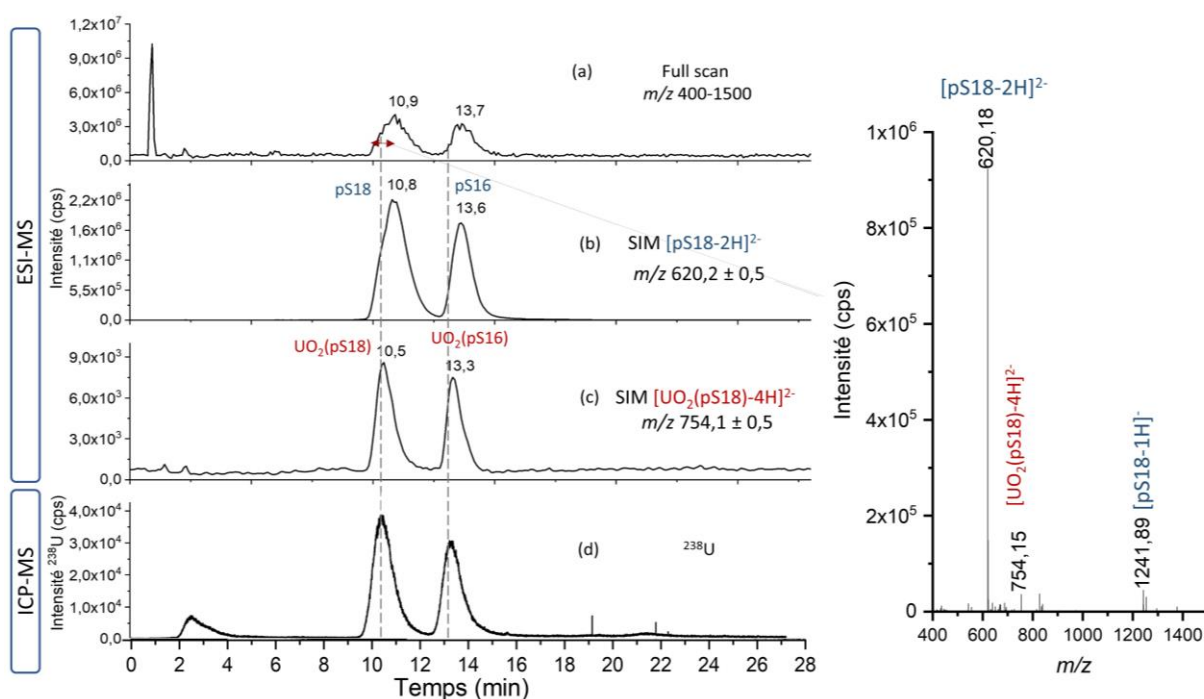


Figure 51 : Chromatogrammes acquis par ESI-MS en mode MS, en mode (a) balayage complet (gamme de masse 400-1500) et en modes SIM pour un suivi ciblé des rapports m/z des (b) peptides non complexés (c) complexes $\text{UO}_2(\text{pS16})/(\text{pS18})$ avec une fenêtre d'isolation $\Delta m = 1$. (d) En ICP-MS, le signal de ^{238}U est enregistré avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillon : UO_2^{2+} -pS16-pS18 2-10-10. Colonne Acquity BEH amide 100 x 2,1 mm ; 1,7 μm . Phase mobile : 70/30 ACN/ H_2O v/v +20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Débit 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, élution en mode isocratique, $V_{\text{inj}} = 3 \mu\text{L}$.

Le chromatogramme acquis par ESI-MS en mode balayage complet montre deux pics avec des temps de rétention de 10,9 et 13,7 min (Figure 51-a). L'extraction des spectres de masse de chaque pic montre les rapports m/z caractéristiques des complexes di-chargés $[\text{UO}_2(\text{pS18})\text{-4H}]^{2-}$ et $[\text{UO}_2(\text{pS16})\text{-4H}]^{2-}$ ainsi que ceux des peptides non complexés $[\text{pS16-2H}]^{2-}$ et $[\text{pS18-2H}]^{2-}$ puisqu'ils ont été rajoutés en excès, comme observé dans le spectre de masse de la Figure 51. Les complexes UO_2^{2+} -peptides et les peptides libres sont donc co-élus dans ces conditions chromatographiques. Néanmoins, les profils d'élution spécifiques des peptides et des complexes enregistrés en mode SIM, en ciblant les rapports m/z de chaque espèce (Figure 51-b et c), permettent de distinguer les fractions libre et complexée des peptides. Le chromatogramme enregistré simultanément par ICP-MS (Figure 51-d) présente un profil similaire à celui obtenu par ESI-MS, mais avec un décalage des temps de rétention des analytes d'environ 2 minutes. Ce décalage, dû à la différence de longueur et de diamètre interne des connectiques en sortie de séparation et les spectromètres de masse, a été corrigé au niveau du chromatogramme.

Les grandeurs chromatographiques en termes de facteur de rétention, sélectivité et résolution ont été calculées à partir des chromatogrammes enregistrés par ESI-MS et par ICP-MS, en suivant le signal de l'isotope ^{238}U , et sont présentées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Facteur de rétention (k'), largeur à mi-hauteur du pic (FWHM), sélectivité (α) et résolution (R_s), calculés à partir du profil d'élution des isomères pS16 et pS18 non complexés obtenu par ESI-MS et à partir des profils d'élution des complexes $\text{UO}_2(\text{pS16})/(\text{pS18})$, acquis simultanément par ESI-MS et ICP-MS

		k'	FWHM	α	R_s
ESI-MS	pS18	13,0	1,2	1,3	1,6
	pS16	16,7	0,9		
	$\text{UO}_2(\text{pS18})$	12,6	0,8	1,3	2,2
	$\text{UO}_2(\text{pS16})$	16,3	0,7		
ICP-MS	$\text{UO}_2(\text{pS18})$	12,6	0,9	1,3	1,9
	$\text{UO}_2(\text{pS16})$	16,3	0,8		

Dans ces conditions, les isomères di-phosphorylés ont été séparés avec de bons facteurs de sélectivité et de résolution (Figure 51-b et Tableau 14), ces données étant reproductibles par rapport à celles obtenues précédemment pour la séparation du mélange des peptides. Les complexes $\text{UO}_2(\text{pS18})/(\text{pS16})$ sont séparés (Figure 51-c) avec un bon facteur de sélectivité ($\alpha = 1,3$) et de résolution ($R_s = 2,2$). Le même facteur de sélectivité a été obtenu sur la base du chromatogramme enregistré par ICP-MS. Cependant, une légère diminution du facteur de résolution $R_s = 1,9$ a été observée (Tableau 14) et ce, en raison des volumes extra colonne associés à la longueur plus importante de la tubulure connectée à l'ICP-MS, mais est toujours considéré comme acceptable ($R_s > 1,5$).

La séparation des complexes formés avec les isomères du peptide di-phosphorylé peut-être expliquée par la disponibilité du groupement pSer selon sa position cis ou trans, pour interagir avec la fonction amide de la phase stationnaire, même lorsque ces isomères sont engagés dans la complexation avec l' UO_2^{2+} . Afin de déterminer la distribution quantitative de l'uranium dans chaque complexe, le rapport des aires des pics des complexes dans le chromatogramme obtenu par ICP-MS a été calculé pour des mesures réalisées en triplicat. L'écart type relatif (RSD) obtenu est de 6,2%, montre une bonne répétabilité des mesures ($< 15\%$). Le rapport des aires des pics des complexes $A(^{238}\text{U}_{\text{UO}_2^{2+}\text{-pS18}})/A(^{238}\text{U}_{\text{UO}_2^{2+}\text{-pS16}})$, est de $1,30 \pm 0,08$. Ce rapport proche de l'unité montre que l' UO_2^{2+} ne se complexe pas de façon préférentielle à l'un des deux isomères di-phosphorylés. La position du groupement pSer dans le squelette peptidique n'a donc pas d'influence sur le pouvoir de complexation de ces peptides envers l' UO_2^{2+} . Ces données sont en accord avec celles obtenues dans des travaux précédents [69], dans lesquels les constantes conditionnelles de stabilité des deux complexes déterminées par fluorescence à pH 7,4 sont $\log K^{\text{pH}=7,4}(\text{UO}_2(\text{pS18})) = 10,1$ et $\log K^{\text{pH}=7,4}(\text{UO}_2(\text{pS16})) = 10,3$. Ces valeurs proches montrent que la stabilité des complexes d' UO_2^{2+} formés avec ces peptides n'est pas impactée par la position des groupements pSer dans le squelette peptidique [69].

La faisabilité de la séparation de complexes d' UO_2^{2+} par HILIC a été démontrée, malgré le défi que représente la séparation de ces complexes, à caractère labile et à liaisons électrostatiques. Les complexes d' UO_2^{2+} avec des isomères de position des peptides biomimétiques di-phosphorylés ont été séparés avec succès avec une phase stationnaire à fonction amide. A notre connaissance, il s'agit de la première séparation de complexes d' UO_2^{2+} par HILIC jamais décrite dans la littérature, séparation d'autant plus délicate que les complexes contiennent des isomères de position des peptides, de structure très proche. Nous avons également mis en évidence que la position cis ou trans des groupements pSer dans le squelette peptidique n'avait pas d'impact sur le pouvoir complexant des isomères vis-à-vis de l' UO_2^{2+} . En revanche elle induit une interaction différenciée des complexes avec la phase stationnaire, ce qui conduit à leur séparation. L'étape suivante consiste à appliquer cette technique séparative à la séparation des complexes d' UO_2^{2+} formés avec les peptides cycliques multi-phosphorylés, couplée simultanément avec l'ESI-MS et l'ICP-MS.

4. Détermination de la distribution quantitative de l' UO_2^{2+} parmi les peptides

Dans cette approche, une méthode de quantification dédiée sera développée dans le but de déterminer par ICP-MS et en ligne la distribution de l' UO_2^{2+} parmi les différents complexes UO_2^{2+} -peptides séparés par HILIC et identifiés simultanément par ESI-MS. Une échelle d'affinité des peptides pour l' UO_2^{2+} pourra ainsi en être déduite. Les peptides considérés dans ce travail ainsi que les constantes de stabilité des complexes qu'ils forment avec l' UO_2^{2+} à pH = 7,4 sont rassemblés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Constantes de stabilité des complexes UO_2^{2+} -peptides déterminées par fluorescence à pH 7,4 [9,69,113,192].

n pSer	Peptide	$\log K^{\text{pH}=7,4}(\text{UO}_2^{2+}\text{-peptide})$
0	pS0	8,2*
1	pS8	9,6
1	pS1	9,2
2	pS18	10,1
2	pS16	10,3
3	pS168	10,7
4	pS1368	11,3

*Mesurée à pH=6 [192]

Des expériences visant à éluer par HILIC les complexes d' UO_2^{2+} formés avec les peptides contenant 0 et 1 résidu pSer ont été réalisées, mais aucun pic correspondant aux complexes d' UO_2^{2+} n'a été observé, même en modifiant la nature de la phase stationnaire et la composition de la phase mobile. Seuls les pics des peptides libres ont été détectés par ESI-MS. Ces observations peuvent être attribuées aux faibles constantes de stabilités de ces complexes à l'origine de leur dissociation lors de la séparation. En revanche, nous avons mis en évidence dans le paragraphe précédent que les complexes d' UO_2^{2+} contenant les isomères de position pS16 et pS18, avec des constantes de stabilité $\log K^{\text{pH}=7,4}(\text{UO}_2^{2+}\text{-peptide}) \sim 10$, ont pu être séparés et détectés. Suite à des limitations de quantités liées à la synthèse des peptides pS18 et pS168, ils n'ont pas pu être intégrés dans l'étude. Cette dernière a donc été menée avec les peptides contenant un nombre de résidus pSer supérieur ou égal à 2, en l'occurrence les deux peptides pS16 et pS1368.

4.1. Définition des conditions de séparation par HILIC des complexes d' UO_2^{2+} contenant des peptides avec différents degrés de phosphorylation

4.1.1. Sélection de la phase stationnaire et de la composition de la phase mobile

La colonne Acquity BEH amide a conduit à une bonne sélectivité de séparation des complexes d' UO_2^{2+} formés avec les isomères di-phosphorylés pS16 et pS18 et des peptides di- et tétra-phosphorylés pS16 et pS1368 (chapitre 3). La sélectivité de cette colonne a donc été évaluée pour séparer les complexes

d' UO_2^{2+} contenant ces deux peptides, avec la même composition de phase mobile, à savoir 70/30 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. A cette fin, un échantillon contenant UO_2^{2+} et les peptides pS1368 et pS16 en proportions 2UO_2^{2+} - $0,5\text{pS1368}$ - 20pS16 a été considéré. Le peptide pS1368 le plus affin pour l' UO_2^{2+} a été ajouté en sous-stœchiométrie par rapport à ce dernier alors que pS16 en excès, afin d'éviter une complexation totale par pS1368. Les profils d'éluion obtenus simultanément par ESI-MS et ICP-MS sont présentés dans la Figure 52.

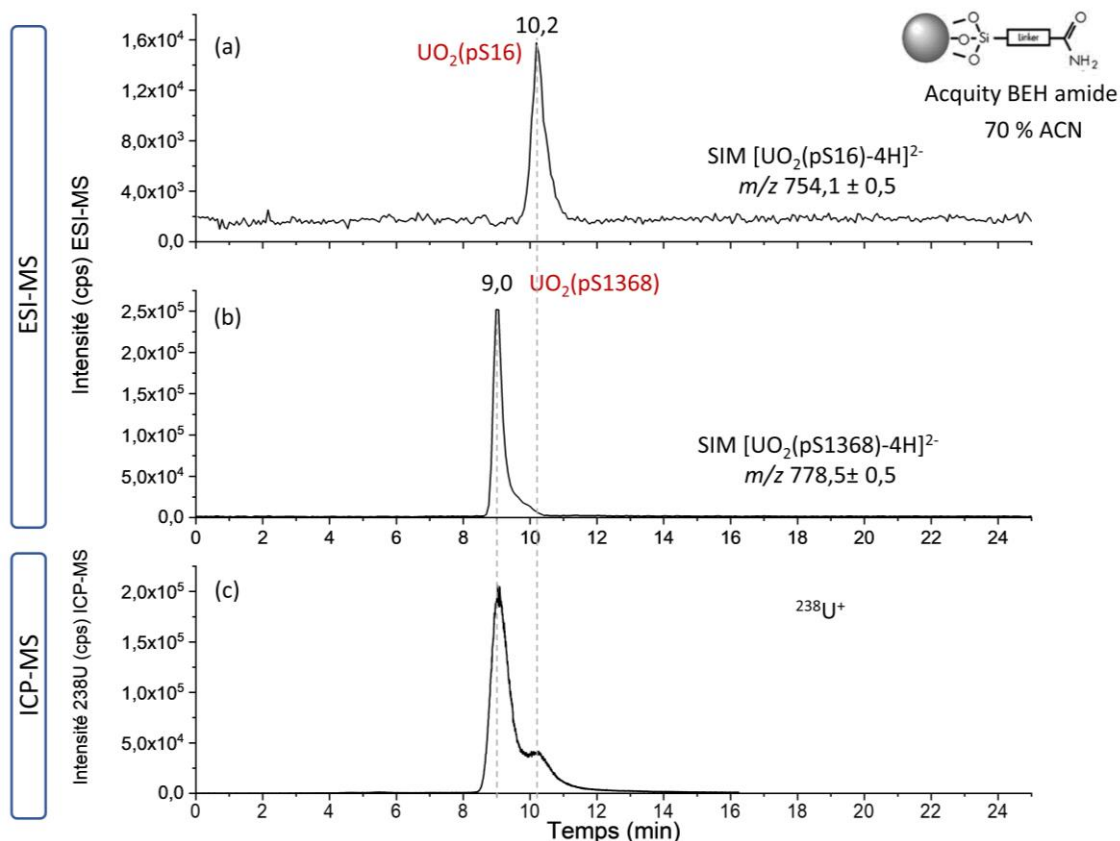


Figure 52: Chromatogrammes acquis par (a-b) ESI-MS en mode SIM pour un suivi ciblé des rapports m/z de (a) complexe $\text{UO}_2(\text{pS16})$ et (b) complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ avec une fenêtre d'isolation de $\Delta m = 1$, et par (c) ICP-MS pour un suivi du signal de ^{238}U avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillon : 2UO_2^{2+} - $0,5\text{pS1368}$ - 20pS16 . Colonne : Acquity BEH amide 100 x 2,1 mm ; 1,7 μm . Phase mobile : 70/30 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Débit 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, éluion en mode isocratique, $V_{\text{inj}} = 3 \mu\text{L}$.

Une résolution insuffisante a été obtenue dans ces conditions pour séparer les complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{pS16})$ identifiés en mode SIM par ESI-MS (Figure 52a et b). L'augmentation du pourcentage d'ACN dans la phase mobile permettrait d'améliorer la résolution mais conduirait à une rétention plus importante avec un élargissement des pics et des risques de dissociation partielle ou totale des complexes. Cette option n'a donc pas été retenue. La colonne YMC Triart diol, moins polaire que la colonne à fonction amide a alors été considérée, dans la mesure où elle est susceptible de conduire à une rétention moins importante. Une phase mobile identique, contenant 70% ACN a été utilisée dans un premier temps mais a conduit à une résolution insatisfaisante. Le pourcentage d'ACN a été ainsi augmenté jusqu'à 72%, les chromatogrammes correspondant enregistrés par ESI-MS et ICP-MS sont présentés dans la Figure 53.

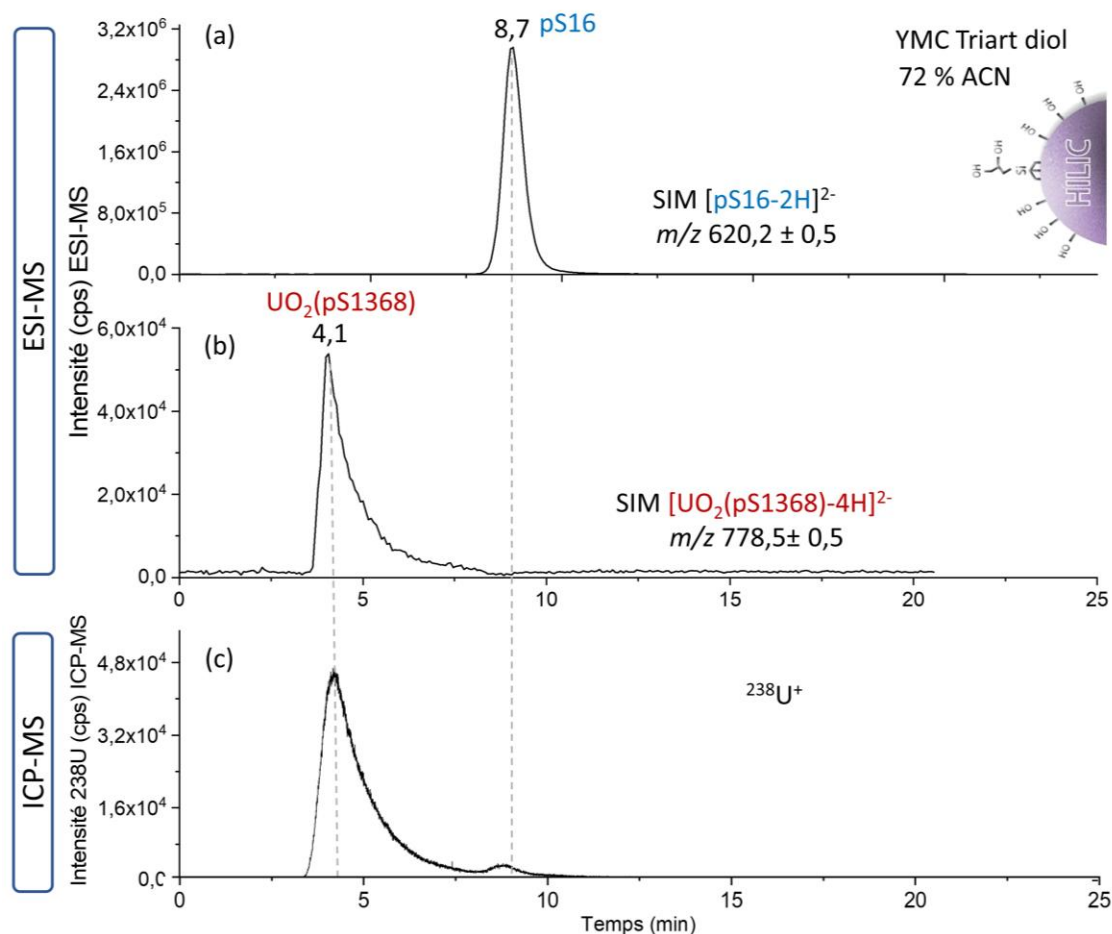


Figure 53: Chromatogrammes acquis par (a-b) ESI-MS en mode SIM pour un suivi ciblé des rapports m/z de (a) pS16 libre et (b) complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ avec une fenêtre d'isolation de $\Delta m = 1$, et par (c) ICP-MS pour un suivi du signal de l' ^{238}U avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillon : 2UO_2^{2+} -0,5pS1368-20pS16. Colonne : YMC Triart Diol 100 x 2,1 mm ; 1,9 μm . Phase mobile : 72/28 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Débit 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, élution en mode isocratique, $V_{\text{inj}} = 3 \mu\text{L}$.

En ESI-MS, le pic du peptide pS16 libre en excès a été détecté à un temps de rétention de 8,7 min (Figure 53a). L'ICP-MS étant plus sensible que l'ESI-MS, l'enregistrement du signal de l'isotope ^{238}U a permis d'observer un pic de faible intensité ($3,5 \times 10^3$ cps) au même temps de rétention (Figure 53c), ce qui permet de suggérer qu'il s'agit du pic correspondant au complexe $\text{UO}_2(\text{pS16})$. Le pic à $t_R = 4,1$ min (Figure 53c) a pu être identifié comme étant celui du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, par comparaison de son temps de rétention avec le pic observé en ESI-MS (Figure 53b). Sur la base du chromatogramme acquis en ICP-MS, les complexes $\text{UO}_2(\text{pS16})$ et $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ ont été séparés avec une bonne sélectivité ($\alpha = 2,3$) et résolution ($R_s = 3,9$). Ainsi, la colonne YMC triart diol et la phase mobile composée de 72/28 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ont été retenues pour la suite de l'étude.

4.1.2. Comportement en HILIC des complexes UO_2^{2+} -peptides

Comme observé en amont, le complexe $\text{UO}_2(\text{pS16})$ est élué au même temps de rétention que le pS16 libre (Figure 53a et c). Par contre, le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ est séparé de la fraction libre du peptide pS1368 lorsque ce dernier est en excès, par exemple pour une proportion 2UO_2^{2+} -6pS1368 (Figure 54).

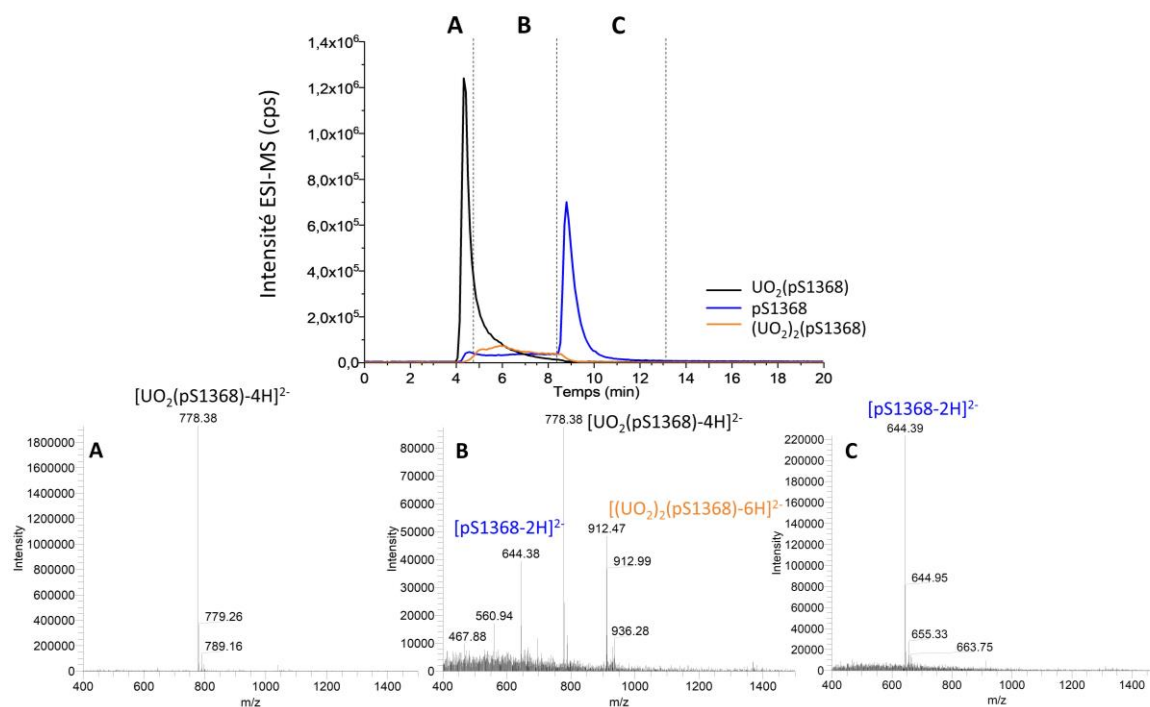


Figure 54: Superposition des chromatogrammes enregistrés par ESI-MS en mode d'acquisition SIM, centré sur le rapport m/z des espèces $[\text{UO}_2(\text{pS1368})\text{-}4\text{H}]^{2-}$, $[(\text{UO}_2)_2(\text{pS1368})\text{-}6\text{H}]^{2-}$ et $[\text{pS1368}\text{-}2\text{H}]^{2-}$. A, B et C représentent les spectres de masse extraits des différentes régions du chromatogramme enregistré en mode balayage complet (Full scan) sur une gamme de masse comprise entre 400 et 1500. Echantillon : $2\text{UO}_2^{2+}\text{-}6\text{pS1368}$. Colonne : YMC triart Diol 100 x 2,1 ; 1,9 μm , phase mobile 72/28 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, V_{inj} = 3 μL , Débit = 300 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ est élué 4,5 min plus tôt que la fraction du peptide libre en excès. Ce comportement peut être lié à la diminution de la charge globale du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ par rapport à celle du peptide libre. Une différence similaire a été observée par Köster et *al.* lors de l'étude du comportement en HILIC du complexe $\text{Fe}^{3+}\text{-EDTA}$ avec différentes phases stationnaires [12]. Le facteur de rétention de la fraction non complexée de l'EDTA était supérieur à celui du complexe $\text{Fe}^{3+}\text{-EDTA}$, ce qui a été attribué à la diminution de la charge globale lorsque l'EDTA est complexé au Fe^{3+} , conduisant à une réduction de sa rétention *via* le mécanisme de partage hydrophile [12].

Le chromatogramme enregistré en mode SIM centré sur la masse du peptide pS1368 montre une augmentation de la ligne de base précédant le pic de pS1368 (Figure 54). Le spectre de masse extrait de cette région, acquis en mode balayage complet met en évidence la co-existence de trois espèces (zone B) : l'excès de ligand non complexé pS1368, le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ prédominant et le complexe $(\text{UO}_2)_2(\text{pS1368})$ de stœchiométrie 2-1 (Figure 54B). Ce dernier peut être négligé en raison de sa faible abondance par rapport au complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, majoritaire. Les zones A et C correspondent respectivement aux pics d'éluion de $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et de pS1368 en excès.

La co-existence de ces trois espèces peut être expliquée par le caractère labile du complexe d' UO_2^{2+} , en échange dynamique rapide avec le ligand.

4.2. Mise au point d'une méthode d'identification et de quantification des complexes UO_2^{2+} -peptides par HILIC-ESI-MS/ICP-MS

L'étape préliminaire essentielle au développement de cette approche est de dimensionner la méthode de quantification de l' UO_2^{2+} dans les complexes par ICP-MS, en tenant compte de la nature des analytes et de la matrice liée à la séparation chromatographique, composée d'une phase mobile hydro-organique. Comme précisé dans le chapitre bibliographique, plusieurs approches classiques de quantification sont décrites dans la littérature. Dans notre étude, une quantification sur la base d'un étalonnage externe a été sélectionnée en raison de sa simplicité de mise en œuvre et des niveaux d'incertitudes associés, suffisants pour notre étude avec un ordre de grandeur de 5 à 15%. La stratégie consiste à déterminer dans un premier temps la concentration totale d'U dans l'échantillon de travail, notée $[\text{U}]_t$. Ces mesures sont effectuées hors ligne par ICP-MS et les échantillons sont introduits en mode FIA ou « flow injection analysis » *via* l'injecteur automatique du passeur de la chaîne chromatographique avec la même composition et le même débit de phase mobile que ceux utilisés pour les séparations des complexes. Dans un deuxième temps, les différentes espèces d' UO_2^{2+} contenues dans l'échantillon sont séparées par HILIC, identifiées en ligne par ESI-MS et leur teneur en U déterminée simultanément et également en ligne par ICP-MS. Ainsi, la répartition de l'U au sein de chaque espèce selon $[\text{U}]_t = [\text{U}]_{\text{espèce1}} + [\text{U}]_{\text{espèce2}} + [\text{U}]_{\text{espèce3}}$ peut être quantifiée. Dans les deux cas, le mode d'injection des échantillons donne des signaux transitoires qui ont été traités en intégrant l'aire totale du pic, proportionnelle à la concentration en U dans l'espèce associée au pic.

4.2.1. Dimensionnement de la méthode de quantification de l'U total par ICP-MS

L'étalonnage a été réalisé par injection de solutions étalons d'U en mode FIA dans l'ICP-MS. La gamme d'étalonnage sélectionnée consiste en 5 niveaux de concentrations en U compris entre 8 et 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ afin de couvrir la concentration d'U dans l'échantillon de travail, ciblée à 23,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Les solutions étalons d'U sont préparées dans le même milieu que celui de l'échantillon, composé de 70/30 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ à pH 7,4. A ce pH, l'hydrolyse domine la spéciation de l' UO_2^{2+} en absence de molécule ayant un pouvoir complexant suffisamment élevé et peut conduire à sa précipitation selon sa concentration [193]. Afin de limiter ce phénomène, le peptide pS1368 est ajouté dans les solutions étalons d'U, ce qui permet de plus de préparer des droites d'étalonnage avec des étalons similaires aux échantillons à doser. Les étapes de préparation des solutions étalons sont détaillées dans l'annexe I.

Afin de suivre en continu la stabilité du signal enregistré par ICP-MS, le Bismuth (^{209}Bi), a été ajouté dans la solution de compensation d'acide nitrique en amont du T mélangeur qui précède l'injecteur (Figure 48). Cet élément est généralement utilisé comme étalon interne pour la quantification d'éléments lourds, avec une masse atomique proche de celle de ^{238}U , et est libre d'interférences

spectrales. La Figure 55 montre les signaux transitoires acquis par ICP-MS pour chaque solution étalon d'U injectée en mode FIA, ainsi que le signal du ^{209}Bi introduit en continu à une concentration de 10 ng mL^{-1} .

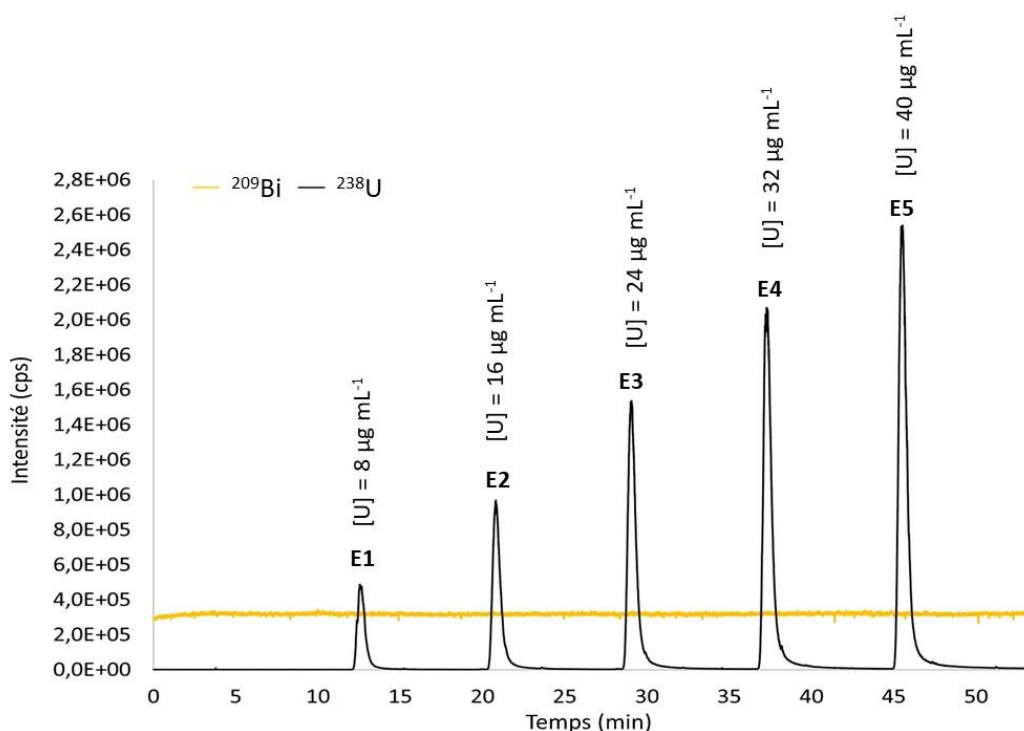


Figure 55 : Signaux transitoires des solutions étalons d'U obtenu par ICP-MS. Phase mobile : 72/28 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, débit $300 \mu\text{L min}^{-1}$, $V_{\text{inj}} = 3 \mu\text{L}$. Le signal continu correspond à celui de l'étalon interne, le Bi (10 ng mL^{-1}) introduit en amont du T mélangeur. Les signaux de ^{209}Bi et ^{238}U ont été enregistrés avec un temps d'intégration de 90 ms.

La stabilité du signal du ^{209}Bi au cours d'une acquisition est évaluée par l'intermédiaire de l'écart type relatif RSD (%), calculé pour des mesures acquises en continu sur une durée de 55 min selon l'équation 1 :

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\text{Ecart type de n valeurs}}{\text{Moyenne de n valeurs}} \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

La RSD a été évaluée à 1,9% ce qui traduit une très bonne stabilité ($< 15 \%$) du signal au cours d'un cycle d'acquisitions. La stabilité de la réponse en ICP-MS pendant une journée a été également évaluée en appliquant la même formule en se basant sur l'écart type et la moyenne des mesures du ^{209}Bi pour à 11 cycle d'acquisitions. Cette étape est réalisée chaque jour, des RSD comprises entre 1 et 5,9% ont été obtenues, ce qui est considéré comme acceptable pour nos applications.

La droite d'étalonnage a été établie en injectant les solutions étalons en triplicat et en traçant la valeur moyenne des aires des pics en fonction de la concentration d'uranium dans chaque solution étalon ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figure 56).

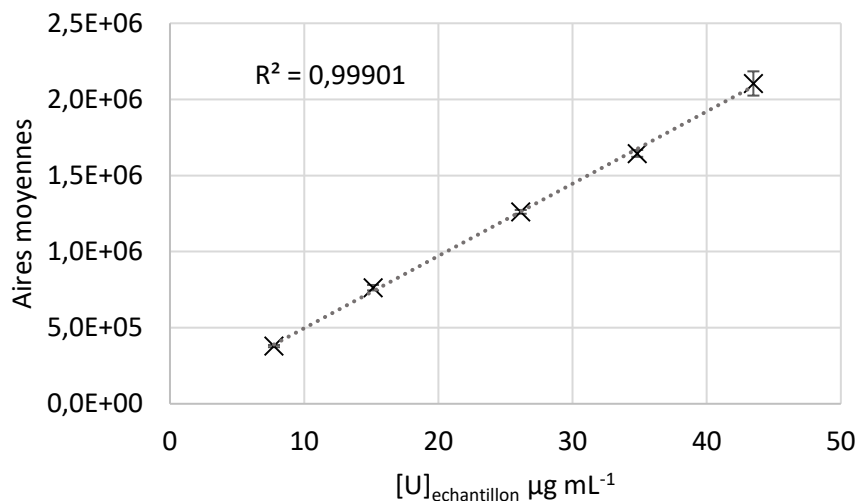


Figure 56: Droite d'étalonnage représentant la valeur moyenne des aires des pics d'U en fonction de la concentration d'U dans chaque solution étalon ($\mu\text{g mL}^{-1}$) injectée en triplicat. Phase mobile : 68/32 ACN/ H_2O v/v + 20 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, débit $300 \mu\text{L min}^{-1}$, $V_{\text{inj}} = 3 \mu\text{L}$. Les barres verticales correspondent à l'écart type des valeurs obtenues en triplicat pour chaque niveau de concentration.

Une bonne linéarité est obtenue, traduite par un facteur de corrélation $R^2 = 0,99901$. La répétabilité des mesures a été déterminée à partir de la RSD des aires des pics pour chaque niveau de concentration. Une bonne répétabilité comprise entre 1% et 4% a été obtenue ($< 15\%$). Des droites d'étalonnage ont été établies pour chaque campagne d'expériences

4.2.2. Dimensionnement de la méthode de quantification par HILIC-ESI-MS/ICP-MS

Dans l'échantillon, l'U total est distribué dans plusieurs espèces qui seront séparées par HILIC. Les pics chromatographique associés à des espèces séparées sont des signaux transitoires, comme illustré dans la Figure 57.

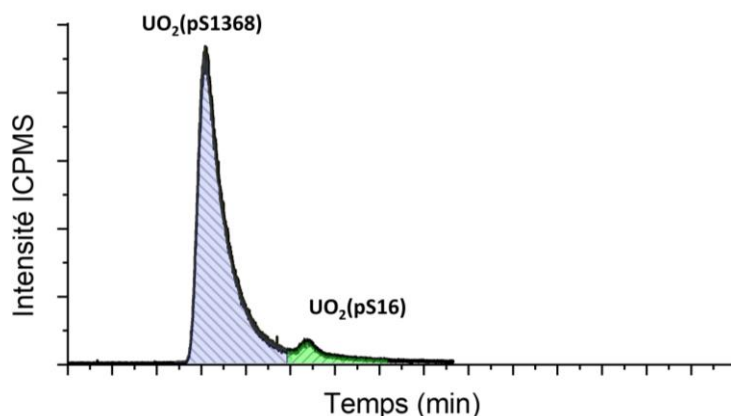


Figure 57 : Chromatogramme des complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{pS16})$, obtenu par ICP-MS en suivant le signal de ^{238}U . Echantillon $2\text{UO}_2^{2+} \cdot 0,5\text{pS1368} - 20\text{pS16}$. Colonne YMC Triart diol $100 \times 2 \text{ mm}$; $1,9 \mu\text{m}$. Phase mobile 72/28 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, débit $300 \mu\text{L min}^{-1}$, mode d'élution isocratique. $V_{\text{inj}} = 3 \mu\text{L}$.

La quantification de l'U contenu dans chaque complexe est basée sur l'intégration de l'aire des pics associés à chaque complexe. Lors de la séparation, une adsorption de l' UO_2^{2+} sur la phase stationnaire peut avoir lieu et a été décrite dans la littérature lors de la séparation de fractions protéiques riches

en UO_2^{2+} par SEC. Cette fraction d' UO_2^{2+} non complexé a été récupérée en éluant dans la colonne du carbonate sous sa forme bicarbonate de sodium NaHCO_3 en raison de son fort pouvoir chélatant [82]. La même démarche a été adoptée pour récupérer par injections successives d'EDTA du Cu, du Ni et du Zn adsorbés à la surface d'une phase stationnaire zwitterionique lors de la séparation par HILIC de complexes contenant ces métaux [194]. Ainsi, dans le but de vérifier une éventuelle adsorption de l' UO_2^{2+} sur la colonne, des injections successives du peptide pS1368, ayant la plus forte affinité pour l' UO_2^{2+} ont été effectuées jusqu'à ce que l'intensité du signal d' UO_2^{2+} relargué, enregistré par ICP-MS soit inférieure ou égale à 10^3 cps. La concentration de cette fraction non complexée d' UO_2^{2+} , notée $[\text{U}]_{\text{libre}}$, est ensuite déterminée par étalonnage externe, sur la base de l'aire des pics associés à chaque injection de pS1368.

Finalement, un bilan de masse a été établi en rapportant la somme des concentrations de l' UO_2^{2+} sous ses formes libre et complexée, à la concentration totale en UO_2^{2+} dans l'échantillon, $[\text{U}]_{\text{total}}$ selon :

$$\text{Bilan de masse (\%)} = \frac{\sum [\text{U}]_{\text{U-pS1368}} + [\text{U}]_{\text{U-pS16}} + [\text{U}]_{\text{libre}}}{[\text{U}]_{\text{total}}} \quad (\text{Équation 2})$$

La distribution quantitative de l'U sous ses différentes formes chimiques a été déterminée en normalisant la concentration en UO_2^{2+} dans chaque espèce X par rapport à la concentration totale d' UO_2^{2+} dans l'échantillon selon l'équation 3 :

$$\% \text{U}_x = \frac{[\text{U}_x]}{[\text{U}]_{\text{total}}} \quad (\text{Équation 3})$$

4.3. Détermination de l'échelle d'affinité de l'uranium pour les peptides multiphosphorylés

La méthode de quantification développée a été appliquée à la détermination en ligne et en une étape unique de l'échelle d'affinité de l' UO_2^{2+} pour les peptides pS16 et pS1368. Pour ce faire, l' UO_2^{2+} a été mis en présence de différentes proportions de pS16 et pS1368 à pH = 7,4. Chaque échantillon a été préparé indépendamment pour aboutir à une concentration finale d' UO_2^{2+} de 10^{-4} mol L^{-1} et de concentrations de pS1368 et pS16 respectant les rapports stœchiométriques indiqués dans le Tableau 16:

Tableau 16 : Proportions UO_2^{2+} -xpS1368-ypS16 visées, avec x et y les stœchiométries des peptides par rapport à l' UO_2^{2+} .

UO_2^{2+}	x pS1368	y pS16
2	4	0
2	3	1
2	2	2
2	0,5	20
2	0	20

La concentration totale de UO_2^{2+} dans chaque échantillon a été déterminée en réalisant des injections en duplicat par ICP-MS selon la méthode décrite dans la partie précédente. Les concentrations et les

rapports stœchiométriques des peptides calculés à partir de ces valeurs sont recensés dans le [Tableau 17](#).

Tableau 17 : Concentration totale en U dans les échantillons $[\text{U}]_t$, écart relatif* des valeurs mesurées en 2 répliques, concentration des peptides dans l'échantillon, calculée par pesée à partir de celle de la solution stock dosée par HILIC-UV et proportion UO_2^{2+} -xpS1368-ypS16 expérimentale

UO_2^{2+} - xpS1368- ypS16 Visée	$[\text{U}]_t$				Ecart relatif* (%)	[pS1368] mol L ⁻¹	[pS16] mol L ⁻¹	UO_2^{2+} - xpS1368- ypS16 Expérimentale
	μg mL ⁻¹		mol L ⁻¹					
	Valeur 1	Valeur 2	Valeur 1	Valeur 2				
2-4-0	33,89	35,47	$1,42 \times 10^{-4}$	$1,49 \times 10^{-4}$	4,6	$4,61 \times 10^{-4}$	0,0	2-6,4-0
2-3-1	39,80	39,67	$1,67 \times 10^{-4}$	$1,67 \times 10^{-4}$	0,3	$1,73 \times 10^{-4}$	$5,97 \times 10^{-5}$	2-2,1-0,7
2-2-2	30,48	31,37	$1,28 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-4}$	2,9	$1,24 \times 10^{-4}$	$1,24 \times 10^{-4}$	2-1,9-1,9
2-0,5-20	20,79	20,94	$8,74 \times 10^{-5}$	$8,80 \times 10^{-5}$	0,7	$2,34 \times 10^{-5}$	$9,15 \times 10^{-4}$	2-0,5-20,9
2-0-20	20,55	20,31	$8,63 \times 10^{-5}$	$8,53 \times 10^{-5}$	1,2	0	$9,20 \times 10^{-4}$	2-0-21,2

*Ecart relatif = (valeur1-valeur 2)/(valeur 1)

Chaque échantillon a été soumis à une séparation en duplicat. Les chromatogrammes obtenus simultanément par HILIC-ESI-MS/ICP-MS pour les différents échantillons sont présentés dans la [Figure 58](#).

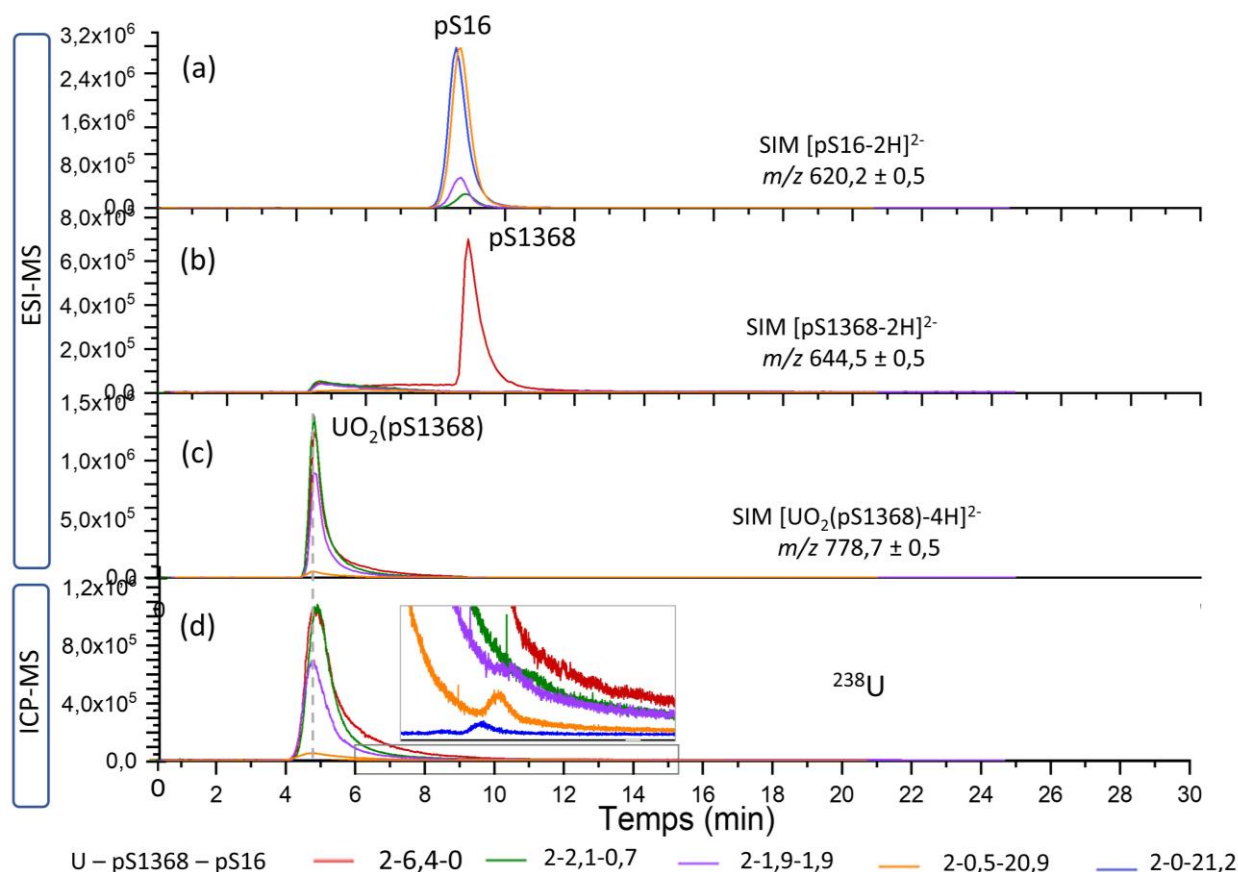


Figure 58 : Chromatogrammes acquis par (a-c) ESI-MS en mode d'acquisition SIM, pour un suivi ciblé des rapports m/z de (a) pS16, (b) pS1368, ET (c) le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, et par (d) ICP-MS en suivant le signal de ^{238}U avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillons UO_2^{2+} -xpS1368-ypS16. Colonne YMC Triart Diol 100 x 2 mm ; 1,9 μm. Phase mobile 72/28 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L⁻¹ $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Elution en mode isocratique. Débit 300 μL min⁻¹, V_{inj} = 3 μL.

Le chromatogramme de la Figure 58-a montre un pic correspondant au peptide pS16 libre, alors que celui du complexe $\text{UO}_2(\text{pS16})$ n'a été observé pour aucun échantillon par ESI-MS, même lorsque le pS16 est en excès significatif par rapport à UO_2^{2+} . En revanche, le pic du peptide tétraphosphorylé pS1368 libre n'est observé que lorsqu'il est en excès par rapport à UO_2^{2+} (Figure 58-b), indiquant un engagement total de pS1368 dans la complexation quand il est en rapport stœchiométrique. Dans tous les cas, une augmentation de la ligne de base précédant le pic du pS1368 libre a également été observée, comme décrit dans le paragraphe 4.1.

Le chromatogramme obtenu par ICP-MS (Figure 58-d) montre un pic d' ^{238}U majoritaire correspondant au complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ par comparaison de son temps de rétention à celui du pic observé en ESI-MS. En revanche, le pic correspondant au complexe $\text{UO}_2(\text{pS16})$ n'est observé en ICP-MS que lorsque pS16 est en large excès par rapport à UO_2^{2+} à savoir les échantillons contenant une proportion UO_2^{2+} -pS1368-pS16 2-0,5-20,9 et 2-0-21,2. Le temps de rétention de ce pic, identique à celui du peptide pS16 identifié par ESI-MS (Figure 58-a), a permis de l'attribuer au complexe $\text{UO}_2(\text{pS16})$.

L' UO_2^{2+} résiduel adsorbé à la surface de la phase stationnaire a été récupéré après chaque séparation. Les bilans de masse obtenus sont présentés dans le Tableau 18.

Tableau 18: Bilan de masse calculé pour chaque échantillon analysé en duplicat. Ecart relatif entre les valeurs obtenues pour chaque réplique.

UO_2^{2+} -xpS1368-ypS16	Bilan de masse		Ecart relatif
	Réplique 1	Réplique 2	
2-6,4-0	100,1%	96,1%	4,1%
2-2,1-0,7	100,9%	94,4%	6,4%
2-1,9-1,9	98,7%	96,3%	2,5%
2-0,5-20,9	101,7%	98,4%	3,3%
2-0-21,2	99,7%	103,6%	4,0%

Un bilan de masse compris entre 95 % et 104 % indique une récupération quasi-totale de l'U, avec des écarts relatifs entre les valeurs obtenues pour chaque réplique compris entre 2,5 et 6,4%, ce qui permet de déterminer la répartition quantitative de l' UO_2^{2+} dans les différentes espèces. La concentration de l' UO_2^{2+} dans chaque espèce mesurée par étalonnage externe et en ligne, ainsi que les écarts relatifs entre les valeurs obtenues pour chaque réplique, sont représentés dans l'histogramme de la Figure 59-a. L' UO_2^{2+} contenu dans le complexe $\text{UO}_2(\text{pS16})$ n'a pas pu être quantifié puisque le rapport signal/bruit (S/N) du pic correspondant est inférieur à 10 [195].

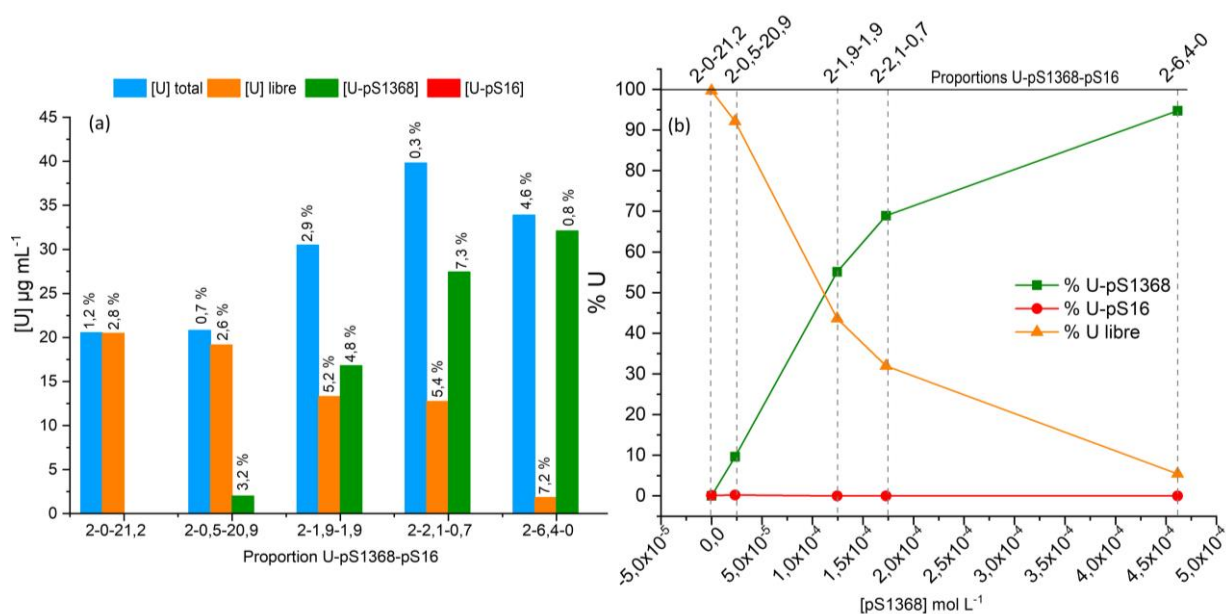


Figure 59 : Distribution quantitative de l'U parmi les espèces $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, $\text{UO}_2(\text{pS16})$ et U libre. (a) concentration de l'U dans chaque espèce, déterminée par étalonnage externe. Les pourcentages en vertical expriment l'écart relatif entre les valeurs de concentrations obtenues en duplicat (b) Distribution quantitative de l'U parmi les différentes espèces en fonction de la concentration en pS1368 et des proportions de chaque échantillon.

L'écart relatif entre les concentrations en UO_2^{2+} contenu dans les différentes espèces calculées à partir des aires des pics chromatographiques de chaque réplique, est compris entre 0,8 et 7,3% ce qui est considéré comme acceptable ($< 15\%$) et montre une bonne répétabilité des injections (Figure 59a). La distribution quantitative de l'U parmi les différentes espèces a été calculée en normalisant la concentration d'U dans chaque espèce par rapport à celle de U total pour chaque échantillon et est représentée dans le diagramme de la Figure 59b. En présence de trois équivalents de pS1368, 95% de l'U est engagé dans le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et les 5% restants sont sous forme d'U libre. Lorsque la proportion de pS1368 diminue en faveur de celle de pS16, seule la fraction d'U libre augmente. Pour un mélange équimolaire $\text{UO}_2(\text{pS1368})(\text{pS16})$ 2-2-2, elle atteint 45% alors que les 55% restants représentent le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$. Lorsque pS1368 est en sous-stœchiométrie et pS16 dix fois en excès par rapport à l' UO_2^{2+} , 10% de l'U reste sous forme $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ alors qu'environ 92% sont sous forme d'U libre. Finalement, 99,6% de l'U sont sous forme libre même en présence de dix équivalents de pS16 uniquement. Puisque l'espèce $\text{UO}_2(\text{pS16})$ n'a pas pu être quantifiée, une estimation de la proportion relative de l'aire du pic de ce complexe par rapport à celle du pic de l'U total dans l'échantillon a été calculée et représente seulement 0,2%.

D'après ces résultats, on peut conclure que trois équivalents de pS1368 par rapport à UO_2^{2+} ont abouti à la complexation de 95% de ce dernier, alors que dix équivalents de pS16 sont insuffisants pour complexer moins de 1%. Lorsque ces deux peptides sont présents en proportion équimolaire vis-à-vis de l' UO_2^{2+} , la moitié de l'U est complexée au peptide pS1368 alors que la moitié restante est sous forme d'U libre.

Ces données montrent que le peptide pS1368 présente une plus grande affinité pour l' UO_2^{2+} que le peptide pS16, confirmant ainsi les valeurs des constantes de stabilité précédemment publiées[9]. Le rapport de ces deux constantes étant égal à 10, il est nécessaire de se mettre en fort excès de pS16 pour complexer l' UO_2^{2+} , ce qui risquerait de saturer la colonne dans nos conditions de travail.

En conclusion, la faisabilité de la séparation par HILIC des complexes d' UO_2^{2+} formés avec les peptides cycliques multiphosphorylés a été démontrée, avec la préservation quasi-totale de l'intégrité du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, ce qui représente un défi compte-tenu de son caractère labile. Une méthode de quantification dédiée, basée sur un étalonnage externe a été développée ICP-MS dans le but de déterminer en ligne la distribution quantitative de l' UO_2^{2+} dans les complexes formés avec les peptides multiphosphorylés issus de la séparation et simultanément identifiés par ESI-MS. L'application de cette méthode a permis de confirmer en une étape unique que le peptide tétraphosphorylé pS1368 présentait une affinité plus importante vis-à-vis de l' UO_2^{2+} que son équivalent di-phosphorylé. La limitation de cette méthode réside dans le fait qu'elle est uniquement adaptée à la séparation de complexes d' UO_2^{2+} de constantes de stabilités supérieures ou égales à 10 en unité log. Les complexes formés avec les peptides contenant moins de deux résidus pSer et donc ayant de constantes de stabilités inférieures à 10, n'ont donc pas pu être détectés en raison du grand excès de peptide nécessaire pour compenser le phénomène de dissociation qui peut avoir lieu lors de la séparation.

5. Effet de la structure des peptides sur l'affinité pour l' UO_2^{2+}

Lors de la conception de peptides biomimétiques, la structure du peptide joue un rôle primordial, puisque la coordination du cation UO_2^{2+} est directement liée au degré de flexibilité du squelette peptidique [196]. Les peptides cycliques considérés dans ce travail sont préorganisés et conçus spécifiquement pour complexer UO_2^{2+} dans son plan équatorial. Des peptides linéaires de séquence équivalente sont plus flexibles et doivent donc se structurer autour de l' UO_2^{2+} pour se coordonner efficacement. La structure du peptide a donc un effet direct sur son affinité pour l'uranium [192]. Dans cette partie, la méthodologie développée précédemment par HILIC-ESI-MS/ICP-MS a été appliquée pour évaluer l'affinité de l' UO_2^{2+} pour des peptides tétraphosphorylés cyclique et linéaire, en ligne et en une étape unique.

- Détermination de la distribution quantitative de l' UO_2^{2+} parmi des peptides tétraphosphorylés cyclique et linéaire

Une concentration fixe de l' UO_2^{2+} a été mise en présence de proportions variables des deux peptides tétraphosphorylés cyclique et linéaire (Figure 60) qui vont entrer en compétition pour le complexer.

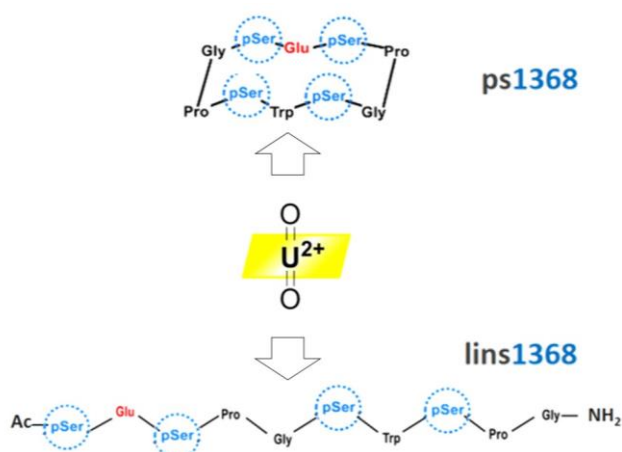


Figure 60 : Représentation schématique des structures cyclique (ps1368) et linéaire (lins1368) du peptide tétraphosphorylé en compétition pour complexer le cation UO_2^{2+}

La première étape a consisté à définir les conditions de séparation des complexes d' UO_2^{2+} formés avec ces deux peptides par HILIC.

5.1. Définition des conditions de séparation

La sélectivité des colonnes à greffage amide et diol utilisées dans les expériences précédentes a été évaluée avec un échantillon contenant un mélange équimolaire de deux solutions de contact $\text{UO}_2(\text{ps1368})_2$ et $\text{UO}_2(\text{lins1368})_2$. Les profils d'éluion issus de l'enregistrement du signal de l' ^{238}U par l'ICP-MS en aval du couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS sont présentés dans la Figure 61. Les pics ont été identifiés par ESI-MS.

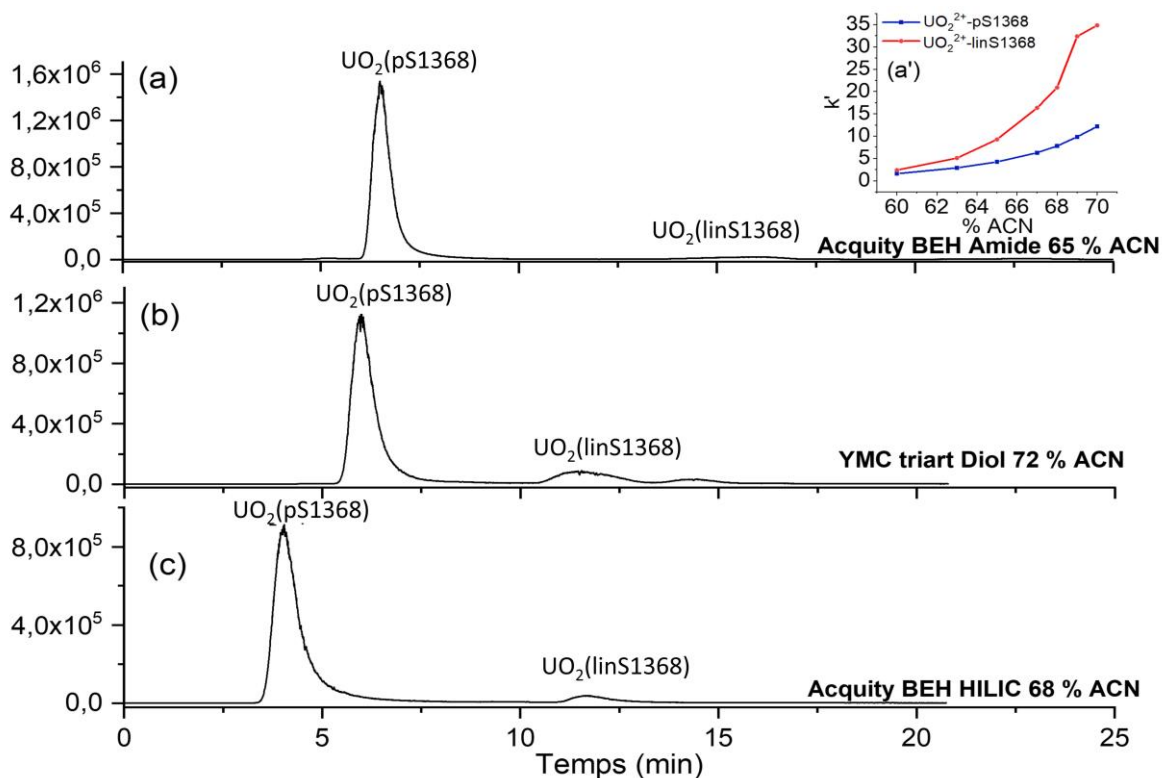


Figure 61 : Chromatogrammes des complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{linS1368})$, acquis par ICP-MS en enregistrant le signal de ^{238}U par ICP-MS avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillon : mélange équimolaire de deux solutions de contact $\text{UO}_2(\text{pS1368})_2$ et $\text{UO}_2(\text{linS1368})_2$. Colonne (a) Acquity BEH amide $100 \times 2,1$; $1,7 \mu\text{m}$, (b) YMC Triart Diol $100 \times 2 \text{ mm}$; $1,9 \mu\text{m}$, (c) Acquity BEH HILIC $100 \times 2,1$; $1,7 \mu\text{m}$. Phase mobile ACN/ H_2O + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ contenant (a) 65 % ACN, (b) 72 % ACN et (c) 68 % ACN. (a') variation de k' en fonction du % ACN. Elution en mode isocratique. Débit $300 \mu\text{L min}^{-1}$, $V_{\text{inj}} = 3 \mu\text{L}$.

Avec la colonne Acquity BEH amide, une phase mobile contenant 70% ACN a conduit à un pic très large avec un facteur de rétention très important pour $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ ($k' > 30$). Le pourcentage d'ACN dans la phase mobile a été diminué jusqu'à 60% afin de réduire le facteur de rétention de ce complexe (Figure 61a'). Pour 60% d'ACN, les pics sont co-élus et 65 % d'ACN (Figure 61-a) a conduit à une séparation non satisfaisante en raison du pic très large et déformé du complexe $\text{UO}_2(\text{linS1368})$. Cette colonne s'est donc avérée non adaptée à la séparation des deux complexes. Les mêmes résultats ont été obtenus avec la colonne YMC Triart Diol (Figure 61-b), moins polaire que la colonne à fonction amide, en employant une phase mobile contenant 72% ACN. Par conséquent, la sélectivité d'une nouvelle phase stationnaire a été évaluée pour séparer ces deux complexes aux propriétés très proches. Rappelons que le critère de choix de la phase stationnaire est qu'elle doit conduire à des facteurs de rétention les plus faibles possibles afin de minimiser le risque de dissociation des complexes au cours de la séparation, tout en gardant une résolution satisfaisante [11]. Ainsi, une colonne à base de silice hybride non greffée (Acquity BEH HILIC), de polarité intermédiaire entre celle des colonnes à greffage amide et diol, a été sélectionnée comme compromis. Le profil d'éluion par ICP-MS obtenu avec cette colonne en employant une phase mobile contenant 68% ACN est présenté dans la (Figure 61-c). Dans ces conditions de séparation, les facteurs de rétention des complexes

$\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ sont les moins élevés de l'ordre de 1,1 et 9,3, respectivement et ces deux complexes ont été séparés avec de bons facteurs de sélectivité α et de résolution R_s de 8,1 et 5,6 respectivement. De plus, l'allure du pic du complexe $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ et la valeur de sa largeur à mi-hauteur, étant de 0,96, sont acceptables. A notre connaissance, l'emploi de la colonne de silice hybride n'a jamais été décrite dans la littérature pour séparer des complexes métalliques. Une seule étude reporte l'utilisation d'une colonne de silice vierge pour la séparation d'agents de contraste à base de Gadolinium [197] mais la plupart des séparations de complexes métalliques sont effectuées avec des phases stationnaires greffées par des fonctions zwitterionique, diol et amide [12,165].

Malgré la différence de fonctionnalisation des phases stationnaires, les profils obtenus par ESI-MS et avec les trois colonnes (figure non présentée) montrent que le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ est également moins retenu que la fraction libre du peptide pS1368 ajouté en excès. Ce comportement peut être attribué à la diminution de la charge globale du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, induisant une diminution de la polarité et donc de la rétention en HILIC *via* le mécanisme de partage hydrophile, comme observé par Koster *et al.* [12]. Par ailleurs, le complexe $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ est toujours élué avec le même temps de rétention que celui du peptide non complexé, comme c'était le cas pour le peptide pS16.

5.2. Evaluation de l'effet de la structure du peptide tétraphosphorylé sur son pouvoir complexant pour l' UO_2^{2+} par HILIC-ESI-MS/ICP-MS

La méthode de quantification développée en amont a été appliquée à la détermination en ligne de l'affinité de l' UO_2^{2+} vis-à-vis des peptides tétraphosphorylés cyclique et linéaire, pS1368 et linS1368. A cette fin, l' UO_2^{2+} a été mis en présence des deux peptides en proportions variables et dans des échantillons différents tout en gardant la concentration en UO_2^{2+} fixe à 10^{-4} mol L⁻¹. Les proportions UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368 visées sont recensées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Proportions UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368 visées

UO_2^{2+}	x pS1368	y linS1368
2	4	0
2	3	1
2	2	2
2	0,5	3,5
2	0	4

Les échantillons ont été analysés en duplicats et la teneur en U total a été déterminée par étalonnage externe en ICP-MS comme détaillé précédemment, ce qui a permis de calculer les proportions UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368 expérimentales (Tableau 20).

Tableau 20: Concentration totale $[\text{U}]_t$ dans les échantillons déterminée par étalonnage pour deux réplicats, écart relatif (%) entre les valeurs des concentrations mesurées pour chaque réplique, concentration en peptides pS1368 et linS1368 dans l'échantillon, calculée par pesée à partir de celle de la solution stock dosée par HILIC-UV et proportions expérimentales UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368

UO_2^{2+} - xpS1368- ylinS1368 visées	$[\text{U}]_t$				Ecart relatif (%)	[pS1368] mol L ⁻¹	[linS1368] mol L ⁻¹	UO_2^{2+} - xpS1368- ylinS1368 Expérimentales
	μg mL ⁻¹		mol L ⁻¹					
	Valeur1	Valeur2	Valeur 1	Valeur 2				
2-4-0	28,2	28,4	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$	0,7	$4,5 \times 10^{-4}$	0	2-7,7-0
2-3-1	27,5	27,6	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$	0,3	$1,9 \times 10^{-4}$	$6,1 \times 10^{-5}$	2-3,3-1,1
2-2-2	33,9	34,8	$1,4 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-4}$	2,7	$1,4 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-4}$	2-2-1,95
2-0,5-3,5	24,0	23,9	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$	0,6	$3,7 \times 10^{-5}$	$2,4 \times 10^{-4}$	2-0,7-4,7
2-0-4	28,7	28,1	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$	2,1	0	$4,0 \times 10^{-4}$	2-0-6,6

L'écart relatif entre les valeurs obtenues pour chaque réplique est compris entre 0,3 et 2,7%, montrant une bonne répétabilité des expériences (< 15%).

La séparation des complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ a été également réalisée en duplicat pour chaque échantillon. Les profils élution obtenus par HILIC-ESI-MS/ICP-MS pour les différentes proportions UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368 sont présentés dans la Figure 62.

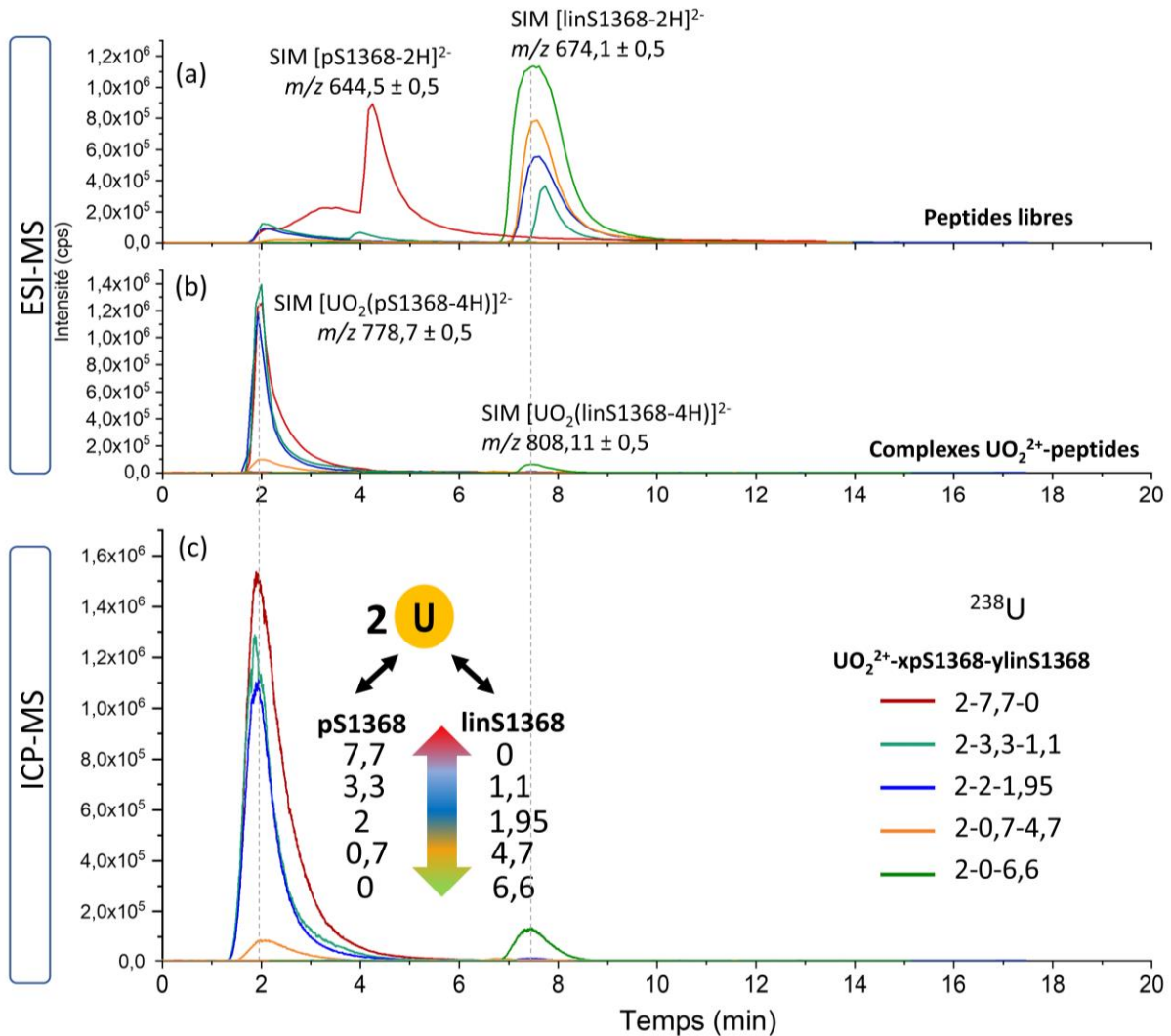


Figure 62: Superposition des chromatogrammes enregistrés par (a-b) ESI-MS en mode d'acquisition SIM, centré sur le rapport m/z des (a) peptides pS1368 et linS1368 et (b) des complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{linS1368})$, et par (c) ICP-MS en suivant le signal de ^{238}U avec un temps d'intégration de 90 ms.

On observe sur les chromatogrammes enregistrés par ESI-MS (Figure 62a et b), que le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ est séparé de la fraction non complexée de pS1368 en excès. Une augmentation de la ligne de base précédant le pic de pS1368 a également été observée (Figure 62a). Ce comportement peut être attribué à un échange dynamique entre UO_2^{2+} et le peptide au cours de la séparation, en raison du caractère labile des complexes d' UO_2^{2+} . Comme précédemment, les trois espèces : $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ de stœchiométrie 1-1 et 2-1 et le peptide pS1368 libre ont été observées dans cette zone pour l'échantillon UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368 de proportion 2-7,7-0 avec une dominance de l'espèce $\text{UO}_2(\text{pS1368})$. Le complexe $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ est élué au même temps de rétention que celui du peptide linS1368 libre. Ce comportement est identique à celui du complexe $\text{UO}_2(\text{pS16})$ sur la phase stationnaire diol. Les pics observés en ICP-MS (Figure 62c) correspondant aux complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux obtenus par ESI-MS, sont séparés avec un bon facteur de sélectivité $\alpha = 6,1$. L'uranyle résiduel adsorbé à la surface de la phase

stationnaire a été récupéré après chaque séparation par des injections successives de pS1368. Sur la base des chromatogrammes obtenus par ICP-MS, un bilan de masse de l' UO_2^{2+} a été calculé pour chaque échantillon (Tableau 21).

Tableau 21 : Bilan de masse calculé pour les échantillons UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368 injectés en duplicat. Ecart relatif (%) entre les valeurs obtenues pour chaque réplique.

U-xpS1368-ylinS1368	Bilan de masse		Ecart relatif
	Réplique 1	Réplique 2	
2-7,7-0	93%	101%	8,9%
2-3,3-1,1	92,6%	102%	10,2%
2-2-1,95	88,3%	86,3%	2,3%
2-0,7-4,7	88,9%	90,4%	1,7%
2-0-6,6	94%	84,9%	9,2%

Les taux de récupération de l' UO_2^{2+} sont compris entre 85 et 102%, ce qui est considéré comme acceptable. Les écarts relatifs entre les valeurs obtenues pour chaque réplique sont compris entre 2 et 10% montrant une reproductibilité acceptable des expériences.

La concentration d' UO_2^{2+} dans chaque espèce issue de la séparation a été déterminée en ligne par étalonnage externe. Les écarts relatifs entre les valeurs obtenues pour les analyses réalisées en duplicat sont représentés dans l'histogramme de la Figure 63b.

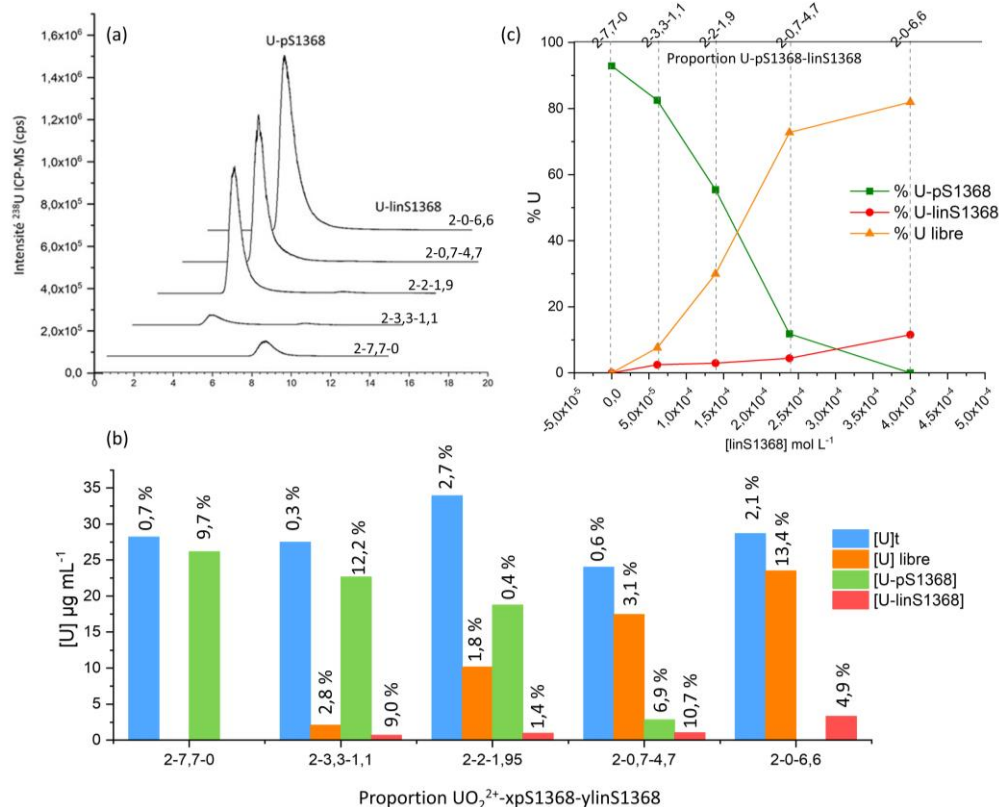


Figure 63 : (a) Profils d'éluion en 3D des complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ identifiés par ESI-MS et obtenus en ICP-MS pour les échantillons contenant des proportions différentes UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368. Distribution quantitative de l'U parmi les espèces $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ et U libre. (a) concentration de l'U dans chaque espèce, déterminée par étalonnage externe. Les pourcentages en vertical expriment l'écart relatif entre les valeurs de concentrations obtenues en duplicat (b) Distribution quantitative de l'U parmi les différentes espèces $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ et U libre en fonction de la concentration en linS1368 et des proportions de chaque échantillon.

Comme le montre la Figure 63b, un écart relatif entre les valeurs des concentrations en U dans les différentes espèces est compris entre 0,4 et 13,4%, montrant une reproductibilité acceptable des mesures. La distribution quantitative de l'U a été déterminée de la même manière que précédemment et est représentée dans le diagramme de la Figure 63c. Pour une proportion UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368 de 2-7,7-0, 93% de l'U est sous forme du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$. Quand la proportion de pS1368 diminue en faveur de celle de son équivalent linéaire, la fraction d'U sous sa forme libre augmente significativement, alors que la fraction de l'U engagée dans le complexe $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ augmente très peu. Lorsque les peptides sont en proportions équimolaires par rapport à UO_2^{2+} , 55% de l'U est sous forme du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ alors que 30 % est sous forme libre et seulement 3 % sont engagés dans le complexe $\text{UO}_2(\text{linS1368})$. Lorsque le peptide linéaire linS1368 est en excès et le cyclique pS1368 en sous-stœchiométrie par rapport à UO_2^{2+} dans la proportion 2-0,7-4,7, le complexe $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ ne représente que 4,4%, alors que l'U sous sa forme libre atteint 70% et celle du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ 12 %. Quand l'U est en présence uniquement du peptide linS1368 en excès, seulement 10% de l'U est engagé dans le complexe avec le peptide linéaire alors que 82%, est sous forme libre.

L'ensemble de ces résultats montrent que la structure cyclique du peptide confère une plus grande stabilité aux complexes d' UO_2^{2+} que la structure linéaire, en raison d'une coordination plus efficace liée à la préorientation des quatre groupements phosphates dans le plan équatorial de l' UO_2^{2+} . Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par les techniques classiques de chimie en solution et notamment par fluorescence, qui ont montré une extinction de fluorescence du peptide linéaire moins marquée que celle du peptide cyclique lors de l'addition d'uranyle [71]. Par ailleurs, la constante de stabilité du complexe $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ n'a pas pu être évaluée par fluorescence.

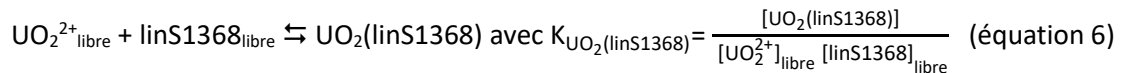
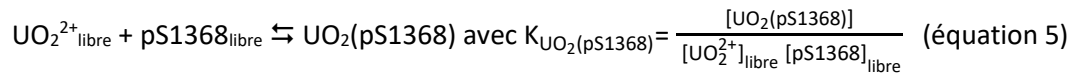
L'analyse de la stabilité de complexes UO_2^{2+} -protéines est décrite dans la littérature. En particulier, la constante de stabilité du complexe $\text{UO}_2(\text{OPN})$ a été mesurée après (i) séparation par électrophorèse capillaire de ce complexe de celui formé avec la fétuine A (FETUA) protéine non phosphorylée d'affinité connue pour l'uranyle avec $\text{Log}K(\text{UO}_2(\text{FETUA})) = 11,4$ [51] et (ii) quantification en ligne de l'U contenu dans chaque complexe par ICP-MS [57]. A pH 7,4, l' UO_2^{2+} a été mis en contact avec une concentration fixe en OPN et des concentrations croissantes en FETUA [51]. Pour une distribution équivalente de UO_2^{2+} entre les deux protéines, la constante d'affinité de l'OPN pour UO_2^{2+} a été déterminée à partir de celle de la FETUA, en réalisant le rapport des constantes de stabilité $\frac{K_{\text{UO}_2(\text{FET})}}{K_{\text{UO}_2(\text{OPN})}}$ ce qui a conduit à la formule suivante :

$$\log K_{\text{OPN}} = \log K_{\text{FET}} - \log \frac{[\text{OPN}]}{[\text{FET}]_{50}} \quad (\text{Equation 4})$$

où [OPN] est la concentration en OPN [FET]₅₀ la concentration en FET ajoutée pour laquelle l' UO_2^{2+} est distribuée d'une façon équivalente entre les deux protéines.

Cette méthodologie a été appliquée dans ce travail pour déterminer la constante de stabilité du complexe $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ à partir de celle de $\text{UO}_2(\text{pS1368})$.

Les constantes de stabilité thermodynamiques des complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ sont décrites selon les équilibres ci-dessous et les équations 5 et 6.



Dans la Figure 63c présentant les courbes de la proportion des complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{UO}_2(\text{linS1368})$, un point d'intersection est obtenu pour lequel 7% de l' UO_2^{2+} se répartit également entre les deux peptides, à savoir : $[\text{UO}_2(\text{pS1368})] = [\text{UO}_2(\text{linS1368})] = 7\% [\text{U}]_{\text{total}} = 7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, avec $[\text{U}]_{\text{total}} = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. La fraction majoritaire restante est sous forme d' UO_2^{2+} libre (86%). En réalisant le

rapport $\frac{K_{\text{UO}_2(\text{pS1368})}}{K_{\text{UO}_2(\text{linS1368})}}$ dans ces conditions et en employant une échelle logarithmique, $K_{\text{UO}_2(\text{linS1368})}$

s'exprime selon l'équation 7 :

$$\text{Log}K_{\text{UO}_2(\text{linS1368})} = \text{log}K_{\text{UO}_2(\text{pS1368})} - \text{log} \frac{[\text{linS1368}]_{\text{libre}}}{[\text{pS1368}]_{\text{libre}}} \quad (\text{équation 7})$$

Comme le montre la Figure 63c, au niveau du point d'intersection, la concentration de linS1368 $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ alors que celle de pS1368 a été estimée à $2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en traçant les mêmes courbes mais en fonction de la concentrations en pS1368 dans les échantillons. L'U se distribue donc de façon équimolaire entre les deux peptides pour une concentration du peptide linéaire 12,5 fois plus importante que celle du peptide cyclique. Les concentrations totales des peptides s'expriment selon les équations 8 et 9 :

$$[\text{linS1368}]_{\text{Total}} = [\text{UO}_2(\text{linS1368})] + [\text{linS1368}]_{\text{libre}} = 3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \quad (\text{équation 8})$$

$$[\text{pS1368}]_{\text{Total}} = [\text{UO}_2(\text{pS1368})] + [\text{pS1368}]_{\text{libre}} = 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \quad (\text{équation 9})$$

Compte tenu des concentrations des différentes espèces calculées ci-dessus ainsi que la valeur de la constante d'affinité, $\text{log}K_{\text{UO}_2(\text{pS1368})} = 11,3$ [9], l'équation 7 devient :

$$\text{Log}K_{\text{UO}_2(\text{linS1368})} = \text{log}(11,3) - \text{log}(17,2) = 10,1 \quad (\text{équation 10})$$

Ainsi, la constante de stabilité $\text{log}K(\text{UO}_2(\text{linS1368}))$ a été évaluée à 10,1. Cette valeur est estimative car le point d'intersection des deux courbes de la Figure 63c correspond à peu de points expérimentaux. Elle montre néanmoins que le peptide tétraphosphorylé linéaire est environ 10 fois moins affiné pour l' UO_2^{2+} que son équivalent cyclique. De plus, la constante de stabilité $\text{Log}K_{\text{UO}_2(\text{linS1368})}$ est identique à $\text{Log}K_{\text{UO}_2(\text{pS18})} = 10,1$, montrant que linS1368 possédant 4 résidus pSer dans un peptide non structuré

a une affinité pour l' UO_2^{2+} équivalente à celle d'un peptide cyclique structuré contenant seulement 2 résidus pSer. Ce résultat confirme que la structure du peptide a un effet aussi important sur la complexation de l' UO_2^{2+} que son degré de phosphorylation. Ce résultat est à rapprocher des effets de structure également observés pour les protéines : l'OPN est peu structurée dans sa forme non complexée, ce qui engendre une certaine flexibilité. Lors de la complexation avec l' UO_2^{2+} , la structure secondaire de l'OPN subit des modifications pour s'adapter à la coordination du métal[7] . L'OPN se structure donc autour du métal afin de positionner efficacement 4 résidus pSer dans son plan équatorial [9]. Ainsi, une structure adaptée à la coordination de l' UO_2^{2+} est nécessaire à l'échelle d'une protéine entière comme à l'échelle d'un peptide biomimétique pour former des complexes d' UO_2^{2+} avec de fortes stabilités.

Les complexes d'uranyle formés avec les peptides tetraphosphorylés cyclique (pS1368) et linéaire (linS1368) ont été séparés avec succès par HILIC, identifiés en ligne par ESI-MS et leur teneur en U a été déterminée simultanément et en ligne par ICP-MS, en appliquant la méthode de quantification dédiée par étalonnage externe développée dans ce travail. Le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ est élué sur une phase stationnaire de silice hybride chargée négativement avec une préservation de la quasi-totalité (93-95%) du complexe, ce qui a été également observé avec une colonne diol neutre. Finalement, la détermination de la distribution quantitative de l' UO_2^{2+} parmi les deux peptides de structures différentes a permis d'évaluer l'effet de la structure sur l'affinité pour l' UO_2^{2+} . La structure cyclique confère une plus grande stabilité aux complexes d' UO_2^{2+} que la structure linéaire, en accord avec les résultats obtenus par les techniques classiques de chimie en solution. La constante de stabilité du complexe $\text{UO}_2(\text{linS1368})$ a été estimée à partir de celle du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et est du même ordre de grandeur que celle du complexe $\text{UO}_2(\text{pS18})$. Ces résultats indiquent que la structure du peptide est un élément important à prendre en compte dans la mise au point de peptides biomimétiques et présente un impact aussi important que son degré de phosphorylation sur la complexation de l' UO_2^{2+} .

Conclusion

Les résultats obtenus dans cette partie reposent sur la mise au point d'une méthode de quantification dédiée afin de séparer des complexes d' UO_2^{2+} formés avec des peptides multiphosphorylés, les caractériser et quantifier en ligne leur teneur en U et ce en une seule étape. Ainsi, par la mise en œuvre du couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS, la distribution quantitative de l'U parmi les différentes espèces issues de la séparation a été ainsi déterminée et a permis d'en déduire une échelle d'affinité des peptides multiphosphorylés cycliques pour l' UO_2^{2+} et d'évaluer l'effet de la structure du peptide sur son affinité pour cet élément. Nous avons mis au point les premières séparations de complexes d' UO_2^{2+} par HILIC jamais décrites dans la littérature, pour des complexes de constantes de stabilité supérieures ou égales à 10^{10} à pH 7,4. Les différentes natures de phases stationnaires polaires disponibles pour le mode HILIC ont permis de sélectionner la plus adaptée à la nature des complexes mis en jeu. Ainsi, trois colonnes HILIC à phases stationnaires amide, diol et silice hybride ont été employées pour séparer différents complexes peptidiques d' UO_2^{2+} . Des séparations de complexes de structure très proche contenant des isomères de position ou des peptides linéaires et cycliques de même séquence ont été réalisées avec succès. L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie est en accord avec ceux obtenus en séquentiel par les techniques classiques de chimie en solution et ont confirmé que le peptide tétraphosphorylé cyclique pS1368 présente l'affinité la plus importante vis-à-vis de l' UO_2^{2+} par rapport aux peptides ayant un degré de phosphorylation moins important. Par ailleurs, l'importance de la structure du peptide et de sa préorganisation lors de la complexation de l' UO_2^{2+} a été mise en évidence, en cohérence avec les effets primordiaux de structure ayant lieu dans les métalloprotéines.

Chapitre V : Evaluation de la
sélectivité du peptide cyclique
tétraphosphorylé vis-à-vis de
l' UO_2^{2+} en présence d'ions
compétiteurs endogènes (Ca^{2+} ,
 Cu^{2+} , Zn^{2+})

Introduction

Le peptide cyclique tétraphosphorylé (pS1368), qui montre une affinité pour l'UO₂²⁺ similaire à celle de l'ostéopontine (OPN), a été proposé comme représentatif des sites de coordination hyperphosphorylés de l'UO₂²⁺ dans cette protéine [9]. Cette forte affinité le positionne également comme candidat potentiel en tant qu'agent décorporant pour la chélation de l'UO₂²⁺ *in vivo*. Afin de valider ces suggestions, la sélectivité de ce peptide vis-à-vis de l'UO₂²⁺ en présence de cations compétiteurs endogènes tels que le calcium (Ca²⁺), le zinc (Zn²⁺) et le cuivre (Cu²⁺) doit être déterminée. La connaissance de ce paramètre est nécessaire pour s'assurer que pS1368 se lie sélectivement à l'UO₂²⁺, dans les milieux biologiques qui contiennent des concentrations significatives en métaux compétiteurs.

L'OPN se lie principalement au Ca²⁺ pour assurer sa fonction biologique. Des études menées sur l'OPN et son homologue non phosphorylé par titrage calorimétrique isotherme (ITC) ont montré que cette protéine pouvait se lier à 10 cations Ca²⁺ *via* les groupements carboxylates des résidus Asp et Glu et ce, indépendamment de son degré de phosphorylation [198]. Connaître la sélectivité de pS1368 vis-à-vis de l'UO₂²⁺ en présence du Ca²⁺ est donc une première étape indispensable. Dans la littérature, la compétition entre Ca²⁺ et UO₂²⁺ pour la complexation de pS1368 a été évaluée par suivi de la fluorescence du résidu tryptophane présent dans la séquence dans le peptide [9,71] (Figure 64).

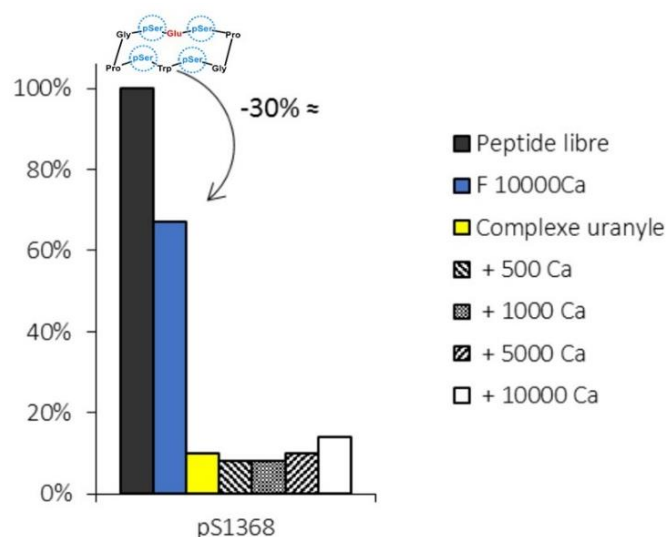


Figure 64: Suivi de la fluorescence de pS1368 en présence de 10000 équivalents de Ca²⁺ et du complexe UO₂(pS1368) suite à l'addition de 500 à 10000 équivalents de Ca²⁺. L'échantillon contient 20 μmol L⁻¹ d'UO₂²⁺ et/ou 10 μmol L⁻¹ de pS1368 en milieu HEPES (20 mmol L⁻¹), NaCl (0.1 mol L⁻¹) à pH 7,4.

L'addition de 10000 équivalents de Ca²⁺ par rapport à pS1368 provoque une extinction de fluorescence de 30%, due au changement d'environnement de la chaîne latérale du tryptophane suite à la formation d'un complexe Ca(pS1368). Une évaluation directe de la sélectivité de pS1368 vis-à-vis de l'UO₂²⁺ en présence du Ca²⁺ n'a donc pas pu être réalisée car la fluorescence du tryptophane est affectée à la fois par UO₂²⁺ et Ca²⁺. De plus, des complexes mixtes UO₂(Ca)(pS1368) peuvent également être formés et

interfèrent avec le complexe d'intérêt $\text{UO}_2(\text{pS1368})$. Par conséquent, la complexation de Ca^{2+} par pS1368 a été étudiée indépendamment par fluorescence. Il ressort que l'affinité de pS1368 pour le Ca^{2+} est nettement plus faible que pour l' UO_2^{2+} , avec $\log K^{\text{pH } 7,4}(\text{Ca}(\text{pS1368})) = 10^2$, moins importante de 9 ordres de grandeurs que $\log K^{\text{pH } 7,4}(\text{UO}_2(\text{pS1368})) = 11,3$. En revanche, la sélectivité de ce peptide vis-à-vis de l' UO_2^{2+} en présence des ions endogènes Cu^{2+} et Zn^{2+} n'est pas connue.

Dans ce chapitre, la méthodologie développée dans le chapitre précédent, basée sur la mise en œuvre du couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS a été appliquée pour évaluer la sélectivité du peptide pS1368 vis-à-vis de l' UO_2^{2+} en présence des métaux endogènes Ca^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} et ce, en une analyse unique. Les conditions de séparation par HILIC des différents complexes formés entre ces ions métalliques et pS1368 ont tout d'abord été mises au point. La sélectivité du peptide pS1368 vis-à-vis de l' UO_2^{2+} en présence du Sr^{2+} , sélectionné comme homologue du Ca^{2+} , a ensuite été évaluée. Les différents complexes préalablement séparés et identifiés en ligne par ESI-MS, ont été quantifiés simultanément par ICP-MS. Enfin, la même démarche a été entreprise pour déterminer la sélectivité de pS1368 vis-à-vis de l' UO_2^{2+} en présence des ions Sr^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} dans un échantillon modèle contenant un mélange équimolaire d' UO_2^{2+} et de ces ions compétiteurs.

1. Sélection du Sr²⁺ comme modèle représentatif du Ca²⁺

Comme précisé dans le chapitre 2, les interférences isobariques, résultant de la présence d'un élément de même masse que l'analyte d'intérêt, pénalisent les analyses par ICP-MS. L'analyse de ⁴⁰Ca par un instrument muni d'un simple quadripôle comme celui employé dans ce travail, est difficile en raison des interférences isobariques avec l'Argon (⁴⁰Ar), utilisé comme gaz plasmagène et de nébulisation. Il est donc plus simple de substituer le ⁴⁰Ca par un homologue de masse différente plus facilement analysable par ce type d'ICP-MS. Cet homologue doit présenter des propriétés de coordination similaires à celles du Ca²⁺ en termes de nombre de coordination, de charge et de rayon ionique, afin de mimer d'une façon pertinente le comportement du Ca²⁺ vis-à-vis du peptide pS1368.

Le strontium (Sr) est situé dans le même groupe II du tableau périodique que le calcium et est également un cation divalent (Figure 65).

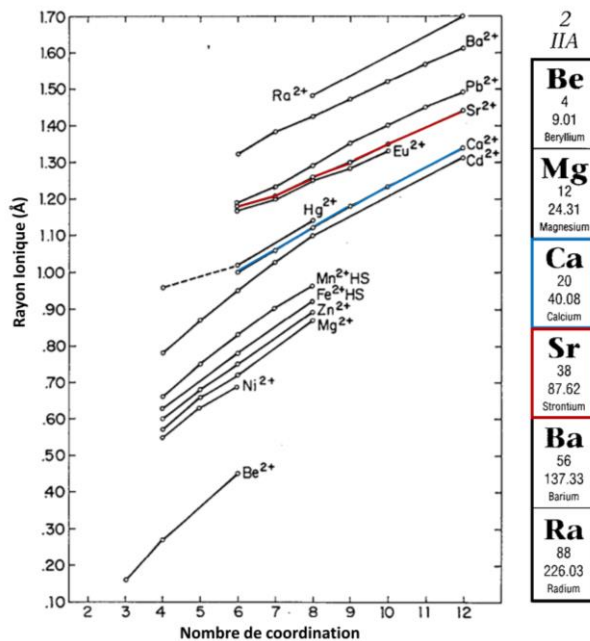


Figure 65: Rayons ioniques de cations divalents en fonction de leur nombre de coordination. Ca²⁺ et Sr²⁺ surlignés en bleu et en rouge respectivement. Adapté de [199].

Le Ca²⁺ et le Sr²⁺ ont les mêmes nombres de coordination et des rayons ioniques proches [199]. A titre d'exemple, pour un nombre de coordination de 6, les rayons ioniques du Ca²⁺ et du Sr²⁺ sont respectivement de 1,00 Å et de 1,13 Å. De plus, ces deux cations présentent des comportements très similaires en milieux biologiques humains [200,201]. Ils sont absorbés au niveau de l'intestin selon le même mécanisme, stockés et concentrés dans les os et principalement éliminés par les urines [200]. Le Sr²⁺ est incorporé dans les os par substitution du Ca²⁺ dans l'hydroxyapatite [201]. En raison de toutes ces caractéristiques, le Sr²⁺ a été choisi comme cation modèle représentatif du Ca²⁺ dans notre étude.

2. Identification des complexes métaux-peptides par ESI-MS

Les spectres de masse des cations en milieu non complexant (Figure 66) et de chaque complexe $\text{M}(\text{pS1368})$ avec $\text{M} = \text{Sr}^{2+}$, Cu^{2+} et Zn^{2+} (Figure 67) ont été enregistrés en mode d'acquisition balayage complet. L'échantillon a été introduit en continu dans le spectromètre de masse. La procédure de préparation de ces échantillons est présentée dans l'annexe I.

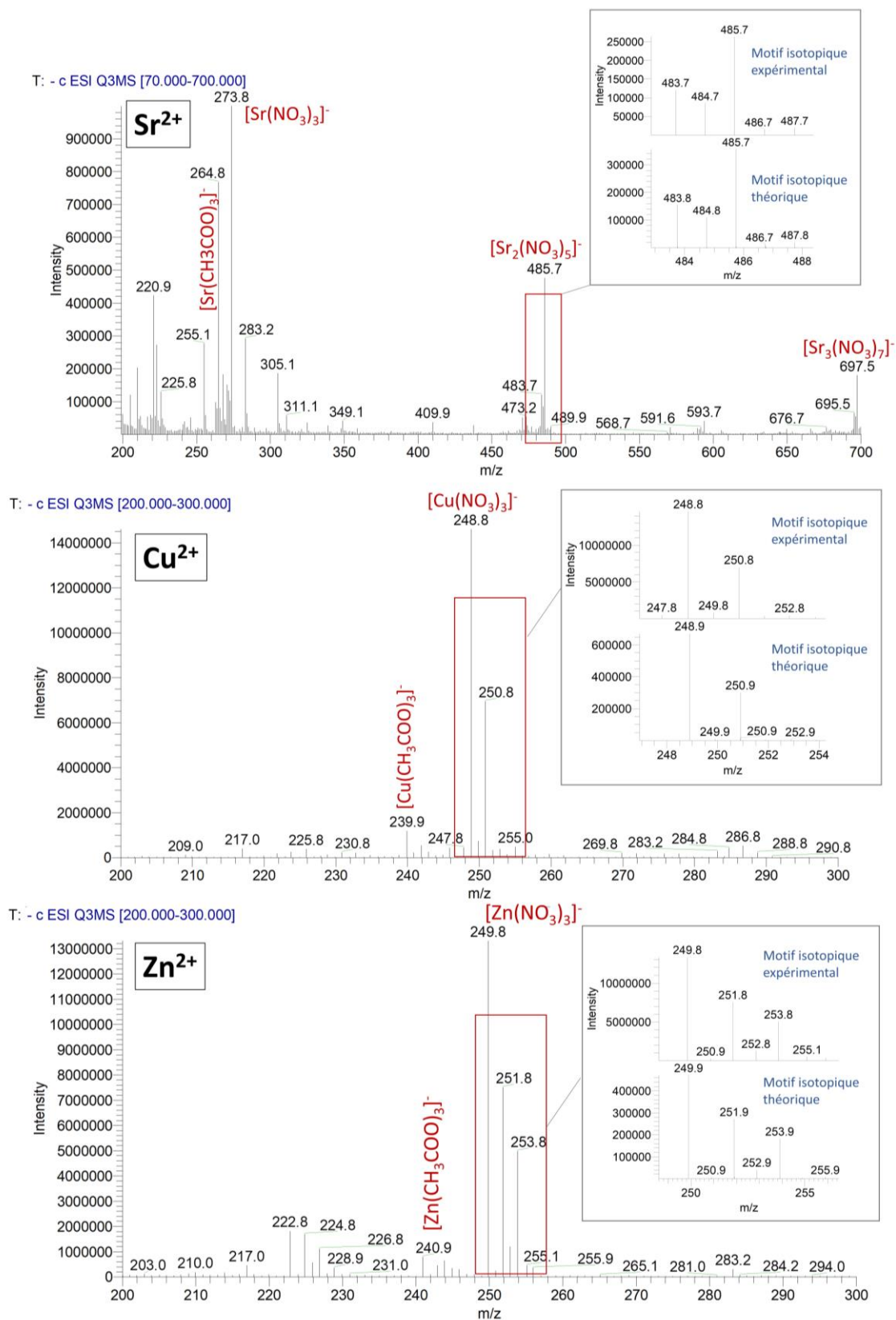


Figure 66 : Spectres de masse du Sr^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} en milieu non complexant enregistrés en mode d'acquisition balayage complet. Gamme de masse comprise entre 70 et 700 pour Sr^{2+} et 200 et 300 pour Cu^{2+} et Zn^{2+} . Echantillon $[\text{M}] = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, préparé par dilution d'une solution intermédiaire dans 70/30 ACN/ H_2O + 20 mmol $\text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Débit d'introduction $10 \mu\text{L min}^{-1}$.

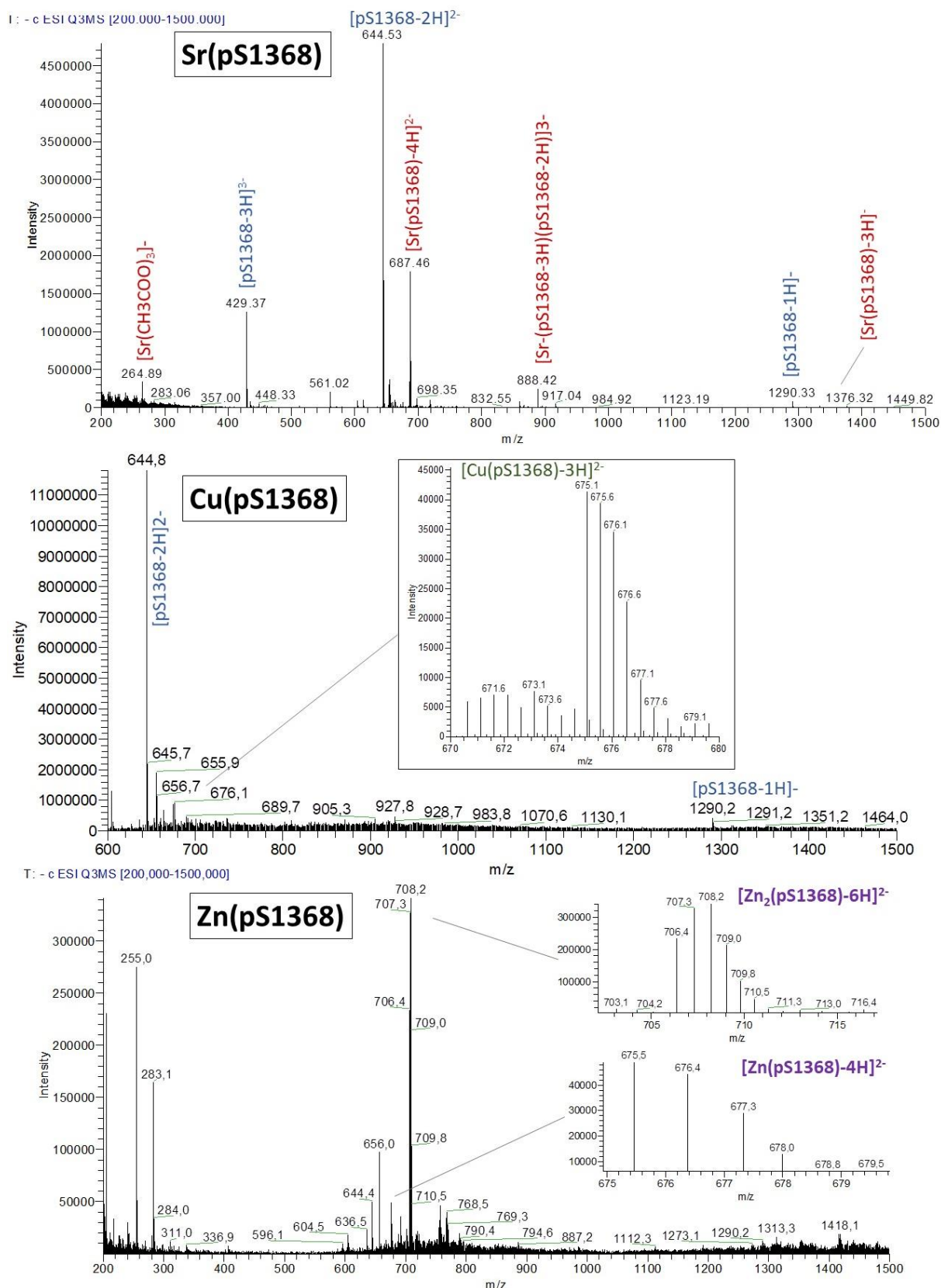


Figure 67 : Spectres de masse des complexes Sr(pS1368), Cu(pS1368) et Zn(pS1368) enregistrés en mode d'acquisition balayage complet. Gammes de masse : 200-1500 pour Sr(pS1368) et Zn(pS1368) et 600-1500 pour Cu(pS1368). Echantillon [M] = 10^{-4} mol L⁻¹ préparé par dilution d'une solution contact dans 70/30 ACN/H₂O + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO. Débit d'introduction 10 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Les principales espèces identifiées sont recensées dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Récapitulatif des espèces M(pS1368) identifiées par ESI-MS, avec M = Sr²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺

Echantillon	m/z	Attribution
Sr ²⁺ dans la phase mobile	264,8	[Sr(CH ₃ COO) ₃] ⁻
	273,8	[Sr(NO ₃) ₃] ⁻
	485,7	[Sr ₂ (NO ₃) ₅] ⁻
	697,5	[Sr ₃ (NO ₃) ₇] ⁻
Sr ²⁺ en présence de 2 équivalents de pS1368	687,5	[Sr(pS1368)-4H] ²⁻
	888,4	[Sr(pS1368) ₂ -5H] ³⁻
	1333,4	[Sr(pS1368) ₂ -4H] ²⁻
	1376,3	[Sr(pS1368)-3H] ⁻
Cu ²⁺ dans la phase mobile	239,9	[Cu(CH ₃ COO) ₃] ⁻
	248,8	[Cu(NO ₃) ₃] ⁻
Cu ²⁺ en présence de 2 équivalents de pS1368	675,1	[Cu(pS1368)-3H] ²⁻
Zn ²⁺ dans la phase mobile	240,9	[Zn(CH ₃ COO) ₃] ⁻
	249,8	[Zn(NO ₃) ₃] ⁻
Zn en présence de 2 équivalents de pS1368	675,6	[Zn(pS1368)-4H] ²⁻
	708,5	[Zn ₂ (pS1368)-6H] ²⁻

L'ensemble des données indique que le Sr²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ forment principalement des complexes de stœchiométries 1-3 avec NO₃⁻ et CH₃COO⁻, comme précédemment observé pour l'UO₂²⁺. Ces ligands sont issus du milieu de préparation des solutions stocks et intermédiaires, à savoir HNO₃ 2% et NH₄CH₃COO 20 mmol L⁻¹ (voir annexe I). En présence du peptide pS1368, les trois métaux forment des complexes M(pS1368) de stœchiométrie 1-1. La stœchiométrie 1-2 a également été observée pour les complexes de Sr²⁺ et les complexes de Zn²⁺ sont majoritairement de stœchiométrie 2-1. La différence des stœchiométries des complexes formés avec Zn²⁺ et Sr²⁺ et leurs abondances relatives par rapport à la fraction libre du peptide permettent de suggérer à priori que le Sr²⁺ et le Zn²⁺ sont des compétiteurs plus puissants que le Cu²⁺ vis-à-vis de l'UO₂²⁺ pour la complexation de pS1368.

3. Evaluation de l'effet compétiteur du Sr²⁺ et de l'UO₂²⁺ vis-à-vis de la complexation de pS1368

La démarche développée dans le chapitre précédent a été entreprise pour évaluer la sélectivité de pS1368 pour l'UO₂²⁺ en présence de Sr²⁺. Une concentration fixe d'UO₂²⁺ a été mise en présence de deux équivalents de pS1368 et d'un nombre croissant d'équivalents de Sr²⁺. Dans un premier temps, la teneur totale en UO₂²⁺ et Sr²⁺ a été mesurée par étalonnage externe par ICP-MS sur la base d'un étalonnage externe, en introduisant les échantillons en mode FIA (Flow Injection Analysis). La méthode de quantification en ligne par HILIC-ESI-MS/ICP-MS a ensuite été appliquée afin d'identifier par ESI-MS les complexes de Sr²⁺ et d'UO₂²⁺ préalablement séparés et de déterminer en ligne par ICP-MS la proportion d'UO₂²⁺ et de Sr²⁺ engagée dans les différents complexes. Ainsi, la variation de la proportion de l'UO₂²⁺ dans le complexe UO₂(pS1368) a été déterminée en fonction du nombre d'équivalents de

Sr²⁺ ajoutés, permettant d'évaluer l'effet compétiteur du Sr²⁺ vis-à-vis de l'UO₂²⁺ pour la complexation de pS1368.

3.1. Mise au point des conditions de séparation des complexes de Sr²⁺ et d'UO₂²⁺

Les conditions chromatographiques employées pour séparer les complexes d'UO₂²⁺ avec les peptides multiphosphorylés, à savoir une colonne à fonction diol et une phase mobile composée de 72/28 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO, ont été testées avec deux échantillons composés d'UO₂²⁺ en présence de deux équivalents de pS1368 d'une part, et de Sr²⁺ en présence de deux équivalents de pS1368 d'autre part. Ainsi, le comportement chromatographique des complexes contenant ces deux éléments a pu être évalué indépendamment, et par extension la faisabilité de leur séparation. Les profils d'élution des complexes obtenus simultanément par ESI-MS et par ICP-MS, en enregistrant les signaux des isotopes les plus abondants de ces deux éléments, soit ²³⁸U et ⁸⁸Sr, sont superposés dans la Figure 68.

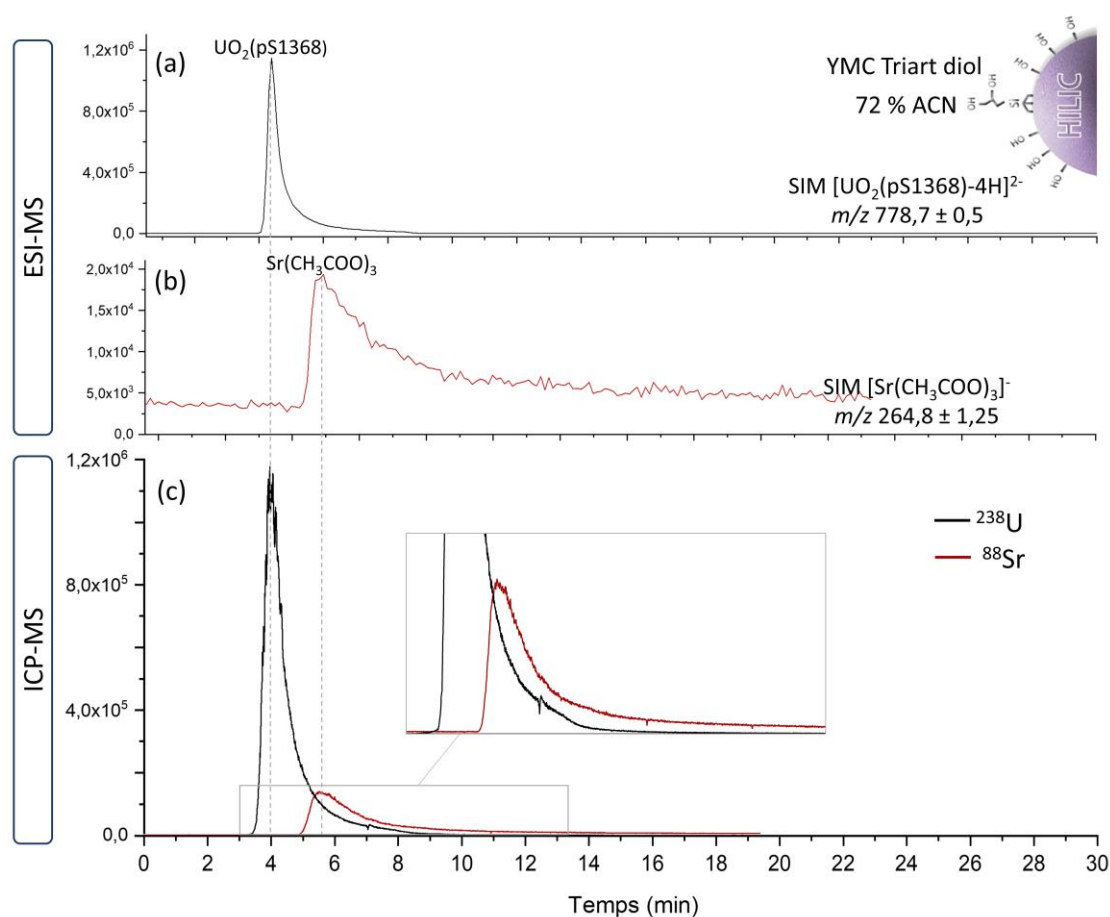


Figure 68 : Superposition des profils d'élution enregistrés par (a-b) ESI-MS en mode SIM, centré sur les rapports m/z caractéristiques des espèces (a) UO₂(pS1368) et (b) Sr(CH₃COO)₃ et par (c) ICP-MS en enregistrant le signal de ²³⁸U et de ⁸⁸Sr, avec un temps d'intégration de 90 ms. Colonne YMC Triart diol, 100 x 2 ; 1,9 μm. Phase mobile 72/28 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO, débit 300 μL min⁻¹, V_{inj} = 3 μL. Echantillon 1 : 1UO₂²⁺-2pS1368, échantillon 2 : 1Sr²⁺- 2pS1368 avec [UO₂²⁺] = [Sr²⁺] = 10⁻⁴ mol L⁻¹. Le décalage de t_R entre les chromatogrammes enregistrés par ESI-MS et ICP-MS a été pris en compte et corrigé.

Les pics d' ^{238}U et de ^{88}Sr enregistrés par ICP-MS (Figure 68c) sont élués avec des facteurs de rétention $k' = 4,3$ et $6,6$ respectivement, calculés selon les équations de l'annexe IV. Par comparaison de leurs facteurs de rétention avec ceux obtenus par ESI-MS (Figure 68a et b), ces pics ont pu être respectivement attribués aux complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$. Aucun pic correspondant au complexe $\text{Sr}(\text{pS1368})$ n'a été observé, ce qui permet de suggérer que le Sr^{2+} est majoritairement sous forme d'un complexe d'acétate dans ces conditions, même en présence de deux équivalents de pS1368. Par ailleurs, la différence des facteurs de rétention des complexes de Sr^{2+} et d' UO_2^{2+} permettent de suggérer que ces conditions chromatographiques sont susceptibles de séparer des complexes de ces éléments lorsqu'ils sont en mélange et ont donc été retenues pour la suite.

3.2. Détermination de la distribution quantitative de l' UO_2^{2+} et du Sr^{2+} dans les différents complexes de ces éléments par HILIC-ESI-MS/ICP-MS

3.2.1. Détermination de la concentration totale en UO_2^{2+} et Sr^{2+} dans les échantillons, hors ligne par ICP-MS

Comme mentionné précédemment, la concentration totale d' UO_2^{2+} et de Sr^{2+} dans les échantillons, avant l'étape de séparation, a été mesurée hors ligne par ICP-MS par étalonnage externe en introduisant les échantillons en mode d'injection FIA. Les étapes de préparation des différents échantillons contenant des proportions $\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + x\text{Sr}^{2+}$ et les concentrations finales visées en UO_2^{2+} , pS1368 et Sr^{2+} sont présentées dans la Figure 69 et détaillé dans l'annexe I.

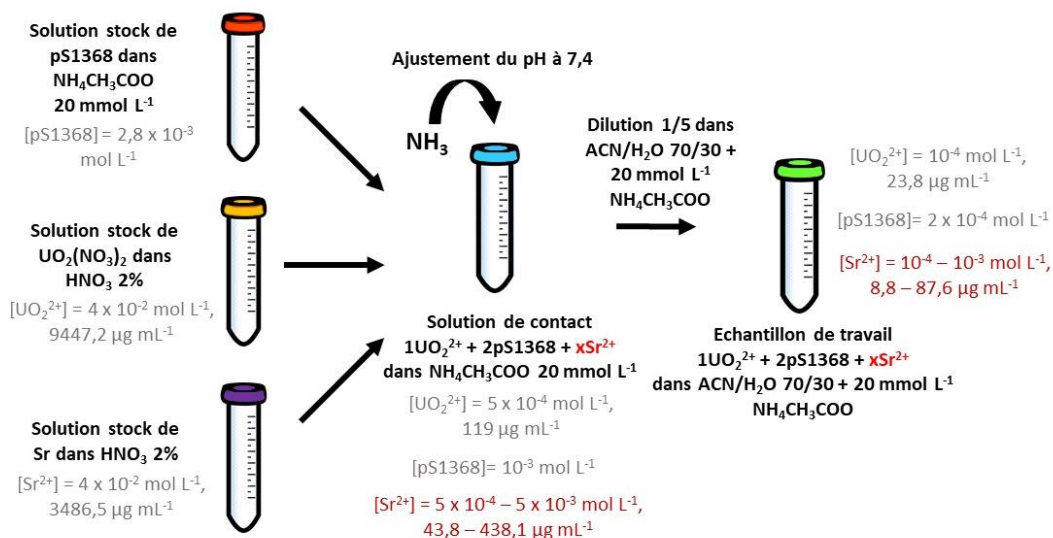


Figure 69: Procédure de préparation des échantillons $\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + x\text{Sr}^{2+}$

Les concentrations visées en Sr^{2+} et en UO_2^{2+} dans les solutions de contact sont détaillées dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Composition des différents échantillons dans lesquels des équivalents croissants de Sr^{2+} ont été ajoutés à de l' UO_2^{2+} et du pS1368 en concentrations fixes

Proportion $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + \text{xSr}$	$[\text{UO}_2^{2+}]$		$[\text{pS1368}]$	$[\text{Sr}^{2+}]$	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	mol L^{-1}	mol L^{-1}	$\mu\text{g mL}^{-1}$	mol L^{-1}
$1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 0\text{Sr}$	119	5×10^{-4}	1×10^{-3}	0	0
$1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 1\text{Sr}$	119	5×10^{-4}	1×10^{-3}	43,8	5×10^{-4}
$1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 2\text{Sr}$	119	5×10^{-4}	1×10^{-3}	87,6	1×10^{-3}
$1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 5\text{Sr}$	119	5×10^{-4}	1×10^{-3}	219,1	$2,5 \times 10^{-3}$
$1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 10\text{Sr}$	119	5×10^{-4}	1×10^{-3}	438,1	5×10^{-3}

L'échantillon avec les proportions $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 5\text{Sr}$ contient une concentration en Sr^{2+} qui simule celle du Ca^{2+} dans les fluides biologiques, comprise entre $2,2$ et $2,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ [198].

Les gammes de concentrations des solutions étalons sont comprises entre 6 et $42 \mu\text{g mL}^{-1}$ pour l' UO_2^{2+} et entre 6 et $92 \mu\text{g mL}^{-1}$ pour le Sr^{2+} , de façon à couvrir les concentrations ciblées dans les échantillons (Figure 69). Le peptide pS1368 a été ajouté aux solutions étalons de Sr^{2+} et UO_2^{2+} pour éviter l'hydrolyse de l' UO_2^{2+} et obtenir une matrice identique à celle des échantillons de travail (voir annexe I). Le Bismuth (^{209}Bi) et l'Yttrium (^{89}Y) ont été ajoutés dans la solution acide employée pour compenser le débit introduit en ICP-MS, afin de contrôler les éventuelles variations du signal de ^{238}U et de ^{88}Sr . Les signaux transitoires correspondant aux solutions étalons en enregistrant le signal des isotopes ^{238}U et ^{88}Sr sont présentés dans la Figure 70.

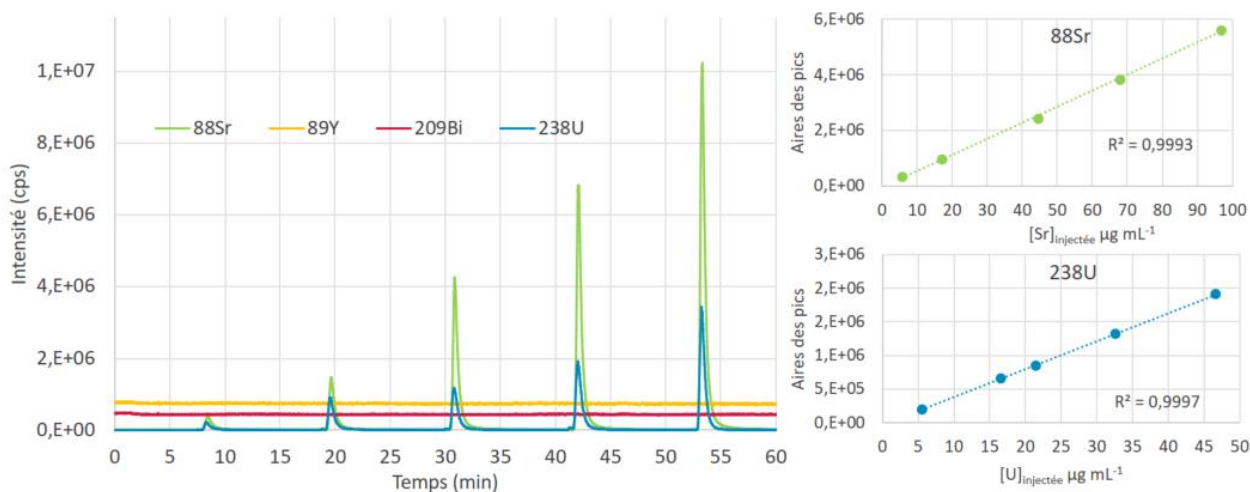


Figure 70: A gauche, les signaux transitoires des solutions d'étalons d'U et de Sr auxquelles a été ajouté pS1368. Les signaux stationnaires en rouge et jaune correspondent au ^{209}Bi et ^{89}Y à 10 ng mL^{-1} utilisés comme étalons internes et introduits en continu. Phase mobile 72/28 ACN/ H_2O v/v + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, débit $300 \mu\text{L min}^{-1}$, $V_{\text{inj}} = 3 \mu\text{L}$. A droite, les droites d'étalonnages correspondant au ^{88}Sr et ^{238}U .

Une bonne linéarité a été obtenue pour les deux droites d'étalonnage avec des coefficients de corrélation de $0,9993$ pour ^{88}Sr et $0,9997$ pour ^{238}U (Figure 70). La stabilité du signal de ^{209}Bi et de ^{89}Y lors de l'injection des solutions étalons a été évaluée en calculant l'écart type relatif RSD (%) des mesures acquises en continu sur une durée de 60 min . Des valeurs de RSD de 2% ont été obtenues

pour les deux isotopes, montrant une très bonne stabilité du signal au cours de l'analyse. Des droites d'étalonnage ont été établies pour chaque campagne d'expériences.

Les teneurs totales d'U et de Sr dans les différents échantillons mesurées hors ligne par ICP-MS, en duplicat sont rassemblées dans le Tableau 24.

Tableau 24: Concentration totale en U et en Sr dans les échantillons déterminée hors ligne en ICP-MS par étalonnage externe et en mode FIA, écart relatif (%) des valeurs obtenues pour deux répliques, concentration de pS1368 mesurée par HILIC-UV et proportions expérimentales $\text{U}+2\text{pS1368} + \text{xSr}$

UO ₂ ²⁺ + 2 pS1368 +xSr	[U] _t		[U] _t		Ecart relatif	[pS1368]	[Sr] _t		[Sr] _t		Ecart relatif	UO ₂ ²⁺ + 2pS1368 +xSr
	μg mL ⁻¹		mol L ⁻¹				μg mL ⁻¹		mol L ⁻¹			
	1	2	1	2			%	mol L ⁻¹	1	2		
1+2 + 0	27,3	27,2	1,1x10 ⁻⁴	1,1x10 ⁻⁴	0,4	1,8x10 ⁻⁴	0,0	0,0	0	0	0,0	1+1,6 + 0
1+2 + 1	16,4	16,7	6,9x10 ⁻⁵	7,0x10 ⁻⁵	1,3	1,6x10 ⁻⁴	5,2	5,3	5,9x10 ⁻⁵	6,0 x10 ⁻⁵	1,8	1+2,4 + 0,9
1+2 + 2	24,6	24,0	1,0x10 ⁻⁴	1,0x10 ⁻⁴	2,2	2,2x10 ⁻⁴	16,3	16,4	1,9 x10 ⁻⁴	1,9 x10 ⁻⁴	0,2	1+2,1 + 1,8
1+2 + 5	23,2	22,1	9,7x10 ⁻⁵	9,3x10 ⁻⁵	4,6	2,0x10 ⁻⁴	40,6	40,2	4,6 x10 ⁻⁴	4,6 x10 ⁻⁴	1,1	1+2 + 4,7
1+2 + 10	18,6	18,8	7,8x10 ⁻⁵	7,9x10 ⁻⁵	1,2	1,9x10 ⁻⁴	55,0	54,9	6,3x10 ⁻⁴	6,2 x10 ⁻⁴	0,1	1+2,5 + 8

L'écart relatif entre les concentrations mesurées pour chaque réplique est compris entre 0,4 et 4,6% pour l'²³⁸U et entre 0,1 et 1,8 % pour le ⁸⁸Sr, et est considéré comme acceptable (inférieurs à 15 %).

3.2.2. Séparation et caractérisation des complexes d' UO_2^{2+} et de Sr^{2+} par HILIC-ESI-MS/ICP-MS

La séparation des complexes d' UO_2^{2+} et de Sr^{2+} a été également réalisée en duplicat pour chaque échantillon. Les chromatogrammes obtenus en ligne simultanément par ESI-MS et ICP-MS sont présentés dans la Figure 71.

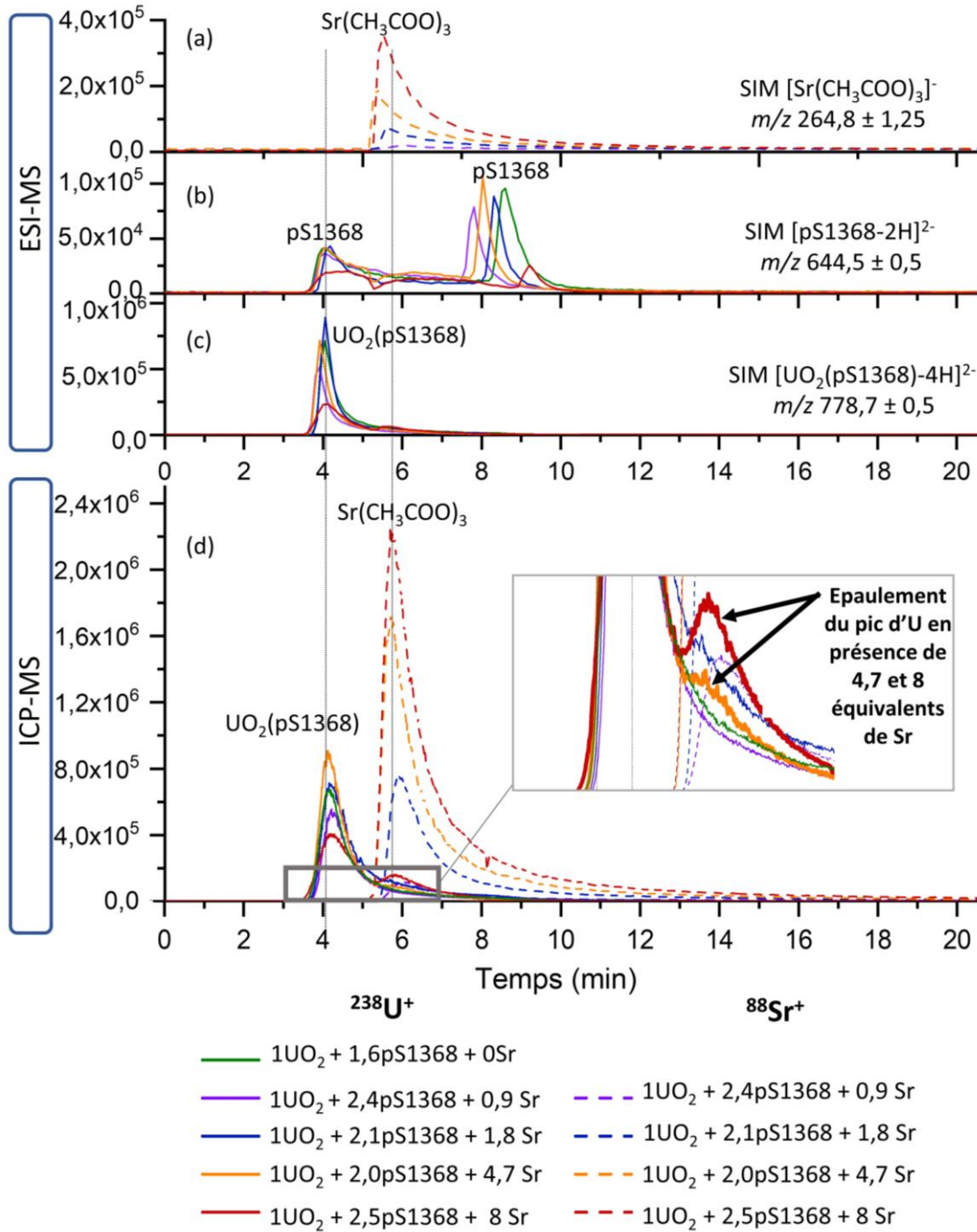


Figure 71 : Chromatogrammes acquis par (a-c) ESI-MS en mode SIM, centré sur les rapports m/z des ions caractéristiques de (a) complexe $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$, (b) de la fraction libre du peptide pS1368, (c) du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et par (d) ICP-MS en enregistrant le signal de ^{238}U (trait plein) et du ^{88}Sr (trait pointillé) avec un temps d'intégration de 90 ms. Colonne YMC Triart Diol 100 x 2 mm ; 1,9 μm . Phase mobile : 72/28 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, débit 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, V_{inj} = 3 μL . Le décalage de t_R entre les chromatogrammes enregistrés en ESI-MS et ICP-MS a été pris en compte et corrigé.

Les pics d' ^{238}U et de ^{88}Sr enregistrés par ICP-MS (Figure 71d) sont élués avec des facteurs de rétention $k' = 4,3$ et $6,6$ respectivement. Par comparaison de ces facteurs de rétention avec ceux obtenus par ESI-MS, ces pics ont pu être respectivement attribués aux complexes $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ (Figure 71a et c). Aucun pic correspondant au complexe $\text{Sr}(\text{pS1368})$ n'a été observé dans les chromatogrammes, montrant que le Sr^{2+} est principalement sous forme d'un complexe d'acétate dans

ces conditions, malgré l'excès de pS1368, dont la fraction libre a été détectée avec un facteur de rétention de l'ordre de 10 (Figure 71b) Lorsque le nombre d'équivalents de Sr^{2+} par rapport à l' UO_2^{2+} est supérieur ou égal à 4,7, un épaulement du pic d'U est observé avec un facteur de rétention $k' = 6,6$, identique à celui du complexe $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ (Figure 71d). Cette observation nous permet de suggérer la formation d'un complexe ternaire $\text{UO}_2(\text{Sr})(\text{pS1368})$, qui peut s'expliquer par la capacité du peptide à piéger les ions UO_2^{2+} et Sr^{2+} grâce à des phosphates pontants [9]. Afin de vérifier cette hypothèse, un filtre de masse supplémentaire centré sur le rapport m/z théorique du complexe ternaire $\text{UO}_2(\text{Sr})(\text{pS1368})$ a été appliqué lors des acquisitions par ESI-MS en mode SIM, pour l'échantillon contenant $1\text{UO}_2 + 2\text{pS1368} + 8\text{Sr}$. Les chromatogrammes enregistrés simultanément par ESI-MS et par ICP-MS sont présentés dans la Figure 72.

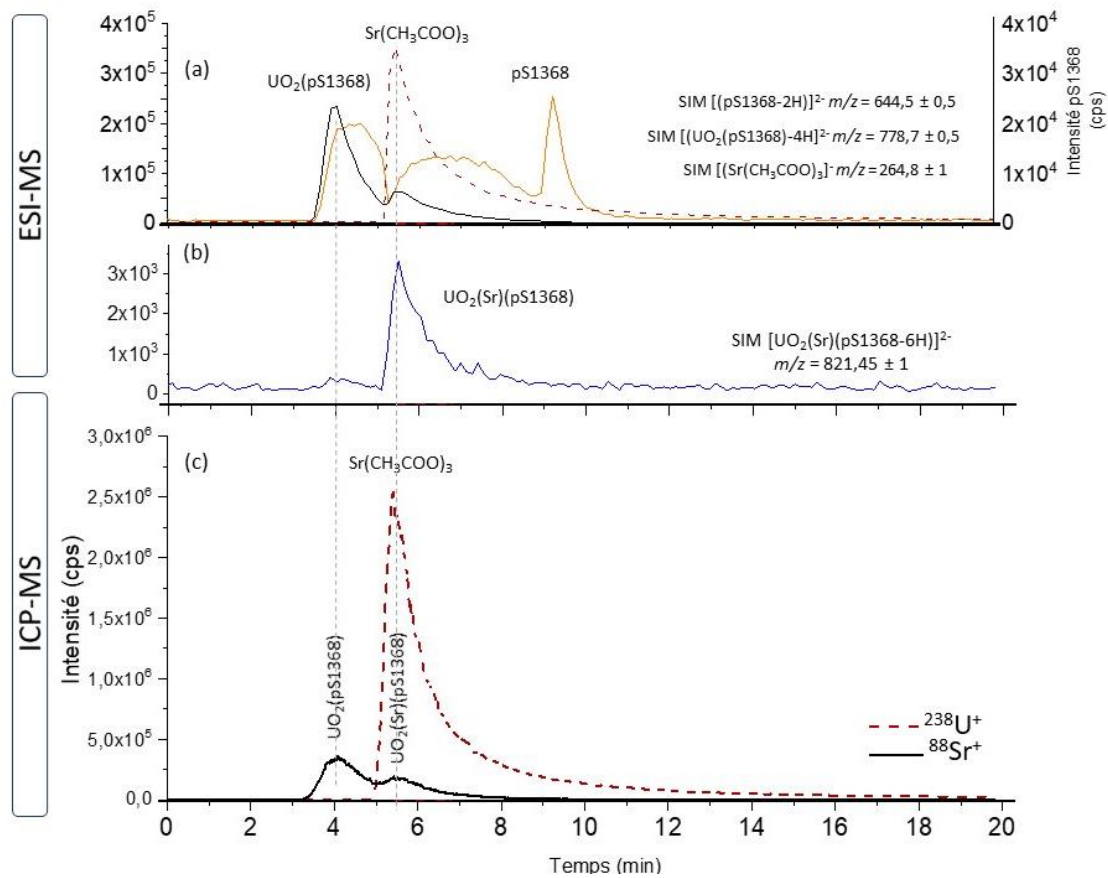


Figure 72: Chromatogrammes enregistrés par (a-b) ESI-MS en mode d'acquisition SIM, centré sur les rapports m/z des espèces (a) $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ en noir, $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ en rouge et pS1368 en orange pointillé, (b) $\text{UO}_2(\text{Sr})(\text{pS1368})$ et par (c) ICP-MS en suivant simultanément les signaux des isotopes ^{238}U et ^{88}Sr . Le décalage de t_R entre les chromatogrammes enregistrés en ESI-MS et ICP-MS a été pris en compte et corrigé

D'après la Figure 72, et par comparaison avec les facteurs de rétention des pics obtenus par ESI-MS, l'épaulement du pic d'U observé en ICP-MS, correspond bien au complexe ternaire $\text{UO}_2(\text{Sr})(\text{pS1368})$ (Figure 72b). Ces résultats montrent que l'addition d'un excès de Sr^{2+} , jusqu'à huit équivalents par rapport à UO_2^{2+} , ne déplace pas ce dernier du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, et conduit à la formation d'un complexe ternaire $\text{UO}_2(\text{Sr})(\text{pS1368})$. Cette observation est en accord avec les données de la littérature

qui reportent la formation de complexes ternaires d'UO₂²⁺, notamment UO₂(Ca)(CO₃)[202] et UO₂(protéine)(CO₃), les protéines étant à titre d'exemple la transferrine et l'albumine [52].

Comme le montrent les Figure 71d et c, la séparation des complexes UO₂(pS1368) et UO₂(Sr)(pS1368) est faiblement résolutive, s'agissant d'un épaulement. Plusieurs tentatives ont été réalisées afin de déconvoluer le profil de ²³⁸U dans le but de déterminer la proportion d'UO₂²⁺ engagée dans chacun de ces complexes mais n'ont pas abouti à des résultats satisfaisants (Voir annexe VI). Ainsi, la proportion de l'UO₂²⁺ et du Sr²⁺ engagés dans les différentes espèces a été déterminée en appliquant l'équation 3.

$$\% U_x = \frac{[U_x]}{[U]_{\text{total}}} \quad (\text{Équation 3})$$

Les proportions déterminées pour les échantillons contenant 4,7 et 8 équivalents de Sr²⁺ incluent celle du complexe ternaire, ce qui signifie qu'elles sont légèrement surestimées pour ces deux échantillons. Ces valeurs ont été comparées avec la proportion de l'UO₂²⁺ impliquée dans la complexation avec pS1368 dans le complexe témoin UO₂(pS1368), afin de déterminer la variation de la proportion de l'UO₂²⁺ dans ce complexe en fonction du nombre d'équivalents de Sr²⁺ ajouté. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 73.

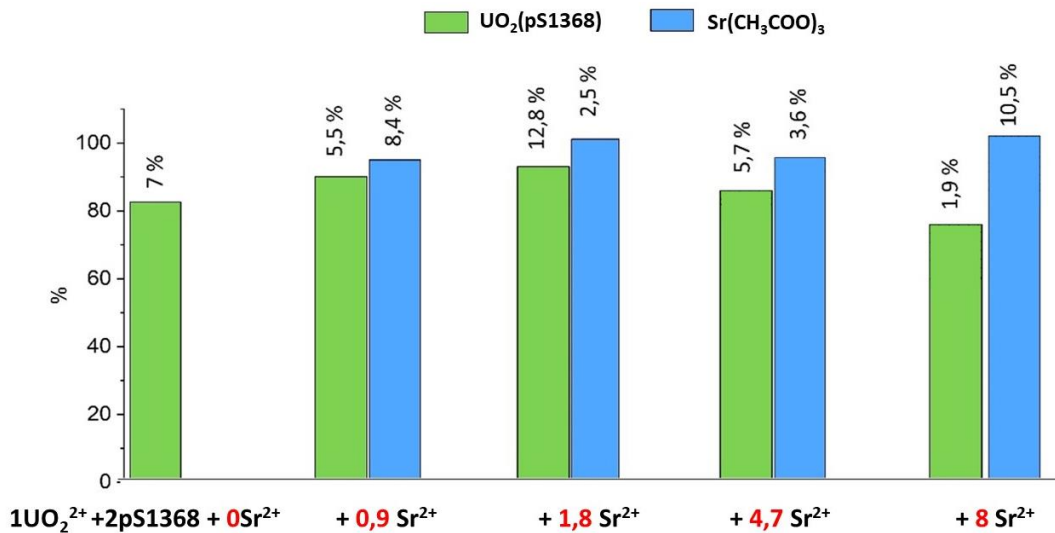


Figure 73 : Proportions d'UO₂²⁺ et de Sr²⁺ engagées dans les espèces UO₂(pS1368), Sr(CH₃COO)₃ et UO₂(Sr)(pS1368) pour les différents échantillons 1UO₂²⁺ + 2pS1368 + xSr²⁺, avec x = 0-8. L'écart relatif entre les proportions d'espèces d'UO₂²⁺ et de Sr²⁺ déterminées pour chaque réplique est indiqué verticalement.

D'après la Figure 73, quel que soit le nombre d'équivalents de Sr, au minimum 80% de l'UO₂²⁺ reste lié au peptide pS1368. D'autre part, la fraction résiduelle d'UO₂²⁺ adsorbée à la surface de la phase stationnaire a été récupérée par une série d'injections de pS1368 comme décrit précédemment mais n'a pas été quantifiée. Par ailleurs, la quasi-totalité du Sr²⁺ (plus de 90%) est sous forme de complexe d'acétate.

L'ensemble de ces résultats permet de déduire que le peptide pS1368 est sélectif vis-à-vis de la complexation de l'UO₂²⁺, même en présence d'un excès de Sr. Ces observations traduisent bien le fait

que la constante de stabilité $K^{\text{pH}7,4}(\text{UO}_2(\text{pS1368})) = 10^{11,3}$ est largement supérieure à $K^{\text{pH}7,4}(\text{Ca}(\text{pS1368})) = 10^2$ [9]. La présence des quatre sites phosphorylés dans le squelette peptidique de pS1368, mimant les sites riches en phosphates de l'OPN, permet bien d'induire une sélectivité pour l' UO_2^{2+} même en présence d'un excès de Sr^{2+} . Par ailleurs, la faible affinité de ce peptide pour le Sr^{2+} est en accord avec les données de la littérature, indiquant que le Ca^{2+} ne se lie pas à l'OPN via ses résidus phosphorylés, mais *via* des résidus Asp et Glu [198]. On peut suggérer que le résidu Glu en position 2 dans pS1368 est potentiellement impliqué dans la formation du complexe ternaire, en plus des résidus pSer. La caractérisation de la sphère de coordination de l' UO_2^{2+} dans ce complexe ternaire s'avérerait intéressante afin de confirmer cette hypothèse.

4. Evaluation de la sélectivité de pS1368 vis-à-vis de l' UO_2^{2+} en présence de Cu^{2+} , Zn^{2+} et Sr^{2+}

La sélectivité de pS1368 pour l' UO_2^{2+} en présence des métaux endogènes Cu^{2+} , Zn^{2+} et Sr^{2+} a été évaluée en appliquant la même démarche que précédemment. Dans ce cas, la simulation de la concentration de Cu^{2+} et Zn^{2+} dans les fluides biologiques est plus délicate que celle du Ca^{2+} . En effet, le Cu^{2+} et Zn^{2+} ont des concentrations respectives de l'ordre de 0,001 et 0,05 10^{-3} mol L^{-1} dans les fluides biologiques [2], à savoir 2500 et 50 fois moins importantes que celle du Ca^{2+} . En raison des dilutions successives imposées par notre méthodologie, un échantillon respectant ces proportions ne permet pas d'atteindre une concentration de ces éléments suffisante pour être détectées par ICP-MS, sachant que leur limite de détection est plus élevée que d'autres éléments. Leur analyse dans ces conditions est donc très difficile. Ainsi, un échantillon modèle, contenant un mélange équimolaire de tous les métaux à une concentration de 10^{-4} mol L^{-1} en présence de deux équivalents de pS1368, a été considéré. La présence de ces éléments en concentrations équimolaires permet d'évaluer l'influence de chacun sur le déplacement potentiel de l' UO_2^{2+} du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$.

La teneur totale des éléments a tout d'abord été mesurée hors ligne par ICP-MS en mode FIA. La méthode de quantification développée avec le couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS a ensuite été appliquée afin d'identifier en ligne les différentes espèces issues de la séparation et de les quantifier simultanément par ICP-MS en suivant le signal de l'isotope le plus abondant de chaque élément, à savoir ^{238}U , ^{88}Sr , ^{63}Cu et ^{64}Zn .

Dans tous les cas, la proportion relative de l' UO_2^{2+} engagée dans le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ par rapport à la quantité d' UO_2^{2+} totale dans l'échantillon, a été déterminée en réalisant un rapport de l'aire du pic de $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ sur celui correspondant à l' UO_2^{2+} total dans l'échantillon. Cette proportion a été comparée à celle de l'échantillon témoin qui ne contient que UO_2^{2+} . La proportion des autres éléments engagée dans les différentes espèces par rapport à leur teneur totale dans l'échantillon a été déterminée de la même manière. Cette démarche permet de quantifier l'impact des métaux Sr^{2+} , Cu^{2+}

et Zn^{2+} sur la proportion d' UO_2^{2+} engagée dans le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et ainsi d'évaluer la sélectivité de pS1368 vis-à-vis de l' UO_2^{2+} en présence de ces métaux compétiteurs.

Dans une première étape, la concentration des de Sr, Cu et Zn dans la solution de contact préparée dans $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 20 mmol L^{-1} a été mesurée hors ligne par ICP-MS pendant 3 jours consécutifs. Dans ces conditions, une précipitation du Cu a été observée, alors que ce n'a pas été le cas pour le Zn et le Sr (voir annexe VII). Par conséquent la concentration en $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ a été augmenté à 60 mmol L^{-1} ce qui a permis de conserver le Cu sous sa forme soluble. Ainsi, la solution de contact a été préparée dans $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 60 mmol L^{-1} et diluée par un facteur 5 dans la phase mobile composée de 70/30 ACN/ H_2O + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ pour obtenir l'échantillon de travail, comme présenté dans la Figure 74.

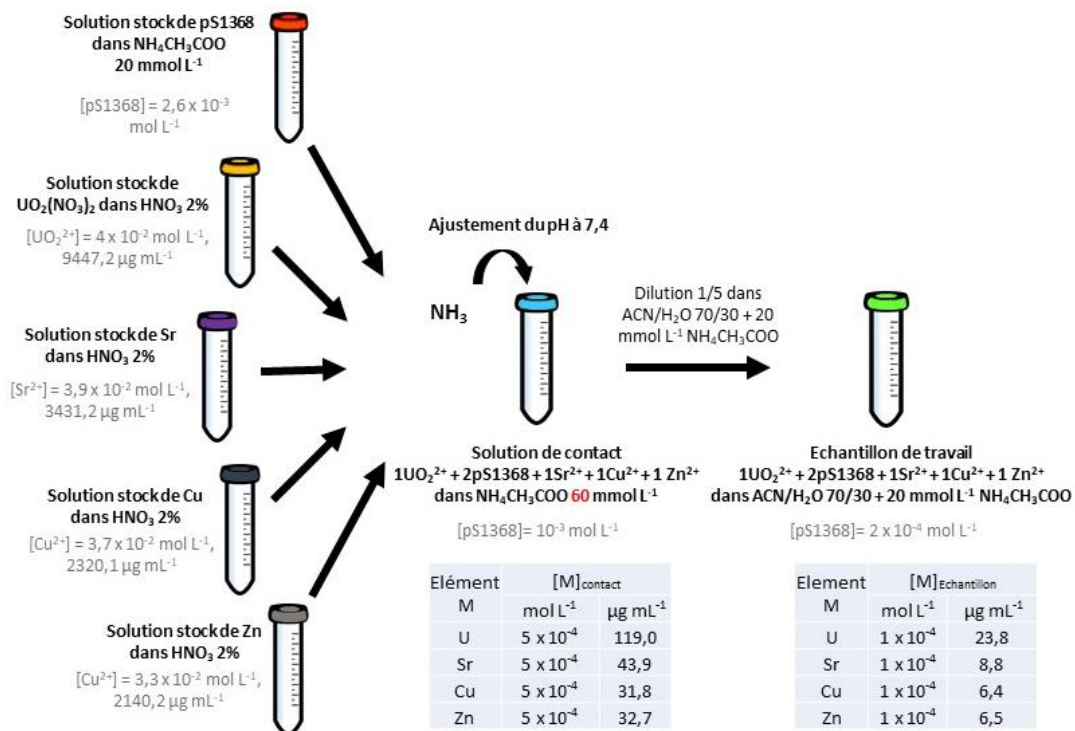


Figure 74 : Procédure de préparation de l'échantillon modèle $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 1\text{Sr}^{2+} + 1\text{Cu}^{2+} + 1\text{Zn}^{2+}$

Les différents complexes contenus dans l'échantillon modèle ont été séparés avec succès dans les conditions chromatographiques sélectionnées précédemment, à savoir la colonne YMC triart diol et une phase mobile composée de 72/28 ACN/ H_2O + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Les séparations ont été réalisées en duplicat. Aucun pic correspondant au Zn n'a été détecté en ICP-MS comme en ESI-MS. Des injections successives d'EDTA dans la colonne ont permis de récupérer la totalité du Zn, montrant qu'il était adsorbé à la surface de la colonne. Ainsi, les chromatogrammes de la séparation des complexes d' UO_2^{2+} , de Cu^{2+} et de Sr^{2+} acquis en ligne et simultanément par ESI-MS et par ICP-MS sont présentés dans la Figure 75.

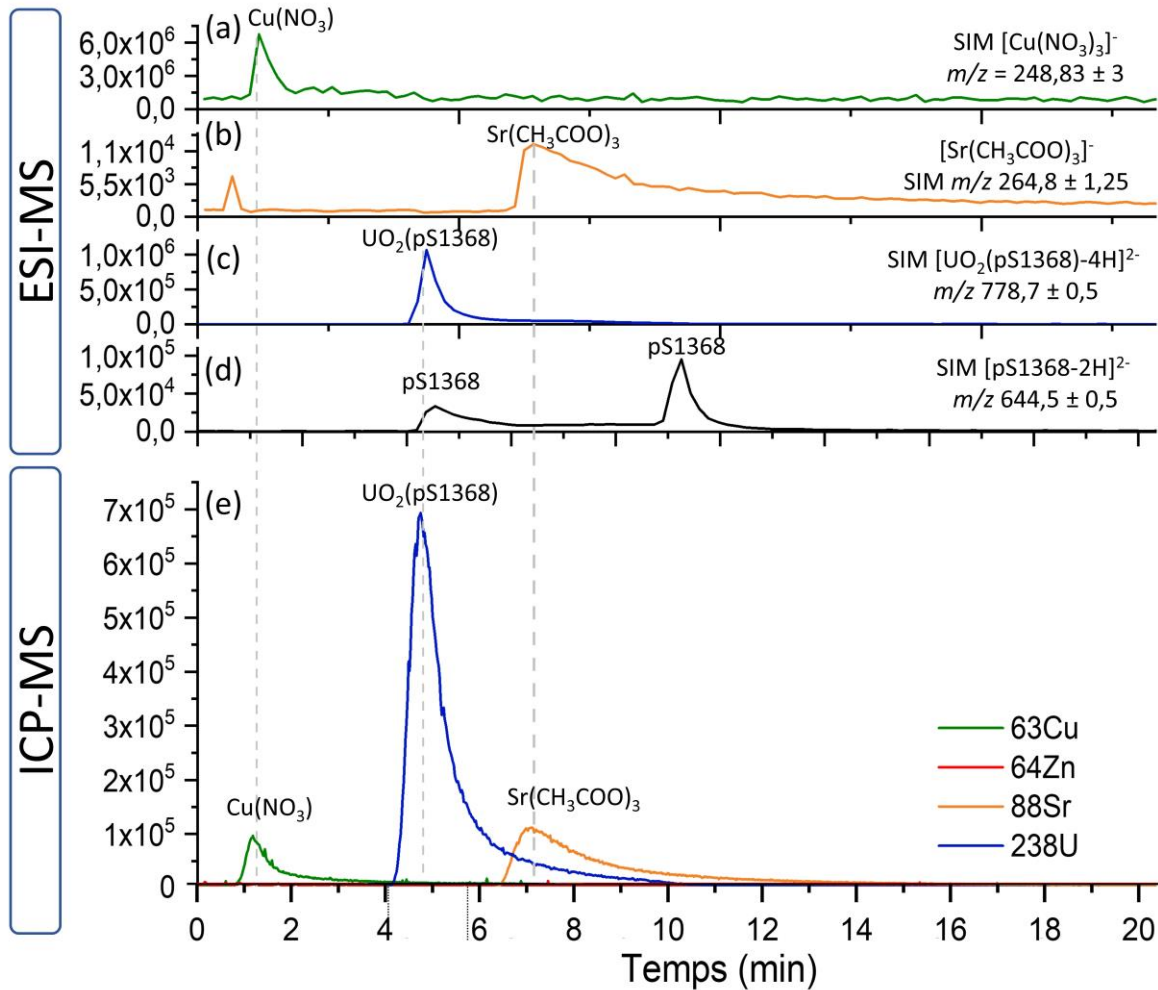


Figure 75 : Chromatogrammes acquis par (a-d) ESI-MS en mode SIM, centré sur les rapports m/z des ions caractéristiques des complexes (a) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_3$, (b) $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$, (c) $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et (d) la fraction libre de pS1368. et (e) superposition des profils d'éluion enregistrés simultanément par ICP-MS en suivant le signal des isotopes ^{238}U , ^{88}Sr , ^{63}Cu et ^{64}Zn avec un temps d'intégration de 90 ms. Echantillon : $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 1\text{Sr}^{2+} + 1\text{Cu}^{2+} + 1\text{Zn}^{2+}$. Colonne YMC Triart Diol 100 x 2 mm ; 1,9 μm . Phase mobile 72/28 ACN/ H_2O v/v + 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, débit 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, $V_{\text{inj}} = 3\mu\text{L}$. Le décalage de t_R entre les chromatogrammes enregistrés en ESI-MS et ICP-MS a été pris en compte et corrigé.

Les pics de ^{63}Cu , ^{238}U et ^{88}Sr sont élués avec des facteurs de retentions $k' = 0,5, 4,8$ et $6,9$ respectivement (Figure 75e). Par comparaison de ces facteurs de rétention avec ceux obtenus par ESI-MS, ces pics ont pu être respectivement attribués aux complexes $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ et/ou $\text{Cu}(\text{NO}_3)_3$, $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ (Figure 75a-c). On peut déduire que les métaux Sr^{2+} et Cu^{2+} sont séparés sous forme de complexes d'acétate et de nitrate dans ces conditions, malgré l'excès de pS1368 (Figure 75d). Par ailleurs, l' UO_2^{2+} est élué sous forme du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ alors que l'espèce dans laquelle le Zn^{2+} n'a pas pu être identifiée en raison de l'adsorption de cet élément sur la colonne.

Finalement, la proportion de U, Sr, Cu, engagée dans chacune des espèces par rapport à leur teneur totale dans l'échantillon a été déterminée. La proportion relative du Zn^{2+} non complexé a été déterminée en réalisant la somme des aires des pics obtenus après éluion avec l'EDTA et en rapportant cette somme à l'aire du pic du Zn total contenu dans l'échantillon. Les proportions de chaque élément engagés dans les différentes espèces par rapport à leur teneur totale dans

l'échantillon, exprimées en pourcent (%) et obtenues pour deux répliques sont présentées dans la Figure 76.

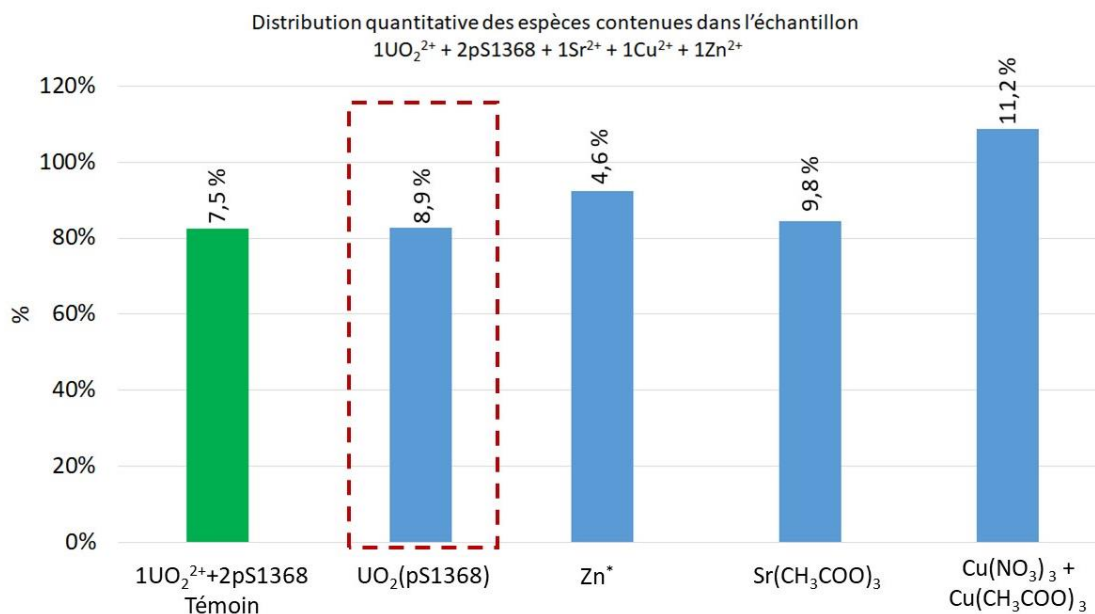


Figure 76: Proportions des éléments E, avec $\text{E} = \text{Zn}^{2+}$, UO_2^{2+} , Sr^{2+} et Cu^{2+} engagés dans les différentes espèces $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, $\text{Sr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ et $\text{Cu}(\text{NO}_3)_3 + \text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ issues de la séparation. *la proportion du Zn est obtenue indirectement après récupération du Zn adsorbé sur la colonne avec de l'EDTA. L'écart relatif entre les proportions d'espèces déterminées pour chaque réplique est indiqué verticalement.

D'après la Figure 76, on constate que plus de 80% de l' UO_2^{2+} est complexé à pS1368 alors que la fraction restante est adsorbée à la surface de la colonne, puisqu'elle a été récupérée en éluant du pS1368. Le Sr^{2+} et le Cu^{2+} sont majoritairement (80-100%) sous forme de complexes d'acétate ou de nitrate. La Figure 76 montre également que la proportion de l' UO_2^{2+} engagée dans le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ dans l'échantillon modèle est identique à celle dans l'échantillon témoin. Ainsi, l' UO_2^{2+} contenu dans le complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ n'est pas déplacé par le Sr^{2+} , ni le Cu^{2+} , ni le Zn^{2+} en proportions équimolaires par rapport à l' UO_2^{2+} , ce qui montre que pS1368 complexe sélectivement l' UO_2^{2+} en présence de ces compétiteurs. Ces résultats confirment l'intérêt potentiel de ce peptide en tant qu'agent décorporant sélectif de l' UO_2^{2+} *in vivo*.

Conclusion

Dans ce chapitre, la méthodologie développée dans le chapitre précédent a été appliquée à l'évaluation directe et en une étape de la sélectivité du peptide pS1368 vis-à-vis de l'UO₂²⁺ en présence des métaux compétiteurs endogènes Ca²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺. Le Ca²⁺ a été substitué par le Sr²⁺ ayant des propriétés physico-chimiques proches permettant de mimer le comportement de Ca²⁺ lors de la complexation par pS1368, tout en assurant une détection en ICP-MS en absence d'interférences. Les complexes d'UO₂²⁺, de Sr²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ ont pu être séparés avec succès par HILIC, identifiés en ligne par ESI-MS et simultanément quantifiés par ICP-MS.

En présence du Sr²⁺, homologue du Ca²⁺, plus de 80% de l'UO₂²⁺ est complexé à pS1368 dans l'échantillon témoin comme dans les échantillons modèles, contenant un nombre d'équivalents croissant de Sr²⁺ par rapport à l'UO₂²⁺. Ces résultats ont permis de conclure que le peptide pS1368 était sélectif de l'UO₂²⁺ en présence de Sr²⁺ en concentrations représentatives de celles du Ca²⁺ en milieu biologique. La formation d'un complexe ternaire UO₂(Sr)(pS1368) est observée lorsque le nombre d'équivalents de Sr²⁺ par rapport à l'UO₂²⁺ est supérieur ou égal à 4,7.

La sélectivité de ce peptide pour l'UO₂²⁺ en présence de cations compétiteurs endogènes tels que le Cu²⁺, le Zn²⁺ en plus du Sr²⁺ a été également évaluée. L'UO₂²⁺ contenu dans le complexe UO₂(pS1368) n'est pas déplacé en présence de ces métaux en proportion équimolaire par rapport à UO₂²⁺. A notre connaissance, la sélectivité du peptide pS1368 vis-à-vis de l'UO₂²⁺ en présence du Zn²⁺ et du Cu²⁺ n'a pas été évaluée dans la littérature, il s'agit donc des premiers résultats répondant à cette question.

Ainsi, la sélectivité peut être déterminé en une étape unique, grâce à la mise en œuvre du couplage simultané de l'HILIC à l'ESI-MS et l'ICP-MS, en combinaison avec le développement d'une méthode de quantification dédiée. La forte affinité du peptide pS1368 pour l'UO₂²⁺ et sa sélectivité par rapport au Sr²⁺ et aux autres métaux endogènes confirment ainsi la pertinence du site de coordination de l'UO₂²⁺ hyperphosphorylé de l'OPN mimé dans le cyclopeptide pS1368, et son potentiel en tant qu'agent décorporant sélectif de l'UO₂²⁺ *in vivo*.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de ce projet de thèse a porté sur le développement d'une méthode analytique pour évaluer en une seule étape l'affinité de peptides biomimétiques multiphosphorylés pour l' UO_2^{2+} , ainsi que la sélectivité vis-à-vis de cet élément en présence de cations compétiteurs endogènes (Cu^{2+} , Zn^{2+} et Ca^{2+}). Cette approche est essentielle pour identifier les sites de coordination responsables de la haute affinité l' UO_2^{2+} pour ses protéines cibles, afin de mieux comprendre les modes d'interaction à l'échelle moléculaire intimement liés à sa toxicité et pour développer des agents décorporants par chélation sélective. La stratégie analytique a reposé sur la mise en œuvre du couplage de la séparation des complexes peptidiques par HILIC simultanément avec l'ESI-MS, assurant l'identification des espèces issues de la séparation et avec l'ICP-MS, permettant une quantification multi-élémentaire de chaque espèce. Les développements réalisés dans ce travail ont apporté une contribution significative dans les domaines de la chimie analytique et de la chimie bio-inorganique.

Au niveau analytique, les conditions de séparation des peptides cycliques multiphosphorylés, de leurs complexes avec l' UO_2^{2+} et des complexes contenant des métaux endogènes ont été mises au point par HILIC à pH physiologique. La séparation de complexes d' UO_2^{2+} étant connue pour être très délicate, une partie essentielle de ce travail a été consacrée à de nouveaux développements chromatographiques dédiés. Ainsi, l'ensemble des peptides cycliques multiphosphorylés, incluant leurs isomères de position, ont été séparés avec des colonnes neutres à greffage amide (Acquity UPLC BEH amide) et diol (YMC-Triart Diol), avec des facteurs de sélectivité et de résolution supérieurs à 1 et 1,5. Les complexes d' UO_2^{2+} formés avec les isomères des peptides diphosphorylés cycliques (pS16 et pS18) ont été séparés avec succès en employant la colonne à greffage amide, ceux formés avec des peptides ayant 2 et 4 résidus pSer (pS16 et ps1368) avec la colonne à greffage diol et les complexes d' UO_2^{2+} avec des peptides tétraphosphorylés cyclique et linéaire avec une colonne de silice hybride non greffée (Acquity BEH HILIC). Le complexe d' UO_2^{2+} formé avec le ligand cyclique tétraphosphorylé pS1368 a également été séparé des complexes de métaux endogènes grâce à la colonne à greffage diol. Dans tous les cas, les séparations ont été conduites dans des conditions d'élution isocratique avec une phase mobile contenant au minimum 70% d'ACN et une concentration en $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ fixée à 20 mmol L^{-1} , avec des colonnes de dimensions conventionnelles, c'est-à-dire un diamètre de 2 mm et une longueur de 100 mm.

Les mécanismes de rétention des peptides et de leurs complexes métalliques ont été discutés. L'effet de la charge et de la position des acides aminés dans le squelette peptidique sur la rétention des peptides a été mis en évidence et a également été observé lors de la séparation des complexes UO_2^{2+} -peptides, ce qui a permis de séparer des complexes contenant des isomères de position. A ce jour, la

séparation de cette classe de peptides synthétiques à pH 7,4 dans le contexte de développements de méthodes analytiques dédiées à l'étude de l'interaction de métaux toxiques avec des molécules d'intérêt biologique n'a jamais été reportée dans la littérature. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Chromatography B* [13]. De même, la séparation de complexes d' UO_2^{2+} par HILIC n'a jamais décrite dans la littérature. Dans ce travail, les conditions de séparation de ces complexes ont été mises au point et ont même abouti avec succès à la séparation de complexes d' UO_2^{2+} formés avec les isomères de position des peptides et des peptides homologues à structure cyclique et linéaire.

Des méthodes dédiées de caractérisation structurale et multi-élémentaire ont été développées pour identifier par ESI-MS et quantifier par ICP-MS, simultanément et en ligne, les complexes peptidiques issus de la séparation par HILIC. La quantification a été mise au point sur la base d'un étalonnage externe. Deux situations ont été considérées : dans la première, de l' UO_2^{2+} a été mis en présence de différents peptides qui entrent en compétition pour le complexer et dans la deuxième, le peptide tétraphosphorylé pS1368 a été mis en présence d' UO_2^{2+} et de métaux endogènes compétiteurs. L'application de cette méthodologie a permis de déterminer en ligne la distribution de l' UO_2^{2+} parmi les différents complexes peptidiques séparés et identifiés simultanément par ESI-MS et de la même manière, les proportions d' UO_2^{2+} et de métaux engagées dans chaque complexe de pS1368. Lorsque l' UO_2^{2+} est en présence des isomères de position pS16 et pS18, l' UO_2^{2+} se distribue de façon équivalente entre les deux isomères. Lorsque les peptides cycliques di- et tétraphosphorylés (pS16 et pS1368) présents à différentes proportions entrent en compétition pour la complexation de l' UO_2^{2+} , ce dernier se complexe préférentiellement avec le peptide pS1368 ayant le plus grand nombre de résidus phosphorylés soulignant l'affinité élevée de l' UO_2^{2+} pour les groupements phosphates. En présence des homologues tétraphosphorylés cyclique et linéaire, la complexation de l' UO_2^{2+} avec le peptide cyclique est favorisée. Finalement, les cations compétiteurs endogènes, tels que le Cu^{2+} , le Zn^{2+} et le Sr^{2+} homologue du Ca^{2+} ne déplacent pas UO_2^{2+} du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ même lorsque ces cations compétiteurs sont présents en grand excès. Toutefois, pour un nombre d'équivalents de Sr^{2+} supérieur à 4,7, un complexe ternaire $\text{UO}_2(\text{Sr})(\text{pS1368})$ a été observé.

Ainsi, le développement de cette méthode analytique a permis d'acquérir des données quantitatives relatives à l'affinité et à la sélectivité de peptides biomimétiques vis-à-vis de l' UO_2^{2+} , en ligne et en une étape unique, entraînant ainsi une réduction de temps et de quantités de matière engagés par rapport aux approches conventionnelles menées en mode discontinu.

Ces développements analytiques ont permis d'apporter des éléments de compréhension dans le domaine de la chimie bio-inorganique, notamment sur le mode d'interaction de l' UO_2^{2+} avec des peptides biomimétiques et sur la sélectivité de ces derniers pour la complexation de l' UO_2^{2+} en présence de cations compétiteurs endogènes. L'effet de la position des acides aminés phosphorylés

dans le squelette peptidique, du nombre de résidus phosphorylés et de la structure cyclique ou linéaire des peptides sur leur affinité pour l' UO_2^{2+} a pu être quantifié. La position des résidus pSer dans le squelette peptidique n'influence pas la complexation de l' UO_2^{2+} , en adéquation avec leurs constantes de stabilité très proches. L'augmentation du nombre de groupements pSer dans le peptide a induit une augmentation de l'affinité de ce dernier vis-à-vis de l' UO_2^{2+} , confirmant ainsi que le peptide pS1368, ayant quatre résidus pSer, est plus affin pour l' UO_2^{2+} que le peptide ayant seulement deux résidus pSer. Une échelle d'affinité de ces peptides vis-à-vis de l' UO_2^{2+} a été ainsi établie par cette approche, malgré sa limitation à des complexes d' UO_2^{2+} de constante de stabilité $\log K^{\text{pH}=7,4}$ supérieure ou égale à 10. Enfin, la constante de stabilité du complexe d' UO_2^{2+} formé avec le peptide tétraphosphorylé linéaire a pu être calculée à partir de celle du peptide cyclique. En se basant sur ces constantes de stabilités, on a pu déduire que la structure cyclique du peptide confère une plus grande stabilité aux complexes d' UO_2^{2+} par rapport à la structure linéaire, en adéquation avec les résultats obtenus par les techniques classiques de chimie des solutions. Le peptide pS1368 s'est avéré sélectif vis-à-vis de l' UO_2^{2+} en présence du Sr^{2+} en concentrations représentatives de celles du Ca^{2+} en milieu biologique. En outre, la sélectivité de ce peptide vis-à-vis de l' UO_2^{2+} en présence d'un mélange équimolaire de Cu^{2+} , Zn^{2+} et Sr^{2+} a été mise en évidence pour la première fois. L'ensemble de ces résultats a permis de confirmer la pertinence des sites de coordination présents dans le peptide tétraphosphorylé pS1368, mimant les sites hyperphosphorylés présents dans l'ostéopontine, et l'intérêt potentiel de ce peptide comme agent décorporant par chélation sélective.

Les perspectives à ce travail sont nombreuses. Cette approche peut être étendue à la détermination de l'affinité de ces peptides biomimétiques pour les autres actinides (Pu, Am, Cm...), ainsi que leurs propriétés de sélectivité en présence de cations compétiteurs endogènes dans un contexte de toxicologie nucléaire. A cette fin, les développements instrumentaux nécessaires à l'implantation du couplage simultané en boîte à gants sont en cours de finalisation dans la zone contrôlée du laboratoire, dédiée à la manipulation d'échantillons radioactifs. Les développements méthodologiques réalisés dans ce travail pourront donc être mis à profit pour caractériser finement les interactions de radioéléments avec des familles variées de molécules complexantes.

La réduction de l'échelle de cette méthode analytique du format conventionnel au format nanofluidique présente l'avantage de réduire les quantités de matières engagées et les effluents générés, point crucial lorsque les peptides sont synthétisés en quantités très restreintes. Des colonnes HILIC en format nano de diamètre interne compris entre 25 μm et 100 μm existent actuellement sur le marché. Cependant, les fonctions chimiques des phases stationnaires disponibles dans ce format sont limitées. La transposition de la séparation dans les canaux d'un microsystème est envisageable, permettant de plus de réduire davantage l'échelle de méthode d'analyse. La conception d'un tel

dispositif nécessite des développements faisant appel à la technologie microfluidique, au domaine de la chimie pour la fonctionnalisation des canaux et de la chimie analytique pour adapter la méthodologie au format miniaturisé. De façon générale, la diminution de l'échelle analytique présente un atout supplémentaire dans le domaine du nucléaire, avec la minimisation des contraintes liées à la manipulation d'éléments radioactifs.

D'un point de vue méthodologique, l'analyse isotopique en ligne des éléments dans les espèces séparées, peut apporter des informations supplémentaires précieuses pour décrire et interpréter finement l'interaction des éléments avec les peptides. A cette fin, le couplage de la séparation à un ICP-MS muni d'un analyseur à multi-collection (ICP-MC-MS), est impératif pour être capable de mesurer des isotopes de masse très proche avec une incertitude de l'ordre du pour mille et une méthode de caractérisation isotopique de haute précision en ligne associée doit également être développée.

L'analyse isotopique de haute précision des éléments dans les milieux biologiques est prometteuse comme marqueur de métabolisme, outil de diagnostic et de suivi de patients. Cette méthode d'analyse isotopique en ligne peut être donc étendue à la caractérisation d'échantillons biologiques pour la découverte de nouveaux biomarqueurs.

La quantification de certains métaux d'intérêt dans les études toxicologiques, en particulier le ^{40}Ca et le ^{56}Fe est délicate avec un ICP-MS muni d'un simple quadripôle (ICP-Q-MS) en raison des interférences isobariques. Dans ce travail, le Ca^{2+} a été substitué par le Sr^{2+} exempt de interférences. Afin de pallier les limitations liées à l'analyse du Ca^{2+} par ICP-Q-MS, le couplage simultané peut être réalisé avec un ICP-MS muni d'un analyseur équipé d'un triple quadripôle (ICP-QQQ-MS). L'avantage de cette technologie est qu'elle permet de s'affranchir des interférences isobariques sans avoir recours à la substitution des analytes ciblés par un homologue. Pour ce faire, un gaz de réaction ou de collision réagit avec l'analyte d'intérêt ou l'interfèrent dans le deuxième quadripôle, ce qui permet d'analyser l'analyte cible en absence d'interférences. Cette technologie offre également la possibilité de pouvoir quantifier les éléments constitutifs des protéines et des peptides biomimétiques comme le ^{31}P et le ^{32}S . La quantification en ligne des peptides ou des protéines contenant du P et du S, en plus des métaux auxquels ils sont complexés, présente un intérêt majeur pour améliorer la caractérisation du mode d'interactions métaux-biomolécules et calculer les constantes de stabilité thermodynamiques associées.

Cette approche par HILIC-ESI-MS/ICP-MS peut être étendue au criblage des propriétés de complexation de diverses classes de molécules chélatantes envers des éléments d'intérêt dans les domaines des énergies, toxicologiques et environnementaux. Dans la filière nucléaire, elle présente un apport en soutien à la conception de molécules hautement sélectives pour la récupération des actinides mineurs (Am, Cm, Np) contenus dans des solutions de combustibles usés. Selon le même

principe, les propriétés de sélectivité de molécules vis-à-vis de métaux nobles (Ag, Pd, Pt...), de terres rares (Dy, Nd, Eu, Tb...), de métaux de transition (Cu, Ni...) peuvent être également évaluées pour le recyclage de métaux stratégiques dans le domaine des nouvelles technologies de production et de stockage de l'énergie.

Cette méthodologie peut être appliquée à l'étude de l'impact des métaux hautement toxiques sur l'homme et l'environnement, notamment à l'analyse de leur spéciation qui gouverne leur toxicité. A titre d'exemple, l'élucidation de la spéciation du chrome et du mercure et la quantification en ligne de leur teneur dans des matrices alimentaires, biologiques ou environnementales, grâce à la mise en œuvre du couplage simultané peuvent être d'un intérêt majeur visant à mieux comprendre leurs mécanismes de toxicité à l'échelle moléculaire et à acquérir des données dans un contexte réglementaire.

Références

- [1] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.-G. Danielsson, H. Muntau, H.P.V. Leeuwen, (IUPAC Recommendations 2000), *Pure Appl. Chem.* (2000) 18.
- [2] M.A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana, V.M. Nurchi, The essential metals for humans: a brief overview, *J. Inorg. Biochem.* 195 (2019) 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013>.
- [3] S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski, *Metallomics: the concept and methodology*, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 1119. <https://doi.org/10.1039/b713633c>.
- [4] The Actinide and Transactinide Elements (Z = 90–103 and 104–112), in: *Chem. Elem.*, Elsevier, 1997: pp. 1250–1284. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-3365-9.50037-7>.
- [5] M. Ma, R. Wang, L. Xu, M. Xu, S. Liu, Emerging health risks and underlying toxicological mechanisms of uranium contamination: Lessons from the past two decades, *Environ. Int.* 145 (2020) 106107. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106107>.
- [6] C. Basset, O. Averseng, P.-J. Ferron, N. Richaud, A. Hagège, O. Pible, C. Vidaud, Revision of the Biodistribution of Uranyl in Serum: Is Fetuin-A the Major Protein Target?, *Chem. Res. Toxicol.* 26 (2013) 645–653. <https://doi.org/10.1021/tx400048u>.
- [7] L. Qi, C. Basset, O. Averseng, E. Quéméneur, A. Hagège, C. Vidaud, Characterization of UO_2^{2+} binding to osteopontin, a highly phosphorylated protein: insights into potential mechanisms of uranyl accumulation in bones, *Metallomics.* 6 (2014) 166–176. <https://doi.org/10.1039/C3MT00269A>.
- [8] A. Garai, P. Delangle, Recent advances in uranyl binding in proteins thanks to biomimetic peptides, *J. Inorg. Biochem.* 203 (2020) 110936. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110936>.
- [9] F.A. Laporte, C. Lebrun, C. Vidaud, P. Delangle, Phosphate-Rich Biomimetic Peptides Shed Light on High-Affinity Hyperphosphorylated Uranyl Binding Sites in Phosphoproteins, *Chem. – Eur. J.* (2019). <https://doi.org/10.1002/chem.201900646>.
- [10] E. Blanchard, A. Nonell, F. Chartier, A. Rincel, C. Bresson, Evaluation of superficially and fully porous particles for HILIC separation of lanthanide–polyaminocarboxylic species and simultaneous coupling to ESIMS and ICPMS, *RSC Adv.* 8 (2018) 24760–24772. <https://doi.org/10.1039/C8RA02961J>.
- [11] A. Hagège, T.N.S. Huynh, M. Hébrant, Separative techniques for metalloproteomics require balance between separation and perturbation, *TrAC Trends Anal. Chem.* 64 (2015) 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.013>.
- [12] J. Köster, R. Shi, N. von Wirén, G. Weber, Evaluation of different column types for the hydrophilic interaction chromatographic separation of iron-citrate and copper-histidine species from plants, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4934–4943. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.036>.
- [13] L. Abou Zeid, A. Pell, T. Tytus, P. Delangle, C. Bresson, Separation of multiphosphorylated cyclopeptides and their positional isomers by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), *J. Chromatogr. B.* 1177 (2021) 122792. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122792>.
- [14] J.J. Katz, *The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements (Set Vol. 1-6)*, Springer Science & Business Media, 2010.

- [15] Nuclear Energy Agency and International Atomic Energy Agency, Uranium 2020: Resources, Production and Demand, (2020) 484.
- [16] I. Grenthe, J. Drożdżynński, T. Fujino, E.C. Buck, T.E. Albrecht-Schmitt, S.F. Wolf, Uranium, in: L.R. Morss, N.M. Edelstein, J. Fuger (Eds.), *Chem. Actin. Trans. Elem.*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2006: pp. 253–698. https://doi.org/10.1007/1-4020-3598-5_5.
- [17] C. Vidaud, D. Bourgeois, D. Meyer, Bone as Target Organ for Metals: The Case of f-Elements, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 1161–1175. <https://doi.org/10.1021/tx300064m>.
- [18] Coordination Chemistry of the Actinides, in: *Lanthan. Actin. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2006: pp. 173–199. <https://doi.org/10.1002/0470010088.ch11>.
- [19] Radioprotection : Radionucléides, Uranium naturel, Inst. Radioprotection Sûreté Nucl. IRSN Inst. Natl. Rech. Sécurité INRS Fiche ED 4321. (2014). <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%204321>.
- [20] R.G. Pearson, Hard and Soft Acids and Bases, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3533–3539. <https://doi.org/10.1021/ja00905a001>.
- [21] J. Vanhorn, H. Huang, Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data, *Coord. Chem. Rev.* 250 (2006) 765–775. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.09.010>.
- [22] E. Ansoborlo, O. Prat, P. Moisy, C. Den Auwer, P. Guilbaud, M. Carriere, B. Gouget, J. Duffield, D. Doizi, T. Vercoüter, C. Moulin, V. Moulin, Actinide speciation in relation to biological processes, *Biochimie.* 88 (2006) 1605–1618. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.06.011>.
- [23] E.N. Rizkalla, G.R. Choppin, Hydration of lanthanides and actinides in solution, *J. Alloys Compd.* 180 (1992) 325–336. [https://doi.org/10.1016/0925-8388\(92\)90398-5](https://doi.org/10.1016/0925-8388(92)90398-5).
- [24] U. Wahlgren, H. Moll, I. Grenthe, B. Schimmelpfennig, L. Maron, V. Vallet, O. Gropen, Structure of Uranium(VI) in Strong Alkaline Solutions. A Combined Theoretical and Experimental Investigation, *J. Phys. Chem. A.* 103 (1999) 8257–8264. <https://doi.org/10.1021/jp990042d>.
- [25] N. Bardin, P. Rubini, C. Madie, Hydration of Actinyl(VI), MO₂+aq (M = U, Np, Pu). An NMR Study, (1998) 6.
- [26] F. Quiles, A. Burneau, Infrared and Raman spectra of uranyl(VI)/ oxo-hydroxo complexes in acid aqueous solutions: a chemometric study, *Vib. Spectrosc.* (2000) 11.
- [27] M. Aaberg, D. Ferri, J. Glaser, I. Grenthe, Structure of the hydrated dioxouranium(VI) ion in aqueous solution. An x-ray diffraction and proton NMR study, *Inorg. Chem.* 22 (1983) 3986–3989. <https://doi.org/10.1021/ic00168a033>.
- [28] C. Clavaguéra-Sarrio, V. Brenner, S. Hoyau, C.J. Marsden, P. Millié, J.-P. Dognon, Modeling of Uranyl Cation–Water Clusters, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 3051–3060. <https://doi.org/10.1021/jp0273833>.
- [29] S. Berto, F. Crea, P.G. Daniele, A. Gianguzza, A. Pettignano, S. Sammartano, Advances in the investigation of dioxouranium(VI) complexes of interest for natural fluids, *Coord. Chem. Rev.* 256 (2012) 63–81. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.08.015>.
- [30] M. Sutton, S.R. Burastero, Uranium(VI) Solubility and Speciation in Simulated Elemental Human Biological Fluids, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 1468–1480. <https://doi.org/10.1021/tx049878k>.
- [31] United Nations, Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, Sources, effects and risks of ionizing radiation: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation : UNSCEAR 2016 report to the General Assembly with scientific annexes., 2017. <http://www.unscear.org/unscear/en/publications/2016.html> (accessed September 14, 2021).

- [32] World Health Organization, Guidelines for drinking-water quality, (2011) 303–304.
- [33] O. Prat, T. Vercouter, E. Ansoborlo, P. Fichet, P. Perret, P. Kurttio, L. Salonen, Uranium Speciation in Drinking Water from Drilled Wells in Southern Finland and Its Potential Links to Health Effects, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3941–3946. <https://doi.org/10.1021/es803658e>.
- [34] World Health Organization, others, Uranium in drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality, 2004.
- [35] M. Souidi, E. Tissandie, R. Racine, H.B. Soussan, C. Rouas, E. Grignard, I. Dublineau, P. Gourmelon, P. Lestaevel, Y. Gueguen, Uranium: properties and biological effects after internal contamination, in: *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 2009: pp. 23–38.
- [36] C. Dinocourt, M. Legrand, I. Dublineau, P. Lestaevel, The neurotoxicology of uranium, *Toxicology*. 337 (2015) 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.08.004>.
- [37] É. Ansoborlo, B. Amekraz, C. Moulin, V. Moulin, F. Taran, T. Bailly, R. Burgada, M.-H. Hengé-Napoli, A. Jeanson, C. Den Auwer, L. Bonin, P. Moisy, Review of actinide decorporation with chelating agents, *Comptes Rendus Chim.* 10 (2007) 1010–1019. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2007.01.015>.
- [38] P. Maria L. Limson Zamora MSc, J.M.Z. PhD, G.B.M. DCBT, R.A.F.F. DCBT, W.C.H. DCBT, K.C. DCBT, Uranium in Drinking Water: Renal Effects of Long-Term Ingestion by an Aboriginal Community, *Arch. Environ. Occup. Health.* 64 (2009) 228–241. <https://doi.org/10.1080/19338240903241267>.
- [39] P. Kurttio, H. Komulainen, A. Leino, L. Salonen, A. Auvinen, H. Saha, Bone as a Possible Target of Chemical Toxicity of Natural Uranium in Drinking Water, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 68–72. <https://doi.org/10.1289/ehp.7475>.
- [40] M.A. McDiarmid, M. Cloeren, J.M. Gaitens, S. Hines, E. Streeten, R.J.B. III, C.H. Brown, M. Condon, T. Roth, M. Oliver, L. Brown, M. Dux, M.R. Lewin-Smith, F. Strathmann, M.A. Velez-Quinones, P. Gucer, Surveillance results and bone effects in the Gulf War depleted uranium-exposed cohort, *J. Toxicol. Environ. Health A.* 81 (2018) 1083–1097. <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1538914>.
- [41] M.A. McDiarmid, J.P. Keogh, F.J. Hooper, K. McPhaul, K. Squibb, R. Kane, R. DiPino, M. Kabat, B. Kaup, L. Anderson, D. Hoover, L. Brown, M. Hamilton, D. Jacobson-Kram, B. Burrows, M. Walsh, Health Effects of Depleted Uranium on Exposed Gulf War Veterans, *Environ. Res.* 82 (2000) 168–180. <https://doi.org/10.1006/enrs.1999.4012>.
- [42] F. Paquet, P. Houpert, E. Blanchardon, O. Delissen, C. Maubert, B. Dhieux, A.M. Moreels, S. Frelon, V. &Na;, P. Gourmelon, Accumulation and distribution of uranium in rats after chronic exposure by ingestion:, *Health Phys.* 90 (2006) 139–147. <https://doi.org/10.1097/01.HP.0000174527.66111.83>.
- [43] M. Monleau, C. Bussy, P. Lestaevel, P. Houpert, F. Paquet, V. Chazel, Bioaccumulation and behavioural effects of depleted uranium in rats exposed to repeated inhalations, *Neurosci. Lett.* 390 (2005) 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.07.051>.
- [44] C. Thiebault, M. Carriere, S. Milgram, A. Simon, L. Avoscan, B. Gouget, Uranium Induces Apoptosis and Is Genotoxic to Normal Rat Kidney (NRK-52E) Proximal Cells, *Toxicol. Sci.* 98 (2007) 479–487. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm130>.
- [45] M. Carrière, L. Avoscan, R. Collins, F. Carrot, H. Khodja, E. Ansoborlo, B. Gouget, Influence of Uranium Speciation on Normal Rat Kidney (NRK-52^E) Proximal Cell Cytotoxicity, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 446–452. <https://doi.org/10.1021/tx034224h>.

- [46] V. Pierrefite-Carle, S. Santucci-Darmanin, V. Breuil, T. Gritsaenko, C. Vidaud, G. Creff, P.L. Solari, S. Pagnotta, R. Al-Sahlane, C. Den Auwer, others, Effect of natural uranium on the UMR-106 osteoblastic cell line: Impairment of the autophagic process as an underlying mechanism of uranium toxicity, *Arch. Toxicol.* 91 (2017) 1903–1914.
- [47] E. Paredes, E. Avazeri, V. Malard, C. Vidaud, P.E. Reiller, R. Ortega, A. Nonell, H. Isnard, F. Chartier, C. Bresson, Evidence of isotopic fractionation of natural uranium in cultured human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (2016) 14007–14012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610885113>.
- [48] O. Carugo, Structural features of uranium-protein complexes, *J. Inorg. Biochem.* 189 (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.08.014>.
- [49] O. Pible, P. Guilbaud, J.-L. Pellequer, C. Vidaud, E. Quéméneur, Structural insights into protein–uranyl interaction: towards an in silico detection method, *Biochimie.* 88 (2006) 1631–1638. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.05.015>.
- [50] O. Pible, C. Vidaud, S. Plantevin, J.-L. Pellequer, E. Quéméneur, Predicting the disruption by UO_2^{2+} of a protein–ligand interaction: UO_2^{2+} Disrupts a Protein– Ca^{2+} -Ligand Interaction, *Protein Sci.* 19 (2010) 2219–2230. <https://doi.org/10.1002/pro.501>.
- [51] T.-N.S. Huynh, D. Bourgeois, C. Basset, C. Vidaud, A. Hagège, Assessment of CE-ICP/MS hyphenation for the study of uranyl/protein interactions: CE and CEC, *ELECTROPHORESIS.* 36 (2015) 1374–1382. <https://doi.org/10.1002/elps.201400471>.
- [52] G. Montavon, C. Apostolidis, F. Bruchertseifer, U. Repinc, A. Morgenstern, Spectroscopic study of the interaction of U(VI) with transferrin and albumin for speciation of U(VI) under blood serum conditions, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 1609–1616. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.08.010>.
- [53] C. Vidaud, S. Gourion-Arsiquaud, F. Rollin-Genetet, C. Torne-Celer, S. Plantevin, O. Pible, C. Berthomieu, E. Quéméneur, Structural Consequences of Binding of UO_2^{2+} to Apotransferrin: Can This Protein Account for Entry of Uranium into Human Cells?, *Biochemistry.* 46 (2007) 2215–2226. <https://doi.org/10.1021/bi061945h>.
- [54] J. Michon, S. Frelon, C. Garnier, F. Coppin, Determinations of Uranium(VI) Binding Properties with some Metalloproteins (Transferrin, Albumin, Metallothionein and Ferritin) by Fluorescence Quenching, *J. Fluoresc.* 20 (2010) 581–590. <https://doi.org/10.1007/s10895-009-0587-3>.
- [55] M. Ali, A. Kumar, M. Kumar, B.N. Pandey, The interaction of human serum albumin with selected lanthanide and actinide ions: Binding affinities, protein unfolding and conformational changes, *Biochimie.* 123 (2016) 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.01.012>.
- [56] C. Basset, A. Dedieu, P. Guérin, E. Quéméneur, D. Meyer, C. Vidaud, Specific capture of uranyl protein targets by metal affinity chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1185 (2008) 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.081>.
- [57] T.-N.S. Huynh, C. Vidaud, A. Hagège, Investigation of uranium interactions with calcium phosphate-binding proteins using ICP/MS and CE-ICP/MS, *Metallomics.* 8 (2016) 1185–1192. <https://doi.org/10.1039/C6MT00147E>.
- [58] S. Sauge-Merle, F. Brulfert, R. Pardoux, P.L. Solari, D. Lemaire, S. Safi, P. Guilbaud, E. Simoni, M.L. Merroun, C. Berthomieu, Structural Analysis of Uranyl Complexation by the EF-Hand Motif of Calmodulin: Effect of Phosphorylation, *Chem. - Eur. J.* 23 (2017) 15505–15517. <https://doi.org/10.1002/chem.201703484>.
- [59] F. Brulfert, S. Safi, A. Jeanson, E. Martinez-Baez, J. Roques, C. Berthomieu, P.-L. Solari, S. Sauge-Merle, É. Simoni, Structural Environment and Stability of the Complexes Formed Between

- Calmodulin and Actinyl Ions, *Inorg. Chem.* 55 (2016) 2728–2736. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02440>.
- [60] L. Le Clainche, C. Vita, Selective binding of uranyl cation by a novel calmodulin peptide, *Environ. Chem. Lett.* 4 (2006) 45–49. <https://doi.org/10.1007/s10311-005-0033-y>.
- [61] S. Kumar, G. Creff, C. Hennig, A. Rossberg, R. Steudtner, J. Raff, C. Vidaud, F.R. Oberhaensli, M.D. Bottein, C. Auwer, How Do Actinyls Interact with Hyperphosphorylated Yolk Protein Phosvitin?, *Chem. – Eur. J.* 25 (2019) 12332–12341. <https://doi.org/10.1002/chem.201902015>.
- [62] B. Li, J. Raff, A. Barkleit, G. Bernhard, H. Foerstendorf, Complexation of U(VI) with highly phosphorylated protein, phosvitinA vibrational spectroscopic approach, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 718–725. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.03.004>.
- [63] F. Coppin, J. Michon, C. Garnier, S. Frelon, Fluorescence Quenching Determination of Uranium (VI) Binding Properties by Two Functional Proteins: Acetylcholinesterase (AChE) and Vitellogenin (Vtg), *J. Fluoresc.* 25 (2015) 569–576. <https://doi.org/10.1007/s10895-015-1536-y>.
- [64] O. Averseng, A. Hagège, F. Taran, C. Vidaud, Surface Plasmon Resonance for Rapid Screening of Uranyl Affine Proteins, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9797–9802. <https://doi.org/10.1021/ac102578y>.
- [65] S. Safi, G. Creff, A. Jeanson, L. Qi, C. Basset, J. Roques, P.L. Solari, E. Simoni, C. Vidaud, C. Den Auwer, Osteopontin: A Uranium Phosphorylated Binding-Site Characterization, *Chem. - Eur. J.* 19 (2013) 11261–11269. <https://doi.org/10.1002/chem.201300989>.
- [66] R. Pardoux, S. Sauge-Merle, D. Lemaire, P. Delangle, L. Guilloureau, J.-M. Adriano, C. Berthomieu, Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation, *PLoS ONE.* 7 (2012) e41922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041922>.
- [67] H. Zänker, K. Heine, S. Weiss, V. Brendler, R. Husar, G. Bernhard, K. Gloe, T. Henle, A. Barkleit, Strong Uranium(VI) Binding onto Bovine Milk Proteins, Selected Protein Sequences, and Model Peptides, *Inorg. Chem.* 58 (2019) 4173–4189. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b03231>.
- [68] C. Lebrun, M. Starck, V. Gathu, Y. Chenavier, P. Delangle, Engineering Short Peptide Sequences for Uranyl Binding, *Chem. - Eur. J.* 20 (2014) 16566–16573. <https://doi.org/10.1002/chem.201404546>.
- [69] M. Starck, N. Sisommay, F.A. Laporte, S. Oros, C. Lebrun, P. Delangle, Preorganized Peptide Scaffolds as Mimics of Phosphorylated Proteins Binding Sites with a High Affinity for Uranyl, *Inorg. Chem.* 54 (2015) 11557–11562. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02249>.
- [70] M. Starck, F.A. Laporte, S. Oros, N. Sisommay, V. Gathu, P.L. Solari, G. Creff, J. Roques, C. Den Auwer, C. Lebrun, P. Delangle, Cyclic Phosphopeptides to Rationalize the Role of Phosphoamino Acids in Uranyl Binding to Biological Targets, *Chem.- Eur. J.* 23 (2017) 5281–5290. <https://doi.org/10.1002/chem.201605481>.
- [71] F. Laporte, Compréhension des mécanismes de complexation de l'uranyle par les molécules du vivant: élaboration de peptides biomimétiques chélatants pour la détoxification, PhD Thesis, Grenoble Alpes, 2017.
- [72] Q. Zhang, B. Jin, T. Zheng, X. Tang, Z. Guo, R. Peng, Hexadentate β -Dicarbonyl(bis-catecholamine) Ligands for Efficient Uranyl Cation Decorporation: Thermodynamic and Antioxidant Activity Studies, *Inorg. Chem.* 58 (2019) 14626–14634. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b02306>.
- [73] Y. Ohmachi, T. Imamura, M. Ikeda, E. Shishikura, E. Kim, O. Kurihara, K. Sakai, Sodium bicarbonate protects uranium-induced acute nephrotoxicity through uranium-decorporation by urinary alkalinization in rats, *J. Toxicol. Pathol.* 28 (2015) 65–71. <https://doi.org/10.1293/tox.2014-0041>.

- [74] P.W. Durbin, LAURISTON S. TAYLOR LECTURE: THE QUEST FOR THERAPEUTIC ACTINIDE CHELATORS; Health Phys. 95 (2008) 465–492. <https://doi.org/10.1097/01.HP.0000326345.41816.c2>.
- [75] F. Cisnetti, C. Gateau, C. Lebrun, P. Delangle, Lanthanide(III) Complexes with Two Hexapeptides Incorporating Unnatural Chelating Amino Acids: Secondary Structure and Stability, Chem. - Eur. J. 15 (2009) 7456–7469. <https://doi.org/10.1002/chem.200900747>.
- [76] C. Jacopin, M. Sawicki, G. Plancque, D. Doizi, F. Taran, E. Ansoborlo, B. Amekraz, C. Moulin, Investigation of the Interaction between 1-Hydroxyethane-1,1'-diphosphonic Acid (HEDP) and Uranium(VI), Inorg. Chem. 42 (2003) 5015–5022. <https://doi.org/10.1021/ic0343509>.
- [77] M. Sawicki, J.-M. Siaugue, C. Jacopin, C. Moulin, T. Bailly, R. Burgada, S. Meunier, P. Baret, J.-L. Pierre, F. Taran, Discovery of Powerful Uranyl Ligands from Efficient Synthesis and Screening, Chem. - Eur. J. 11 (2005) 3689–3697. <https://doi.org/10.1002/chem.200401056>.
- [78] M. Sawicki, D. Lecerclé, G. Grillon, B. Le Gall, A.-L. Sérandour, J.-L. Poncy, T. Bailly, R. Burgada, M. Lecouvey, V. Challeix, A. Leydier, S. Pellet-Rostaing, E. Ansoborlo, F. Taran, Bisphosphonate sequestering agents. Synthesis and preliminary evaluation for in vitro and in vivo uranium(VI) chelation, Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 2768–2777. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.01.018>.
- [79] G. Ye, J. Roques, P.-L. Solari, C. Den Auwer, A. Jeanson, J. Brandel, L.J. Charbonnière, W. Wu, É. Simoni, Structural and Thermodynamics Studies on Polyaminophosphonate Ligands for Uranyl Decorporation, Inorg. Chem. 60 (2021) 2149–2159. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c02145>.
- [80] E. Migianu-Griffoni, C. Mbemba, R. Burgada, D. Lecerclé, F. Taran, M. Lecouvey, Design and synthesis of new polyphosphorylated upper-rim modified calix[4]arenes as potential and selective chelating agents of uranyl ion, Tetrahedron. 65 (2009) 1517–1523. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.11.076>.
- [81] A.E.V. Gorden, J. Xu, K.N. Raymond, P. Durbin, Rational Design of Sequestering Agents for Plutonium and Other Actinides, Chem. Rev. 103 (2003) 4207–4282. <https://doi.org/10.1021/cr990114x>.
- [82] A. Younes, G. Creff, M.R. Beccia, P. Moisy, J. Roques, J. Aupiais, C. Hennig, P.L. Solari, C. Den Auwer, C. Vidaud, Is hydroxypyridonate 3,4,3-LI(1,2-HOPO) a good competitor of fetuin for uranyl metabolism?, Metallomics. 11 (2019) 496–507. <https://doi.org/10.1039/C8MT00272J>.
- [83] A. Leydier, Y. Lin, G. Arrachart, R. Turgis, D. Lecerclé, A. Favre-Reguillon, F. Taran, M. Lemaire, S. Pellet-Rostaing, EDTA and DTPA modified ligands as sequestering agents for uranyl decorporation, Tetrahedron. 68 (2012) 1163–1170. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.11.065>.
- [84] A. Leydier, D. Lecerclé, S. Pellet-Rostaing, A. Favre-Reguillon, F. Taran, M. Lemaire, Sequestering agent for uranyl chelation: a new family of CAMS ligands, Tetrahedron. 64 (2008) 6662–6669. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.05.021>.
- [85] A. Leydier, D. Lecerclé, S. Pellet-Rostaing, A. Favre-Réguillon, F. Taran, M. Lemaire, Sequestering agents for uranyl chelation: new calixarene ligands, Tetrahedron. 64 (2008) 11319–11324. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.08.104>.
- [86] A. Leydier, D. Lecerclé, S. Pellet-Rostaing, A. Favre-Reguillon, F. Taran, M. Lemaire, Sequestering agent for uranyl chelation: new binaphtyl ligands, Tetrahedron Lett. 52 (2011) 3973–3977. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.05.075>.
- [87] S. Lei, B. Jin, Q. Zhang, Z. Zhang, X. Wang, R. Peng, S. Chu, Synthesis of bifunctional biscatecholamine chelators for uranium decorporation, Polyhedron. 119 (2016) 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2016.09.006>.

- [88] F. Lahrouch, O. Sofronov, G. Creff, A. Rossberg, C. Hennig, C. Den Auwer, C. Di Giorgio, Polyethyleneimine methylphosphonate: towards the design of a new class of macromolecular actinide chelating agents in the case of human exposition, *Dalton Trans.* 46 (2017) 13869–13877. <https://doi.org/10.1039/C7DT02643A>.
- [89] S. Scapolan, E. Ansoborlo, C. Moulin, C. Madic, Investigations by time-resolved laser-induced fluorescence and capillary electrophoresis of the uranyl–phosphate species: application to blood serum, *J. Alloys Compd.* 271–273 (1998) 106–111. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(98\)00035-8](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(98)00035-8).
- [90] S.P. Pasilis, J.E. Pemberton, Speciation and Coordination Chemistry of Uranyl(VI)–Citrate Complexes in Aqueous Solution, *Inorg. Chem.* 42 (2003) 6793–6800. <https://doi.org/10.1021/ic0341800>.
- [91] C. Hennig, A. Ikeda, K. Schmeide, V. Brendler, H. Moll, S. Tsushima, A.C. Scheinost, S. Skanthakumar, R. Wilson, L. Soderholm, K. Servaes, et al., The relationship of monodentate and bidentate coordinated uranium(VI) sulfate in aqueous solution, *Radiochim. Acta.* 96 (2008) 607–611. <https://doi.org/10.1524/ract.2008.1543>.
- [92] L. Götzke, G. Schaper, J. März, P. Kaden, N. Huittinen, T. Stumpf, K.K.K. Kammerlander, E. Brunner, P. Hahn, A. Mehnert, B. Kersting, T. Henle, L.F. Lindoy, G. Zanoni, J.J. Weigand, Coordination chemistry of f-block metal ions with ligands bearing bio-relevant functional groups, *Coord. Chem. Rev.* 386 (2019) 267–309. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.01.006>.
- [93] V.B. Di Marco, G.G. Bombi, Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in the study of metal–ligand solution equilibria, *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 347–379. <https://doi.org/10.1002/mas.20070>.
- [94] M.J. Keith-Roach, A review of recent trends in electrospray ionisation–mass spectrometry for the analysis of metal–organic ligand complexes, *Anal. Chim. Acta.* 678 (2010) 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.023>.
- [95] D.D. Carlton, K.A. Schug, A review on the interrogation of peptide–metal interactions using electrospray ionization–mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 686 (2011) 19–39. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.050>.
- [96] R. Jirásko, M. Holčápek, Structural analysis of organometallic compounds with soft ionization mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 1013–1036. <https://doi.org/10.1002/mas.20309>.
- [97] S. Indelicato, D. Bongiorno, L. Ceraulo, Recent Approaches for Chemical Speciation and Analysis by Electrospray Ionization (ESI) Mass Spectrometry, *Front. Chem.* 8 (2021) 625945. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.625945>.
- [98] M.J. Van Stipdonk, W. Chien, K. Bulleigh, Q. Wu, G.S. Groenewold, Gas-Phase Uranyl–Nitrile Complex Ions, *J. Phys. Chem. A.* 110 (2006) 959–970. <https://doi.org/10.1021/jp054422c>.
- [99] M.J. Van Stipdonk, A. Iacovino, I. Tatosian, Influence of Background H₂O on the Collision-Induced Dissociation Products Generated from [UO₂NO₃]⁺, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 29 (2018) 1416–1424. <https://doi.org/10.1007/s13361-018-1947-5>.
- [100] M.J. Van Stipdonk, M. del C. Michellini, A. Plaviak, D. Martin, J.K. Gibson, Formation of Bare UO₂²⁺ and NUO⁺ by Fragmentation of Gas-Phase Uranyl–Acetonitrile Complexes, *J. Phys. Chem. A.* 118 (2014) 7838–7846. <https://doi.org/10.1021/jp5066067>.
- [101] M. Van Stipdonk, V. Anbalagan, W. Chien, G. Gresham, G. Groenewold, D. Hanna, Elucidation of the collision induced dissociation pathways of water and alcohol coordinated complexes containing the uranyl cation, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14 (2003) 1205–1214. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(03\)00531-2](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(03)00531-2).

- [102] M.J. Van Stipdonk, C. O'Malley, A. Plaviak, D. Martin, J. Pestok, P.A. Mihm, C.G. Hanley, T.A. Corcovilos, J.K. Gibson, B.J. Bythell, Dissociation of gas-phase, doubly-charged uranyl-acetone complexes by collisional activation and infrared photodissociation, *Int. J. Mass Spectrom.* 396 (2016) 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2015.12.005>.
- [103] W. Chien, V. Anbalagan, M. Zandler, M. Stipdonk, D. Hanna, G. Gresham, G. Groenewold, Intrinsic hydration of monovalent uranyl hydroxide, nitrate, and acetate cations, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.01.013>.
- [104] A.M. Mustapha, S.P. Pasilis, Probing uranyl(VI) speciation in the presence of amidoxime ligands using electrospray ionization mass spectrometry: Probing uranyl(VI) speciation by ESI-MS, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 2135–2142. <https://doi.org/10.1002/rcm.6672>.
- [105] P. Kumar, P.G. Jaison, V.M. Telmore, D. Alamelu, S.K. Aggarwal, B. Sadhu, M. Sundararajan, Gas phase reactions of uranyl with α -hydroxyisobutyric acid using electrospray ionization mass spectrometry and density functional theory, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 308 (2016) 303–310. <https://doi.org/10.1007/s10967-015-4664-6>.
- [106] P. Kumar, P.G. Jaison, V.M. Telmore, B. Sadhu, M. Sundararajan, Speciation of uranium-mandelic acid complexes using electrospray ionization mass spectrometry and density functional theory: Study of uranium-mandelic acid complexes using ESI-MS and DFT, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 31 (2017) 561–571. <https://doi.org/10.1002/rcm.7817>.
- [107] L.W. McDonald, J.A. Campbell, T. Vercouter, S.B. Clark, Characterization of Actinides Complexed to Nuclear Fuel Constituents Using ESI-MS, *Anal. Chem.* 88 (2016) 2614–2621. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03352>.
- [108] M. Luo, B. Hu, X. Zhang, D. Peng, H. Chen, L. Zhang, Y. Huan, Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Sensitive Detection of Uranyl Species in Natural Water Samples, *Anal. Chem.* 82 (2010) 282–289. <https://doi.org/10.1021/ac9019494>.
- [109] M. Starck, N. Sisommay, F.A. Laporte, S. Oros, C. Lebrun, P. Delangle, Preorganized Peptide Scaffolds as Mimics of Phosphorylated Proteins Binding Sites with a High Affinity for Uranyl, *Inorg. Chem.* 54 (2015) 11557–11562. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02249>.
- [110] N.G. Tsierekzos, J. Roithová, D. Schröder, M. Ončák, P. Slaviček, Can Electrospray Mass Spectrometry Quantitatively Probe Speciation? Hydrolysis of Uranyl Nitrate Studied by Gas-Phase Methods, *Inorg. Chem.* 48 (2009) 6287–6296. <https://doi.org/10.1021/ic900575r>.
- [111] Á. Somogyi, S.P. Pasilis, J.E. Pemberton, Electrospray ionization of uranyl-citrate complexes: Adduct formation and ion-molecule reactions in 3D ion trap and ion cyclotron resonance trapping instruments, *Int. J. Mass Spectrom.* 265 (2007) 281–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2007.02.050>.
- [112] A. Artese, S. Dourdain, N. Boubals, T. Dumas, P.L. Solari, D. Menut, L. Berthon, P. Guilbaud, S. Pellet-Rostaing, Evidence of Supramolecular Origin of Selectivity in Solvent Extraction of Bifunctional Amidophosphonate Extractants with Different Configurations, *Solvent Extr. Ion Exch.* (2021) 1–23. <https://doi.org/10.1080/07366299.2021.1961433>.
- [113] M. Starck, F.A. Laporte, S. Oros, N. Sisommay, V. Gathu, P.L. Solari, G. Creff, J. Roques, C. Den Auwer, C. Lebrun, P. Delangle, Cyclic Phosphopeptides to Rationalize the Role of Phosphoamino Acids in Uranyl Binding to Biological Targets, *Chem. - Eur. J.* 23 (2017) 5281–5290. <https://doi.org/10.1002/chem.201605481>.
- [114] C. Galindo, M. Del Nero, Trace Level Uranyl Complexation with Phenylphosphonic Acid in Aqueous Solution: Direct Speciation by High Resolution Mass Spectrometry, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 4372–4383. <https://doi.org/10.1021/ic302494a>.

- [115] C.-L. Xiao, C.-Z. Wang, L. Mei, X.-R. Zhang, N. Wall, Y.-L. Zhao, Z.-F. Chai, W.-Q. Shi, Europium, uranyl, and thorium-phenanthroline amide complexes in acetonitrile solution: an ESI-MS and DFT combined investigation, *Dalton Trans.* 44 (2015) 14376–14387. <https://doi.org/10.1039/C5DT01766A>.
- [116] S. Wahu, J.-C. Berthet, P. Thuéry, D. Guillaumont, M. Ephritikhine, R. Guillot, G. Cote, C. Bresson, Structural Versatility of Uranyl(VI) Nitrate Complexes That Involve the Diamide Ligand $\text{Et}_2\text{N}(\text{C}=\text{O})(\text{CH}_2)_n(\text{C}=\text{O})\text{NEt}_2$ ($0 \leq n \leq 6$), *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012 (2012) 3747–3763. <https://doi.org/10.1002/ejic.201200243>.
- [117] D. Pröfrock, A. Prange, Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry (ICP-MS) for Quantitative Analysis in Environmental and Life Sciences: A Review of Challenges, Solutions, and Trends, *Appl. Spectrosc.* 66 (2012) 843–868. <https://doi.org/10.1366/12-06681>.
- [118] C. Vidaud, A. Dedieu, C. Basset, S. Plantevin, I. Dany, O. Pible, E. Quéménéur, Screening of Human Serum Proteins for Uranium Binding, *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005) 946–953. <https://doi.org/10.1021/tx050038v>.
- [119] A. Armid, S. Ohde, R. Shinjo, T. Toki, Determination of uranium in pore water from coastal sediment by standard addition ICP-MS analysis, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 275 (2008) 233–237. <https://doi.org/10.1007/s10967-007-6997-2>.
- [120] J.R. Wood, G.A. Gill, L.-J. Kuo, J.E. Strivens, K.-Y. Choe, Comparison of Analytical Methods for the Determination of Uranium in Seawater Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Ind. Eng. Chem. Res.* 55 (2016) 4344–4350. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b03680>.
- [121] L.D. Asnin, Peak measurement and calibration in chromatographic analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 81 (2016) 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.01.006>.
- [122] M. Xu, S. Frelon, O. Simon, R. Lobinski, S. Mounicou, Non-denaturing isoelectric focusing gel electrophoresis for uranium–protein complexes quantitative analysis with LA-ICP MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 1063–1072. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7033-8>.
- [123] C. Vidaud, M. Robert, E. Paredes, R. Ortega, E. Avazeri, L. Jing, J.-M. Guignonis, C. Bresson, V. Malard, Deciphering the uranium target proteins in human dopaminergic SH-SY5Y cells, *Arch. Toxicol.* 93 (2019) 2141–2154. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02497-4>.
- [124] S. Frelon, S. Mounicou, R. Lobinski, R. Gilbin, O. Simon, Subcellular fractionation and chemical speciation of uranium to elucidate its fate in gills and hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii*, *Chemosphere.* 91 (2013) 481–490. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.008>.
- [125] Y. Eb-Levadoux, S. Frelon, O. Simon, C. Arnaudguilhem, R. Lobinski, S. Mounicou, In vivo identification of potential uranium protein targets in zebrafish ovaries after chronic waterborne exposure, *Metallomics.* 9 (2017) 525–534. <https://doi.org/10.1039/C6MT00291A>.
- [126] S. Frelon, O. Simon, Y. Eb-Levadoux, S. Mounicou, Screening of potential uranium protein targets in fish ovaries after chronic waterborne exposure: Differences and similarities between roach and zebrafish, *J. Environ. Radioact.* 222 (2020) 106365. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2020.106365>.
- [127] G. Bucher, S. Mounicou, O. Simon, M. Floriani, R. Lobinski, S. Frelon, Different uranium distribution patterns in cytosolic protein pool of zebrafish gills after chronic and acute waterborne exposures, *Chemosphere.* 111 (2014) 412–417. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.110>.

- [128] C. Bresson, F. Chartier, L'analyse isotopique d'éléments essentiels : un nouvel outil pour la médecine ?, *Rev. Francoph. Lab.* 2021 (2021) 64–75. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(21\)00172-6](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(21)00172-6).
- [129] E. Paredes, E. Avazeri, V. Malard, C. Vidaud, P.E. Reiller, R. Ortega, A. Nonell, H. Isnard, F. Chartier, C. Bresson, Impact of uranium uptake on isotopic fractionation and endogenous element homeostasis in human neuron-like cells, *Sci. Rep.* 8 (2018) 17163. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35413-4>.
- [130] L.K. Kostanski, D.M. Keller, A.E. Hamielec, Size-exclusion chromatography—a review of calibration methodologies, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 58 (2004) 159–186. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.10.001>.
- [131] Ł. Szyrwił, V. Liauchuk, L. Chavatte, R. Lobinski, In vitro induction and proteomics characterisation of a uranyl–protein interaction network in bovine serum, *Metallomics.* 7 (2015) 1604–1611. <https://doi.org/10.1039/C5MT00207A>.
- [132] R.C.F. Cheung, J.H. Wong, T.B. Ng, Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 1411–1420. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4507-0>.
- [133] A. Dedieu, F. Bérenguer, C. Basset, O. Prat, E. Quéméneur, O. Pible, C. Vidaud, Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 5365–5376. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.023>.
- [134] N. Delaunay, *Électrophorèse capillaire - Principes*, Tech. Ing. (2019) 25.
- [135] A.J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *J. Chromatogr. A.* 499 (1990) 177–196. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96972-3).
- [136] D.V. McCalley, Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1523 (2017) 49–71. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.026>.
- [137] D.V. McCalley, Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?, *J. Chromatogr. A.* 1171 (2007) 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.047>.
- [138] Eric S. Grumbach, Kenneth J. Fountain, *Comprehensive guide to HILIC*, Waters Corportaion. (2010).
- [139] P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784–1821. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600199>.
- [140] B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.
- [141] G. Greco, T. Letzel, Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 684–693. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt015>.
- [142] P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review, *Anal. Chim. Acta.* 692 (2011) 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>.
- [143] A.J. Alpert, Effect of salts on retention in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1538 (2018) 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.038>.

- [144] E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, Hydrophilic Interaction Chromatography: Current Trends and Applications, in: *Ref. Module Chem. Mol. Sci. Chem. Eng.*, Elsevier, 2018: p. B9780124095472126000. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12681-2>.
- [145] A. Periat, I.S. Krull, D. Guillarme, Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins: *Liquid Chromatography, J. Sep. Sci.* 38 (2015) 357–367. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400969>.
- [146] M. Gilar, A. Jaworski, Retention behavior of peptides in hydrophilic-interaction chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 8890–8896. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.005>.
- [147] S. Le Maux, A.B. Nongonierma, R.J. FitzGerald, Improved short peptide identification using HILIC–MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence, *Food Chem.* 173 (2015) 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.104>.
- [148] Y. Yang, R.I. Boysen, M.T.W. Hearn, Hydrophilic interaction chromatography coupled to electrospray mass spectrometry for the separation of peptides and protein digests, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 5518–5524. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.085>.
- [149] W. Jiang, G. Fischer, Y. Girmay, K. Irgum, Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode, *J. Chromatogr. A.* 1127 (2006) 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.080>.
- [150] V. Spicer, O.V. Krokhin, Peptide retention time prediction in hydrophilic interaction liquid chromatography. Comparison of separation selectivity between bare silica and bonded stationary phases, *J. Chromatogr. A.* 1534 (2018) 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.046>.
- [151] D. Singer, J. Kuhlmann, M. Muschket, R. Hoffmann, Separation of Multiphosphorylated Peptide Isomers by Hydrophilic Interaction Chromatography on an Aminopropyl Phase, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6409–6414. <https://doi.org/10.1021/ac100473k>.
- [152] M.J. Badgett, B. Boyes, R. Orlando, Peptide retention prediction using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1537 (2018) 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.055>.
- [153] S. Di Palma, P.J. Boersema, A.J.R. Heck, S. Mohammed, Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (ZIC-HILIC and ZIC-cHILIC) Provide High Resolution Separation and Increase Sensitivity in Proteome Analysis, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3440–3447. <https://doi.org/10.1021/ac103312e>.
- [154] D.E. McNulty, R.S. Annan, Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection., *Mol. Cell. Proteomics MCP.* 7 (2008) 971–980. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700543-MCP200>.
- [155] P.J. Boersema, S. Mohammed, A.J.R. Heck, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 151–159. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1865-7>.
- [156] M. Gilar, P. Olivova, A.E. Daly, J.C. Gebler, Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6426–6434. <https://doi.org/10.1021/ac050923i>.
- [157] F. Xie, P. Colin, J. Van Boclaer, Zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry with HybridSPE-precipitation for the determination of intact

- cisplatin in human plasma, *Talanta*. 174 (2017) 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.002>.
- [158] L. Beuvier, C. Bresson, A. Nonell, L. Vio, N. Henry, V. Pichon, F. Chartier, Simple separation and characterization of lanthanide–polyaminocarboxylic acid complexes by HILIC ESI-MS, *RSC Adv.* 5 (2015) 92858–92868. <https://doi.org/10.1039/C5RA16078B>.
- [159] J. Künnemeyer, L. Terborg, S. Nowak, A. Scheffer, L. Telgmann, F. Tokmak, A. Günzel, G. Wiesmüller, S. Reichelt, U. Karst, Speciation Analysis of Gadolinium-Based MRI Contrast Agents in Blood Plasma by Hydrophilic Interaction Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8163–8170. <https://doi.org/10.1021/ac801264j>.
- [160] M. Horstmann, R. Gonzalez de Vega, David.P. Bishop, U. Karst, P.A. Doble, D. Clases, Determination of gadolinium MRI contrast agents in fresh and oceanic waters of Australia employing micro-solid phase extraction, HILIC-ICP-MS and bandpass mass filtering, *J. Anal. At. Spectrom.* 36 (2021) 767–775. <https://doi.org/10.1039/DOJA00493F>.
- [161] M. Birka, C.A. Wehe, O. Hachmöller, M. Sperling, U. Karst, Tracing gadolinium-based contrast agents from surface water to drinking water by means of speciation analysis, *J. Chromatogr. A.* 1440 (2016) 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.050>.
- [162] T. Grevenstuk, P. Flis, L. Ouerdane, R. Lobinski, A. Romano, Identification of the tri-Al tricitrate complex in *Plantago almogravensis* by hydrophilic interaction LC with parallel ICP-MS and electrospray Orbitrap MS/MS detection, *Metallomics.* 5 (2013) 1285. <https://doi.org/10.1039/c3mt00101f>.
- [163] D. Xie, J. Mattusch, R. Wennrich, Separation of Organoarsenicals by Means of Zwitterionic Hydrophilic Interaction Chromatography (ZIC[®]-HILIC) and Parallel ICP-MS/ESI-MS Detection, *Eng. Life Sci.* 8 (2008) 582–588. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800041>.
- [164] S. Miah, I.M.M. Rahman, M. Takemura, S. Fukiage, A.S. Mashio, T. Maki, H. Hasegawa, Determination of multiple chelator complexes in aqueous matrices using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry, *Talanta*. 194 (2019) 980–990. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.085>.
- [165] G. Weber, N. von Wirén, H. Hayen, Hydrophilic interaction chromatography of small metal species in plants using sulfobetaine- and phosphorylcholine-type zwitterionic stationary phases, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1615–1622. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800060>.
- [166] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*, 3rd ed, J. Wiley, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2007.
- [167] S. Banerjee, S. Mazumdar, Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte, *Int. J. Anal. Chem.* 2012 (2012) 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- [168] R. Łobiński, D. Schaumlöffel, J. Szpunar, Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry, *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 255–289. <https://doi.org/10.1002/mas.20069>.
- [169] S.J. Gaskell, *Electrospray: Principles and Practice*, *J. MASS Spectrom.* 32 (1997) 12.
- [170] M. Holčápek, R. Jirásko, M. Lísa, Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques, *J. Chromatogr. A.* 1259 (2012) 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.072>.
- [171] Y. Fillatre, *Produits phytosanitaires: Développement d’une méthode d’analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem*, Thèse Dr. Univ. Angers. (2011) 289.

- [172] W.M.A. Niessen, D. Falck, Introduction to Mass Spectrometry, a Tutorial, in: J. Kool, W.M.A. Niessen (Eds.), *Anal. Biomol. Interact. Mass Spectrom.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2015: pp. 1–54. <https://doi.org/10.1002/9783527673391.ch1>.
- [173] H. Paucot, M. Potin-Gautier, ICP-MS : couplage plasma induit par haute fréquence – spectrométrie de masse, *Tech. Ing.* (2010) 18.
- [174] G. Favre, Etude des réactions “ions - molécules” en phase gazeuse dans les dispositifs de collision-réaction : Application à la résolution directe des interférences spectroscopiques en ICP-MS, Thèse Dr. -Univ. D’EVRY VAL D’ESSONNE. (2008) 160.
- [175] J. Poupon, Spectrométrie de masse en plasma induit : principe, appareillage et intérêt en biologie clinique, *Rev. Francoph. Lab.* 2021 (2021) 55–63. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(21\)00171-4](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(21)00171-4).
- [176] F. Cubadda, Inductively coupled plasma mass spectrometry, in: *Food Toxic. Anal.*, Elsevier, 2007: pp. 697–751. <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50020-1>.
- [177] Y. Makonnen, D. Beauchemin, The inductively coupled plasma as a source for optical emission spectrometry and mass spectrometry, in: *Sample Introd. Syst. ICPMS ICPOES*, Elsevier, 2020: pp. 1–55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59482-2.00001-4>.
- [178] V. Vacchina, M. Potin-Gautier, F. Seby, Couplage HPLC-ICP-MS et application à la spéciation, *Tech. Ing.* (2019) 24.
- [179] S. Diez-Fernández, H. Isnard, A. Nonell, C. Bresson, F. Chartier, Radionuclide analysis using collision–reaction cell ICP-MS technology: a review, *J. Anal. At. Spectrom.* 35 (2020) 2793–2819. <https://doi.org/10.1039/D0JA00211A>.
- [180] May, Thomas W and Wiedmeyer, Ray H, A table of polyatomic interferences in ICP-MS, *At. Spectrosc.-NORWALK Conn.* (1998) 150--155.
- [181] E. Bolea-Fernandez, L. Balcaen, M. Resano, F. Vanhaecke, Overcoming spectral overlap via inductively coupled plasma-tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS). A tutorial review, *J. Anal. At. Spectrom.* 32 (2017) 1660–1679. <https://doi.org/10.1039/C7JA00010C>.
- [182] V. Balaram, Strategies to overcome interferences in elemental and isotopic geochemical analysis by quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry: A critical evaluation of the recent developments, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 35 (2021). <https://doi.org/10.1002/rcm.9065>.
- [183] G. Bouchoux, M. Sablier, Spectrométrie de masse - Principe et appareillage, *Tech. Ing.* (2005) 35.
- [184] A. Leclercq, A. Nonell, J.L. Todolí Torró, C. Bresson, L. Vio, T. Vercouter, F. Chartier, Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part I. Theoretical considerations, *Anal. Chim. Acta.* 885 (2015) 33–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.049>.
- [185] A. Leclercq, A. Nonell, J.L. Todolí Torró, C. Bresson, L. Vio, T. Vercouter, F. Chartier, Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part II. Practical considerations, *Anal. Chim. Acta.* 885 (2015) 57–91. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.039>.
- [186] A.J. Alpert, Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides, *Anal. Chem.* 80 (2008) 62–76. <https://doi.org/10.1021/ac070997p>.

- [187] E.S. Grumbach, D.M. Diehl, U.D. Neue, The application of novel 1.7 μm ethylene bridged hybrid particles for hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1511–1518. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700673>.
- [188] https://www.ymc.co.jp/en/columns/ymc_triart_sil/, (n.d.).
- [189] A. Yanagida, H. Murao, M. Ohnishi-Kameyama, Y. Yamakawa, A. Shoji, M. Tagashira, T. Kanda, H. Shindo, Y. Shibusawa, Retention behavior of oligomeric proanthocyanidins in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1143 (2007) 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.004>.
- [190] C. Basset, O. Averseng, P.-J. Ferron, N. Richaud, A. Hagège, O. Pible, C. Vidaud, Revision of the Biodistribution of Uranyl in Serum: Is Fetuin-A the Major Protein Target?, *Chem. Res. Toxicol.* 26 (2013) 645–653. <https://doi.org/10.1021/tx400048u>.
- [191] C. Basset, A. Dedieu, P. Guérin, E. Quéméneur, D. Meyer, C. Vidaud, Specific capture of uranyl protein targets by metal affinity chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1185 (2008) 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.081>.
- [192] C. Lebrun, M. Starck, V. Gathu, Y. Chenavier, P. Delangle, Engineering Short Peptide Sequences for Uranyl Binding, *Chem. - Eur. J.* 20 (2014) 16566–16573. <https://doi.org/10.1002/chem.201404546>.
- [193] M. Sutton, S.R. Burastero, Uranium(VI) Solubility and Speciation in Simulated Elemental Human Biological Fluids, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 1468–1480. <https://doi.org/10.1021/tx049878k>.
- [194] Y. Xuan, E.B. Scheuermann, A.R. Meda, H. Hayen, N. von Wiren, G. Weber, Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1136 (2006) 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.060>.
- [195] Validation of analytical procedures : text and methodology Q2(R1), in: *Int. Conf. Harmon. Tech. Requir. Regist. Pharm. Hum. Use*, 2005.
- [196] A. Garai, P. Delangle, Recent advances in uranyl binding in proteins thanks to biomimetic peptides, *J. Inorg. Biochem.* 203 (2020) 110936. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110936>.
- [197] M. Birka, K.S. Wentker, E. Lasmöller, B. Arheilger, C.A. Wehe, M. Sperling, R. Stadler, U. Karst, Diagnosis of Nephrogenic Systemic Fibrosis by means of Elemental Bioimaging and Speciation Analysis, *Anal. Chem.* 87 (2015) 3321–3328. <https://doi.org/10.1021/ac504488k>.
- [198] E. Klänning, B. Christensen, E.S. Sørensen, T. Vorup-Jensen, J.K. Jensen, Osteopontin binds multiple calcium ions with high affinity and independently of phosphorylation status, *Bone.* 66 (2014) 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.05.020>.
- [199] R.D. Shannon, Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides, *Acta Crystallogr. Sect. A.* 32 (1976) 751–767. <https://doi.org/10.1107/S0567739476001551>.
- [200] M. Cohen-Solal, Strontium overload and toxicity: impact on renal osteodystrophy, *Nephrol. Dial. Transplant.* 17 (2002) 30–34. https://doi.org/10.1093/ndt/17.suppl_2.30.
- [201] A.C. Raffalt, J.E.T. Andersen, S. Christgau, Application of inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP–MS) and quality assurance to study the incorporation of strontium into bone, bone marrow, and teeth of dogs after one month of treatment with strontium malonate, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2199–2207. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2171-0>.

-
- [202] S.D. Kelly, K.M. Kemner, S.C. Brooks, X-ray absorption spectroscopy identifies calcium-uranyl-carbonate complexes at environmental concentrations, *Geochim. Cosmochim. Acta.* 71 (2007) 821–834. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.10.013>.
- [203] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, δ Conversion Parameter between pH Scales (and) in Acetonitrile/Water Mixtures at Various Compositions and Temperatures, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3180–3187. <https://doi.org/10.1021/ac062372h>.

Annexes

Annexe I. Partie expérimentale

1. Produits chimiques

L'acétonitrile (ACN, LC-MS grade) et l'ammoniaque 22 % ont été fournis par VWR prolabo (Briare le canal, France). L'acétate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$) et le toluène par Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le L-Tryptophane (pureté 99%) a été fourni de Arcos organics. Les solutions standards d'uranium (U), de Bismuth (Bi), d'Yttrium (Y), de Strontium (Sr), de Zinc (Zn) et de Cuivre (Cu) à $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ en milieu acide nitrique (HNO_3 2% (w/w)) ont été fournies par SPEX CertiPrep (Longjumeau, France). L'eau ultrapure (18,2 M Ω .cm) a été obtenue à partir d'un système de purification : système milliQ (Millipore, Guyancourt, France). L'acide nitrique HNO_3 2% a été préparé à partir d'eau ultrapure et de HNO_3 à 65% de la société Merck (France), qui a été distillé avec un evapoclean provenant de Analab (France).

2. Peptides

Les peptides considérés au cours de ce travail sont synthétisés et fournis par l'équipe du CIBEST du SyMMES (Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, 38 000 Grenoble - France). Les détails de synthèse sont présentés dans les références suivantes [9,69,113,192]. Les peptides tétra-phosphorylés cyclique et linéaire pS1368 et linS1368 ont été synthétisés et fournis par la société « Cambridge peptides » (Cambridge, Royaume uni). Leur nomenclature, séquence peptidique, masse moléculaire ainsi que leur constante d'affinité pour l' UO_2^{2+} calculés par le CIBEST sont récapitulés dans le Tableau 1.

Tableau 1: nomenclature, séquence peptidique, masse moléculaire et constante d'affinité pour l' UO_2^{2+} à une certaine valeur de pH des peptides.

Peptides	Séquence ($\text{X}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{X}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{X}_9\text{X}_{10}$)	Masse moléculaire (g mol^{-1})	$\log K(\text{UO}_2^{2+}$ - peptides)	pH
pS0	c(EREPGEWEPG)	1166,5	8,2	6
pS1	c(pSREPGEWEPG)	1204,5	9,6	6-7,4
pS8	c(EREPGEWpSPG)	1204,5	9,6-9,7	6-7,4
pS16	c(pSREPGpSWEPPG)	1242,4	8,6-10,1	6-7,4
pS18	c(pSREPGEWpSPG)	1242,4	8,7-10,3	6-7,4
pS168	c(pSEEPGpSWpSPG)	1253,3	10,7	7
pS1368	c(pSEpSPGpSWpSPG)	1291,3	11,1	7
LinS1368	pSEpSPGpSWpSPG	1350,3	/	/

3. Préparation de la phase mobile

Deux pots de phase mobile A (60/40 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO) et B (80/20 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO) ont été préparés en mélangeant les proportions appropriées d'acétonitrile et d'eau (v/v) de manière à obtenir les pourcentages souhaités. Avant d'ajouter l'acétonitrile, la quantité adéquate d'acétate d'ammonium préalablement séchée est bien dissoute dans l'eau pour atteindre la concentration souhaitée dans le volume total ACN/H₂O. Ainsi, le pH de la phase mobile est stabilisé autour de 7, avec un décalage de 0,5 unité entre le pH aqueux et le pH hydro-organique [203].

4. Préparation des solutions stocks, des solutions de contact et des échantillons

4.1. Solution stock d'uranium naturel

La solution stock d'uranium naturel (^{nat}U) utilisée au cours de ce travail est préparée par dilution d'une solution stock de nitrate d'uranyle plus concentrée (concentration approximative 72 000 µg mL⁻¹ dans 3% HNO₃) dans l'eau ultra pure pour atteindre une concentration ciblée de 10 000 µg mL⁻¹ (5 x 10⁻² mol L⁻¹). La solution stock d'^{nat}U a été quantifiée par ICP-MS par étalonnage externe en utilisant les solutions d'U SPEX à concentration certifiée comme étalons. L'échantillon à dosé a été préparé par dilution de la solution stock d'^{nat}U dans HNO₃ 2% pour avoir une concentration visée de 1 ng mL⁻¹. Les solutions étalons ont été préparées à partir des solutions SPEX qui ont subi les dilutions nécessaires dans HNO₃ 2% pour avoir une gamme de concentration comprise entre 0,5 et 1,5 ng mL⁻¹. La concentration expérimentale de la solution stock obtenue par étalonnage est de 9447,2 µg mL⁻¹ (3,97 x 10⁻² mol L⁻¹).

4.2. Solutions stock de Sr²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺

Les solutions stocks de Sr²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ à 10 000 µg mL⁻¹ ont été préparées à partir des solutions SPEX certifiées. Ces dernières étant de concentration 1000 µg mL⁻¹ dans HNO₃ 2% ont été évaporées à sec sur une plaque chauffante à 95 degrés puis récupérées avec le volume adéquat de HNO₃ 2% pour avoir une concentration de 10 000 µg mL⁻¹. Leur concentration exacte a été finalement déterminée par étalonnage externe par ICP-MS. Les échantillons à doser ont été préparés par dilution des solutions stock dans HNO₃ 2% pour avoir une concentration visée de 1 ng mL⁻¹. Les solutions étalons ont été préparées à partir des solutions SPEX qui ont subi les dilutions nécessaires dans HNO₃ 2% pour avoir une gamme de concentration comprise entre 0,4 et 2,75 ng mL⁻¹.

4.3. Solutions stock de peptides

Les solutions stocks de peptides sont préparées par pesée d'une masse comprise entre 2 et 5 mg qui est dissoute dans ≈ 1 mL d'acétate d'ammonium 20 mmol L^{-1} ($\text{pH} \approx 7$) pour avoir une concentration comprise entre 2×10^{-3} et $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Ces solutions sont stockées dans des cryotubes stériles dans le réfrigérateur à 4°C .

- **Quantification**

Les solutions stock de peptides ont été dosées par UV, en aval d'une séparation par HILIC, par étalonnage externe en utilisant le L-Tryptophane (Trp) comme standard. Un couplage en série HILIC-UV-ESI-MS a été réalisé afin de caractériser les peptides par les deux techniques. La longueur d'onde sélectionnée en UV est 280 nm, qui correspond à l'absorbance maximale du Trp. La solution stock de Trp a été préparée par pesée d'une masse de Trp en poudre de 0,1 g qui a été dissoute dans 50 mL de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 20 mmol L^{-1} pour avoir une concentration de $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Une solution intermédiaire de Trp a été préparée par dilution de la solution stock d'un facteur 1/10 dans $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 20 mmol L^{-1} pour avoir une concentration de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Les solutions étalons de Trp ont été préparées à partir de la solution intermédiaire en réalisant les dilutions nécessaires dans la phase mobile 70/30 ACN/ H_2O + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ pour avoir une gamme de concentration comprise entre 5×10^{-6} et $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Les échantillons de peptide à doser ont été préparés par dilution de leurs solutions stocks dans la phase mobile de façon à avoir une concentration nominale de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Deux colonnes HILIC ont été sélectionnées pour la quantification : Une colonne à greffage diol (YMC-Triart Diol 100 x 2 mm ; $1,9 \mu\text{m}$) et une colonne non greffée à base de silice hybride (Acquity BEH HILIC 100 x 2,1 ; $1,7 \mu\text{m}$) avec des phases mobiles composées respectivement de 70/30 et 68/32 ACN/ H_2O + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$. Les solutions étalons ainsi que les échantillons à doser ont été injectés en triplicat dans la colonne. La totalité de l'aire des pics des étalons et des échantillons a été intégrée en utilisant le logiciel Origin Pro 2018. La droite d'étalonnage a été tracée en présentant l'aire moyenne des aires des pics des étalons de Trp injectés en triplicat en fonction de leurs concentrations (Figure 1).

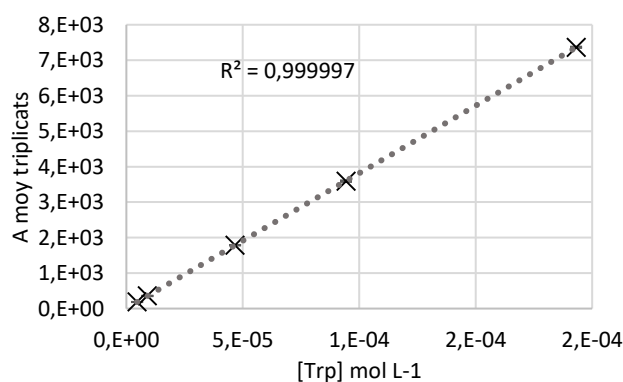


Figure 1: Droite d'étalonnage obtenue en présentant l'aire moyenne des aires des pics des solutions étalons de tryptophane, injectées en triplicat, en fonction de leur concentration.

Un écart type relatif (RSD) sur les aires des pics des solutions étalons injectées en triplicat est < 15% et est compris entre 1 et 3% pour les échantillons de peptides à doser. Les conditions chromatographiques et les paramètres de source et d'acquisition en ESI-MS sont identiques à celles employés dans le reste des expériences et sont détaillés dans les paragraphes 5.1 et 5.2, respectivement. Les conditions de détection et les paramètres d'acquisition en UV sont listées dans le Tableau 2.

Tableau 2: Conditions de détection et les paramètres d'acquisition en UV-VIS

Modes d'acquisition	Mode longueur d'onde unique (single wavelength) = 280 nm Mode balayage : spectre d'absorbance enregistré entre 190 et 350 nm
Bande passante (bandwidth)	1 nm
Largeur de fente (slit width)	Etroite
Fréquence d'acquisition	5 Hz
Temps de réponse	2 s

Les profils d'élution obtenus par HILIC-UV-ESIMS pour les peptides pS0, pS18, pS16, pS1368 et lnS1368 sont représentés dans la Figure 2.

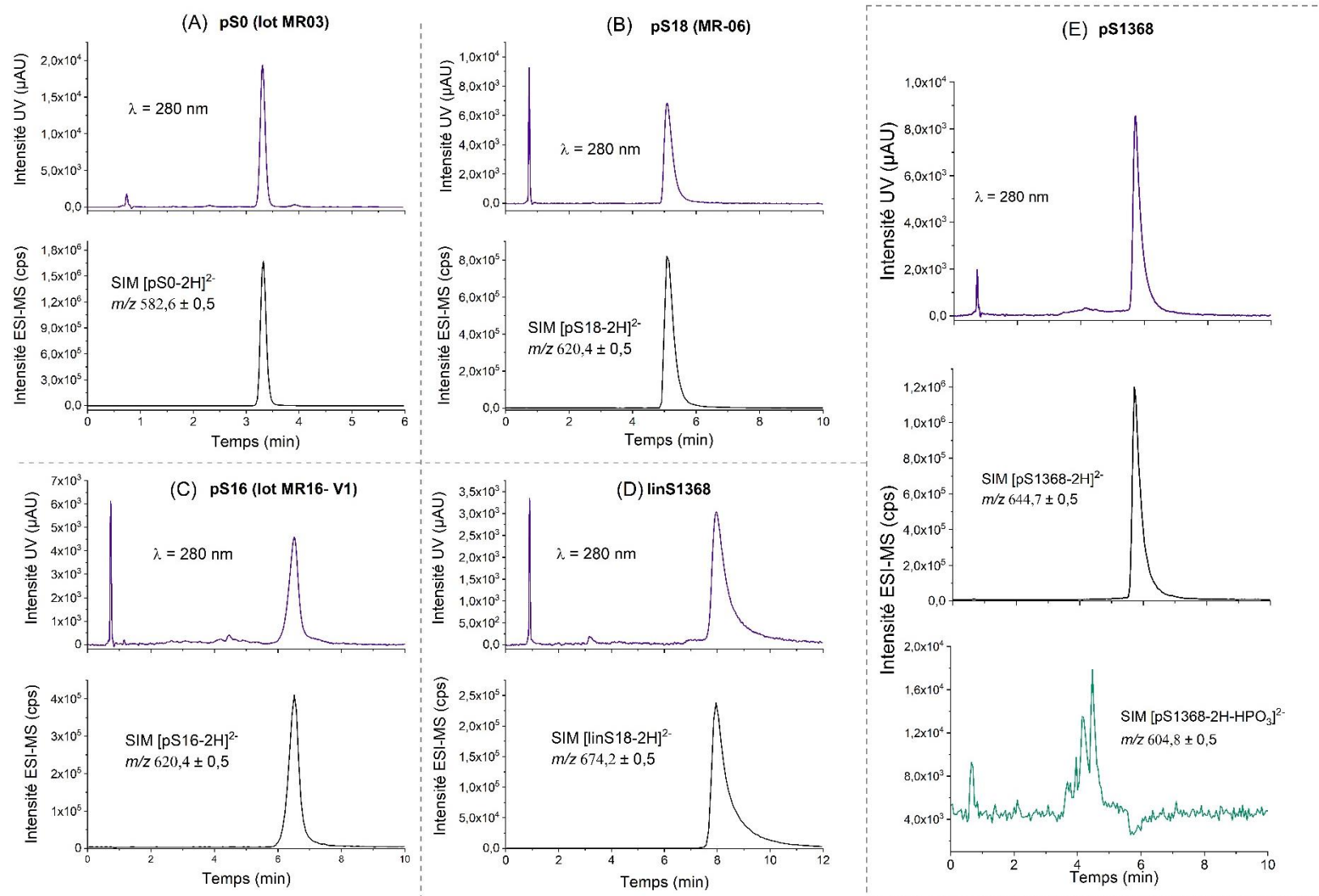


Figure 2 : Profils d'élution des peptides pS0, pS18, pS16, pS1368 et linS1368 obtenus par UV (en violet) et par ESI-MS (en noir et vert). (A)-(C) et (E), colonne YMC triart diol (100 x 2 mm ; 1,9 μ m) avec phase mobile composée de 70/30 ACN/H₂O + 20 mmol L⁻¹ NH₄O₂CCH₃ et (D) colonne Acquity BEH HILIC 100 x 2,1 ; 1,7 μ m avec 68/32 ACN/H₂O + 20 mmol L⁻¹ NH₄O₂CCH₃

4.4. Solutions contenant les peptides en mélange

La solution de contact contenant les peptides en mélange a été préparée en ajoutant le volume nécessaire de chaque solution stock de peptides pour obtenir les concentrations visées, étant de $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pour pS0, pS1/8, pS16/18 et de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pour pS168 et pS1368. Cette solution de contact subi finalement une dilution d'un facteur 1/5 dans la phase mobile pour obtenir des concentrations de $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ pour pS0, pS1, pS8, pS16, pS18 et $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pour pS168 et pS1368.

4.5. Solutions d' UO_2^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} en milieu non complexant

Ces solutions ont été préparées par dilution des solutions stocks de chaque métal dans l'acétate d'ammonium 20 mmol L^{-1} pour avoir une solution intermédiaire dont la concentration en métal est de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Cette solution subie finalement une dilution d'un facteur 1/5 dans la phase mobile composée de 70/30 ACN/ H_2O + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ pour avoir l'échantillon de travail contenant une concentration en métal de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.6. Solutions de contact UO_2^{2+} -peptides

Quelle que soit la solution de contact UO_2^{2+} -peptide visée, cette dernière a été préparée par pesée en ajoutant un très petit volume de la solution stock d' UO_2^{2+} (entre 1,3 et 1,6 μL) dans la solution stock de peptide P ($\approx 125\text{-}250 \mu\text{L}$) pour obtenir le rapport U/P souhaité. La concentration en UO_2^{2+} de la solution de contact est généralement fixée à $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Le pH de cette solution est ensuite ajusté à $\text{pH} = 7,4$ avec l'ammoniaque 20-22%, vérifié avec un papier pH. La solution de contact est systématiquement préparée la veille de l'injection pour un temps d'incubation d'environ 12h. Le jour de l'analyse, la solution de contact subi une dilution finale d'un facteur 1/5 dans la phase mobile composée de 70/30 ACN/ H_2O + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ pour avoir l'échantillon de travail avec $[\text{UO}_2^{2+}] = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, à savoir $23,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Les différentes étapes de préparation des solutions de contact sont résumées dans la Figure 3.

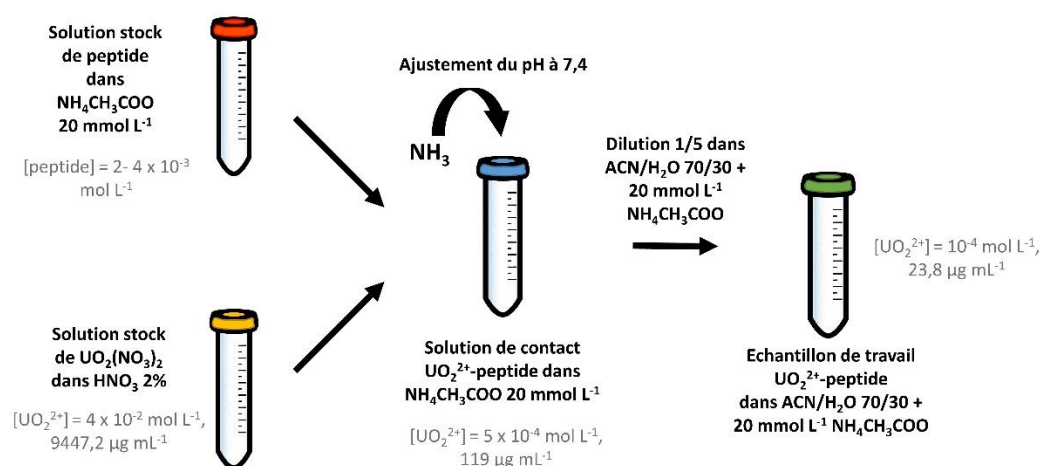


Figure 3 : Procédure de préparation des solutions de contact UO_2^{2+} -peptide et des échantillons de travail

➤ *Pour le système UO_2^{2+} -pS16-pS18*

Afin de préparer la solution de contact UO_2^{2+} -pS16-pS18 de stoechiométrie 2-10-10, les solutions stock de pS16 et pS18 ont été diluées dans 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO pour avoir les concentrations correspondantes à la stoechiométrie souhaitée, à savoir [pS16] = [pS18] = 10⁻³ mol L⁻¹. Sur le mélange équimolaire pS16/pS18 de volume total 250 µL, 1,3 µL de la solution stock d'^{nat}U ont été ajoutés pour avoir [UO₂²⁺] = 2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. La solution de contact a subi une dilution d'un facteur 1/2 dans la phase mobile pour avoir une concentration en UO₂²⁺ de 10⁻⁴ mol L⁻¹ dans l'échantillon de travail.

➤ *Pour le système UO_2^{2+} -pS1368-pS16*

Les solutions de contact UO_2^{2+} -pS1368-pS16 ont été préparées en ajoutant les volumes nécessaires des solutions stock d' UO_2^{2+} et de peptides pour avoir les concentrations souhaitées pour les proportions UO_2^{2+} -xpS1368-ypS16 comme montre le Tableau 3. La concentration en UO_2^{2+} des solutions de contact est de 5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ sauf pour les solutions de contact UO_2^{2+} -pS1368-pS16 de proportions 2-0,5-20 et 2-0-20 pour lesquelles la concentration en UO_2^{2+} a été de 2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

Tableau 3 : Proportions UO_2^{2+} -xpS1368-ypS16 visées, avec x et y les stoechiométries des peptides par rapport à l' UO_2^{2+} .

UO_2^{2+}	x pS1368	y pS16
2	4	0
2	3	1
2	2	2
2	0,5	20
2	0	20

Les solutions de contact ont subi une dilution d'un facteur 1/2 ou 1/5 dans la phase mobile pour avoir une concentration finale en UO_2^{2+} de 10⁻⁴ mol L⁻¹ dans l'échantillon de travail.

➤ *Pour le système UO_2^{2+} -pS1368-linS1368*

Les solutions de contact UO_2^{2+} -pS1368-linS1368 ont été préparées en ajoutant les volumes nécessaires des solutions stocks d' UO_2^{2+} et de peptides pour avoir les concentrations souhaitées pour les proportions UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368 comme montre le Tableau 4. La concentration en UO_2^{2+} des solutions de contact est fixée à 5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ pour toutes les proportions.

Tableau 4 : Proportions UO_2^{2+} -xpS1368-ylinS1368 visées, avec x et y les stoechiométries des peptides par rapport à l' UO_2^{2+} .

n UO_2^{2+}	x pS1368	y linS1368
2	4	0
2	3	1
2	2	2
2	0,5	3,5
2	0	4

Les solutions de contact ont subi une dilution d'un facteur 1/5 dans la phase mobile pour avoir une concentration finale en UO_2^{2+} de 10^{-4} mol L^{-1} dans l'échantillon de travail.

4.7. Solutions de contact UO_2^{2+} -peptides en présence des métaux

➤ Pour le système $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + \text{xSr}^{2+}$

Les solutions de contact $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + \text{xSr}^{2+}$ ont été préparées en ajoutant les volumes nécessaires des solutions stocks d' UO_2^{2+} , de Sr^{2+} et de pS1368 pour avoir les concentrations souhaitées pour les proportions $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + \text{xSr}^{2+}$ comme montre la Figure 4.

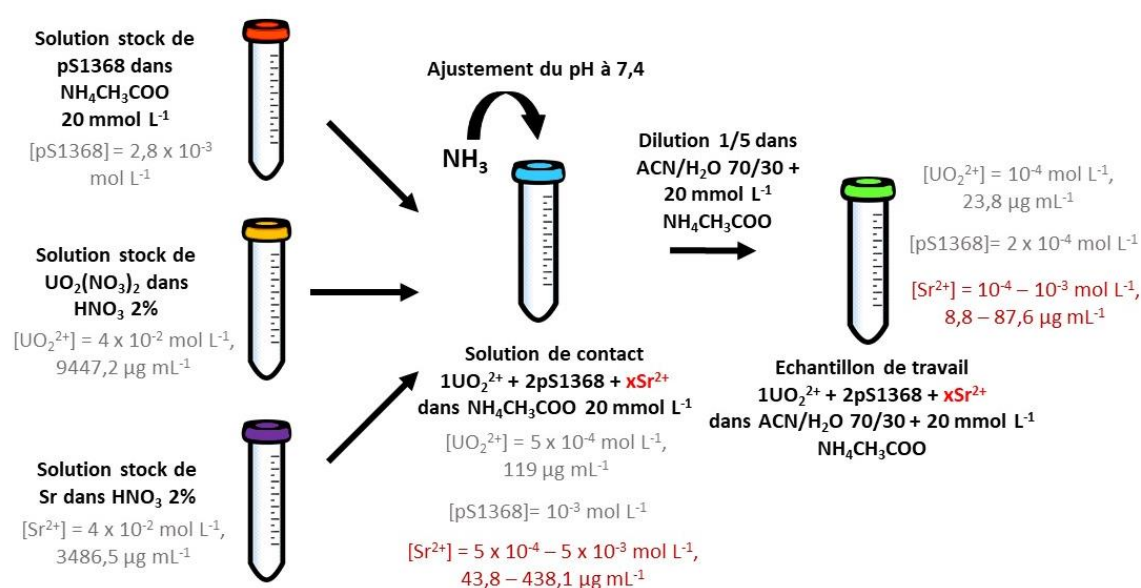


Figure 4: Procédure de préparation des échantillons $\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + \text{xSr}^{2+}$

Les proportions $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + \text{xSr}^{2+}$ visées sont présentées dans Tableau 5. La concentration en UO_2^{2+} des solutions de contact est fixée à 5×10^{-4} mol L^{-1} pour toutes les proportions.

Tableau 5 : Proportions $\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + \text{xSr}^{2+}$ visées, avec x les stœchiométries de Sr^{2+} par rapport à l' UO_2^{2+} .

UO_2^{2+}	pS1368	x Sr^{2+}
1	2	0
1	2	1
1	2	2
1	2	5
1	2	10

Les solutions de contact ont subi une dilution d'un facteur 1/5 dans la phase mobile pour avoir une concentration finale en UO_2^{2+} et en Sr^{2+} de 10^{-4} mol L^{-1} dans l'échantillon de travail.

➤ Pour le système $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 1\text{Sr}^{2+} + 1\text{Cu}^{2+} + 1\text{Zn}^{2+}$

La solution de contact $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 1\text{Sr}^{2+} + 1\text{Cu}^{2+} + 1\text{Zn}^{2+}$ a été préparée en ajoutant les volumes nécessaires des solutions stocks de chaque élément et de pS1368 pour avoir une concentration équimolaire de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pour chacun, comme montre la Figure 5.

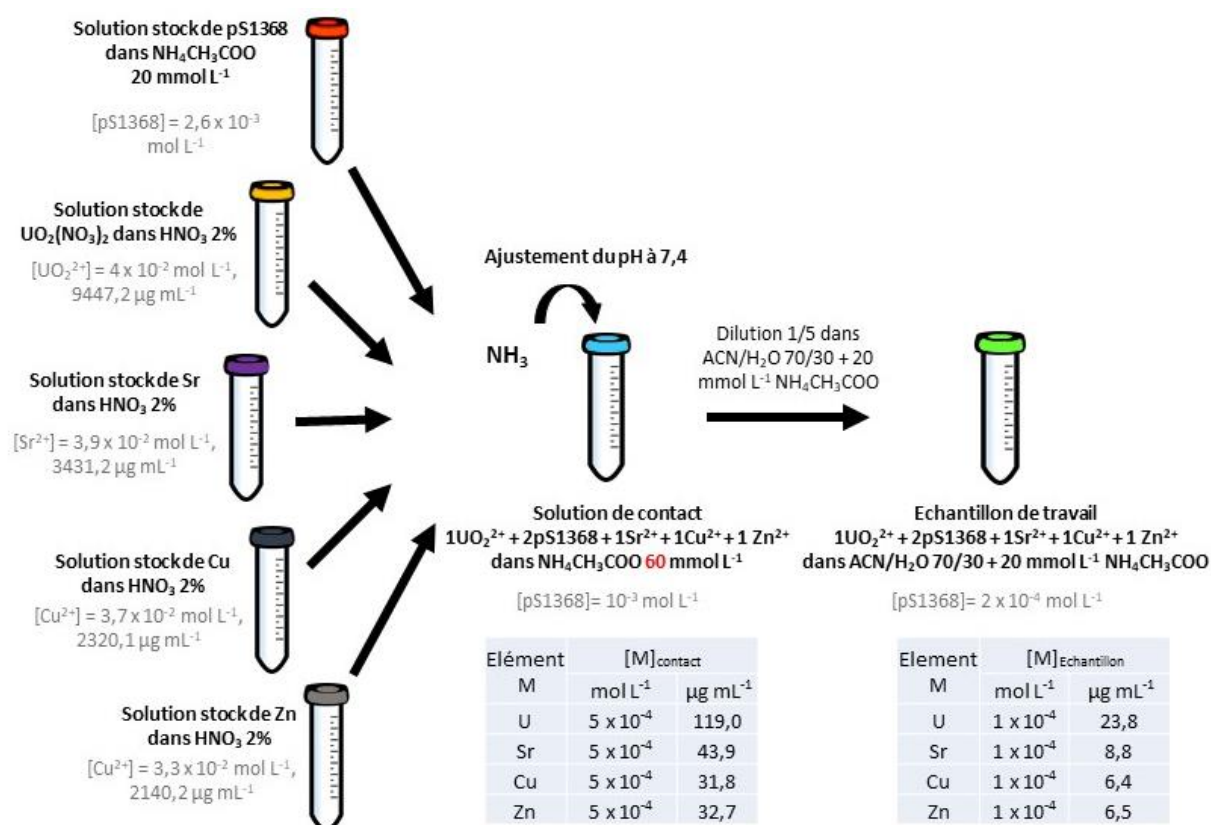


Figure 5 : Procédure de préparation de l'échantillon modèle $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 1\text{Sr}^{2+} + 1\text{Cu}^{2+} + 1\text{Zn}^{2+}$

La solution de contact a subi une dilution d'un facteur 1/5 dans la phase mobile pour avoir une concentration finale de $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pour chaque élément dans l'échantillon de travail.

5. Instrumentation

5.1. Conditions chromatographiques

Les séparations ont été réalisées avec une chaîne chromatographique Ultimate 3000 UHPLC+ focused (Dionex/ThermoFisher, Courtaboeuf, France), constituée d'un dégazeur, d'une double pompe RS, d'un passeur d'échantillons thermostaté RS, d'un four de colonne thermostaté RS, d'un détecteur UV et d'un système d'acquisition des données (logiciel XCalibur version 2.1.0.1139.)

Les colonnes sont déstockées avec 100% ACN ou 100 % isopropanol pour celles stockées dans l'hexane et ensuite conditionnées avec 70/30 ACN/H₂O. Enfin, elles sont conditionnées sous la phase mobile de travail 20 x le volume de la colonne. Le débit de la phase mobile a été fixé à $300 \mu\text{L min}^{-1}$ pour toutes

les colonnes et le volume injecté est de 3 μL . Le temps mort a été déterminé par UV-VIS à 254 nm en injectant 1 μL d'un marqueur non retenu, le toluène. Le passeur d'échantillons ainsi que la colonne ont été maintenus à 22°C pour toutes les analyses.

5.1.ESI-MS

L'instrument utilisé est un spectromètre de masse TSQ Quantum Ultra™ Triple Stage Quadrupole (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) équipé d'une source d'ionisation H-ESI II et d'un triple quadripôle (ESIMS-QqQ). Les paramètres de source tels que la position de la sonde, la tension du spray, les débits de gaz séchant et auxiliaire, la température de vaporisation et l'optique ionique ont été optimisés en infusion directe à 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ afin d'obtenir le signal le plus intense et stable possible. En mode couplage à 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ la température du vaporiseur, le gaz séchant, le gaz auxiliaire et la température du tube de transfert ont été ajustés en fonction du débit et en suivant les recommandations du constructeur. Les paramètres de source et d'acquisition utilisés en mode injection directe (débit = 10 $\mu\text{L min}^{-1}$) et en mode couplage (débit = 300 $\mu\text{L min}^{-1}$) sont rassemblés dans les Tableau 6 et Tableau 7.

Tableau 6 : Paramètres de source optimisés pour les deux modes d'injection

Paramètres de source	Injection directe (Débit 10 $\mu\text{L min}^{-1}$)	Couplage HILIC-ESIMS (Débit 300 $\mu\text{L min}^{-1}$)
Position de la sonde (profondeur)	A-B	B-C
Position de la vis micrométrique (Avant/arrière)	1,75	1,75
Position latérale (-1 à +1)	0	0
Tension du spray (V)	3500	3500
Température de vaporiseur (°C)	90	120
Gaz séchant (unité arbitraire)	20	40
Gaz auxiliaire (unité arbitraire)	10	15
Température du capillaire (°C)	280	360
Skimmer offset (V)	0	0

Tableau 7 : Paramètres d'acquisition sélectionnés pour les deux modes d'injection

Paramètres d'acquisition	Injection directe (Débit 10 $\mu\text{L min}^{-1}$)	Couplage HILIC-ESIMS (Débit 300 $\mu\text{L min}^{-1}$)
Mode d'acquisition		Centroïde
Polarité		Négatif
Temps de scan		0,7 s
Résolution/largeur du pic de masse à mi-hauteur		0,5 u
Le nombre de micro scans		1
Nombre de scan	100	-
Modes de balayage	FS	FS + SIM

FS : Full Scan

SIM : Single Ion Monitoring

Les modes de balayages FS et SIM sont caractérisés par :

- SIM : Application de différents filtres de masses centrés sur le rapport m/z caractéristique de l'espèce d'intérêt avec une fenêtre d'isolation de $\Delta m = 1$ pour les peptides libres et les complexes UO_2^{2+} -peptides et ajustée selon le motif isotopique des autres métaux Sr^{2+} , Zn^{2+} et Cu^{2+}
- FS : Sélection d'une gamme de masse étendue : m/z [400-1500]

5.2.ICP-MS

L'instrument utilisé est un ICPMS-quadrupolaire XSeries II (Thermo Scientific, Bremen, Allemagne) équipé d'un PC3X (Elemental Scientific, ESI, Omaha, NE, USA) permettant de refroidir par effet Peltier la chambre de nébulisation. Un débit de 8 mL min^{-1} d'oxygène a été introduit dans le plasma par l'intermédiaire de la chambre de nébulisation afin d'éviter tout dépôt de carbone sur les cônes, lié à l'utilisation du solvant organique. L'ICP-MS était équipé d'un micro-nébuliseur téflon PFA-ST à $200 \mu\text{L min}^{-1}$ (Elemental Scientific, ESI, Omaha, NE, USA), d'une chambre de nébulisation cyclonique thermostatée à 2°C (Elemental Scientific, ESI, Omaha, NE, USA), d'un injecteur de diamètre interne 1 mm (Thermo Scientific), d'une torche en quartz (Thermo Scientific), d'un cône échantillonneur et éxcreteur en platine (Thermo Scientific). Les données ont été acquises avec le logiciel Plasmalab (Thermo Fisher). Les paramètres de la source de l'ICP-MS et du système de focalisation des ions ont été optimisés quotidiennement par injection d'une solution d'U à 25 ng mL^{-1} (ppb) d'une part et la solution de HNO_3 2% d'autre part, infusés en continu par l'intermédiaire du fluigent afin d'avoir environ 1 ng mL^{-1} d'U qui atteint l'ICP-MS dans des conditions qui simulent exactement celles en mode couplage (Figure 6).

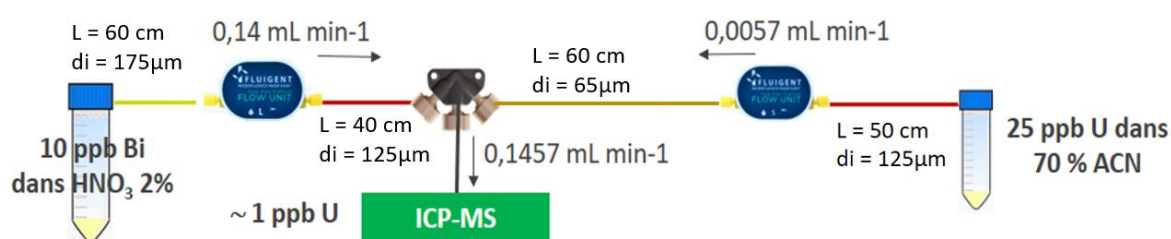


Figure 6 : Procédure de vérification quotidienne des performances de l'ICP-MS

Les paramètres de source appliqués en ICP-MS sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Paramètres de source en ICP-MS

Gaz plasmagène (L min^{-1})	15
Gaz auxiliaire (L min^{-1})	0,92
Gaz de nébulisation (L min^{-1})	0,69
Oxygène (mL min^{-1})	8

Paramètres d'acquisition :

- Les signaux des isotopes de ^{238}U , de ^{88}Sr , ^{63}Cu et ^{64}Zn sont suivis avec un temps d'intégration (Dwell time) de 90 ms.

5.3. Couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS

Le couplage simultané HILIC-ESI-MS /ICP-MS a été réalisé en laboratoire conventionnel en respectant les contraintes imposées par le dispositif implanté en zone contrôlée. Le dimensionnement du couplage est représenté dans la Figure 7.

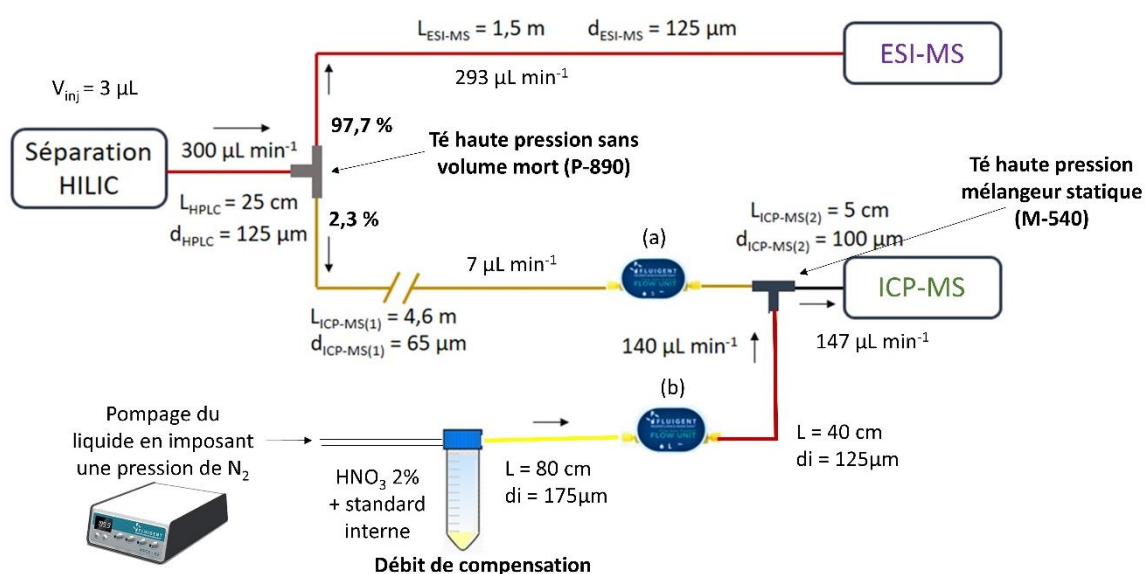


Figure 7 : Schéma du dimensionnement du couplage simultané HILIC-ESI-MS/ICP-MS

Les temps de rétention observés en ICP-MS sont décalés d'environ 2 min par rapport à ceux observés en ESI-MS, ce qui est dû à la longueur de la tubulure allant vers l'ICP-MS.

6. Mise au point de la méthode de quantification par ICP-MS

➤ Pour les expériences du chapitre 4

6.1. Préparation des solutions étalons d'U

Les solutions étalons contenant l'U en concentrations croissantes varient entre 8 et $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ en présence de pS1368 dans la phase mobile composée de 70/30 ACN/H₂O + $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ont été préparées à partir de la solution stock d' ^{nat}U à $9447,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ dans HNO₃ 2%, selon les différentes étapes présentées dans la Figure 8.

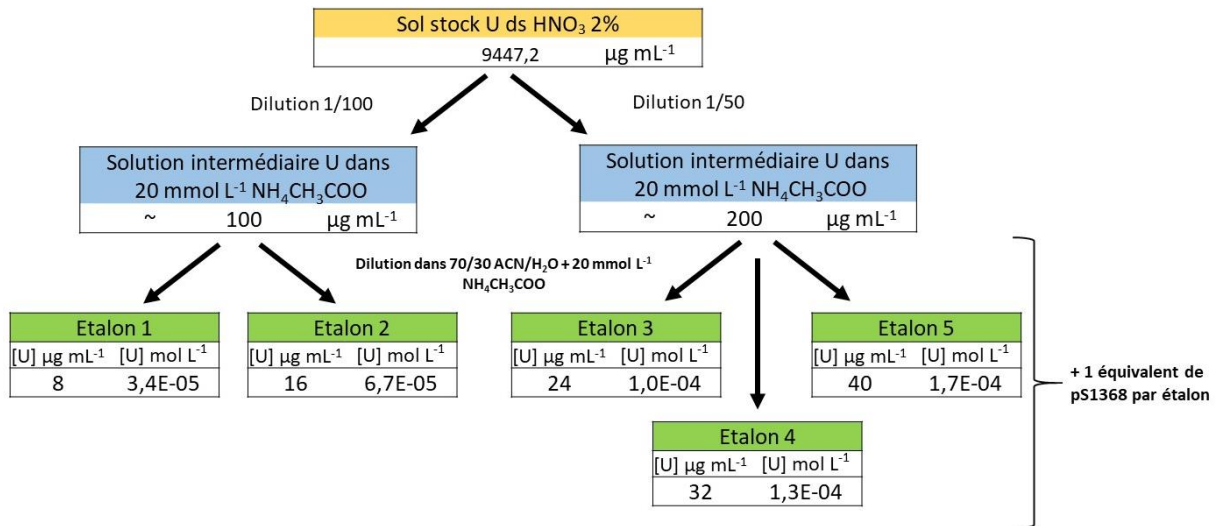


Figure 8 : Procédure de préparation des solutions étalons d'U

➤ Pour les expériences du chapitre 5

6.2. Préparation des solutions étalons d'U + Sr

Les solutions étalons contenant l'U et le Sr en concentrations croissantes varient entre 6 et 42 µg mL⁻¹ pour l'U et 6 et 92 µg mL⁻¹ pour le Sr en présence de pS1368 dans la phase mobile composée de 70/30 ACN/H₂O + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO, ont été préparée à partir de la solution stock d'^{nat}U à 9447,2 µg mL⁻¹ et Sr à 9637,96 µg mL⁻¹ dans HNO₃ 2% selon les différentes étapes présentées dans la Figure 9.

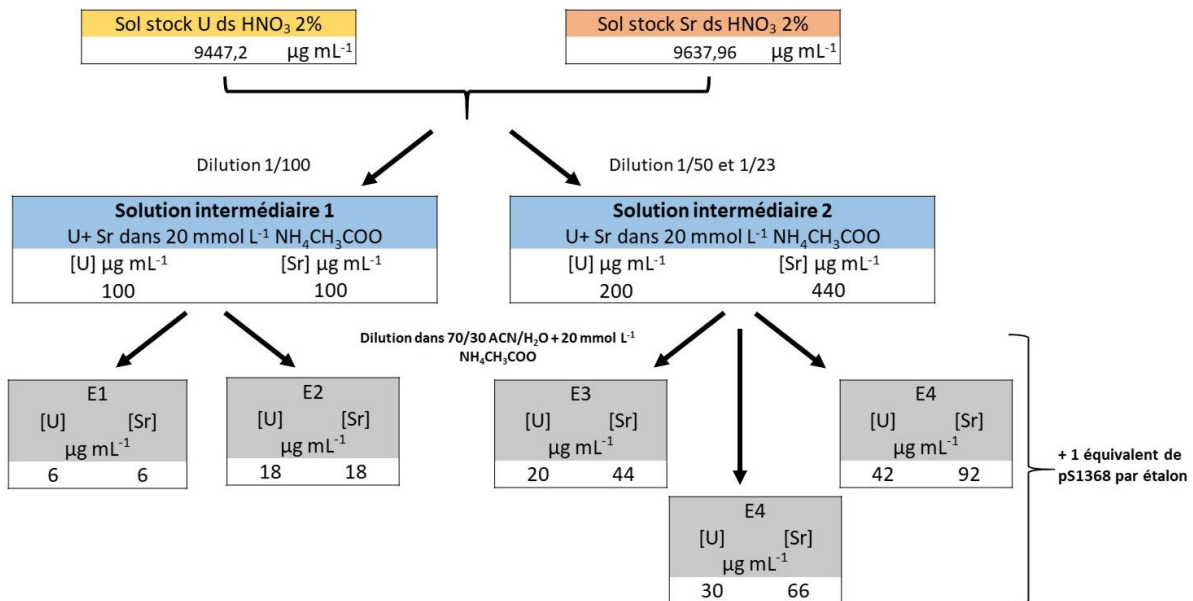


Figure 9 : Procédure de préparation des solutions étalons U + Sr

Annexe II. Constantes d'équilibre thermodynamiques

La réaction de formation des complexes d'U obéit à la loi de l'équilibre thermodynamique selon l'équation 1. Nous désignerons par U l'uranium, par L le ligand sous sa forme totalement déprotonée et par H⁺ le proton.



Cet équilibre est caractérisé par des constantes d'équilibre thermodynamiques de formation, ou de stabilité, et de dissociation. Différentes constantes de stabilité peuvent être définies selon que l'on considère la complexation sous sa forme globale ou comme une suite de réactions successives. Ces constantes sont absolues et ne dépendent pas du pH du milieu.

❖ Constante de stabilité globale

La constante de stabilité globale β_{mlh} est la constante d'équilibre de l'équation 1 :

$$\beta_{mlh} = \frac{[U_mL_lH_h]}{[U]^m[L]^l[H]^h} \quad \text{(Equation 2)}$$

Pour $m = 1, 2$ les constantes de stabilité globales s'écrivent de la manière suivante :

$$m = 1, \quad U + L \leftrightarrow UL \text{ (b)} ; \quad \beta_{110} = \frac{[UL]}{[U][L]} \quad \text{(Equation 3)}$$

$$m = 2, \quad 2U + L \leftrightarrow U_2L \text{ (c)} ; \quad \beta_{210} = \frac{[U_2L]}{[U]^2[L]} \quad \text{(Equation 4)}$$

❖ Constantes de stabilité successives

Il s'agit des constantes d'équilibre associées à chaque étape du processus de formation du complexe, comme montrent les équations 5 et 6. Les constantes de formation successives sont notées K_i .

$$U + L \leftrightarrow UL \text{ (d)} ; \quad K_1 = \frac{[UL]}{[U][L]} \quad \text{(Equation 5)}$$

$$UL + U \leftrightarrow U_2L \text{ (e)} ; \quad K_2 = \frac{[U_2L]}{[UL][U]} \quad \text{(Equation 6)}$$

❖ Relation entre constante globale β_{mlh} et constantes successives K_i

La constante de stabilité globale peut être obtenue en multipliant toutes les constantes de stabilité successives:

$$\beta_{mlh} = K_1 * K_2 \text{ (Equation 7)}$$

$$\text{Où } K_1 = \beta_{110} \text{ (Equation 8)}$$

$$\text{et } K_2 = \frac{\beta_{210}}{\beta_{110}} \quad (\text{Equation 9})$$

❖ *Constante de stabilité apparente*

Il s'agit d'une constante globale dépendante du pH du milieu, nommée également constante conditionnelle. Elle est définie par l'équation (Equation 10).

$$\beta_{\text{ml}}^{\text{pH}} = \frac{[\text{U}_m\text{L}_1]}{[\text{U}]^3[\text{L}]_{\text{tot}}^1} \quad (\text{Equation 10})$$

$$\text{Avec } [\text{L}]_{\text{tot}}^1 = [\text{L}] + [\text{LH}] + [\text{LH}_2] + \dots = \sum_i [\text{LH}_i]$$

La détermination des constantes d'équilibre thermodynamiques fournit une valeur quantitative de l'affinité d'un ligand envers le cation UO_2^{2+} .

Annexe III. Spectres de masses caractéristiques des peptides multiphosphorylés en ESI-MS

Les spectres de masse ESI-MS en mode négatif (-) obtenus par injection directe des peptides multiphosphorylés, et enregistrés en mode balayage complet (Full scan) d'une gamme de masse généralement comprise entre 400 et 1500 uma sont présentés dans les figures 10-16. Le débit d'injection est de $10 \mu\text{L min}^{-1}$ et les paramètres de sources correspondant à ce mode d'injection sont présentés dans l'annexe I.

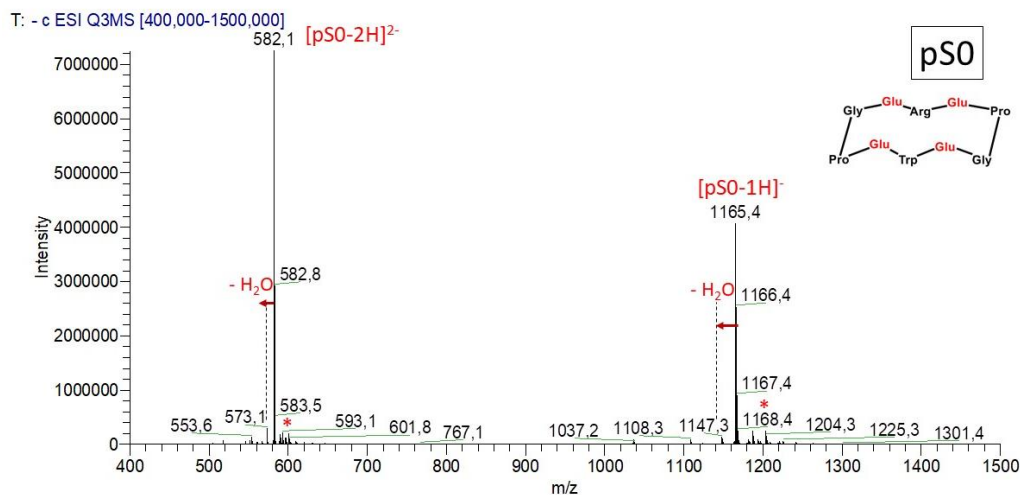


Figure 10 : Spectre de masse ESI-MS (-) du peptide pSO à $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Gamme de masse 400-1500 - largeur du pic à mi-hauteur 0,5, temps de scan 0,7, nombre de scans : 100. (*) représente des adduits de sodium.

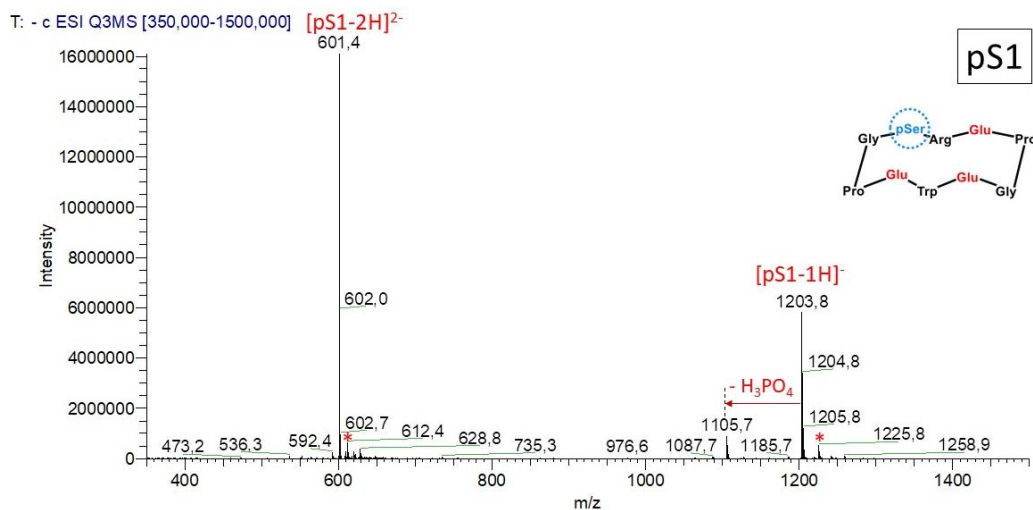


Figure 11 : Spectre de masse ESI-MS (-) du peptide pS1 à $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Gamme de masse 350-1500 - largeur du pic à mi-hauteur 0,5, temps de scan 0,7, nombre de scans : 100. (*) représente des adduits de sodium.

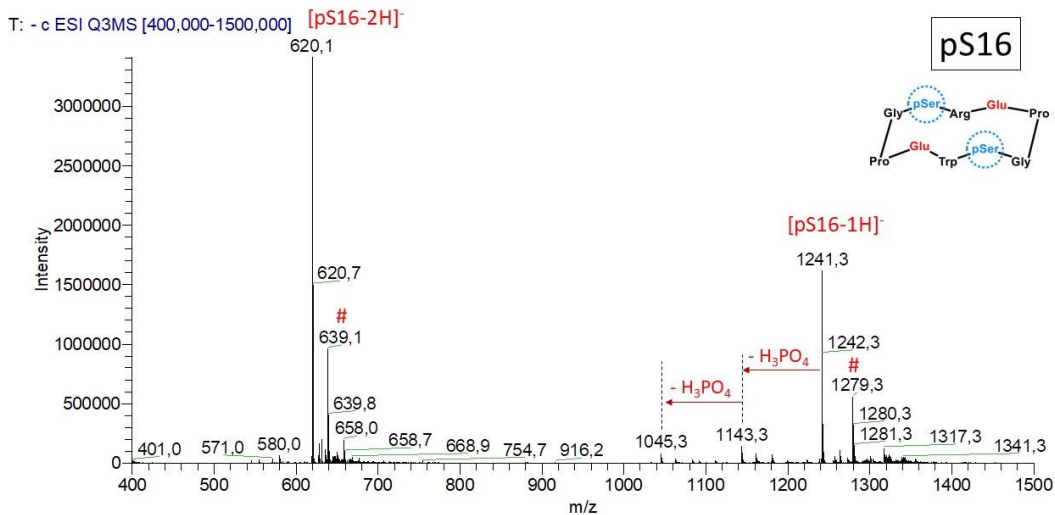


Figure 12: Spectre de masse ESI-MS (-) du peptide pS16 à 10^{-4} mol L⁻¹. Gamme de masse 400-1500 - largeur du pic à mi-hauteur 0,5, temps de scan 0,7, nombre de scans : 100. (*) représente des adduits de sodium, (#) les adduits de potassium.

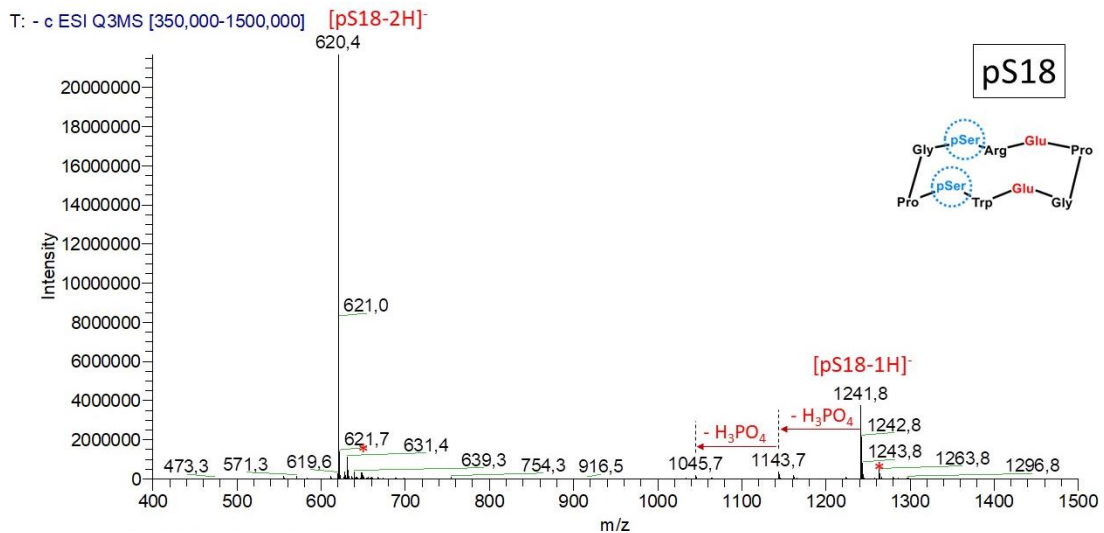


Figure 13 : Spectre de masse ESI-MS (-) du peptide pS18 à 10^{-4} mol L⁻¹. Gamme de masse 350-1500 - largeur du pic à mi-hauteur 0,5, temps de scan 0,7, nombre de scans : 100. (*) représente des adduits de sodium.

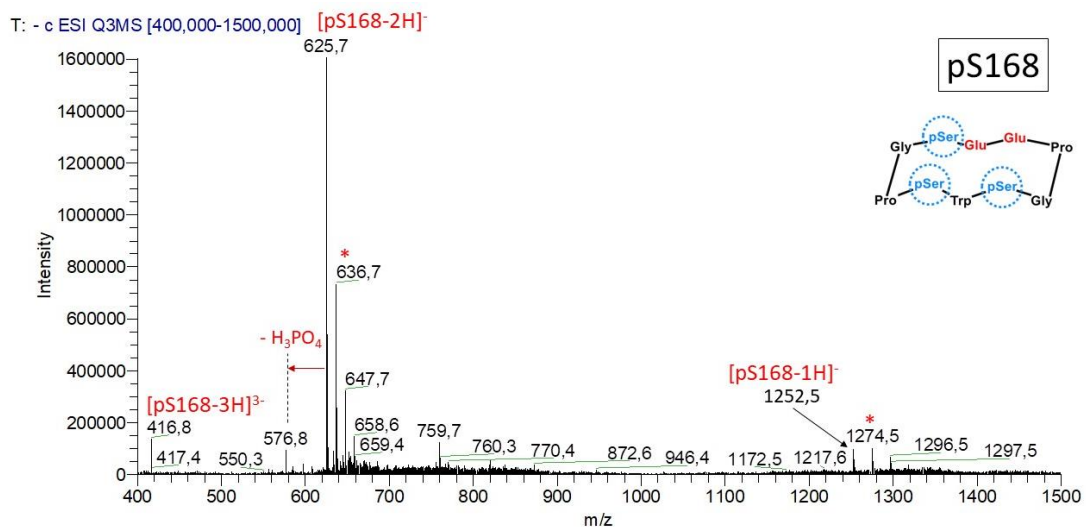
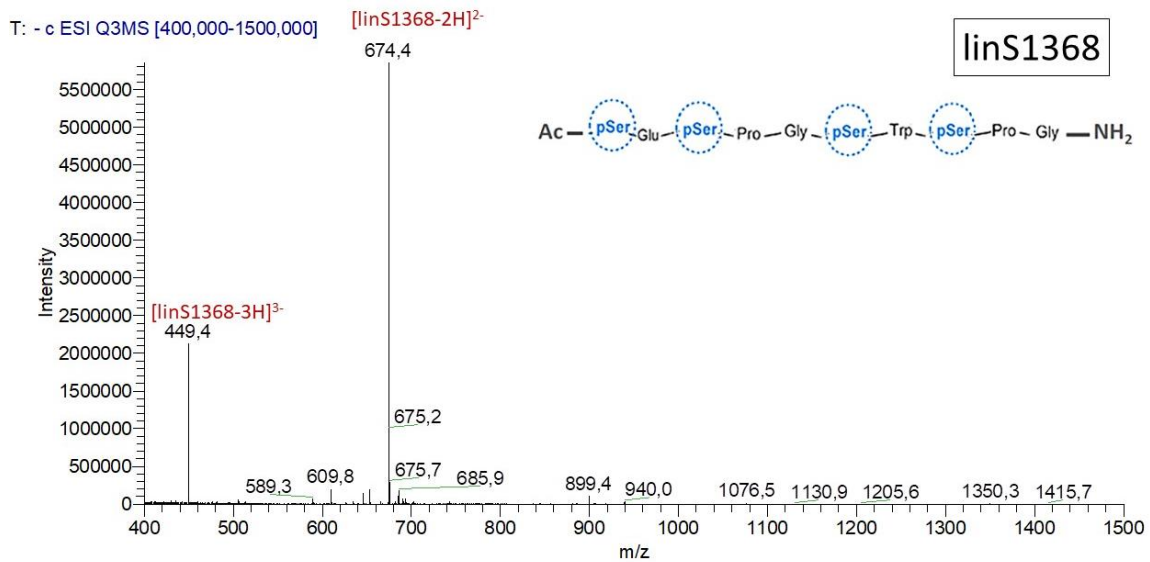
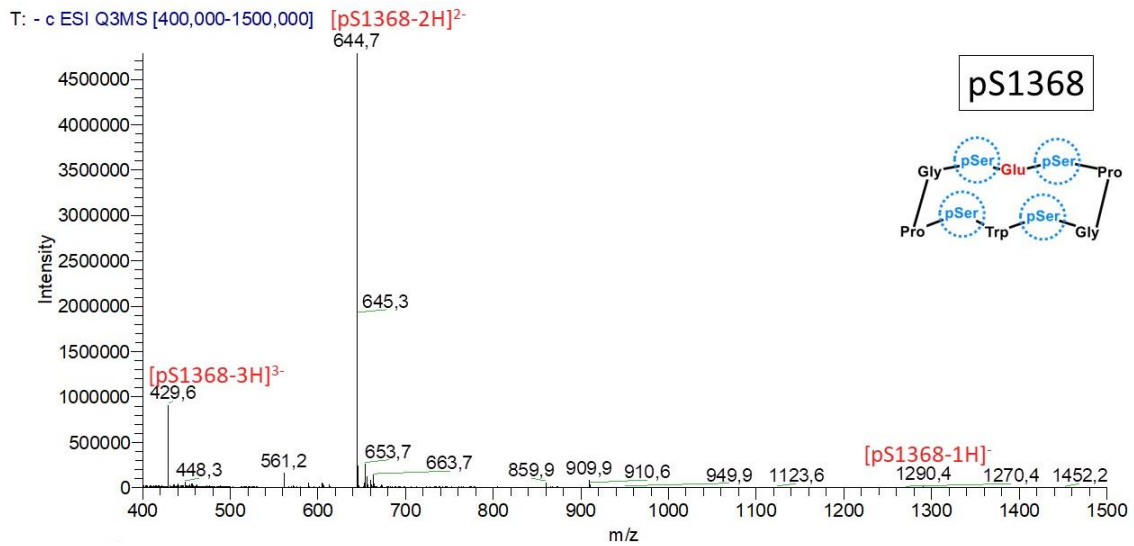


Figure 14 : Spectre de masse ESI-MS (-) du peptide pS168 à 10^{-4} mol L⁻¹. Gamme de masse 400-1500 - largeur du pic à mi-hauteur 0,5, temps de scan 0,7, nombre de scans : 100. (*) représente des adduits de sodium.



Annexe IV. Grandeurs chromatographiques

Temps de rétention et temps mort

Le temps de rétention (t_R) correspond au temps nécessaire à l'élution d'un composé de la colonne. Le temps mort (t_0) est le temps nécessaire pour qu'un composé non retenu par la phase stationnaire traverse la colonne. Pour déterminer le t_0 en mode HILIC, des composés non polaires peuvent être injectés tels que du toluène ou du naphthalène.

Facteur de rétention

En chromatographie de partage, l'élution d'un composé est fondée sa distribution successive entre la phase stationnaire et la phase mobile. Le facteur de rétention (k') permet de mesurer le temps qu'un composant passe dans la phase stationnaire par rapport au temps qu'il passe dans la phase mobile. Il est calculé à partir du temps de rétention du composé (t_R) et du temps mort (t_0) comme le montre la Figure 17.

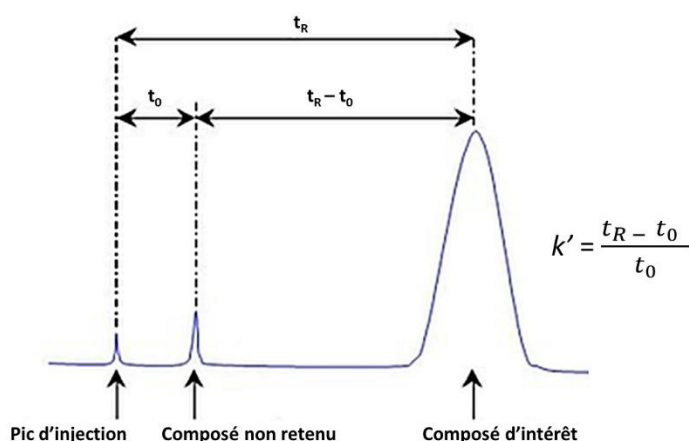


Figure 17: Représentation schématique du calcul du facteur de rétention k' à partir du temps de rétention du composé (t_R) et du temps mort (t_0)

Lorsque $k' = 0$, à savoir $t_R = t_0$, le composé n'est pas retenu dans la colonne. Plus k' est grand plus le composé est retenu.

Le facteur k' permet de caractériser la rétention d'un composé tout en s'affranchissant des paramètres géométriques d'une colonne.

Facteur de sélectivité

Le facteur de sélectivité α permet de mesurer la distance entre les maxima de deux pics consécutifs de composés a et b. Il est calculé en rapportant le facteur de rétention du composé b (k'_b), le plus retenu, à celui du composé a (k'_a), comme le montre l'Equation 11.

$$\alpha = \frac{k'_b}{k'_a} \quad (\text{Equation 11})$$

Si $\alpha = 1$, les deux pics ont le même temps de rétention et sont co-élus. Ainsi, α doit être supérieure à 1 pour assurer une bonne séparation des deux pics.

Facteur de résolution

Le facteur de résolution R_s permet de décrire la qualité de la séparation des pics consécutifs de deux composés a et b en tenant compte de leur temps de rétention (t_R) et de leur largeur à mi-hauteur ($W_{0,5h}$) comme montré dans l'Equation 12.

$$R_s = 1,8 \times \left(\frac{t_{Rb} - t_{Ra}}{W_{0,5h_a} + W_{0,5h_b}} \right) \quad (\text{Equation 12})$$

Pour séparer les deux pics des composés a et b avec un bon retour à la ligne de base, un $R_s = 1,5$ doit être obtenu, comme le montre la Figure 18.

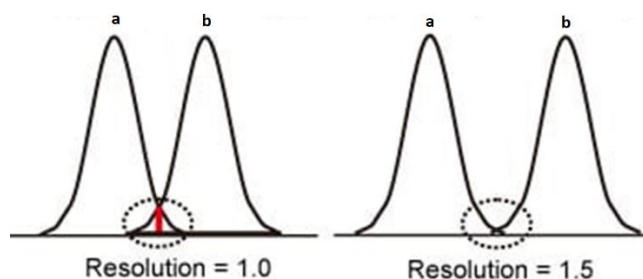


Figure 18 : Représentation schématique de la qualité de séparation de deux pics pour un facteur R_s de 1 et de 1,5.

Pour un R_s inférieur à 1,5, un chevauchement de pics est observé. Ainsi, le facteur R_s doit être toujours supérieur ou égal à 1,5.

Facteur d'asymétrie

L'asymétrie du pic est définie par un facteur d'asymétrie qui est déterminé à 10% de la hauteur du pic selon l'équation 13.

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (\text{Equation 13})$$

Avec b : la largeur du pic à 10% de la hauteur après le sommet du pic et a : la largeur du pic à 10% de la hauteur avant le sommet du pic (Figure 19).

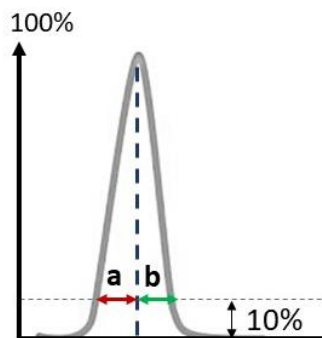


Figure 19 : Représentation schématique des paramètres a et b pour le calcul du facteur d'asymétrie d'un pic.

- Si A_s est égal à 1, le pic est symétrique (cas idéal).
- Si A_s est supérieur à 1, alors $b > a$. Cela se traduit par une trainée de pic sur le chromatogramme indiquant une forte interaction des composés avec la phase stationnaire.
- Si A_s est inférieur à 1, alors $a > b$. Un front diffus est alors observable sur le chromatogramme dû à la surcharge du système ou à un problème de solubilité.

Annexe V : Données chromatographiques du chapitre III

Les grandeurs chromatographiques : facteur de rétention (k'), largeur à mi-hauteur du pic (FWHM), la sélectivité (α) et la résolution (R_s) ont été calculées à partir des formules décrites dans l'annexe IV. Le chromatogramme correspondant à chaque peptide a été enregistré en mode SIM centré sur le rapport m/z du peptide dichargé avec une fenêtre d'isolation de $\Delta m = 1$. Les pics obtenus au niveau de chaque chromatogramme ont été traités par le logiciel Origin Pro 2018 pour calculer la largeur à mi-hauteur du pic.

Annexe V.1. Les colonnes en silice vierge non greffées

YMC-Pack Sil	67 % ACN							
		ps0	ps8	ps168	ps1	ps1368	ps18	ps16
	k'	3,3	5,7	11,2	14,5	18,6	21,4	27,0
	FWHM	0,3	0,6	1,4	1,2	3,7	1,7	2,5
	α	1,7	2,0	1,3	1,3	1,2	1,3	
	R_s	3,1	3,2	1,5	1,0	0,6	1,6	
	65 % ACN							
		ps0	ps8	ps168	ps1	ps1368	ps18	ps16
	k'	2,0	3,6	6,1	8,9	9,2	12,4	15,7
	FWHM	0,2	0,4	0,6	0,8	0,9	1,1	2,0
	α	1,8	1,7	1,5	1,0	1,3	1,3	
	R_s	2,9	2,8	2,3	0,2	1,9	1,3	
	63 % ACN							
		ps0	ps8	ps168	ps1368	ps1	ps18	ps16
	k'	1,5	2,3	3,3	5,1	5,7	7,7	9,8
	FWHM	0,1	0,3	0,4	0,6	0,6	0,7	1,5
	α	1,5	1,4	1,5	1,1	1,4	1,3	
	R_s	2,1	1,8	2,2	0,6	1,8	1,1	

Hypersil Gold Silica	67 % ACN							
		ps0	ps8	ps168	ps1368	ps1	ps18	ps16
	k'	1,4	1,9	2,8	4,5	5,7	6,8	8,0
	FWHM	0,2	0,3	0,6	0,8	0,6	0,6	1,2
	α	1,4	1,5	1,6	1,3	1,2	1,2	
	R_s	1,2	1,2	1,5	1,2	1,1	0,8	
	65 % ACN							
		ps0	ps8	ps168	ps1368	ps1	ps18	ps16
	k'	1,0	1,5	2,0	2,8	4,5	5,1	6,2
	FWHM	0,2	0,3	0,6	0,4	0,4	0,5	1,1
	α	1,5	1,4	1,4	1,6	1,1	1,2	
	R_s	1,1	0,8	1,1	2,7	0,9	0,9	
	63 % ACN							
		ps0	ps8	ps168	ps1368	ps1	ps18	ps16
	k'	0,3	0,5	ND	ND	2,0	2,1	2,6
FWHM	0,2	0,4	ND	ND	0,4	0,3	0,6	
α	2,0	3,7	1,0	1,3				
R_s	0,6	2,7	0,2	0,8				

YMC-Triart SIL	69 % ACN							
		ps0	ps8	ps168	ps1368	ps1	ps18	ps16
	k'	3,7	4,7	5,1	7,1	8,9	9,3	12,8
	FWHM	0,2	0,5	0,6	0,8	0,7	0,9	1,4
	α	1,3	1,1	1,4	1,3	1,1	1,4	
	R_s	1,4	0,4	1,6	1,3	0,3	1,6	
	68 % ACN							
		ps0	ps8	ps168	ps1368	ps1	ps18	ps16
	k'	3,0	3,8	3,9	5,2	7,0	7,4	9,9
	FWHM	0,2	0,4	0,4	0,5	0,6	0,7	1,2
	α	1,3	1,0	1,3	1,3	1,1	1,3	
	R_s	1,3	0,1	1,5	1,7	0,4	1,3	

Annexe V.2. Les colonnes à greffage diols

Inertsil Diol	72 % ACN							
		ps0	ps8	ps1	ps18	ps16	ps168	ps1368
	k'	2,8	3,2	3,9	4,4	4,9	5,1	5,7
	FWHM	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,6	0,9
	α	1,1	1,2	1,1	1,1	1,0	1,1	
	R_s	0,6	1,2	0,7	0,8	0,2	0,6	
	75 % ACN							
		ps0	ps8	ps1	ps18	ps16	ps168	ps1368
	k'	5,8	6,9	9,2	10,2	12,3	13,6	15,7
	FWHM	0,6	0,7	0,7	0,9	0,9	1,2	1,6
	α	1,2	1,3	1,1	1,2	1,1	1,2	
	R_s	1,1	2,0	0,8	1,5	0,8	1,0	

YMC-Triart Diol	72 % ACN							
		ps0	ps8	ps1	ps18	ps168	ps1368	ps16
	k'	4,6	5,4	7,6	8,3	8,6	10,3	10,4
	FWHM	0,2	0,4	0,3	0,5	0,6	0,8	0,6
	α	1,2	1,4	1,1	1,0	1,2	1,0	
	R_s	1,2	3,0	0,7	0,3	1,1	0,1	
	74 % ACN							
		ps0	ps8	ps1	ps18	ps168	ps16	ps1368
	k'	7,4	9,3	13,6	15,0	17,1	19,3	20,9
	FWHM	0,3	0,5	0,5	0,8	0,8	0,9	1,2
	α	1,3	1,5	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
	R_s	2,1	4,1	1,1	1,3	1,1	1,1	0,7
	75 % ACN							
		ps0	ps8	ps1	ps18	ps168	ps16	ps1368
	k'	10,0	13,0	19,1	21,5	25,6	28,0	32,3
FWHM	0,4	0,7	0,6	1	1,3	1,1	1,6	
α	1,3	1,5	1,1	1,2	1,1	1,2		
R_s	2,6	4,4	1,4	1,7	0,9	1,5		

Annexe V.3. La colonne acclain HILIC-10

Acclain HILIC-10	72 % ACN							
		ps0	ps8	ps168	ps1368	ps18	ps1	ps16
	k'	2,8	3,0	3,4	3,4	3,5	3,8	4,4
	FWHM	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5
	α	1,1	1,1	1,0	1,0	1,1	1,2	
	R_s	0,6	0,7	0,0	0,2	0,4	1,0	
	75 % ACN							
		ps0	ps8	ps168	ps1368	ps18	ps1	ps16
	k'	4,8	5,2	6,0	6,2	6,3	6,5	8,0
	FWHM	0,4	0,5	0,6	0,9	0,6	0,5	0,8
	α	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0	1,2	
	R_s	0,7	1,1	0,2	0,1	0,3	1,7	
	77 % ACN							
		ps0	ps8	ps168	ps18	ps1368	ps1	ps16
	k'	6,8	7,5	8,8	9,2	9,3	9,7	11,4
FWHM	0,6	0,8	0,9	1,0	1,4	0,9	1,4	
α	1,1	1,2	1,0	1,0	1,0	1,2		
R_s	0,7	1,2	0,3	0,1	0,3	1,1		
80 % ACN								
	ps0	ps8	ps18	ps168	ps1	ps1368	ps16	
k'	14,7	16,8	22,5	22,9	23,2	25,8	28,5	
FWHM	1,2	1,5	2,1	2,5	1,8	3,8	3,0	
α	1,1	1,3	1,0	1,0	1,1	1,1		
R_s	1,2	2,4	0,1	0,1	0,7	0,6		

Annexe V.4. La colonne à greffage zwitterionique

ZIC-pHILIC	72 % ACN							
		ps0	ps8	ps1	ps18	ps16	ps1368	ps168
	k'	3,6	4,9	6,2	7,3	8,8	13,4	13,6
	FWHM	0,4	0,4	0,5	0,6	0,7	1,3	1,9
	α	1,3	1,3	1,2	1,2	1,5	1,0	
	R_s	1,8	1,7	1,2	1,3	2,8	0,1	
	74 % ACN							
		ps0	ps8	ps1	ps18	ps16	ps1368	ps168
	k'	6,0	8,0	10,4	12,5	15,4	21,7	22,5
	FWHM	0,5	0,7	0,7	1,0	1,0	2,0	4,4
	α	1,3	1,3	1,2	1,2	1,4	1,0	
	R_s	2,0	2,1	1,5	1,7	2,4	0,1	
	76 % ACN							
		ps0	ps8	ps1	ps18	ps16	ps1368	ps168
	k'	10,1	14,1	19,0	23,0	29,0	39,4	40,8
	FWHM	0,7	1,0	1,0	1,6	1,6	3,5	8,6
	α	1,4	1,4	1,2	1,3	1,4	1,0	
	R_s	2,7	2,8	1,8	2,2	2,4	0,1	

Annexe VI. Déconvolution du pic d'U pour quantifier la proportion du complexe ternaire $\text{UO}_2(\text{Sr})(\text{pS1368})$

Comme montré dans le chapitre 5, pour un échantillon contenant $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368}$ en présence de 4,7 et 8 équivalents de Sr^{2+} , un épaulement du pic d'U est observé en ICP-MS. Cet épaulement a été identifié comme pic correspondant à un complexe ternaire $\text{UO}_2(\text{Sr})(\text{pS1368})$, faiblement résolu du pic du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ comme le montre la Figure 20.

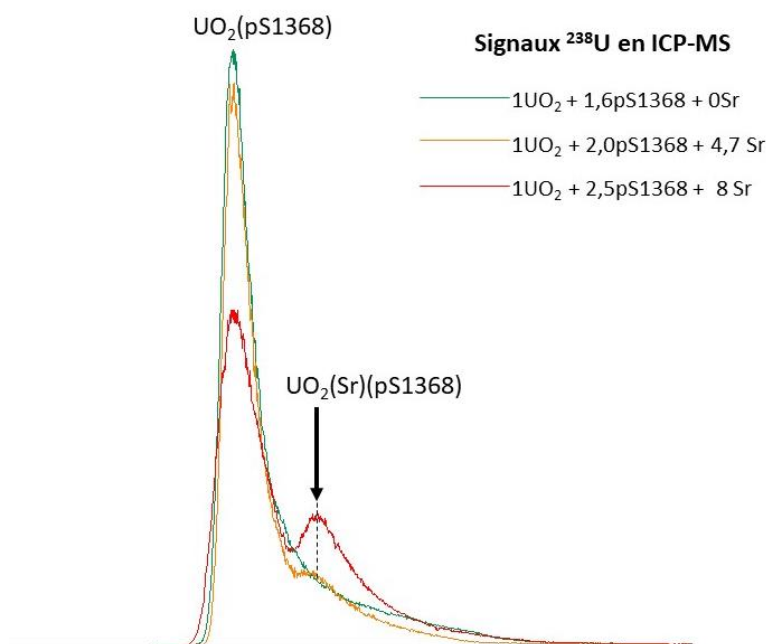


Figure 20 : Superposition des profils d'élution obtenus par ICP-MS du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ dans les échantillons $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + x\text{Sr}^{2+}$

Comme observé dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** 20, le pic du complexe ternaire est élué au niveau de la trainée du pic du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$. Dans le chapitre 4, on a démontré qu'au niveau de cette trainée existe une zone dynamique d'échange entre UO_2^{2+} et pS1368. Il est donc important de déterminer la contribution de cette zone d'échange à l'aire du pic de $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ dans l'échantillon $1\text{UO}_2 + 1,6\text{pS1368} + 0\text{Sr}$. Pour ce faire, le pic $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ a été divisé en deux zones (Figure 21) en se basant sur les données obtenues en ESI-MS et montrées dans le chapitre 4.

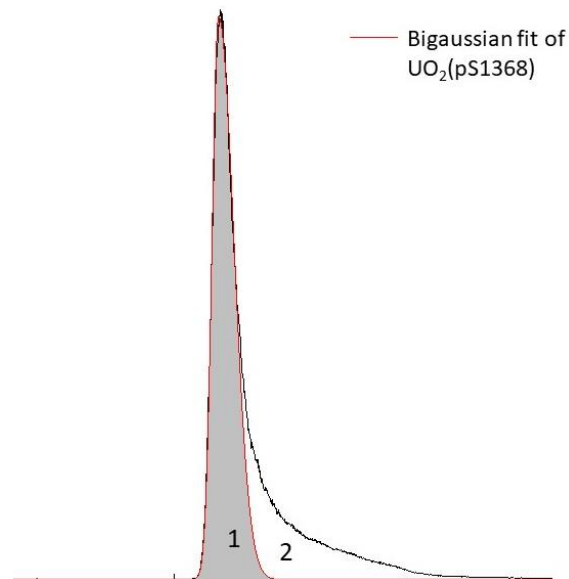


Figure 21 : Ajustement d'un pic théorique de fonction bigaussienne au pic d'U du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ de l'échantillon $1\text{UO}_2 + 1,6\text{pS1368} + 0\text{Sr}$

Une zone 1 définie par un pic théorique de fonction bigaussienne correspond au complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ et une zone 2 correspond à l'échange dynamique. Par soustraction de l'aire totale du pic de celle du pic bigaussien ajusté, la proportion de l'échange dynamique (zone 2) a été déterminée par rapport à la zone 1 pour deux injections différentes du même échantillon et est de l'ordre de 42,9% et 47,3, avec un écart relatif de 9% entre les deux valeurs. Un ajustement du pic théorique de fonction bigaussienne a été également réalisé pour les profils d'élution de l'U correspondants aux échantillons $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368}$ en présence de 4,7 et 8 équivalents de Sr^{2+} (Figure 22).

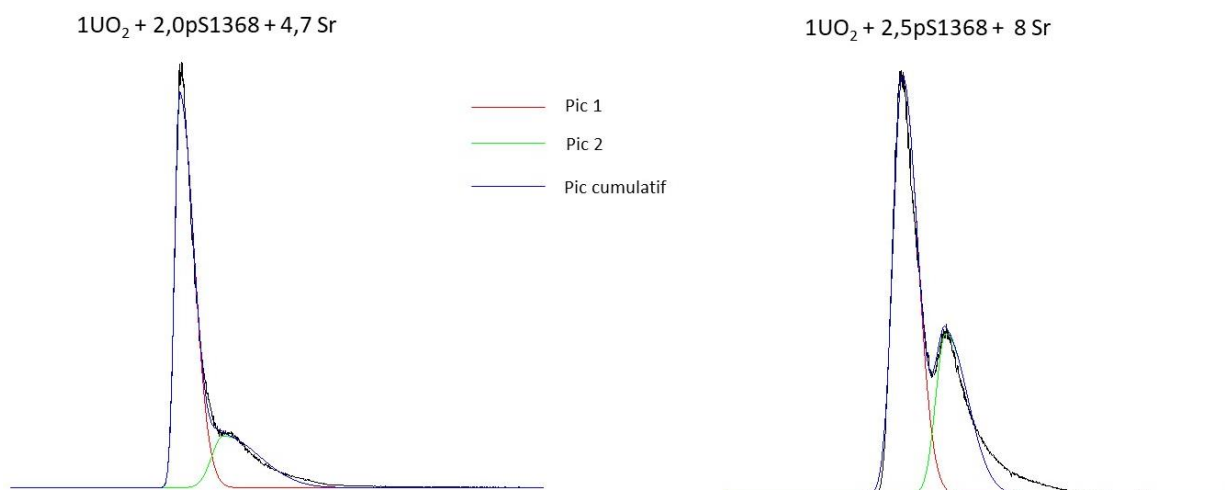


Figure 22 : Ajustement d'un pic théorique à fonction bigaussienne aux pic d'U des complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$ des échantillons $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368}$ en présence de 4,7 et 8 équivalents de Sr^{2+}

Comme le montre la Figure 22, un pic théorique de fonction bigaussienne n'a pas été adapté à la définition du pic de l'épaulement de l'U. L'ajustement d'autres pics théoriques à différentes fonctions a été réalisé mais aucun n'a été adapté à ce profil.

Afin d'avoir une idée de la proportion de la zone 2 par rapport à la zone 1 pour les pics correspondants aux échantillons $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368}$ en présence de 4,7 et 8 équivalents de Sr^{2+} , avec zone 2 = échange dynamique + complexe ternaire, une soustraction de l'aire totale du pic de celle du pic théorique bigaussien a été réalisée. Pour l'échantillon $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 4,7 \text{Sr}^{2+}$ et $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 8\text{Sr}^{2+}$, la zone 2 constitue 55% et 35 % de la zone 1 respectivement.

Annexe VII. Suivi de la concentration des métaux Sr^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} en milieu $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$

La concentration des éléments Sr^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} dans la solution de contact en milieu 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, a été suivie pendant trois jours consécutifs selon la démarche présentée dans la Figure 22.

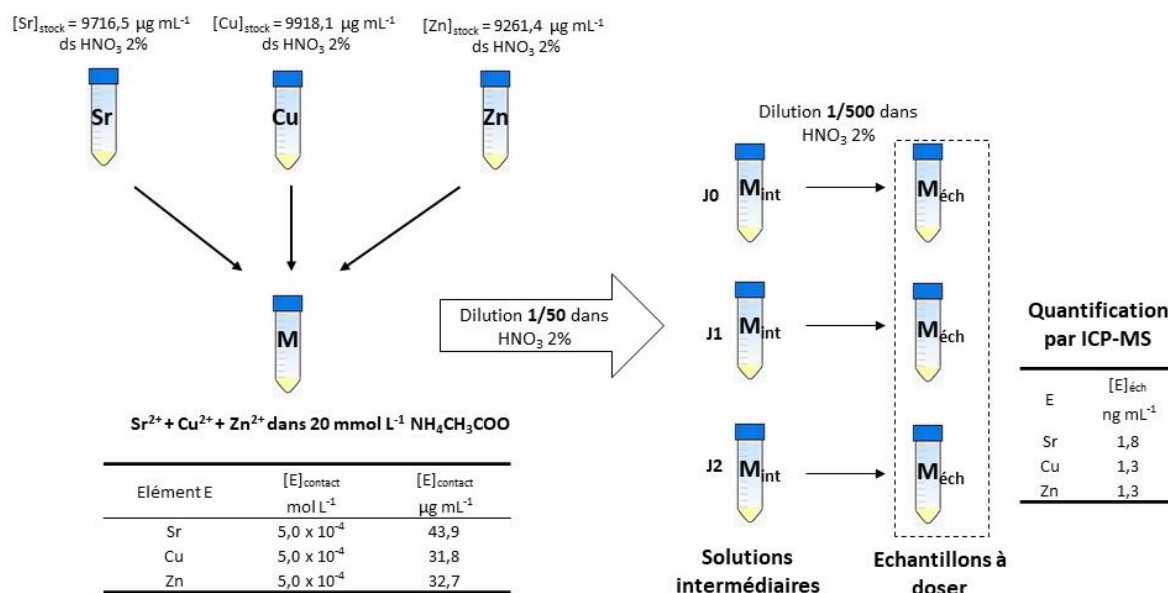


Figure 22 : Procédure de préparation de la solution de contact $\text{Sr}^{2+} + \text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$ en milieu 20 mmol L^{-1} $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ et du suivi de leur concentration pendant 3 jours consécutifs par ICP-MS.

D'après la Figure 22, la solution de contact contenant les éléments Sr^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} a été préparée en ajoutant le volume nécessaire des solutions stocks correspondantes pour atteindre une concentration ciblée de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ pour chaque élément, à savoir 43,9, 31,8 et 32,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pour Sr^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} respectivement. Le pH a été ajusté à $\text{pH}=7,4$ en ajoutant le volume nécessaire de NH_3 (20-22%). Trois prélèvements ont été réalisés en J0, J1 et J2 pour préparer les solutions intermédiaires en réalisant une dilution d'un facteur 1/50 dans HNO_3 2%. Les solutions intermédiaires correspondantes à chaque prélèvement ont subi ensuite une dilution supplémentaire d'un facteur 1/500 dans HNO_3 2% pour obtenir les échantillons à doser. Ces échantillons ont été quantifiés hors ligne par étalonnage externe en ICP-MS en milieu HNO_3 2%. Pour ce faire, des solutions étalons contenant les trois éléments ont été préparées en milieu HNO_3 2% à partir des solutions SPEX certifiées. Ces dernières ont subi les dilutions nécessaires dans HNO_3 2% pour avoir une gamme de concentration comprise entre 0,4 et 7 ng mL^{-1} . Les solutions étalons ainsi que les solutions intermédiaires et les échantillons ont été préparées par pesée. Les droites d'étalonnages correspondantes sont présentées dans la Figure 23.

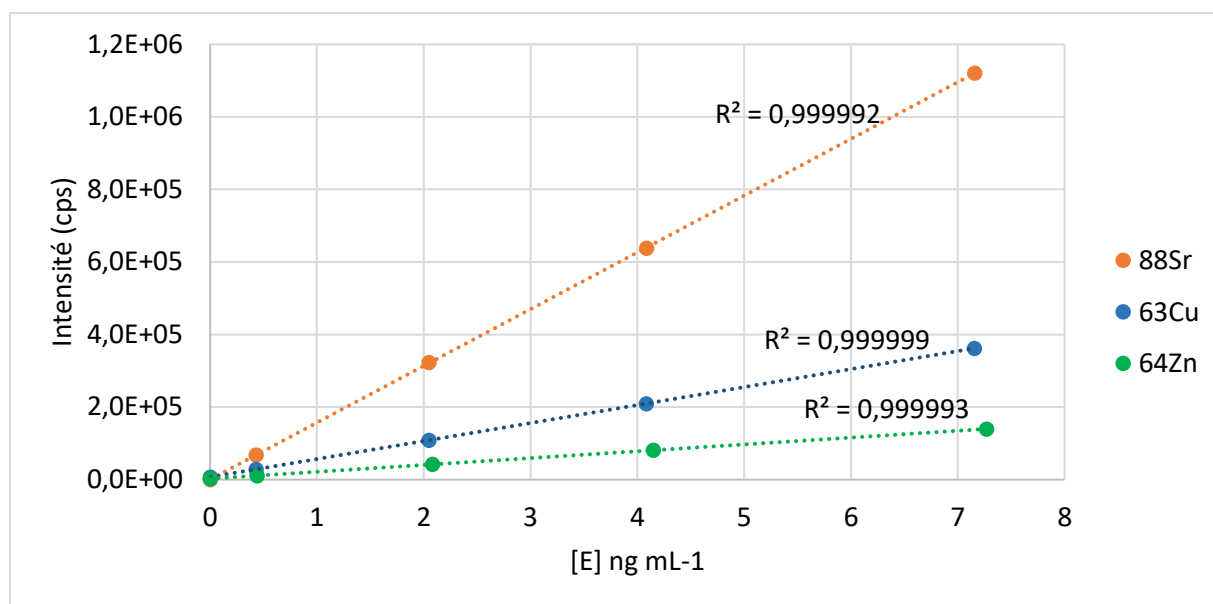


Figure 23 : Superposition des droites d'étalonnages du ⁸⁸Sr, ⁶³Cu et ⁶⁴Zn pour une gamme de concentration variant entre 0,4 et 7 ng mL⁻¹

Les limites de quantifications (LOQ) ont été déterminées pour chaque élément à partir de la droite d'étalonnage selon :

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_b}{a} \quad (\text{Equation 14})$$

Avec a la pente, et S_b l'écart type sur l'ordonnée à l'origine b de la droite d'étalonnage. Les limites de quantification obtenues pour ⁸⁸Sr, ⁶³Cu et ⁶⁴Zn sont respectivement 0,06, 0,76 et 0,75 ng mL⁻¹. Les concentrations des éléments Sr²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ dans les échantillons, obtenues par étalonnage sont recensées dans le Tableau 9. Afin de suivre la concentration de ces éléments, un écart relatif entre la concentration déterminée expérimentalement par pesée et celle déterminée par dosage a été déterminé. Un faible écart relatif indique que la concentration de l'élément n'est pas modifiée alors qu'un écart relatif important indique une précipitation.

Tableau 9 : Concentrations en ⁸⁸Sr, ⁶³Cu et ⁶⁴Zn des échantillons à doser préparés à partir de la solution de contact Sr²⁺+ Cu²⁺ + Zn²⁺ en milieu 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃COO, et obtenues par dosage et par pesée.

Jours	Elément E	[E] _{dosage}	[E] _{expérimental}	Ecart relatif
		ng mL ⁻¹	ng mL ⁻¹	%
J0	⁸⁸ Sr	2,03	2,04	0,79
	⁶³ Cu	< LOQ	1,58	ND
	⁶⁴ Zn	1,29	1,44	10,25
J1	⁸⁸ Sr	2,06	2,07	0,62
	⁶³ Cu	< LOQ	1,60	ND
	⁶⁴ Zn	1,33	1,46	8,96
J2	⁸⁸ Sr	2,08	2,09	0,40
	⁶³ Cu	< LOQ	1,62	ND
	⁶⁴ Zn	1,32	1,47	10,30

Comme le montre le Tableau 9, la concentration en Cu^{2+} de l'échantillon à doser est inférieure à sa limite de quantification. Ce résultat montre que le Cu^{2+} a précipité dans la solution de contact en milieu $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ce qui a été également observé visuellement par l'intermédiaire d'un précipité bleuâtre. La concentration en Sr^{2+} obtenue par dosage n'a dévié que de 0,6% en moyenne par rapport à la concentration expérimentale obtenue par pesée et celle du Zn a dévié de 10% en moyenne. Sur la base de ces observations, la concentration en $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ de la solution de contact a été augmentée de 20 à 60 mmol L^{-1} . La même démarche a été réalisée pour préparer les solutions (Figure 22) et pour les quantifier. Les résultats obtenus sont recensés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Concentrations en ^{88}Sr , ^{63}Cu et ^{64}Zn des échantillons à doser préparés à partir de la solution de contact $\text{Sr}^{2+} + \text{Cu}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$ en milieu $60 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, et obtenues par dosage et par pesée.

Jours	Elément E	[E] _{dosage}	[E] _{expérimental}	Ecart relatif
		ng mL ⁻¹	ng mL ⁻¹	%
J0	^{88}Sr	2,02	2,06	2,11
	^{63}Cu	1,38	1,57	12,60
	^{64}Zn	1,51	1,45	4,34
J1	^{88}Sr	1,94	2,04	4,72
	^{63}Cu	1,43	1,56	8,22
	^{64}Zn	1,50	1,43	4,98
J2	^{88}Sr	1,95	2,07	6,02
	^{63}Cu	1,48	1,58	6,61
	^{64}Zn	1,54	1,46	5,29

D'après le Tableau 10, la concentration en Cu^{2+} de l'échantillon à doser a dévié de 12,6% en J0, de 8,22% en J1 et de 6,61% en J2 par rapport aux concentrations expérimentales obtenues par pesée. Cet écart étant inférieur à 15% pour trois jours consécutifs est considéré comme acceptable puisque plus de 85% du Cu^{2+} est sous forme soluble. Des écarts inférieurs à 10% ont été obtenus pour le Sr^{2+} et le Zn^{2+} pendant les trois jours ce qui est également considéré comme acceptable. Ces conditions ont été donc retenus pour la suite de l'étude et la solution de contact contenant $1\text{UO}_2^{2+} + 2\text{pS1368} + 1\text{Sr}^{2+} + 1\text{Cu}^{2+} + 1\text{Zn}^{2+}$ a été préparé dans $60 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$.



Separation of multiphosphorylated cyclopeptides and their positional isomers by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS)

Lana Abou Zeid ^{a,c,*}, Albert Pell ^a, Théo Tytus ^a, Pascale Delangle ^b, Carole Bresson ^a

^a Université Paris-Saclay, CEA, Service d'Etudes Analytiques et de Réactivité des Surfaces, F-91191 Gif-sur-Yvette, France

^b Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, SYMMES, 38 000 Grenoble, France

^c Sorbonne Université, F-75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords

HILIC
Hydrophilic interaction liquid chromatography
Multiphosphorylated cyclopeptides
Phosphopeptide isomers
Retention mechanisms
ESI-MS

ABSTRACT

Peptides are efficient models used in different fields such as toxicology to study the interactions of several contaminants at the molecular scale, requiring the development of bio-analytical strategies. In this context, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was used to separate synthetic multiphosphorylated cyclopeptides and their positional isomers at physiological pH. We assessed (i) the selectivity of eleven HILIC columns, from different manufacturers and packed with diverse polar sorbents, and (ii) the effect of mobile phase composition on the separation selectivity. The best selectivity and baseline resolution were achieved with the columns grafted by neutral sorbents amide and diol. Furthermore, we investigated the HILIC retention mechanism of these peptides by examining the effect of the number of phosphorylated residues in the peptide scaffold on their retention. The peptide behavior followed the classical hydrophilic partitioning mechanism exclusively on amide and diol columns. This trend was not fully respected on bare and hybrid silica due to the attractive/repulsive interactions of the deprotonated surface silanol groups with the Arginine or Glutamate residues in the peptide scaffold according to the peptide sequence. The position of the phosphorylated amino acid in the peptide backbone also showed to have an impact on the retention, making possible the separation of positional isomers of these multiphosphorylated cyclic peptides using HILIC.

1. Introduction

Peptides are efficient models to study metal-protein binding sites [1,2] and some of their derivatives have been proposed as specific metal chelators in detoxification applications [3,4] or as models of enzyme activity [5]. Peptides with sequences found in albumin [6], osteopontin [7] and calcium binding calmodulin [8] have been used to help identifying uranium (U) chelation sites in these proteins and to evaluate their affinity towards this cation, using spectroscopic techniques such as fluorescence spectroscopy, isothermal titration calorimetry (ITC), extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) and circular dichroism. Uranyl ion displays a specific geometry that promotes coordination of ligands in the equatorial plane perpendicular to the O-U-O axis. In this context, pre-organized cyclodecapeptides designed specifically to coordinate U have been synthesized to mimic the so far unknown uranyl ion

binding sites in phosphate-rich proteins, such as osteopontin [9]. In the cyclodecapeptides shown in Fig. 1, the four amino acid side chains at positions 1, 3, 6, and 8 are pre-oriented in the "upper face" of the peptide scaffold to efficiently coordinate uranyl in its equatorial plane. Those amino acids were initially four glutamic acids (Glu) in p50 [10] that were progressively replaced by phosphoserine (pSer) to obtain four pSer residues in p51360. Peptides are named according to the number and position of the pSer residues [11–13].

In view of developing a dedicated analytical method by chromatography coupled to mass spectrometry to determine an affinity scale of these peptides towards uranium based on the separation of the uranyl-peptide complexes at physiological pH (~7), the prior investigation of the separation conditions and chromatographic behavior of these kind of peptides is crucial.

In the field of phosphoproteomics, various chromatographic

* Corresponding author at: Université Paris-Saclay, CEA, Service d'Etudes Analytiques et de Réactivité des Surfaces, F-91191 Gif-sur-Yvette, France.
E-mail address: lana.abouzeid@cea.fr (L. Abou Zeid).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122792>

Received 31 March 2021; Received in revised form 17 May 2021; Accepted 19 May 2021

Available online 25 May 2021

1570-0232/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

approaches have been applied to separate phosphopeptides from their non-phosphorylated counterparts in complex samples such as proteomic digests. Dedicated methods, mainly based on multidimensional chromatography often involving ion-exchange chromatography combined with reversed-phase chromatography (RPLC) have been set up, and generally in acidic conditions [14,15]. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is dedicated to the separation of polar and hydrophilic molecules [16]. It combines polar stationary phases and hydro-organic mobile phases rich in organic modifier containing a volatile salt, providing suitable conditions for ESI-MS detection [17]. The analytes are retained according to their polarity and hydrophilicity through liquid-liquid partition between the mobile phase and a semi-immobilized water layer on the surface of the polar stationary phase, being the main retention mechanism [18]. Furthermore, secondary interactions such as hydrogen-bonding, dipole-dipole and electrostatic interactions generally contribute also to the retention at different degrees. Because of these features, HILIC has been more and more used these last decades to separate amino acids, peptides, metabolites and proteins [19] and has gained popularity in phosphoproteomics [20]. Using this separation mode, various polar stationary phases, mainly amide [21–24], zwitterionic [25,26], bare silica [21,22] and less frequently amino [23,27] and diol [27,28], have been used in one dimension or hyphenated with RPLC in second dimension [29,30] in studies involving unphosphorylated or multiphosphorylated linear peptides under acidic conditions. Concerning positional isomers, to our knowledge, only one study reports the separation of the positional isomers of linear multiphosphorylated peptides from protein digests, using aminopropyl HILIC stationary phase under strong acidic conditions (pH 2) [27].

The aim of this work was to set up the conditions to separate at physiological pH, synthetic pre-organized multiphosphorylated cyclodecapeptides including positional isomers (see Fig. 1) using HILIC coupled to ESI-MS. In general, the peptide separations are carried out in acidic conditions but in our study, physiological pH is a key-parameter to reflect biological conditions relevant in toxicology, that are required for the following steps aiming at characterizing uranium

interactions with these peptides. The selectivity of eleven polar stationary phases from different manufacturers was evaluated using different mobile phase compositions. In addition, the retention mechanisms of the peptides on the different columns were discussed, as well as the impact of the nature and the position of the amino acids in the sequence on the peptide retention.

2. Experimental part

2.1. Chemicals

Acetonitrile (ACN, CH₃CN, LC-MS grade) was supplied by VWR prolabo (Briare le canal, France). Ammonium acetate (NH₄O₂CCH₃) and toluene (C₆H₅CH₃, purity > 99.7%) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Ultrapure water (18.2 MΩ cm) was obtained from Milli-Q purification system (Merck millipore, Guyancourt - France).

2.2. Peptides

The peptides were synthesized, characterized using ESI-MS and circular dichroism and supplied by the CIBEST team at GyMMES (Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IRIG, 38 000 Grenoble - France) following the procedures described elsewhere [10–13]. Table 1 summarizes nomenclature, amino acid sequence, molecular mass and the maximum charge at pH 7.4 for each peptide.

2.3. Preparation of peptide stock solutions and samples

The peptide stock solutions were prepared by dissolving the adequate amount of the targeted peptide powder in 20 mmol L⁻¹ NH₄O₂CCH₃ (pH = 7) to reach a concentration between 2 and 4 mmol L⁻¹. An intermediate solution containing around 2.5 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ pS0, pS1/8, pS16/18 and around 5 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ pS168 and pS1368 was prepared by mixing the adequate volume of the peptide stock solutions and adding further the appropriate volume of 20 mmol L⁻¹

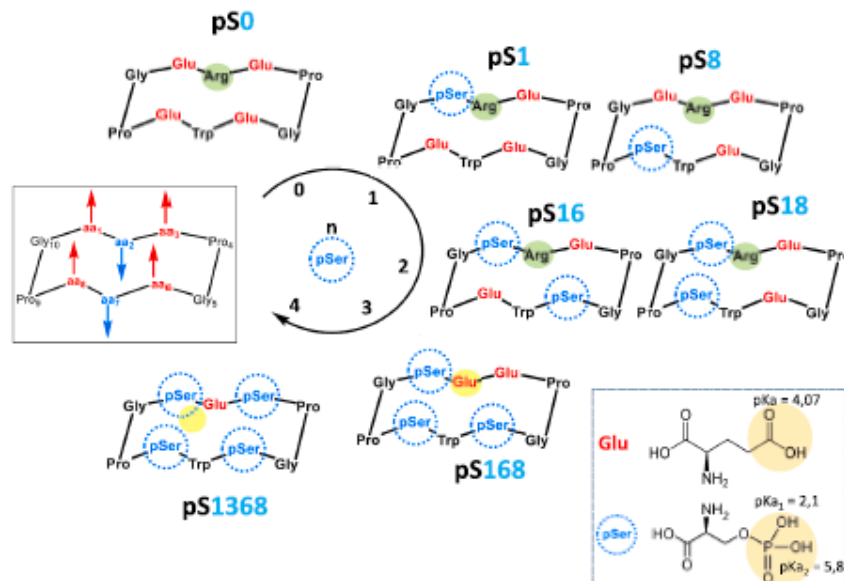


Fig. 1. Structure of the synthetic cyclodecapeptides and their positional isomers.

Table 1
Nomenclature, amino acid sequence, molecular mass and maximum charge at pH 7.4 for each peptide.

Peptides	Sequence	Molecular mass (g mol ⁻¹)	Maximum charge at pH 7.4
	(X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀)		
pS0	c(EREPGEWEPG)	1166.5	-3
pS1	c(pSREPGEWEPG)	1204.5	-4
pS8	c(EREPGEWpSPG)	1204.5	-4
pS16	c(pSREPGpSWEPG)	1242.4	-5
pS18	c(pSREPGEWpSPG)	1242.4	-5
pS168	c(pSEEPGpSWpSPG)	1253.3	-8
pS1368	c(pSEpSPGpSWpSPG)	1291.3	-9

X is the letter code of amino acids. pS stands for phosphorylated serine residues (pSer).

NH₄O₂CCH₃. The working samples were obtained by diluting the intermediate solution in the reference mobile phase (70/30 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄CH₃CO₂) to reach final peptide concentrations of 5 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ for pS0, pS1/8 and pS16/18, and 10⁻⁴ mol L⁻¹ pS168 and pS1368.

2.4. Instrumentation

Experiments were carried out using an ultimate 3000 UHPLC⁺ Dionex/ThermoFisher scientific (Courtaboeuf, France), which consists of a degasser, a dual RS pump, an RS autosampler, a column compartment and an RS diode array detector. A triple quadrupole TSQ Quantum Ultra™ mass spectrometer (Thermo Fisher scientific, San Diego CA, USA) equipped with an H-ESI II ionization probe was coupled to the chromatographic system. All mass spectra were recorded in negative ionization mode with the following parameters: spray voltage -3.5 kV, temperature of the probe 120 °C and temperature of the capillary 360 °C. Mass spectra were acquired in full scan (*m/z* 400-1500) and in

single ion monitoring (SIM) by selecting the *m/z* ratio associated to each peptide (spectral width: ± 0.5 *m/z*).

2.5. Chromatographic conditions




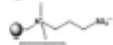

The peptide separations were performed with eleven columns (see Table 2) in isocratic elution. Targeted mobile phase composition was obtained by online mixing of solvent A (60/40 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄O₂CCH₃) and solvent B (80/20 ACN/H₂O v/v + 20 mmol L⁻¹ NH₄O₂CCH₃) in the adequate proportions. The flow rate was 300 μL min⁻¹ and the injection volume was 3 μL except for YMC-Triart Diol column, for which it was 1 μL.

Peptide retention factor *k* was calculated for each column in accordance with the following equation (1):

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (1)$$

where *t_R* is the retention time (min) of peptides, determined by HILIC-

Table 2
Column specifications: name, manufacturer, base material, carbon load (%), surface area (m² g⁻¹), and column dimensions.

Stationary phase functionalization	Column name (manufacturer)	Base material	Carbon load (%)	Surface area m ² g ⁻¹	Functional group	Particle size (μm)	Dimension (mm)
Amide	Acquity UPLC BEH amide (Waters)	Bridged ethylene hybrid BEH silica	12	185		1.7	100 × 2.1
Silica Hybrid silica	Acquity UPLC BEH HILIC (Waters)	BEH silica	Unbonded	185	/	1.7	100 × 2.1
	YMC-Triart SIL (YMC)	Organic/inorganic hybrid Silica	Unbonded	330	/	3	100 × 2.0
Bare silica	Luna ® Silica (phenomenex)	Ultra-high purity silica	unbonded	400	/	3	100 × 2.1
	YMC-Pack SIL (YMC)	Ultra-pure metal free silica	unbonded	330	/	3	100 × 2.1
Proprietary Polar Group	Hypersil GOLD™ Silica (Thermo scientific)	Highly pure base Deactivated silica	Unbonded	220	/	1.9	100 × 2.1
	Acclaim™ HILIC-10 (Thermo scientific)	Ultrapure Silica	8	300	Proprietary	3	150 × 2.1
Diol	YMC-Triart Diol (YMC)	Organic/inorganic hybrid Silica	12	360		1.9	100 × 2.0
	Inertsil Diol (GL science)	High purity silica gel	20	450		3	150 × 2.1
Zwitterionic (sulfobetaine)	ZIC-pHILIC (Merck)	Polymeric	ND	ND		5	150 × 2.1
Amide polyol	BioZen Glycan (phenomenex)	ND	ND	200		2.6	150 × 2.1

ESIMS, t_0 is the void time of unretained marker, toluene (10^{-4} mol L $^{-1}$, $V_{inj} = 1$ μ L), determined by HILIC-UV/VIS at 254 nm.

Selectivity and resolution factors, α and R_s , respectively, were calculated based on equations (2) and (3):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

$$R_s = 1.18 \times \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5M1} + W_{0.5M2}} \quad (3)$$

Being analyte 2 more retained than analyte 1. $W_{0.5}$ corresponds to full width half-maximum of each peak.

Asymmetry factor A_s was calculated for every separation using all the tested columns at the mobile phase composition 70/30 ACN/H $_2$ O + 20 mmol L $^{-1}$ NH $_4$ O $_2$ CCH $_3$ according to the following equation (4):

$$A_s = b/a \quad (4)$$

where a is the width at the left half of the peak at 10% peak height and b is width at the right half of the peak width at 10% peak height.

3. Results and discussion

3.1. Selectivity of various polar stationary phases

The separation of peptides using the eleven columns was first assayed with a reference mobile phase consisting of ACN/H $_2$ O 70/30 v/v + 20 mmol L $^{-1}$ NH $_4$ O $_2$ CCH $_3$ [31] at physiological pH. The corresponding elution profiles (Fig. 2) and the chromatographic parameters such as k' , A_s , α and R_s (Table 3) reflect the different selectivity of the tested columns for separating the cyclopeptides in these conditions.

With bioZen glycan, no elution of peptides was observed even using different mobile phase compositions. Therefore, this column is not suitable and was dropped out from the study.

Bare silica columns such as Luna Silica, YMC-Pack SIL and Hypersil GOLD Silica display a highly polar and negatively charged stationary phase at pH 7 due to deprotonated surface silanol groups. Because of this high polarity, the highest retention factors of all the peptides were obtained with the first two columns among all the tested ones with k' reaching for example 45.8 and 31.9 for monophosphorylated pS1 on Luna Silica and YMC-Pack SIL, respectively (see Table 3). It must be noticed that retention is significantly lower for the Hypersil GOLD Silica, with $k' = 12.3$ for pS1. The retention of the negatively charged peptides displaying the same charge as the stationary phase reflects that the main retention mechanism-taking place is hydrophilic partitioning with respect to electrostatic repulsions, that solely would lead to decreased or no retention of analytes. The retention of analytes displaying the same charge as the stationary phase is one of the HILIC features compared to ion exchange chromatography [32].

In the case of the highly retentive Luna Silica, only broad peaks were observed for pS0, pS1 and pS8, while none of the remaining multiphosphorylated peptides was observed using this mobile phase composition. In the same conditions, all the peptides were eluted with the YMC-Pack SIL and Hypersil GOLD Silica columns. This difference is attributed to the surface area of the columns, varying as follows: Hypersil GOLD Silica < YMC-Pack SIL < Luna Silica (Table 2) and leading to increasing retention of peptides accordingly. Using YMC-Pack SIL and Hypersil GOLD Silica, pS16 was the most retained peptide with $k' = 65.7$ and 18.8, respectively. Overall, a good separation of the pS8-pS1 positional isomers was achieved with the three columns with selectivity factors of 2.4 for Luna Silica and YMC-Pack SIL and 2.8 for

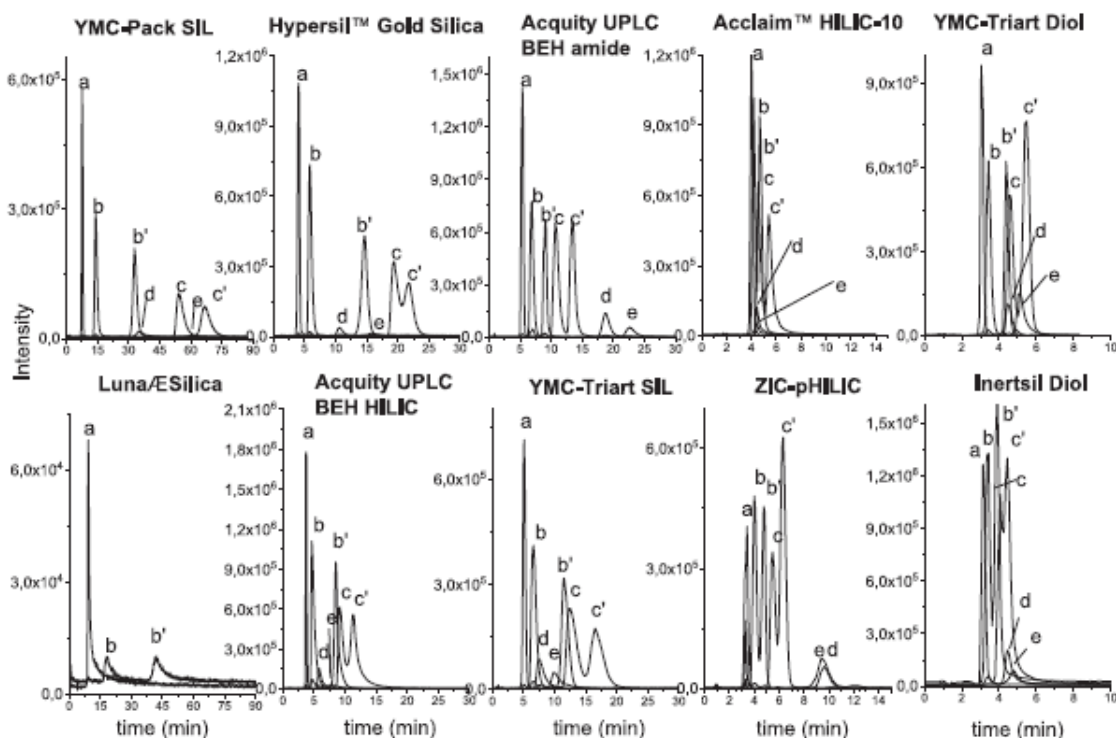


Fig. 2. Overlay of ESI-MS elution profile of each peptide in the mixture, obtained in SIM mode and using mobile phase composition made of 70/30 ACN/H $_2$ O v/v + 20 mmol L $^{-1}$ NH $_4$ O $_2$ CCH $_3$. Flow rate: 300 μ L min $^{-1}$ in isocratic elution. Peptides were detected in their discharged form [M-2H] $^{2-}$ at the following m/z ratio: (a) pS0 (m/z = 582.3), (b) pS8 and (b') pS1 (m/z = 601.2), (c) pS18 and (c') pS16 (m/z = 620.2), (d) pS168 (m/z = 625.7), (e) pS1368 (m/z = 644.6).

Table 3
Chromatographic parameters (*K'*, *As*, α and *R_s*) calculated for the separation of the peptides with stationary phases grafted by different polar functional groups, using a mobile phase composition of 70/30 ACN/H₂O + 20 mmol L⁻¹ NH₄O₂CO₃.

	Amide																			
	Hybrid silica				Bare silica				Zwitterionic				Proprietary							
	Acquity UPLC BEH HILIC		YMC-Triart SIL		Inertsil GOLD SIL		YMC-Pack SIL		Hypersil GOLD SIL		ZIC-pHILIC		Acclaim HILIC-10		YMC-Triart Diol		Inertsil Diol			
<i>K'</i>	<i>As</i>	<i>K'</i>	<i>As</i>	<i>K'</i>	<i>As</i>	<i>K'</i>	<i>As</i>	<i>K'</i>	<i>As</i>	<i>K'</i>	<i>As</i>	<i>K'</i>	<i>As</i>	<i>K'</i>	<i>As</i>	<i>K'</i>	<i>As</i>			
pS0	5.7	1.0	3.2	1.0	4.7	1.3	9.3	7.8	6.6	1.4	2.7	0.8	2.4	2.1	1.5	2.8	2	1.8		
pS8	7.6	1.4	4.2	5.0	6.3	1.6	19.3	/	13.2	1.6	4.4	1.5	3.0	2.2	/	3.3	2	2.1		
pS1	10.4	0.8	8.4	2.4	11.8	1.7	45.8	/	31.9	1.6	12.3	1.1	3.8	2.6	/	4.5	2	2.5		
pS18	12.4	2.0	9.2	/	12.9	/	ND	/	53.3	2.9	16.6	/	4.6	/	/	4.6	/	2.7		
pS16	15.9	1.1	11.6	/	17.4	/	ND	/	65.7	2.0	18.8	/	5.4	/	/	5.9	1	3.0		
pS168	22.4	1.7	5.4	5.3	7.3	3.7	ND	/	33.9	/	8.7	3.2	8.7	1.8	2.4	5	3	3.0		
pS1368	27.2	2.2	7.6	3.8	9.9	6.9	ND	/	60.8	/	13.3	/	8.6	1.3	2.5	4.3	3	3.3		
α	α -pep-pan	1.3	1.3	α -pep-pan	1.3	α -pep-pan	2.1	α -pep-pan	2.0	α -pep-pan	1.6	1.6	α -pep-pan	1.2	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan	1.2	α -pep-pan	
	α -pep-pan	1.4	1.4	α -pep-pan	1.3	α -pep-pan	2.4	α -pep-pan	2.4	α -pep-pan	2.0	2.0	α -pep-pan	1.3	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan	1.4	α -pep-pan	
	α -pep-pan	1.2	1.4	α -pep-pan	1.3	α -pep-pan	ND	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan	1.4	1.4	α -pep-pan	1.2	α -pep-pan	1.0	α -pep-pan	1.0	α -pep-pan	
	α -pep-pan	1.3	1.1	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan	ND	α -pep-pan	1.6	α -pep-pan	1.1	1.1	α -pep-pan	1.2	α -pep-pan	1.0	α -pep-pan	1.0	α -pep-pan	
	α -pep-pan	1.4	1.1	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan	ND	α -pep-pan	1.3	α -pep-pan	1.1	1.3	α -pep-pan	1.6	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan	1.2	α -pep-pan	
	α -pep-pan	1.2	1.3	α -pep-pan	1.3	α -pep-pan	1.4	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan	1.1	1.1	α -pep-pan	1.0	α -pep-pan	1.2	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan	
	α -pep-pan	1.7	1.5	α -pep-pan	1.5	α -pep-pan	1.4	α -pep-pan	2.3	α -pep-pan	4.1	α -pep-pan	2.3	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan	0.6	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan
	α -pep-pan	2.2	1.0	α -pep-pan	0.5	α -pep-pan	0.5	α -pep-pan	0.5	α -pep-pan	0.5	α -pep-pan	3.5	α -pep-pan	1.4	α -pep-pan	0.5	α -pep-pan	2.4	α -pep-pan
	α -pep-pan	1.2	0.5	α -pep-pan	0.2	α -pep-pan	0.9	α -pep-pan	3.0	α -pep-pan	0.4	α -pep-pan	2.2	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan	0.2	α -pep-pan	0.0	α -pep-pan
	α -pep-pan	1.8	0.2	α -pep-pan	0.2	α -pep-pan	ND	α -pep-pan	2.9	α -pep-pan	0.4	α -pep-pan	0.4	α -pep-pan	1.0	α -pep-pan	0.0	α -pep-pan	0.2	α -pep-pan
	α -pep-pan	2.8	0.6	α -pep-pan	0.6	α -pep-pan	0.4	α -pep-pan	0.7	α -pep-pan	1.4	α -pep-pan	1.4	α -pep-pan	2.8	α -pep-pan	0.4	α -pep-pan	1.0	α -pep-pan
	α -pep-pan	1.6	1.0	α -pep-pan	1.0	α -pep-pan	1.1	α -pep-pan	0.4	α -pep-pan	0.9	α -pep-pan	0.9	α -pep-pan	0.1	α -pep-pan	1.0	α -pep-pan	0.6	α -pep-pan
<i>R_s</i>	$R_{s(pS8-pS1)}$	2.2	1.8	$R_{s(pS8-pS1)}$	2.2	$R_{s(pS8-pS1)}$	2.2	$R_{s(pS8-pS1)}$	2.2	$R_{s(pS8-pS1)}$	2.2	$R_{s(pS8-pS1)}$	2.2	$R_{s(pS8-pS1)}$	2.2	$R_{s(pS8-pS1)}$	2.2	$R_{s(pS8-pS1)}$	2.2	
	$R_{s(pS16-pS1368)}$	2.8	0.4	$R_{s(pS16-pS1368)}$	2.8	$R_{s(pS16-pS1368)}$	2.8	$R_{s(pS16-pS1368)}$	2.8	$R_{s(pS16-pS1368)}$	2.8	$R_{s(pS16-pS1368)}$	2.8	$R_{s(pS16-pS1368)}$	2.8	$R_{s(pS16-pS1368)}$	2.8	$R_{s(pS16-pS1368)}$	2.8	
	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	0.4	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	
	$R_{s(pS168-pS1)}$	1.6	0.4	$R_{s(pS168-pS1)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1)}$	1.6	
	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	0.4	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	
	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.6	0.4	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.6	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.6	
	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	0.4	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	
	$R_{s(pS168-pS18)}$	1.0	0.4	$R_{s(pS168-pS18)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS18)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS18)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS18)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS18)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS18)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS18)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS18)}$	1.0	
	$R_{s(pS168-pS0)}$	1.0	0.4	$R_{s(pS168-pS0)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS0)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS0)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS0)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS0)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS0)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS0)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS0)}$	1.0	
	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	0.4	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS8)}$	1.0	
	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	0.4	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS16)}$	1.0	
	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.0	0.4	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.0	$R_{s(pS168-pS1368)}$	1.0	

ND: Not Detected; /: *As* cannot be calculated due to (i) unresolved peaks or (ii) 10% of the peak height < baseline noise.

Hypersil Gold Silica.

Hybrid silica Acquity UPLC BEH HILIC and YMC-Triart SIL columns contain non-grafted stationary phases, made of supports with different hybrid technologies. Bridged ethylene hybrid (BEH) supports consist of ethylene bridges embedded within the silica matrix that coat nearly one-third of the surface silanols [33]. YMC-Triart SIL is based on hybrid particles with multi-layered organic/inorganic silica [34]. Hybrid supports provide stationary phases with lower deprotonated surface silanol groups and decreased polarity compared to bare silica columns, leading to lower peptide retention factors as can be seen in Fig. 2 and Table 3. For example, pS1 retention factor is three times lower with YMC-Triart SIL (*K'* = 11.8) than with YMC-Pack SIL (*K'* = 31.9). As observed with bare silica columns, the peptides were more retained on the column exhibiting the higher surface area that is the YMC-Triart SIL with respect to the Acquity UPLC BEH HILIC (Table 2) and pS16 was eluted with the highest retention factor with both hybrid silica columns.

The remaining columns are based on bare or hybrid silica supports, grafted with different functional groups such as amide, diol and zwitterionic.

Acquity UPLC BEH amide is based on hybrid silica support, grafted with neutral amide groups through an alkyl spacer. As neutral stationary phase, analyte retention is driven by hydrophilic partitioning as main mechanism and hydrogen bonding also contribute to the retention owing to the hydrogen donor and acceptor ability of the amide group. Accordingly, the retention factors of the peptides increased with respect to the number of pSer residues in the peptides scaffold in agreement with their increasing polarity and hydrophilicity (Fig. 2 and Table 3). Amide stationary phase displayed high separation selectivity and baseline resolution for separating these cyclic peptides, including their positional isomers (*R_{s(pS8-pS1)}* = 2.2 and *R_{s(pS16-pS16)}* = 1.8).

Acclaim HILIC-10 is based on bare silica support, grafted with a proprietary hydrophilic functional group. It showed weak retention of the peptides leading to co-elution of most of them and a poor baseline resolution (*R_s* < 1.5 as shown in Table 3). This reflects the insufficient polarity of the functional group for separating these peptides under the selected conditions.

ZIC-pHILIC is a zwitterionic column, made of a polymer material grafted with a sufoalkylbetaine chain that contains both negatively charged sulfonic acid and positively charged quaternary ammonium separated by a short alkyl spacer. As the two oppositely charged groups are present in equimolar ratio, the zwitterionic function is globally neutral. Sulfoalkylbetaine columns strongly adsorb water, therefore hydrophilic partitioning is the main retention mechanism of the analytes, but weak electrostatic interactions contribute to the retention of charged analytes as well as hydrogen bonding [17]. Taking into account these features, the retention of the peptides increased in connection with the number of pSer groups, even though in this mobile phase composition peaks are poorly resolved (*R_s* < 1.5, except for pS16-pS1368 *R_s* = 2.8, see Table 3) and the tri- and tetraphosphorylated peptides were co-eluted (Fig. 2).

YMC-Triart Diol and Inertsil Diol columns are respectively based on hybrid and pure silica supports, grafted with neutral dihydroxypropyl groups through a spacer. The separation is based on hydrophilic partitioning as major retention mechanism, in combination with hydrogen bond interactions through the OH group. Using the reference mobile phase, the peptides were weakly retained and almost co-eluted, which is explained by the low polarity and hydrophilicity of diol stationary phases. The retention factors are slightly different with both columns despite being grafted with the same functional group. For example *K'*_{pS1} with YMC-Triart Diol (*K'* = 4.5) is almost twice the observed with Inertsil Diol (*K'* = 2.5). It is important to mention that despite having a hydroxy group on both diol columns, they display differences in the carbon chain length, which is higher for Inertsil Diol. In addition, this latter has an ether group in its chain, which is not present with YMC-Triart Diol (see Table 2). This illustrates that columns categorized as same stationary phase are different between manufacturers in the architecture of the

functional group, the grafting rates and the technology of the material support.

The first screening of various columns for separating multi-phosphorylated cyclic peptides using a fixed mobile phase composition showed diverse selectivity according to the chemical group bonded to the stationary phase. Acquity UPLC BEH amide showed to be suitable for the separation of the peptides. These latter displayed a different chromatographic behavior with the remaining columns and in some cases, we obtained a good separation of the positional isomers, making interesting a further investigation of the effect of mobile phase composition on the separation selectivity of these phosphorylated cyclopeptides and of their HILIC retention mechanism.

3.2. Effect of mobile phase composition

The mobile phase's elution force is another parameter influencing the separation selectivity in HILIC and is highly related to organic content of the mobile phase. By way of example, Fig. 3 shows the chromatographic behavior (Fig. 3A) and the retention factors of the peptides (Fig. 3B) in function of the mobile phase's organic content for columns of increasing polarity: Acclaim HILIC-10, diol (YMC-Triart Diol), Zwitterionic (ZIC-pHILIC) and bare silica (YMC-Pack SIL). In all cases, the salt concentration was kept at 20 mmol L⁻¹.

As previously observed, 70% ACN in the mobile phase induced unacceptable retention factors with the more polar bare silica columns. We therefore assessed the effect of higher mobile phase's elution force for this class of stationary phases by decreasing the proportion of ACN. This latter was decreased up to 40% with the highly retentive Luna Silica

column, but pS168 and pS1368 were still not eluted and pS18 and pS16 were eluted near the void time (data not shown), rendering this column not suitable for the rest of the study. For YMC-Pack SIL, the peptide retention factors of all the peptides decreased with the ACN percentage as expected (Fig. 3A and B). It must however be noticed that elution order changed between pS168 and pS1368 and their neighboring peptides when the mobile phase's elution force was modified (Fig. 3B). The same behavior was observed on Hypersil Gold Silica but only for pS1368 (see Table 3 and Supporting Information).

For the less polar remaining columns, the elution force was decreased by increasing the mobile phase organic content, promoting the retention of the peptides in all cases. With the Acclaim HILIC-10, the ACN content was increased up to 77%, but the selectivity was still insufficient (Fig. 3A) and the separation of the peptides was not achieved. A composition of 80% ACN did not improve the separation performance either and yielded retention factors up to 28.5 with very wide peaks. Concerning the YMC-Triart Diol, the ACN content was increased up to 75% giving a good separation selectivity ($1.1 < \alpha < 1.5$) and baseline resolution ($R_s > 1.5$) except for the pS168/pS16 ($R_s_{pS168-pS16} = 0.9$) and pS1/pS18 ($R_s_{pS1-pS18} = 1.4$) pairs (See Supporting Information). A change in the elution order was also observed between pS168 and pS1368 and their neighboring peptides at 72% and 74% ACN respectively (Fig. 3A and B). We could suggest that a change in the retention mechanism occurred and that secondary interactions of the peptides with the stationary phase through hydrogen bonding took more important part. For Inertsil Diol, increasing the ACN content up to 75% improved the separation selectivity but was still insufficient due to the wide peaks obtained at this percentage (see Supporting Information).

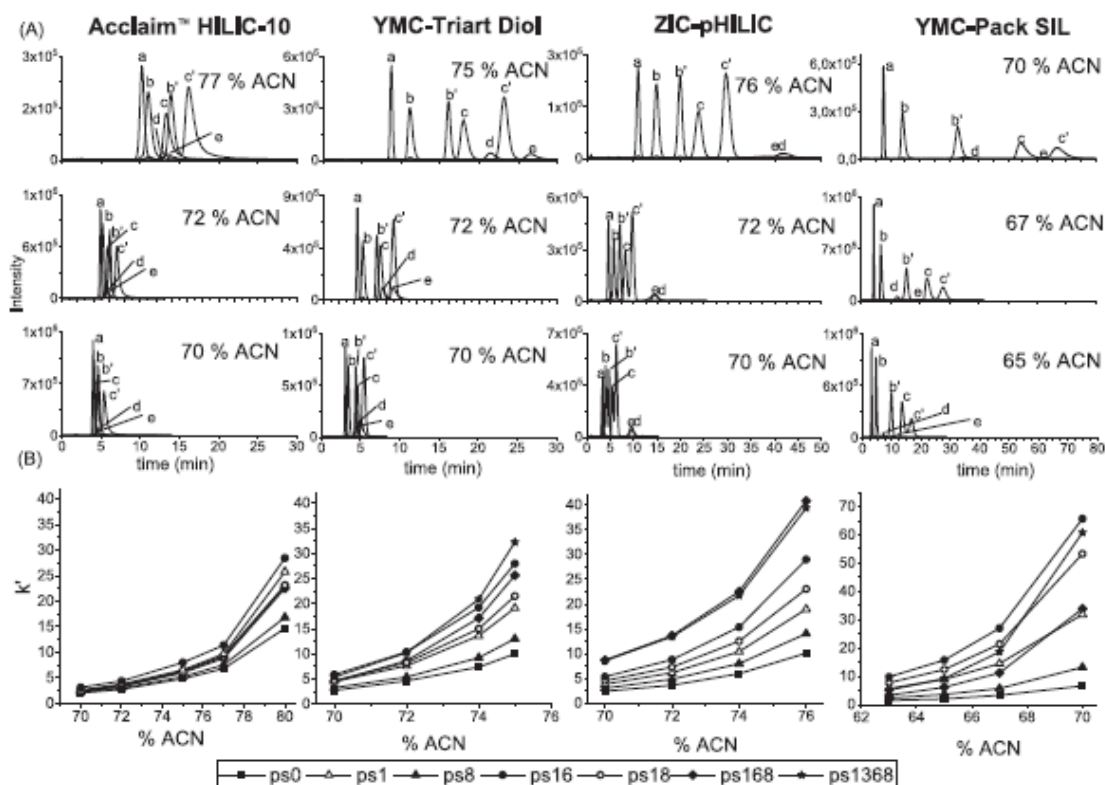


Fig. 3. (A) ESI-MS elution profile of peptides using Acclaim HILIC-10, YMC-Triart Diol, ZIC-pHILIC and YMC-Pack SIL at different mobile phase compositions. Flow rate: 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ in isocratic elution. (a) pS0, (b) pS8, (b') pS1, (c) pS18, (c') pS16, (d) pS168, (e) pS1368. (B) Variation of peptide retention factors with the % of ACN in the mobile phase.

Contrary to YMC-Triart Diol, we observed no change in the elution order of the peptides while modifying the mobile phase composition. For ZIC-pHILIC column, the peptides were eluted in two groups whatever the ACN content. The first one includes peptides with 0, 1 and 2 pSer residues and their positional isomers, which were separated with a good selectivity and baseline resolution at 74% ACN ($1.5 < R_s < 2.4$ and $\alpha > 1$). The second one includes tri- and tetraphosphorylated peptides pS168 and pS1368, which were co-eluted at all the mobile phase compositions. It must be noticed that pS1368 displayed a very large peak at 74% and 76% ACN, making difficult the precise identification of the apex. With hybrid silica columns (see Table 1), the ACN amount was increased up to 74% which did not improve the separation performance and lead to very large peaks and co-elution of some of the peptides (data not shown).

Overall, the mobile phase modification induced in some cases an inversion of the elution order only between the tri- and tetraphosphorylated peptides pS168 and pS1368 and their neighboring peptides respectively. This result reflects that pS168 and pS1368 are more sensitive to the mobile phase polarity than the other peptides.

3.3. HILIC behavior of the multiphosphorylated cyclopeptides

It is commonly known that in HILIC retention increases with analyte polarity [17]. Therefore, higher retention of the peptides is expected by increasing the number of polar pSer residues in their scaffold. As previously shown, this was not always the case in our study and we rather observed two trends in the elution order of the peptides depending on the stationary phase grafting.

In order to illustrate the effect of phosphate groups (pSer) on the retention of the cyclic peptides, their retention factors k' were plotted against the number of pSer in the sequence. In each case, the mobile phase composition was chosen to obtain $k' < 30$, while keeping satisfying resolution and selectivity (see Fig. 4).

A linear correlation between the retention factor and the number of pSer was observed exclusively using the neutral amide-grafted ($R^2 = 0.9489$) and Inertsil Diol-grafted ($R^2 = 0.9315$) columns. The peptide hydrophilicity increases with the number of negatively charged pSer residues, inducing higher retention, in agreement with classical HILIC behavior. Our results are similar to those obtained by Singer *et al.* who separated multiphosphorylated linear peptides with 0, 1, 2 and 3 phosphorylation sites using a diol column, leading to increased retention in accordance with the number of phosphorylation residues [27]. Furthermore, Yanagida *et al.* obtained also high correlation between logk and the increasing number of hydroxy groups (-OH) in proanthocyanidins, using a TSKgel Amide-80 column, and showed that it was the result of the dominance of secondary interactions through hydrogen bonding on hydrophilic partitioning mechanism [35].

When using stationary phases involving electrostatic interactions, the peptides behave differently (Fig. 4). With the bare and hybrid silica columns, the retention factors increased with the number of pSer residues for pS0, pS1-pS8, pS18-pS16 (group A) and then decreased for pS168 and pS1368 (group B).

All of the peptides display a global negative charge because of the presence of negatively charged amino acids such as Glu ($pK_a = 4.07$) and/or pSer ($pK_{a1} = 2.1$ $pK_{a2} = 5.8$), at position 1, 3, 6 and 8. Their

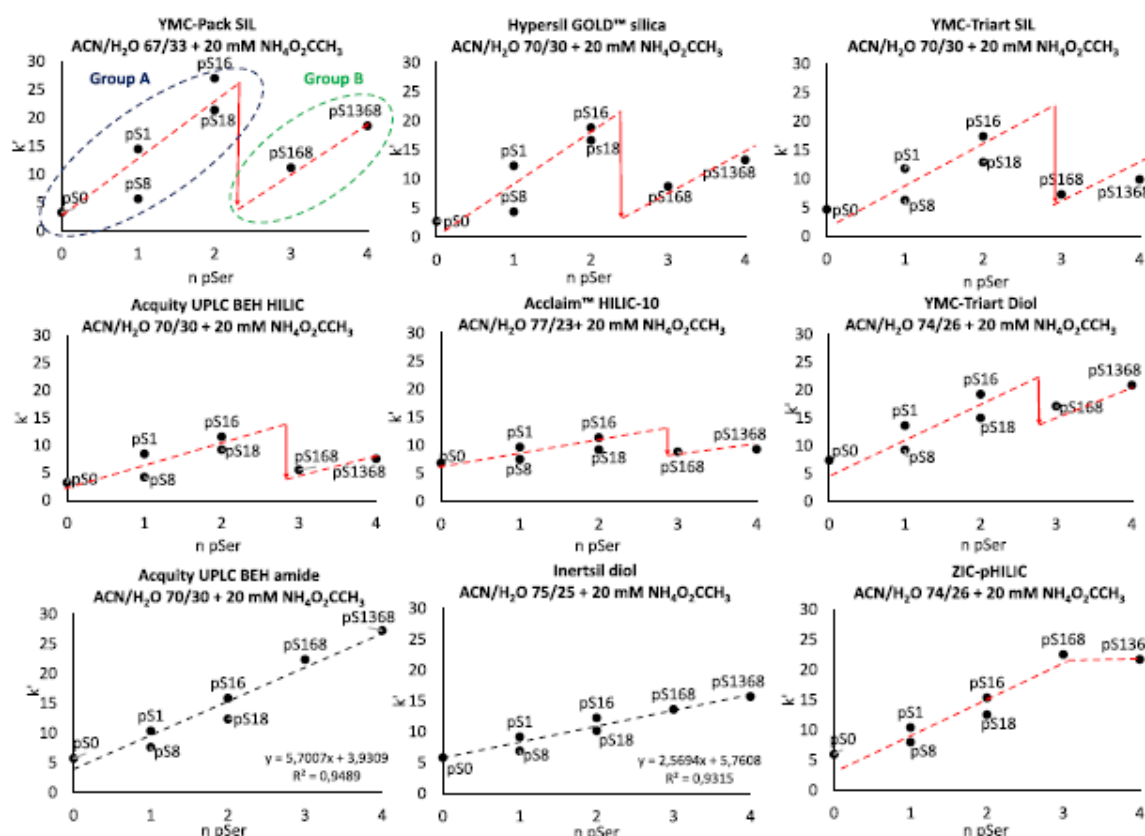


Fig. 4. Variation of the retention factors k' according to the number of pSer residues of the peptides. The mobile phase composition was chosen to yield retention factors k' below 30.

backbone is made of neutral amino acids Pro, Gly at position 4, 5, 9, 10 and Trp at position 7, but the amino acid at position 2 is Arg (pKa = 12.10, charge + 1) for the group A and Glu (pKa = 4.07, charge - 1) for the group B. This difference affects the global negative charge of the peptides, for which the maximum charge at pH 7 increases as follows: pS0 (-3), pS8/1 (-4), pS18/16 (-5), pS168 (-8) and pS1368 (-9). It is important to mention that the amino acids located in position 2 (Arg) and 7 (Trp) are orientated in the "lower face" of the peptide scaffold, contrary to the ones in position 1, 3, 6 and 8, that might affect their retention, since different group of different charge is available towards the surface of the stationary phase.

Since bare and hybrid silica columns display free negatively charged deprotonated silanol groups on their surface, electrostatic interactions contribute also to the retention of the peptides in addition to hydrophilic partitioning. Concerning the group A peptides, additional attractive electrostatic interactions taking place between the negatively charged silanol groups of the stationary phase and the Arg seem to promote their retention. We can assign this behavior to the one described by Alpert as the "contact region of peptides" in HILIC, being the region of these latter that preferentially interact with the stationary phase [36]. Gilar and Jaworski, who studied the HILIC behavior of tryptic linear peptides at pH 4.5 using bare, hybrid, and amide columns have discussed the Arg impact on the peptide retention [21]. Their experiments, along with their retention prediction models, showed that positively charged Arg residues strongly promoted the peptide retention on columns exhibiting deprotonated negatively charged surface silanols such as bare and hybrid silica via cation exchange interactions. This trend was more significant with bare silica compared to hybrid silica columns, due to the differences in deprotonated silanol amount on the surface, which is in agreement with our results [21].

Fig. 4 shows that pS168 and pS1368 had lower retention factors compared to group A peptides. These two peptides bear only negatively charged amino acids and the highest negative charge among the peptides, leading to electrostatic repulsions with the stationary phase and therefore reduced retention. This might explain why the retention factors of these peptides were highly affected by the slightest change of mobile phase composition compared to other peptides.

This different behavior between group A and group B peptides is surprisingly observed with some neutral columns such as YMC-Triart Diol and Acclaim-HILIC-10, but is less pronounced. This means that residual deprotonated surface silanols are accessible on these columns to interact with the analytes and thus influence their retention factors despite being shielded by neutral functionalization. Finally, the ZIC-pHILIC column showed similar behavior for group A peptides whilst pS168 and pS1368 of group B are co-eluted. However, these latter are more retained than the first group, meaning that the nature and the charge of the amino acid in position 2 did not affect the retention. The secondary weak electrostatic interactions combined with the hydrophilic partitioning did not provide enough selectivity to separate these two peptides. This was the case at all mobile phase compositions, as seen in the previous part.

The HILIC behavior of the multiphosphorylated cyclic peptides differed in connection with the charged amino acids (Arg and Glu) in the lower face of the peptide backbone on all the tested columns, except for the amide and inertsil diol for which residual deprotonated silanols had negligible effect.

3.4. Impact of amino acid position on the HILIC retention of the peptides

The positional isomers of mono- and di-phosphorylated peptides differ only by the location of one pSer residue in the sequence, as can be seen in pS1 c(pSREPGWEPEG)/pS8 c(EREPEGWpSPG) and pS16 c(pSREPGpSWEPEG)/pS18 c(pSREPGEWpSPG) (Fig. 1). We achieved a successful separation of these positional isomers with most of the columns, leading to systematic stronger retention of pS1 and pS16 compared to pS8 and pS18 respectively. This shows that the position of

the pSer residue significantly affect the HILIC behavior of the peptides. In the mono- and di-phosphorylated peptides, the pSer residue in position 8 is neighbored by Pro and Trp amino acids, while in their positional isomers it lies between Gly and Arg for pS1 and Gly and Trp for pS16 (Fig. 1). Moreover, in pS16, both pSer residues are located close to Gly residues. We can suggest that the Pro and Trp amino acids close to pSer induce higher steric hindrance in pS8 and pS18 than the amino acids in their isomer counterparts, making thus the pSer residue less available to interact with the stationary phase and therefore lower retention of pS8 and pS18 than pS1 and pS16.

The major effect of amino acid position in the peptide sequence on retention in HILIC has also been reported in the literature based on prediction models and experimental investigations [21,24,28] using linear peptides, where amino acid were positioned at N-terminus or at different other positions. Although peptides involved in our work are cyclic and structured, we obtained results in agreement with these studies.

4. Conclusion

The main objective of this work was to separate synthetic multi-phosphorylated cyclopeptides and their positional isomers at physiological pH using HILIC coupled to ESI-MS, and to shed light on their retention mechanisms. By screening several stationary phases and mobile phase compositions, the best separation selectivity and baseline resolution were achieved using columns grafted with neutral amide (Acquity UPLC BEH amide) and diol (YMC-Triart Diol) functional groups, with a mobile phase containing 70 and 75% ACN and 20 mmol L⁻¹ ammonium acetate, respectively (see Fig. 2 and Fig. 3A).

The HILIC retention mechanism study showed that peptide retention factors followed the classical HILIC mechanism with the amide and Inertsil Diol-grafted columns, and a linear correlation between retention factors and the number of polar phosphorylated residues was obtained. With the remaining columns, we observed that the nature and charge of the amino acid at the lower face of the peptide backbone affected the peptide retention, depending on the contribution part of the secondary electrostatic interactions with the residual deprotonated silanols at the surface of the stationary phase. The position of the amino acid in the backbone had also an impact on the peptide retention, making it possible the separation of mono- and di-phosphorylated positional isomers with satisfying baseline resolution. The next step of this work will focus on the separation of uranium complexes formed with these peptides at physiological pH and the quantification of uranium among these peptides, using HILIC coupled to elemental and molecular mass spectrometry.

Overall, this study gives an insight on the HILIC approaches that can be undertaken for separating cyclic peptides, which can be of great concern for the separation of molecules of cyclic structure, in pharmaceutical, proteomics and therapeutic applications. Furthermore, the high selectivity obtained for separating isobaric phosphopeptides might be particularly useful in proteomics to help identifying phosphorylation sites in proteins through the separation of peptides from protein digests.

CRedit authorship contribution statement

Lana Abou Zeid: Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing - original draft, Visualization. **Albert Pell:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing - review & editing. **Théo Tytus:** Validation, Investigation. **Pascale Delangle:** Conceptualization, Writing - review & editing, Resources, Project administration. **Carole Bresson:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial

interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the CEA for its financial support.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122792>.

References

- [1] E. Mesterházy, C. Lebrun, A. Jancsó, P. Delangle, A Constrained Tetrapeptide as a Model of Cu(I) Binding Sites Involving Cu₄ S₆ Clusters in Proteins, *Inorg. Chem.* 57 (2018) 5723–5731, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02735>.
- [2] A.M. Pujol, M. Culliel, O. Renaudet, C. Lebrun, P. Charbonnier, D. Cassio, C. Gateau, P. Dumy, E. Mintz, P. Delangle, Hepatocyte targeting and intracellular copper chelation by a thiol-containing glyco-cyclopeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 286–296, <https://doi.org/10.1021/ja106206z>.
- [3] C. Gateau, P. Delangle, Design of intrahapatocyte copper(I) chelators as drug candidates for Wilson's disease: Intracellular copper chelation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1315 (2014) 30–36, <https://doi.org/10.1111/nyas.12379>.
- [4] M. Monestier, A.M. Pujol, A. Lamboux, M. Culliel, I. Pignot-Paintrand, D. Cassio, P. Charbonnier, K. Um, A. Harel, S. Bohic, C. Gateau, V. Balter, V. Brun, P. Delangle, E. Mintz, A liver-targeting Cu(I) chelator relocates Cu in hepatocytes and promotes Cu excretion in a murine model of Wilson's disease, *Metallomics* 12 (2020) 1000–1008, <https://doi.org/10.1039/D0MT00069H>.
- [5] M. Tegoni, F. Yu, M. Bersellini, J.E. Penner-Hahn, V.L. Pecoraro, Designing a functional type 2 copper center that has nitrite reductase activity within -helical coiled coils, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 21234–21239, <https://doi.org/10.1073/pnas.1212893110>.
- [6] H. Huang, S. Chaudhary, J.D. Van Horn, Uranyl–Peptide Interactions in Carbonate Solution with DAHK and Derivatives, *Inorg. Chem.* 44 (2005) 813–815, <https://doi.org/10.1021/ac049528l>.
- [7] S. Safi, G. Creff, A. Jeanson, L. Qi, C. Basset, J. Roques, P.L. Solari, E. Simoni, C. Vidaud, C. Den Auwer, Osteopontin: A Uranium Phosphorylated Binding-Site Characterization, *Chem. - Eur. J.* 19 (2013) 11261–11269, <https://doi.org/10.1002/chem.201300989>.
- [8] R. Pardoux, S. Saugé-Merle, D. Lemaire, P. Delangle, L. Guilloreau, J.-M. Adriano, C. Berthomieu, Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation, *PLoS One* 7 (2012) e41922, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041922>.
- [9] A. Garni, P. Delangle, Recent advances in uranyl binding in proteins thanks to biomimetic peptides, *J. Inorg. Biochem.* 203 (2020) 110936, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110936>.
- [10] C. Lebrun, M. Starck, V. Gathu, Y. Chenavier, P. Delangle, Engineering Short Peptide Sequences for Uranyl Binding, *Chem. - Eur. J.* 20 (2014) 16566–16573, <https://doi.org/10.1002/chem.201404546>.
- [11] M. Starck, N. Sisommay, F.A. Laporte, S. Oros, C. Lebrun, P. Delangle, Preorganized Peptide Scaffolds as Mimics of Phosphorylated Proteins Binding Sites with a High Affinity for Uranyl, *Inorg. Chem.* 54 (2015) 11557–11562, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b02249>.
- [12] M. Starck, F.A. Laporte, S. Oros, N. Sisommay, V. Gathu, P.L. Solari, G. Creff, J. Roques, C. Den Auwer, C. Lebrun, P. Delangle, Cyclic Phosphopeptides to Rationalize the Role of Phosphoamino Acids in Uranyl Binding to Biological Targets, *Chem. - Eur. J.* 23 (2017) 5281–5290, <https://doi.org/10.1002/chem.201605481>.
- [13] F.A. Laporte, C. Lebrun, C. Vidaud, P. Delangle, Phosphate-Rich Biomimetic Peptides Shed Light on High-Affinity Hyperphosphorylated Uranyl Binding Sites in Phosphoproteins, *Chem. - Eur. J.* (2019), <https://doi.org/10.1002/chem.201900646>.
- [14] M.L. Hennrich, V. Groenewold, G.J.P.L. Kops, A.J.R. Heck, S. Mohammed, Improving Depth in Phosphoproteomics by Using a Strong Cation Exchange-Weak Anion Exchange-Reversed Phase Multidimensional Separation Approach, *Anal. Chem.* 83 (2011) 7137–7143, <https://doi.org/10.1021/ac2015068>.
- [15] A. Cristobal, F. Marino, H. Post, H.W.P. van den Toorn, S. Mohammed, A.J.R. Heck, Toward an Optimized Workflow for Middle-Down Proteomics, *Anal. Chem.* 89 (2017) 3318–3325, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03756>.
- [16] P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784–1821, <https://doi.org/10.1002/jssc.200600199>.
- [17] P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review, *Anal. Chim. Acta.* 692 (2011) 1–25, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>.
- [18] B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231–247, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.
- [19] A. Periat, I.S. Krull, D. Guillaume, Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins: Liquid Chromatography, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 357–367, <https://doi.org/10.1002/jssc.201400969>.
- [20] D.E. McNulty, R.S. Annan, Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection, *Mol. Cell. Proteomics MCP.* 7 (2008) 971–980, <https://doi.org/10.1074/mcp.M700543-MCP200>.
- [21] M. Gilar, A. Jaworski, Retention behavior of peptides in hydrophilic-interaction chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 8890–8896, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.005>.
- [22] V. Spicer, O.V. Krokhn, Peptide retention time prediction in hydrophilic interaction liquid chromatography. Comparison of separation selectivity between bare silica and bonded stationary phases, *J. Chromatogr. A.* 1534 (2018) 75–84, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.046>.
- [23] Y. Yang, R.I. Boysen, M.T.W. Hearn, Hydrophilic interaction chromatography coupled to electrospray mass spectrometry for the separation of peptides and protein digests, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 5518–5524, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.085>.
- [24] S. Le Maux, A.B. Nongonierma, R.J. FitzGerald, Improved short peptide identification using HILIC-MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence, *Food Chem.* 173 (2015) 847–854, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.104>.
- [25] W. Jiang, G. Fischer, Y. Girmay, K. Irgum, Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode, *J. Chromatogr. A.* 1127 (2006) 82–91, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.080>.
- [26] S. Di Palma, P.J. Boersema, A.J.R. Heck, S. Mohammed, Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (ZIC-HILIC and ZIC-CHILIC) Provide High Resolution Separation and Increase Sensitivity in Proteome Analysis, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3440–3447, <https://doi.org/10.1021/ac103312e>.
- [27] D. Singer, J. Kuhlmann, M. Muschket, R. Hoffmann, Separation of Multiphosphorylated Peptide Isomers by Hydrophilic Interaction Chromatography on an Aminopropyl Phase, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6409–6414, <https://doi.org/10.1021/ac100473k>.
- [28] M.J. Badgett, B. Boyes, R. Orlando, Peptide retention prediction using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1537 (2018) 58–65, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.12.055>.
- [29] P.J. Boersema, N. Divecha, A.J.R. Heck, S. Mohammed, Evaluation and optimization of ZIC-HILIC-RP as an alternative MudPIT strategy, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 937–946, <https://doi.org/10.1021/pr060589m>.
- [30] M.P.Y. Lam, S.O. Siu, E. Lau, X. Mao, H.Z. Sun, P.C.N. Chiu, W.S.B. Yeung, D. M. Cox, I.K. Chu, Online coupling of reverse-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography for protein and glycoprotein characterization, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 791–804, <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3991-2>.
- [31] E. Blanchard, A. Nonell, F. Chartier, A. Rincel, C. Bresson, Evaluation of superficially and fully porous particles for HILIC separation of lanthanide-polyaminocarboxylic species and simultaneous coupling to ESIMS and ICPMS, *RSC Adv.* 8 (2018) 24760–24772, <https://doi.org/10.1039/C8RA02961J>.
- [32] A.J. Alpert, Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides, *Anal. Chem.* 80 (2008) 62–76, <https://doi.org/10.1021/ac070997p>.
- [33] E.S. Grumbach, D.M. Diehl, U.D. Neue, The application of novel 1.7 μm ethylene bridged hybrid particles for hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1511–1518, <https://doi.org/10.1002/jssc.200700673>.
- [34] https://www.ymc.co.jp/en/columns/ymc_triart_sl/. (n.d.).
- [35] A. Yanagida, H. Murao, M. Ohnishi-Kameyama, Y. Yamakawa, A. Shoji, M. Tagashira, T. Kanda, H. Shindo, Y. Shibusawa, Retention behavior of oligomeric proanthocyanidins in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1143 (2007) 153–161, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.004>.
- [36] A.J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *J. Chromatogr. A.* 499 (1990) 177–196, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96972-3).

Résumé

L'objectif de ce travail a consisté à développer une méthode analytique pour déterminer à pH physiologique l'échelle d'affinité de peptides biomimétiques pour l'uranyle (UO_2^{2+}), et leur sélectivité envers cet élément en présence de cations endogènes (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), en ligne et en une étape unique. Cette approche est essentielle pour mieux comprendre les mécanismes de toxicité de l' UO_2^{2+} au niveau moléculaire et pour développer des agents décorporants sélectifs par chélation. La stratégie analytique a reposé sur la mise en œuvre du couplage simultané de la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) avec les spectrométries de masse à source d'ionisation électrospray (ESI-MS) et à source plasma à couplage inductif (ICP-MS). Une étape essentielle a été consacrée à la mise au point de la séparation des peptides multiphosphorylés incluant leurs isomères de position, des complexes d' UO_2^{2+} formés avec les peptides de différente structure et degrés de phosphorylation, et des complexes des métaux avec le peptide tétraphosphorylé. Il s'agit des premières séparations jamais décrites par HILIC. Des méthodes dédiées ont été développées en ligne pour la caractérisation structurale par ESI-MS des complexes peptidiques issus de la séparation et la quantification simultanée des éléments dans ces complexes, permettant de déterminer en une étape unique la distribution quantitative des métaux dans les différentes espèces. Ainsi, une échelle d'affinité des peptides pour l' UO_2^{2+} a été déterminée et a permis de mettre en évidence l'effet de la position des résidus phosphorylés dans le squelette peptidique et de la structure des peptides sur leur affinité pour l' UO_2^{2+} . Suivant la même approche, la sélectivité du peptide tétraphosphorylé pS1368 a été évaluée en présence de cations endogènes comme compétiteurs potentiels dans les milieux biologiques. Ces derniers, présents à différentes proportions n'ont pas déplacé l' UO_2^{2+} du complexe $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, soulignant la sélectivité élevée de ce peptide vis-à-vis de l' UO_2^{2+} et son intérêt en tant qu'agent décorporant sélectif de cet élément *in vivo*.

Mots clés : Uranyle, peptides biomimétiques, métaux, affinité, sélectivité, HILIC, ESI-MS, ICP-MS

Abstract

The aim of this work was to develop an analytical method in order to determine at physiological pH the affinity scale of biomimetic peptides for uranyl (UO_2^{2+}), and their selectivity towards this element in the presence of endogenous cations (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), online and in a single step. This approach is essential to better understand the mechanisms of toxicity of UO_2^{2+} at the molecular level and to develop selective decorporating agents by chelation. The analytical strategy was based on the implementation of the simultaneous coupling of hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with electrospray ionization source (ESI-MS) and inductively coupled plasma source (ICP-MS) mass spectrometry. An essential step has been devoted to the development of the separation of multiphosphorylated peptides including their positional isomers, UO_2^{2+} complexes formed with peptides of different structure and degrees of phosphorylation, and metal complexes formed with the tetraphosphorylated peptide. It is the first separations ever described using HILIC. Dedicated methods have been developed online for the structural characterization by ESI-MS of peptide complexes resulting from the separation and simultaneous quantification of the elements in these complexes, allowing to determine in a single step the quantitative distribution of metals in the different species. Thus, the affinity scale of the peptides for UO_2^{2+} was determined and made it possible to demonstrate the effect of the position of phosphorylated residues in the peptide backbone and of the structure of the peptides on their affinity for UO_2^{2+} . Following the same approach, the selectivity of the tetraphosphorylated peptide pS1368 was evaluated in the presence of endogenous cations as potential competitors in biological media. These cations, present in different proportions, did not displace UO_2^{2+} from the $\text{UO}_2(\text{pS1368})$, underlining the high selectivity of this peptide with respect to UO_2^{2+} and its potential as a promising decorporating agent of this element *in vivo*.

Keywords: Uranyl, biomimetic peptides, metals, affinity, selectivity, HILIC, ESI-MS, ICP-MS