



HAL
open science

Couplage de la photodissociation laser et la spectrométrie de masse pour la caractérisation de l'oxydation des cystéines protéiques

Jean-Valery Guillaubez

► **To cite this version:**

Jean-Valery Guillaubez. Couplage de la photodissociation laser et la spectrométrie de masse pour la caractérisation de l'oxydation des cystéines protéiques. Chimie analytique. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1069 . tel-04120378

HAL Id: tel-04120378

<https://theses.hal.science/tel-04120378>

Submitted on 7 Jun 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.

N° d'ordre NNT :
2022LYSE1069



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206
Chimie

Spécialité de doctorat : Chimie
Discipline : Sciences Analytiques

Soutenue publiquement le 09/05/2022, par :
Jean-Valery GUILLAUBEZ

Couplage de la photodissociation laser et la spectrométrie de masse pour la caractérisation de l'oxydation des cystéines protéiques

Devant le jury composé de :

SALPIN, Jean-Yves

Directeur de recherche, CNRS, Université d'Evry Val D'Essonne

HIRTZ, Christophe

Professeur des Universités, CHU Montpellier, Université Montpellier

VINH, Joëlle

Directrice de recherche, CNRS, Université PSL

COMPAGNON, Isabelle

Maître de Conférences, CNRS, Université Lyon 1

GIROD, Marion

Chargée de recherche, CNRS, Université Lyon 1

Président du jury

Rapporteur

Rapporteuse

Examinatrice

Directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Résumé

Dans un contexte de population vieillissante, la découverte de nouveaux biomarqueurs de pathologies lourdes telles que les maladies neurodégénératives est un des enjeux clefs de notre ère. Grâce aux progrès technologiques, la recherche de biomarqueur se tourne vers des phénomènes minoritaires et transitoires jusque-là impossibles à quantifier. Les variations de l'oxydation des fonctions thiols des cystéines en acide sulfénique (Cys-SOH) ou leur suroxydation traduit la présence d'un dérèglement de l'équilibre redox du corps humain, le stress oxydant. Cependant, de par l'importante gamme de concentration dynamique des échantillons biologiques, la quantification de ces Cys-SOH très peu concentrés représente un défi analytique. La plupart des méthodes de détection et de quantification des Cys-SOH emploient la spectrométrie de masse qui permet une localisation des sites d'oxydation grâce à la fragmentation des peptides issus des protéines oxydées. Cependant, ces techniques nécessitent généralement des étapes d'enrichissement/fractionnement des échantillons afin d'obtenir la sensibilité requise.

Cette thèse porte sur l'amélioration de la sensibilité analytique pour la quantification des Cys-SOH endogènes d'échantillons biologiques en substituant la dissociation classique par collision (HCD) par la photodissociation induite par laser (LID) afin d'ajouter une spécificité optique à la spectrométrie de masse. En effet, le mode de fragmentation HCD est non-discriminant et l'intégralité des ions isobares est fragmentée, générant des interférences responsables du bruit analytique. Les peptides n'absorbant pas dans le visible, le greffage spécifique des Cys-SOH avec un chromophore absorbant à 473 nm, le dabcyloxydation (DabDn), permet de cibler et fragmenter spécifiquement les peptides à Cys-SOH. La fragmentation laser du chromophore DabDn, synthétisé par le laboratoire de Chimie de l'ENS Lyon, a tout d'abord été étudiée et plusieurs mécanismes de fragmentation ont été proposés. La dérivation des Cys-SOH de peptides et protéines modèles dont les cystéines ont été oxydées *in vitro* a été optimisée et leur fragmentation étudiée. Il a également été démontré que la LID permet d'atteindre des limites de détection et de quantification plus basses que celles obtenues en HCD, grâce à la réduction du bruit interférent. La détection et la quantification des Cys-SOH endogènes de

protéines plasmatiques par LID, via leur dérivation, de six échantillons de plasma humain ont été réalisées avec succès, permettant une quantification relative entre les échantillons.

Cette méthode a ensuite été optimisée et appliquée pour le dosage multiplexé de protéines à Cys-SOH endogènes au sein d'une cohorte de plasma de patients sains, atteints de la maladie d'Alzheimer et positifs au COVID-19. Afin de pallier les biais dus à la variation instrumentale ou de la quantité de protéines entre individus, une stratégie de normalisation interne a été mise en place. Ainsi, les peptides à cystéine non oxydée, i.e. thiols libres (Cys-SH), ont été suivis après dérivation par un chromophore dabcyI maléimide, permettant lui aussi une fragmentation spécifique par LID. Le rapport des aires des pics peptides à Cys-SOH et Cys-SH dérivés par les deux chromophores fournit un ratio d'oxydation qui permet de comparer les différents niveaux d'oxydation des protéines plasmatiques suivies. Parmi les 54 plasmas analysés, des variations du taux d'oxydation des échantillons issus de patients positifs au COVID-19 par rapport au reste de la cohorte ont été observées pour cinq peptides issus de quatre protéines plasmatiques. La méthode développée permet donc une quantification relative des Cys-SOH endogènes directe, sensible, robuste, non-biaisée avec un protocole simple exempt d'étapes d'enrichissement ou de fractionnement.

Mots clefs : Spectrométrie de masse haute résolution, photodissociation, chromophore, protéomique, oxydation des cystéines, Alzheimer, COVID-19.

Resume

In a context of population ageing, discovery of novel biomarkers for neurodegenerative diseases is a key issue. Thanks to technological improvements, research now focuses on difficult to quantify low abundance and transitory phenomenon. As an example, overabundance or overoxidation of cysteine thiols oxidized into sulfenic acids (Cys-SOH) reflects disorders of human body redox balance: oxidative stress. However, due to the complexity and concentration dynamic range of the biological samples, quantification of such low concentrated Cys-SOH remains an analytical challenge. Most detection and quantification methods use mass spectrometry, a tool that allows to localise oxidation sites by fragmentation of oxidized protein peptides. However, such techniques rely on enrichment/fractionation steps to reach the required sensitivity.

The aim of this PhD work was to improve sensitivity for endogenous Cys-SOH quantification in biological samples by substituting the classical collision induced dissociation (HCD) mode by laser-induced dissociation (LID) at 473 nm in order to add an optical specificity to the mass selectivity. Indeed, HCD is a non-selective fragmentation mode, where all isobar ions are fragmented generating interferences analytical noise. Since peptides do not absorb in the visible range, this novel approach relies on the proper chemical derivatization of oxidized Cys with a chromophore absorbing at 473 nm, the dabcyyl cyclohexanedione (DabDn), allowing to specifically target and fragment Cys-SOH peptides. The fragmentation of this chromophore, synthesized by the Laboratoire de Chimie of ENS Lyon, was first studied. Derivatization of model Cys-SOH peptides and proteins, whose cysteines were oxidized *in vitro*, was optimised and their fragmentation studied. LID allows to reach lower detection and quantification limits than HCD, by reducing interfering noise. Derivatized endogenous plasma proteins Cys-SOH from six plasma sample were successfully detected and quantified, allowing to perform relative quantification between samples.

This methodology was then optimized and applied for multiplexed quantification of endogenous Cys-SOH proteins of a cohort of plasma samples from healthy, with Alzheimer's disease and COVID-19 positives patients. Internal normalisation was introduced to mitigate instrumental and total protein content in-between samples bias. Non-oxidized cysteine peptides were monitored after derivatization

with a dabcyI maleimide chromophore allowing specific LID fragmentation. Derivatized Cys-SOH and Cys-SH peaks area ratio provides an oxidative ratio allowing to compare plasma protein oxidative levels. Oxidative status variations from 54 plasmas were detected for five peptides in COVID-19 positive patient samples. This method allows a direct, sensitive, unbiased, robust quantification of endogenous Cys-SOH that does not require enrichment or fractionation steps.

Keywords : High resolution mass spectrometry, laser induced dissociation, chromophore derivatization, proteomics, cysteine oxydation, Alzheimer, COVID-19.

Contributions scientifiques

Articles scientifiques

- Guillaubez, J. V., Pitrat, D., Bretonnière, Y., Lemoine, J. & Girod, M. Unbiased Detection of Cysteine Sulfenic Acid by 473 nm Photodissociation Mass Spectrometry: Toward Facile in Vivo Oxidative Status of Plasma Proteins. *Analytical Chemistry* **93**, 2907–2915 (2021).

- Second article scientifique en cours de rédaction.

Conférences

Posters

2019 : Congrès commun de Spéctrométrie de Masse et Analyse Protéomique (SMAP) à Strasbourg, présentation d'un poster physique intitulé « Specific detection of cysteine sulphenic acid by coupling Mass Spectrometry with Laser Induced Dissociation ».

2021 : Congrès en ligne HUPO Reconnect (Human Proteome Organization), présentation d'un poster dématérialisé sur la plateforme Gather intitulé « Specific screening of COVID-19 and Alzheimer's Disease biomarkers through sulphenic acids targeting by mass spectrometry coupled with Laser Induced Dissociation ».

Communications orales

2021

- Rencontres du Club Jeune de la SFMS (RCJSM), communication orale de dix minutes intitulée « Couplage de la photo-dissociation laser et la spectrométrie de masse pour la caractérisation du stress oxydant ».

- Journées Françaises de Spéctrométrie de Masse (JSFM), communication orale de 15 minutes intitulée « Specific detection of cysteine sulphenic acid by coupling mass spectrometry with laser induced dissociation »

« Il doit y avoir quelque chose dans les livres, des choses que nous ne pouvons pas imaginer, pour amener une femme à rester dans une maison en flammes. Oui, il doit y avoir quelque chose. »

« Fahrenheit 451 » – Ray Bradbury

« Les livres sont capables d'emmagasiner les informations bien mieux que nous – ce que nous faisons et dont les livres sont incapables, c'est d'interpréter. Donc, si l'on ne compte pas tirer de conclusions, autant se contenter de laisser les informations dans les textes. »

« Les Archives de Roshar : La voie des rois 1 » – Brandon Sanderson

« Une histoire ne vit pas tant qu'elle n'a pas été imaginée dans l'esprit de quelqu'un. »

« Les Archives de Roshar : La voie des rois 2 » – Brandon Sanderson

« Avoir des idées c'est joli, mais si c'est pour s'endormir dessus ça ne sert à rien »

Rainer Wenger – « La Vague » (2006)

« Je ne peux le porter pour vous, mais je peux vous porter vous ! »

Sam Gamegie à Frodon – « Le seigneur des anneaux : Le retour du roi » – J.R.R Tolkien

« Ou était le Gondor lorsque L'Ouestremarche est tombée ? – En Gondor »

Théoden et Aragorn – « Le seigneur des anneaux : Les deux tours » – J.R.R Tolkien

Remerciements

A ma directrice de thèse, Marion Girod, dont les efforts pour canaliser et guider l'électron libre que je peux être, sans le priver de son autonomie ou de son libre arbitre, m'impressionneront toujours. Son infinie patience devant mes allégories aussi brouillonnes que confuses, sa disponibilité à les écouter sachant pertinemment que je n'en ai jamais pour seulement cinq minutes, son tact franc, direct et pertinent ainsi que sa capacité à trouver les mots justes m'ont laissé une empreinte enluminée par sa gentillesse. L'expérience aura été formidable, enrichissante, épanouissante, et je lui serai éternellement reconnaissant de m'avoir permis de la vivre (presque) comme je l'entendais.

Merci à Jérôme Lemoine d'avoir appuyé ma candidature en se souvenant d'un élève très impliqué dans ses cours mais pas de sa note de partiel. Merci pour ses conseils portant aussi bien aussi bien sur la forme que sur le fond.

Merci à Arnaud Salvador dont les astuces m'auront épargné des heures de travail fastidieux, à Fabien Chirot qui aura finalement échoué à me tuer malgré ses nombreuses tentatives, à Sophie Aycirix qui ne tarit pas d'éloges sur mon gâteau au yaourt, à Clothilde Zerbino qui fût la bonne humeur du sous-sol incarnée.

Merci à la fine équipe de thésards : Nicolas, qui a sauvé nos thèses en me privant l'accès à son bureau, qui sait quels concepts géniaux auraient vu le jour ? Aurélien, que j'ai vu grandir en même temps que sa barbe et qui partage mes goûts en matière de dawa (désolé Marion). Eva, accompagnée de ses fidèles 35 cm. Iulia, dont je jalouse toujours secrètement le score. Thomas (Greg), la piste verglacée de notre bureau me manquera à jamais. Francis, petit nouveau de 40 ans. Sans oublier Valérian, petit ange parti trop tôt, Maxime et notre chassé-croisé, Nour, qui aura légué de sacrées anecdotes et Leny au cœur aussi grand que sa thèse !

Merci à Romain, Indochine ne me quitte plus quand je pense à toi, à Maud, la seule lève tôt de ce labo de feignasses, à Anabelle, toujours rayonnante même dans la galère (respé), à Delphine, à 170 sur les quais du Rhône (presque).

Petite pensée à Numa-Rainier, qui aura bien souffert sous notre joug, Camille qui, elle, y a survécu sans encombre, Ting-Ting qui riait de nos malheurs et réussissait à nous ignorer, à la triplète Margaux, Sarah et Thomas (Cédric), skip vous avez mis le feu en continu.

A mes amis correcteurs, Jérôme et Sonia, vous êtes de sacrées brutasses, et Kloé, qui n'est pas en reste sur la rigolade. Ma gratitude se comptera sûrement en fûts.

A mes amis non correcteurs (que je comprends tout à fait), parfois lecteurs, qui m'ont toujours encouragé, votre implication représente beaucoup pour moi.

A toutes ces personnes qui m'ont demandé « oh trop cool c'est quoi ton sujet en résumé ? », grâce à vous une carrière dans la vulgarisation scientifique s'offre à moi. A ma pilosité faciale, qui a su palier mes fringales d'après-midi au sous-sol en conservant habilement une partie de mon déjeuner.

Un grand merci à mes parents et à ma sœur, qui ont toujours été fiers de moi, sans qui rien de toute cela n'aurait été possible.

Le plus grand et le plus chaleureux des remerciements est réservé à Juliana, ma moitié, qui aura partagé ma vie aussi longtemps que cette thèse, m'aura remonté le moral à grand coups de tacos (pas dans le visage) et m'aura généreusement prêté sa crème anti-eczéma durant les périodes de stress les plus intenses. Tu m'as tant apporté durant ces trois ans, tellement soutenu avec ta joie de vivre, ta motivation et ton enthousiasme qu'une partie non négligeable de ce manuscrit te revient. Merci d'avoir été là et de faire encore partie de ma vie.

Table des matières

Couplage de la photodissociation laser et la spectrométrie de masse pour la caractérisation de l'oxydation des cystéines protéiques	1
Université Claude Bernard – LYON 1	2
Résumé	3
Resume	5
Contributions scientifiques	7
Remerciements	9
Table des matières	11
Liste des abréviations	13
Liste des figures	16
Liste des tableaux	23
Introduction générale	24
Chapitre I. Notions générales sur le stress oxydant	28
Introduction	28
I. L'équilibre redox au sein de la cellule	30
I. 1. Les oxydants : espèces réactives et systèmes de production	30
I. 2. Les antioxydants	38
I. 3. Mécanismes physiologiques impliquant les ROS	45
Conclusion de la partie I	50
II. Stress oxydant	51
II. 1. Illustrations de l'impact du stress oxydant	52
II. 2. Biomarqueurs du stress oxydant	59
Conclusion	64
Chapitre II. État de l'art des techniques de caractérisation des modifications redox des cystéines et quantification de protéines par spectrométrie de masse	65
Introduction	65
I. Méthodes de détection et quantification des Cys-SOH	65
I. 1. Quantité globale de cystéines oxydées	66
I. 2. Localisation (et quantification) des cystéines oxydées	70
II. Analyse des protéines par spectrométrie de masse	84
II. 1. Stratégies analytiques	85
II. 2. Ionisation de l'échantillon	87
II. 3. Analyseurs	88
II. 4. Modes d'acquisition	89
II. 5. Modes de fragmentation	95
Conclusion	110
Chapitre III. Développement d'une méthode dérivation, détection et quantification spécifique des acides sulféniques endogènes de protéines plasmatiques par couplage de la spectrométrie de masse et de la photodissociation.	112
Introduction	112
I. Laser Induced Dissociation (LID)	113
I. 1. Montage expérimental	113
I. 2. Chromophore dabcyI cyclohexanedione	115
II. Dérivation de peptides à cystéine oxydée (Cys-SOH)	127
II. 1. Dérivation des Cys-SOH et fragmentation des peptides dérivés	128
II. 2. Optimisation de la réaction d'oxydérivation	141
II. 3. Impact de la quantité de DabDn sur le milieu de réaction	149
II. 4. Comparaison de la sensibilité des techniques LID et HCD	153

II. 5. Application de la réaction d'oxydérivation à un mélange complexe de peptides.....	157
III. Oxydation dérivation protéique.....	158
III. 1. Effet de la réduction des ponts disulfures par le DTT.....	159
III. 2. Protocole d'oxydérivation protéique.....	162
III. 3. Résultats	162
IV. Dérivation des Cys-SOH endogènes dans des plasmas humains.....	164
IV. 1. Protocole	165
IV. 2. Résultats	165
Conclusion.....	171
Chapitre IV. Détection spécifique et quantification relative multiplexée des acides sulféniques de protéines plasmatiques par couplage de la spectrométrie de masse et de la photodissociation : application à une cohorte de patients Alzheimer	173
Introduction	173
I. Optimisation de la dérivation des Cys-SOH	175
I. 1. Optimisation de la dérivation/digestion des protéines oxydées.....	175
I. 2. Ajout d'acide formique et vérification du % _{org}	180
I. 3. Évaluation des performances de la SPE.....	183
I. 4. Dénaturation des protéines.....	195
I. 5. Répétabilité de la dérivation des Cys-SOH endogènes dans le temps	200
Conclusion.....	201
II. Mise en place de la dérivation des Cys-SH avec la dérivation des Cys-SOH	202
II. 1. Inclusion du DabMal dans le protocole de dérivation des Cys-SOH.....	203
II. 2. Optimisation de la dérivation des Cys-SH et des Cys-SOH endogènes.....	211
III. Analyse des Cys-SH et Cys-SOH endogènes d'échantillons de plasmas issus de cohortes de patients	219
III. 1. Recherche de biomarqueurs.....	220
III. 2. Quantification des Cys-SH et Cys-SOH endogènes des cohortes de patients	224
Conclusion.....	238
Conclusion générale	240
Bibliographie.....	246
Annexe I.....	263
Annexe II.....	268
Annexe III.....	275

Liste des abréviations

2DE	Two dimensionnal electrophoresis	DabMal	Dabcyll Maléimide
4-HNE	4-hydroxy-2-nonéol	DDA	Data Dependent Acquistion
A2MG	α -2 Macroglobuline	Dapcyl	4-[2-[4-(diméthylamino) phenyl]diazényl]-benzoic acid
A1AT	α -1-antitrypsine	DIA	Data Independent Acquisition
AACT	α -1-anthichymotrypsine	DIGE	Differential in gel electrophoresis
Ac.Uq	Acide Urique	DNPH	Dinitrophenyl hydrazine
ACN	Acétonitrile	DNTB	(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid)
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique	DTT	Dithiothréitol
A.F	Acide Formique	ECD	Electron Capture Dissociation
AGC	Automatic Gain Control	EDD	Electron Detachment Dissociation
AGE	Produits terminaux de glycosylation	EFS	Établissement Français du Sang
ALA	Acide α -lipoïque	EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
AMBIC	Bicarbonate d'Ammonium	EID	Electron Induced Dissociation
AMPK	AMP-Protein Kinase	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays
ANOVA	Analysis Of Variance	EPD	Electron Photodetachment
AP-1	Activator Protein 1	Ero1	ER Resident Oxydoréductase 1
APOB-100	Apolipoprotéine B-100	ESI	Electrospray
APOE	Apolipoprotéine E	ETD	Electron Transfert dissociation
ATF6(?)	Activation Transcription factor 6	F	Phénylalanine
ATP	Adenosine TriPhosphate	FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
BEST	Biomarkers endpoints and other tools	FETUA	α -2-HS-glycoprotéine
BIAM	Biotinylated iodoacetamide	FIBA	Fibrinogène α Chain
Biotin-	biotin-N-[6-(biotinamido)-hexyl]-	FIBB	Fibrinogène β chain
HPDP	30-(20-pyridyldithio)-propionamide	FIBG	Fibrinogène γ Chain
BST	Biotin Switch Technique	FINC	Fibronectine
C-term	C-terminal	FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
CAT	Catalase	FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
CERU	Céruloplasmine	FTICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
CFAH	Complément Factor H	GLUT	Glucose Transporter
CID	Collision-Induced Dissociation	GPx	Glutathion peroxydase
CO3	Complément C3	GRx	Glutathion réductase
CO4A	Complément C4A	Grx	Glutaredoxines
CoQ	Coenzyme Q	GSH	Glutathion
COX2	Cytochrome c oxydase sous-unité 2	GST	Glutathion S-Transférase
CTEM	Chaîne de Transport d'Electrons Mitochondriale	GSTK1	Glutathion S-Transférase Kappa 1
CV	Coefficient de Variation	H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
CXCL7	Chemokine C-X-C motif ligand 7	HCD	Higher-Energy C-trap Dissociation
Cys	Cystéine	HEMO	Hémopexine
Cys-SOH	Cystéine à fonction acide sulfénique	HIF1α	Hypoxia Inductible Factor 1-alpha
Cys-SO₂H	Cystéine à fonction acide sulfonique	HILIC	Chromatographie d'interaction hydrophile
Cys-SO₃H	Cystéine à fonction acide sulfonique	HLB	Hydrophilic Lipophilic Balance
CysROx	Cystéines réversiblement oxydées	HPLC	High Performance Liquid Chromatography
D	Acide asparagique	HPT	Haptoglobine
DabDn	Dabcyll cyclohexanedione	HSF	Heat Shock Factor
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry	Hsp	Heat Shock Protein
HSA	Albumine Sérique Humaine		

I	Isoleucine	NETD	Negative Electron Transfert Dissociation
IAM	Iodoacétamide	niECD	Negative Electron Capture Dissociation
ICAT	Isotope-Coded Affinity Tag	NOX	NADPH Oxydase
ICDID	Isotope-Coded Dimedone	NPSP	N-(phenylseleno)-phtahalimide
IGKC	Immuno-globulin κ Constant	Nrf2	Nuclear Factor erythroid 2-related factor 2
IκB	Nuclear Factor of kappa-light- polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor	OhrR	Organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator
IL-1β	Interleukine-1-beta	OPO	Oscillateur Paramétrique Optique
IL-6	Interleukine-6	OxyR	Hydrogen peroxide-inducible gene activator
IodoTMT	Iodoacetyl tandem Mass Tag	p53	Tumor Protein 53
IR	Infrarouge	PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
IT	Injection Time	PDI	Protein Disulfide Isomerase
iTRAQ	Isobaric tag for relative and absolute quantification	PERK	
IRMPD	Infrared multiphoton dissociation	PETD	Photoelectron-Transfer Dissociation
JNK	c-Jun N-Terminal Kinase	PI3K	Phophatidylinositol 3-kinase
K	Lysine	PK	Portéine kinase
L	Leucine	pH	Potentiel Hydrogène
LC	Chromatographie liquide	PO	Peroxysome
LC-MS	Spectrométrie de masse couplée à la chromatographique liquide	PRM	Parallel Reaction Monitoring
LDD	Limite de Détection	Prx	Peroxyredoxines
LDQ	Limite de Quantification	PTM	Modification post-traductionnelle
LED	Diodes électroluminescentes	PTP	Protéine tyrosine phosphatase
LID	Laser Induced Dissociation	Q-TOF	Quadripôle-Time of Flight
LIT	Linear Ion Trap	Q1	Premier quadripôle
LLE	Extraction Liquide-Liquide	q2	Second quadripôle
LOOH	Peroxyde lipidique	Q3	Troisième quadripôle
LR8	Peptide LCTVATLR	QC	Contrôle Qualité
m/z	Ratio masse sur charge	QqQ	Triple quadripôle
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization	R	Arginine
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	R-S-R	Fonction Thioéther
MDA	Malondialdéhyde	R-(S=O)-R	Fonction sulfoxyde
MeOH	Méthanol	RDD	Radical-Directed Dissociation
MMTS	Methylmethan thiosulfonate	RE	Reticulum Endoplasmique
MPBs	Metal-Binding Proteins	RET	Reverse Electron Transport
MRM	Multiple Reaction Monitoring	RES	Reactive Electrophile Species
MS	Spectrométrie de masse	RF	Radiofréquences
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem	RHS	Reactive Halogenated Species
MTBE	methyl tert-butyl ether	RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
MTs	Metallothionéines	RNS	Reactive Nitrogen Species
N-term	N-terminal	ROOH	Peroxyde
NADH	A définir	ROS	Reactive Oxygen Species
NBD	7-chloro-2-nitrobenzo-2-oxa-1,3- diazole	RsrA	Regulator of SigmaR
chloride		RSS	Reactive Sulfur Species
NEM	N-ethylmaléimide	SDS-	Dodécysulfate de sodium -
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells	PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
		SH	Fonction thiol

SHP-1	Protéine tyrosine phosphatase-1	Trx	Thioredoxines
SHIP-1	Phosphatidylinositol 5-phosphatase 1	TWIMS	Travelling Wave Ion Mobility Spectrometry
SILAC	Stable Isotope labelling by amino acids in cell culture	UPR	Unfolded Protein Response
SIM	Single Ion Monitoring	UV	Ultraviolet
SNO	Fonction nitrosyl	UVPD	Ultraviolet Photodissociation
SPE	Solide Phase Extraction	V	Valine
SRM	Selected Reaction Monitoring	VEGFR2	Vascular endothelial Growth Factor Receptor 2
SOD	Superoxyde Dismutase	Vit C	Vitamine C
SOH	Fonction acide sulfénique	Vit E	Vitamine E
SOS	Fonction thiosulfinate	W	Tryptophane
Srx	Sulfiredoxines	WB	Western Blot
S-S	Pont Disulfure	XDH	Xanthine Déshydrogénase
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine	XIC	Extracted Ion Chromatogram
TNF-α	Tumor Necrosis Factor Alpha	XOR	Xanthine Oxyréductase
TOF	Time of Flight	XO	Xanthine Oxydase
TrH	Sérotransferrine	Y	Tyrosine

Liste des figures

Figure 1: Illustration de l'équilibre redox. Lorsque la production et l'élimination des espèces réactives oxygénées (ROS) sont équilibrées, le système cellulaire fonctionne dans ses conditions physiologiques. Lorsque la production de ROS devient plus importante que ce que le système peut éliminer, l'équilibre est rompu en faveur du stress oxydant, une condition pathologique due aux dérèglements induits par les ROS non contrôlés. De même, si l'élimination des ROS est plus importante que leur production, le système entre en état de stress antioxydant, également pathologique.	29
Figure 2: Illustration du complexe I mitochondrial. La production d' $O_2^{\bullet-}$ se fait uniquement au sein de la matrice mitochondriale, lors de la capture d'électrons soit au niveau du complexe FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), soit au niveau du transporteur COQ, après leur acheminement depuis le FAD par un phénomène de RET (Reverse Electron Transport).....	32
Figure 3: Représentation schématique simplifiée du fonctionnement de NOX2 : les électrons issus de NADPH sont transmis à la FAD, puis conduits au travers des hèmes grâce à un médiateur, O_2 , qui sera oxydé en $O_2^{\bullet-}$	33
Figure 4: Deux formes de la XOR en fonction de la concentration en O_2 du milieu : une faible concentration en O_2 (conditions physiologiques) induit une production majoritaire d' H_2O_2 (gauche). L'augmentation de la concentration en O_2 du milieu va conduire à une production plus importante d' $O_2^{\bullet-}$ (droite). ²⁷	35
Figure 5: Illustration des divers mécanismes de production et réduction des ROS ayant lieu au sein d'un peroxyosome (PO). ²⁹	36
Figure 6: Représentation simplifiée du repliement de la chaîne protéique au sein du réticulum endoplasmique suite à la génération d' H_2O_2 par dismutation d' $O_2^{\bullet-}$ produit par réaction d' O_2 avec la FAD de l'antioxydant Ero1 de façon physiologique (gauche) et pathologique suite à l'accroissement de la quantité de ROS intra et extraréticulique (droite).	37
Figure 7: Schématisation des différentes voies de régénération des vitamines C (Vit C), E (Vit E), de l'acide urique (Ac.Uq), de l'acide α -lipoïque (ALA) et de la CoenzymeQ10 (COQ10) entre eux.....	42
Figure 8: Schéma simplifié de l'implication des ROS dans l'apoptose cellulaire au travers des facteurs TNF- α , JNK et NF- κ B.....	47
Figure 9: Schéma décrivant les différentes oxydations possibles du groupement thiol (SH, vert) des cystéines : L'oxydation en acide sulfénique (SOH), leur suroxydation en acides sulfoniques et sulfoniques (SO_2H et SO_3H) ou leur dimérisation par la formation d'un pont disulfure avec une fonction thiol libre (S-S), qui pourra être réduite par une enzyme en thiol. ⁷⁸	62
Figure 10: Suivi de l'évolution de la quantité de thiols dans le temps en fonction du stress oxydatif appliqué.....	67
Figure 11: Estimation de la quantité de CysROx par comparaison de la quantité de thiols libres dérivés d'un échantillon avec la quantité de cystéine totale obtenue grâce au même échantillon dont les CysROx ont été réduites et l'intégralité des thiols dérivés.	69
Figure 12: Électrophorèse orthogonale : Les différents peptides d'un échantillon sont séparés selon une première dimension, réduits dans le gel et à nouveau séparés dans une seconde dimension. La distance parcourue par les peptides oxydés qui ont été réduits sera différente entre la première et la seconde séparation, mettant en évidence leur oxydation. ⁹⁰	72
Figure 13: Schéma expliquant la méthodologie des techniques de marquage isotopique des thiols libres a) ICAT ; b) OxICAT et leur détection par spectrométrie de masse. ⁷⁸	73
Figure 14: Illustration de la Biotin-Switch Technique dans laquelle les SH libres sont alkylés au MMTS, les SOH ou SNO réduits, les SH nouvellement formés dérivés par biotin-HPDP, puis purifiés sur une colonne streptavidine et analysés en LC-MS/MS.....	76
Figure 15: Illustration de la technique IodoTMT où les peptides oxydés issus d'échantillons contrôles (marqués avec un *) et d'échantillons ayant subi un stress oxydant (marqués avec un °) sont	

spécifiquement réduits et dérivés avec des sondes TMT différentes en fonction de la nature l'oxydation et de la catégorie d'échantillons à laquelle ils appartiennent.	77
Figure 16: Illustration de la technique OxiTMT, permettant de normaliser les quantités de CysRox par la quantité de cystéines totale de leur échantillon et de les comparer à différents échantillons en une seule analyse grâce à l'utilisation de différentes sondes TMT. ¹¹³	78
Figure 17: Illustration de la méthode OxITRAQ, où la quantité de CysROx de différents échantillons peut être comparée en une même analyse grâce à la combinaison de la biotin-switch technique et de sondes iTRAQ.	79
Figure 18: Représentation de la méthode Oc-SILAC, où la quantité de CysROx de différents échantillons peut être comparée en une même analyse grâce à la combinaison de la biotin-switch et de la technique SILAC qui permet d'obtenir des versions isotopiques lourdes et légères d'échantillons à comparer..	80
Figure 19: Illustration des mécanismes réactionnels a) Click-ready entre une sonde (R, rouge) conjuguée à un groupement azoture (bleu) et le composé DYn-1 constitué d'un groupement dimédone (noir) et d'un groupement alcyne (orange) b) Ligation de Staudinger entre une sonde (R, rouge) conjuguée à un groupement phosphane (noir) et le composé DAz-2 constitué d'un groupement dimédone (noir) et d'un groupement azoture (bleu).	81
Figure 20: Illustration de la technique Isotope Coded Dimedone permettant la dérivation des SOH et SH d'un échantillon par une sonde d ⁶ -dimédone (a)) et une sonde iododimédone (b)), respectivement. ¹¹⁶	82
Figure 21: Comparaison des techniques a) Top-Down, où la protéine et ses variants intacts sont séparés et analysés en spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) et b) Bottom-Up où la protéine est digérée en peptides qui sont ensuite séparés, sélectionnés individuellement pour être fragmentés puis analysés en spectrométrie de masse.	86
Figure 22: Illustration de l'ionisation a) ESI b) MALDI. ²⁷¹	88
Figure 23: Illustration du mode d'acquisition MRM. Les analytes sont filtrés en fonction de leur m/z en Q1, fragmentés en q2 puis les fragments filtrés selon leur rapport m/z permettant d'obtenir le signal du couple précurseur/fragment en fonction du temps. ²⁷²	90
Figure 24: Illustration des différences de fonctionnement entre les méthodes d'acquisition SRM et PRM (haute résolution). ²⁷³	92
Figure 25: Illustration des différences de fonctionnement des modes Data Dependent Acquisition (DDA) (A) et Data Independent Acquisition (DIA) (B). ¹⁴⁶	94
Figure 26: illustration de la nomenclature universelle des différents types de fragments observés lors de la fragmentation d'un peptide. ¹³⁹	96
Figure 27: Illustration de l'augmentation de l'énergie interne du précurseur jusqu'à sa dissociation suite à l'absorption successive de photons infrarouges de faible énergie hv et la redistribution de l'énergie absorbée par mécanisme vibrationnel (IVR, « Internal Vibrational Redistribution »).....	99
Figure 28: Voies de dissociation à l'état excité en UVPD.	103
Figure 29: Schéma représentant les modes de fragmentation ECD (a)), où la fragmentation du composé d'intérêt se fait par capture d'électrons issus d'un faisceau d'ions, et ETD (b)) dont la fragmentation de l'analyte résulte d'un transfert d'électron suite à sa réaction avec un composé anionique.....	107
Figure 30: Schéma du QExactive (ThermoFisher) couplé avec un laser continu émettant à 473 nm dans la cellule HCD.....	114
Figure 31: Formule développée du chromophore Dabcyl Cyclohexanedione comportant un groupement cyclohexanedione dérivant spécifiquement les SOH (bleu) et un groupement dabcyl qui permet l'absorption des photons à 473 nm, induisant sa fragmentation.	116
Figure 32: Spectre MS du DabDn solubilisé dans 100 % MeOH, moyenné sur 50 scans acquis en mode positif avec une résolution de 140 000.	117
Figure 33: Spectre de fragmentation LID du précurseur [DabDn+H] ⁺ suite à son irradiation laser de puissance 400 mW à 473 nm durant 25 ms avec une énergie de collision de 3 eV, moyenné sur 50 scans acquis avec une résolution de 140 000. L'astérisque marque l'ion précurseur [DabDn+H] ⁺ non	

fragmenté dont l'intensité a été multipliée par 10 pour être visible sur le spectre de fragmentation.	
.....	118
Figure 34: Illustration des différents ions issus de la fragmentation du DabDn. L'ion rapporteur à m/z 252 (rouge) est caractéristique de la dissociation du groupement dabcyyl et du groupement cyclohexanedione au niveau de la liaison ester où seule la partie dabcyyl est détectée.....	118
Figure 35: Spectre de fragmentation HCD du précurseur [DabDn+H] ⁺ (marqué d'un astérisque) fragmenté par une énergie de collision de 24 eV, piégé pendant 3 ms et moyenné par 50 scans acquis avec une résolution de 140 000.	119
Figure 36: Évolution du rendement de fragmentation du précurseur [DabDn+H] ⁺ en fonction de la longueur d'onde du laser irradiant. La longueur d'onde 473 nm est représentée par un trait rouge.	120
Figure 37: Mécanismes de fragmentation LID du DabDn proposés menant pour la formation des ions a) m/z 252,1137, b) 120,0813, c) 148,0869, d) 149,0351, e) 153,0909, f) 270,1243 et g) 139,0759.	122
Figure 38: a) Suivi de la quantité d'ions précurseurs [DabDn+H] ⁺ de m/z 422,2080 détectée b) Fragmentation collisionnelle induite par l'accélération de l'ion précurseur [DabDn+H] ⁺ dans la cellule HCD, en fonction du temps de piégeage dans la cellule HCD pour une énergie de collision de 2 eV (rouge) et 3 eV (bleu) sans irradiation laser.....	123
Figure 39: Rendement de fragmentation de l'ion précurseur [DabDn+H] ⁺ en fonction du temps de piégeage dans la cellule HCD lors de son irradiation laser à 473 nm avec une puissance de 50 mW (noir) 120 mW (rouge) et 850 mW (bleu) avec une accélération de 3 eV. Un agrandissement du rendement de fragmentation de l'ion précurseur en fonction du temps d'irradiation à 850 mW est tracé dans le coin inférieur droit de la figure.	125
Figure 40: a) Rendement de fragmentation du précurseur [DabDn+H] ⁺ en fonction de la puissance du laser pour un temps d'irradiation de 3 ms (rouge) et 25 ms (bleu). Un agrandissement de cette courbe entre 0 et 170 mW et présenté dans le coin inférieur droit. b) Intensités relatives des ions fragments m/z 120,08 (noir), 148,08 (rouge), 153,09 (bleu), 252,11 (vert) et 270,12 (violet) ainsi que du précurseur m/z 422,20 en fonction de la puissance du laser pour un temps d'irradiation de 25 ms.	126
Figure 41: Réaction de dérivation des acides sulféniques par le chromophore dabcyyl cyclohexanedione.	127
Figure 42: Spectres de fragmentation du précurseur triplement protoné [M+3H] ³⁺ du peptide LC*TVATLR a) en LID à 3 eV sous 25 ms d'irradiation à 473 nm avec une puissance de 400 mW et b) en HCD à 24 eV pendant 3 ms.....	131
Figure 43: Évolution de rendement de photodissociation du peptide LC*TVATLR en fonction de la puissance du laser irradiant à une longueur d'onde de 473 nm pendant 25 ms.....	132
Figure 44: Évolution de l'intensité relative des différents fragments générés par la photodissociation laser du peptide LC*TVATLR à 473 nm pendant 25 ms d'irradiation en fonction de la puissance du laser a) Fragments issus du chromophore b) Fragments issus de la chaîne peptidique c) Fragments issus d'une rupture au niveau la chaîne peptidique et du chromophore.	133
Figure 45: Fragmentation du peptide précurseur [M(SH)] ²⁺ du peptide LCTVATLR par LID (3 eV, irradiation 25 ms à 473 nm, 400 mW).....	134
Figure 46: Séparation chromatographique des différentes formes d'oxydation et de dérivation du peptide LCTVATLR après 9h de réaction.	135
Figure 47: Spectres de fragmentation LID (3 eV 25 ms à 473 nm, 400 mW) du peptide LC*TVATLR a) oxydérivé [M(SDabDn)] ³⁺ , b) oxydérivé comportant un oxygène supplémentaire [M(SDabDn)+O] ³⁺ élué à 14,7 min, c) oxydérivé comportant un oxygène supplémentaire [M(SDabDn)+O] ³⁺ élué à 15,3 min. Les spectres de fragmentation ont été tronqués à un m/z de 800 puisqu'aucun ion n'a été détecté au-delà.	136
Figure 48: a) Chromatogramme représentant les différentes formes mono-oxydées du peptide LCTVATLR induites par H ₂ O ₂ après 9h de réaction, où * marque l'acide aminé oxydé ; b) Spectre de	

fragmentation HCD (19 eV, 3 ms) du peptide LCTVAT*LR ; c) Spectre de fragmentation HCD (19 eV, 3 ms) du peptide LCTVATLR*.....	137
Figure 49: Évolution de la quantité de peptide suroxydé en $[M(SO_2H)]^{2+}$ (noir) et oxydé suroxydé en $[M(SDabDn)+O]^{3+}$ (rouge) en fonction du temps de réaction en présence d' H_2O_2 et de DabDn.....	139
Figure 50: a) Schéma de fragmentation HCD (19 eV, 3 ms) du peptide LGADM*EDVR à méthionine oxydée b) Chromatogramme représentant l'Extracted Ion Current (XIC) des rapports m/z de l'ion précurseur du peptide à méthionine oxydée (noir), à méthionine oxydérivée (rouge) et de l'ion rapporteur issu de la fragmentation du chromophore (vert).....	140
Figure 51: a) Spectre de fragmentation LID (3 eV, 25 ms à 473 nm, 400 mW) du peptide LGADMEDVC*GR b) Spectre de fragmentation HCD du peptide LGADM*EDVCGR (19 eV, 3 ms).	140
Figure 52: Évolution de la quantité de peptide LC*TVATLR oxydé sur 24h en fonction du solvant (Bleu - MeOH ; Noir - DMSO), du pourcentage de phase organique (Carré : 33 % de phase organique ; Rond : 50 %) et du ratio molaire cystéine- H_2O_2 (Foncé : ratio 1-1 ; clair : ratio 1-10).	145
Figure 53: Évolution de la quantité de peptide LC*TVATLR oxydé détectée en fonction du solvant de dilution, exprimée en H_2O -ACN (v/v).	146
Figure 54: Évolution de la quantité de peptide LC*TVATLR oxydé formée en fonction du temps et des conditions de réaction : conditions optimales (noir), réaction à 37 °C (rouge), utilisation d'ACN comme solvant organique au lieu du DMSO (bleu), ajout de 2 % (v) d'A.F dans le milieu (vert).	147
Figure 55: Évolution a) de la quantité de peptide LC*TVATLR oxydé présentant un oxygène supplémentaire ($[M(SDabDn)+O]^{3+}$ b) du ratio des quantités de peptides libres ($[M(SH)]^{2+}$) et de dimères ($[M(SS)M]^{4+}$) en fonction du temps et des conditions de réaction : conditions optimales (noir), réaction à 37 °C (rouge), utilisation d'ACN comme solvant organique au lieu du DMSO (bleu), ajout de 2 % (v) d'A.F dans le milieu (vert).....	148
Figure 56: Quantité de peptide LC*TVATLR oxydé en fonction de la concentration en DabDn employée lors de la réaction d'oxydation.....	150
Figure 57: Variation de la quantité de peptide LC*TVATLR oxydé en fonction de la concentration en DabDn utilisée.	151
Figure 58: Suivi de la quantité de DabDn libre (noir) et de peptide LC*TVATLR oxydé (rouge) en fonction du temps de réaction.	152
Figure 59: Courbes de calibration linéaires ($y = ax$) issues de la moyenne de trois échantillons de peptide LC*TVATLR oxydé ajouté dans un digestat tryptique de plasma fragmenté en LID (noir) et HCD (rouge), pour des concentrations allant de 0,67 à 67 nM.....	156
Figure 60: Représentation chromatographique de la séparation des 10 peptides oxydés après 9h de réaction. Pour chaque peptide les intensités des 3 transitions issues de la fragmentation de la chaîne peptidique et les 3 issues de la fragmentation du chromophore ont été sommées, puis les pics chromatographiques modélisés par des gaussiennes.	158
Figure 61: Spectres de fragmentation des peptides NTGIIC*TIGPASR et VC*NPIITK oxydés sur lesquels sont distinguables les fragments b et y issus de la séquence peptidique ainsi que l'ion rapporteur m/z 252,11 issu du chromophore dabcyL.	158
Figure 62: Évolution de la quantité de peptide LC*TVATLR oxydé en fonction du temps et des conditions de réaction : conditions optimisées sans DTT (noir), ajout de DTT avant dérivation des SOH internes (rouge), ajout de DTT avant l'oxydation (bleu), ajout de DTT après 2h d'oxydation (vert).....	160
Figure 63: Évolution a) de la quantité de peptide LC*TVATLR oxydé suroxydé ($[M(SDabDn)+O]^{3+}$ b) Du ratio des quantités de peptides libres ($[M(SH)]^{2+}$) et de dimères ($[M(SS)M]^{4+}$) en fonction du temps et des conditions de réaction : conditions optimisées sans DTT (noir), ajout de DTT avant dérivation des SOH internes (rouge), ajout de DTT avant l'oxydation (bleu), ajout de DTT après 2h d'oxydation (vert).....	161
Figure 64: Chromatogramme reconstitué des 33 peptides à cystéine unique oxydés de la HSA et la TrH.	163

Figure 65: Chromatogramme reconstitué à partir du signal de l'ion rapporteur m/z 252,11 (tolérance en m/z de 10 ppm) issu de la fragmentation du chromophore dans un digestat tryptique des protéines HSA et TrH en HCD (noir) et LID (rouge).....	164
Figure 66: XIC de cinq ions fragments détectés pour quatre peptides à cystéine unique oxydée endogène dérivés par le DabDn dans un échantillon de plasma et fragmentés en PRM-LID. Contrairement aux précédents spectres de fragmentation, l'ion rapporteur à m/z 252,1120 n'est pas le fragment le plus intense. Cela est dû à un changement du laser au cours de ma thèse pour un laser continu irradiant toujours à 473 nm avec une puissance de 800 mW.	167
Figure 67: Quantité relative de protéines à Cys-SOH endogènes dérivée entre les différents échantillons. Cette quantité a été obtenue en moyennant les ratios obtenus avec l'aire du pic chromatographique de chaque peptide à Cys-SOH endogène dérivé normalisée par l'aire du pic maximale du même peptide parmi les six échantillons, et ce pour les sept protéines (albumine humaine en noir, sérotransferrine humaine en rouge, complément C4a en bleu, fibronectine β en vert, α -2 macroglobuline en violet, complément C3 en jaune et fibronectine en bleu ciel).....	168
Figure 68: Comparaison des sensibilités atteintes en LID et HCD pour la détection de peptides à cystéines oxydées endogènes dérivés par le chromophore DabDn issus de six protéines plasmatiques, sur six échantillons de plasma. Les chiffres et l'intensité de la couleur verte représentent le nombre d'échantillons de plasma dans lesquels le peptide a été détecté. La couleur rouge sans chiffre indique que le peptide n'a pas été détecté.....	169
Figure 69: Structure secondaire PDB de : a) l'albumine humaine ; b) la transferrine humaine. Les cystéines oxydées et détectées avec succès sont mises en surbrillance jaune et étiquetées en noir, tandis que les cystéines oxydées non détectées sont mises en surbrillance rouge et étiquetées en gris. Les figures ont été réalisées grâce au logiciel Ezmol.....	171
Figure 70: Évolution du ratio moyen de peptides à Cys-SOH endogène dérivés par protéine en fonction du temps et du protocole de digestion.....	177
Figure 71: Évolution de la quantité de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés des protéines CO4A, CO3, A2MG, APOB-100, FINC, FIBB, HSA et TrH détectés selon le gain moyen en signal de Cys-SOH par protéine obtenu en fonction du temps de dérivation/digestion.....	179
Figure 72: Gain en signal des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés moyen par protéine apporté par l'acidification de l'échantillon avec 2 % du volume de l'échantillon en A.F ou par l'élévation du pourcentage de DMSO dans le milieu de réaction à 50 % par rapport au signal de l'échantillon contrôle (sans A.F et 33% _{org}).....	182
Figure 73: Principe général d'une purification SPE. ²⁷⁴	183
Figure 74: Quantité relative cumulée de peptides à Cys-SOH dérivés élués par protéine en fonction du pourcentage en MeOH du solvant d'élué utilisé avec une cartouche SPE Oasis® HLB 3cc 60 mg.	185
Figure 75: Courbe de calibration issue de la gamme en DabDn comportant 8 points compris entre 0 et 0,62 mM (noirs), réalisés en triplicats avec 5 répétitions au centre (0,24 mM) (non représentés). Les concentrations des différents extraits calculées grâce de l'équation de la droite de calibration sont affichées en rouge.....	189
Figure 76: Gain en signal moyen par peptides à Cys-SOH endogènes dérivés d'une même protéine par rapport à l'échantillon contrôle (DabDn non extrait) obtenu avec l'extraction liquide-liquide du DabDn par le MTBE avant ou après l'étape de SPE.....	192
Figure 77: Quantité de peptide à Cys-SOH endogènes dérivés élués par protéine en fonction du pourcentage en MeOH dans le solvant d'élué utilisé avec une cartouche SPE Oasis® HLB 3cc 400 mg.	194
Figure 78: Quantité de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés détectée moyennée par protéine en fonction de la présence ou non d'urée dans l'étape de dénaturation.	197
Figure 79: Évolution du gain en signal des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés détecté par protéine obtenu en fonction de la quantité de DTT utilisée lors de l'étape de dénaturation ou de l'utilisation de	

TCEP par rapport à un échantillon contrôle (dénaturation avec 5,5 µL de DTT 150 mM dans AMBIC 50 mM, ratio cys-DTT 1-3).....	199
Figure 80: Structure du dabcy maléimide (DabMal), composé d'un groupement maléimide (bleu) qui lui permet de se greffer spécifiquement aux thiols libres, et d'un groupement dabcy qui permet au composé de se fragmenter suite à l'absorption de photons à 473 nm	203
Figure 81: Ratio d'oxydation des 40 couples de peptides Cys-SOH/Cys-SH détectés en PRM-LID. La protéine d'appartenance de chaque peptide est indiquée au travers du code couleur de la légende.	207
Figure 82: Chromatogramme reconstitué de la séparation des versions Cys-SH dérivées au DabMal (rouge) et Cys-SOH dérivées au DabDn (bleu) de 15 peptides suivis en PRM-LID, obtenu par la somme des intensités de trois transitions relatives à l'ion précurseur et trois à quatre transitions relatives aux fragments pour chaque peptide.....	208
Figure 83: Spectres de fragmentation des précurseurs triplement protonés $[M+3H]^{3+}$ des peptides a) SVIPSDGPSVAC ^{Mal} VK dont la Cys-SH est dérivée avec DabMal et b) SVIPSDGPSVAC ^{Dn} VK dont la Cys-SOH est dérivée avec le DabDn, en LID à 473 nm, 800 mW durant 25 ms et 3 eV.....	210
Figure 84: Évolution de la quantité de peptide a) Cys-SH dérivé avec le DabMal b) Cys-SOH dérivé avec le DabDn détectée par rapport à un échantillon contrôle en fonction de différentes conditions de dérivation/digestion : Dérivation des Cys-SOH endogènes en premier lieu pendant 4h ou 8h (Dn_4h, Dn_8h), dérivation des Cys-SH au DabMal en premier lieu pendant 4 h ou 8h (Mal_4h, Mal_8h), digestion de l'échantillon sans chromophore pendant 8h puis dérivation simultanée des Cys-SH et Cys-SOH endogènes avec le DabMal et DabDn pendant la nuit (14h) (2C_14h).....	213
Figure 85: Évolution de la quantité de peptide a) Cys-SH dérivé avec le DabMal b) Cys-SOH dérivé avec le DabDn détectée par rapport à un échantillon de dérivation séquentielle contrôle en fonction de différentes conditions de dérivation/digestion : réaction à 50 % de phase organique (50%org) ; Ajout de 5,5 µL de DTT 150 mM supplémentaires à l'échantillon après dérivation au DabDn (DTT+) ; Dérivation au DabMal réalisée à T° ambiante (T° ambiante) ; Digestion réalisée avec 2 mg/mL de trypsine (Trypsine 2 mg/mL) ;	216
Figure 86: Évolution du gain en signal moyen par protéine des peptides a) Cys-SH dérivés avec le DabMal b) Cys-SOH dérivés avec le DabDn détectés par rapport à un échantillon séquentiellement dérivé contrôle en fonction de différentes conditions de dérivation : ajout de 30 µL d'A.F après l'introduction du DabMal (+2 % A.F), concentration en DabMal de 2,35 mM au lieu de 5,3 mM (DabMal 2,35 mM).	218
Figure 87: Ratio d'oxydation obtenus lors de l'analyse des douze QC pour les peptides a) DEELSCTVVELK de la protéine AACT b) DIASGLIGPLIICK de la protéine CERU c) ICLDPDAPR de la protéine CXCL7 d) LCRPEVDVMCTAFHDNEETFLK. La ligne rouge en pointillé représente la moyenne des douze ratios d'oxydation et les lignes bleues sa valeur à ± 1 écart-type.....	225
Figure 88: Ratios d'oxydation des peptides a) DEELSCTVVELK [AACT] b) ICLDPDAPR [CXCL7] c) DCQDIANK [FIBG] pour les 53 échantillons de la cohorte composée de patients contrôles (vert), atteints de la maladie d'Alzheimer (noirs) et positifs au COVID-19 (bleu). Dispersion des ratios d'oxydation moyens des protéines d) AACT e) CXCL7 f) FIBG entre les populations atteintes de la maladie d'Alzheimer et contrôles. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type estimé de chaque ratio d'oxydation (a), b), c)) ou moyenné entre les peptides d'une même protéine calculé à partir de l'analyse des QC (d), e), f)).	228
Figure 89: Ratios d'oxydation des peptides a) DEELSCTVVELK de la protéine AACT b) DIASGLIGPLIICK de la protéine CERU c) LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK de la protéine HSA d) DCHLAQVPSHTVVAR de la protéine TrH e) DQYELLCLDNTR de la protéine TrH pour les 53 échantillons de la cohorte composée de patients contrôle (vert), atteints de la maladie d'Alzheimer (noirs) et positifs au COVID-19 (bleu)..	231
Figure 90: Représentation 3D de la protéine AACT, dont la cystéine 260 (peptide DEELSCTVVELK) présentant un ratio d'oxydation plus élevé parmi les patients positifs au COVID-19 et certains patients atteints de la maladie d'Alzheimer est surlignée en rouge.....	232

Figure 91: Représentation 3D de la protéine CERU, dont la cystéine 199 (peptide DIASGLIGPLIICK) présentant un ratio d'oxydation plus élevé parmi les patients positifs au COVID-19 est surlignée en rouge. 233

Figure 92: Représentation 3D de la protéine HSA, dont la cystéine 124 (peptide LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK) présentant un ratio d'oxydation plus faible parmi les patients positifs au COVID-19 est surlignée en rouge. 235

Figure 93: : Représentation 3D de la protéine TrH, dont les cystéines 227 et 241 (peptides DQYELLCLDNTR et DCHLAQVPSHTVVAR) présentant chacun un ratio d'oxydation plus élevé parmi les patients positifs au COVID-19 sont respectivement surlignées en jaune et rouge. 236

Figure 94: Illustration des trajectoires des ions (stable en vert, instable en rouge) au sein d'un quadripôle 265

Figure 95: Fonctionnement d'un analyseur Obitrap : A - électrode interne, B - électrode externe, C - trajectoire orbitale de l'ion.²⁷⁵ 267

Figure 96: Schéma récapitulant le développement de la maladie d'Alzheimer au travers des interactions de 345 protéines différentes, établi par le site PeptideAtlas..... 279

Liste des tableaux

Tableau 1: Classement des biomarqueurs du stress oxydant.....	60
Tableau 2: Schéma de dilution utilisé pour la préparation des ajouts de peptide LC*TVATLR oxydé dans des digestats tryptiques de plasma humain.....	154
Tableau 3: Précision et justesse des triplicats de peptide LC*TVALTR oxydé ajouté dans un digestat tryptique de plasma humain à différentes concentrations, analysés en LID et HCD. La mention « N.D » indique que le peptide n'a pas été détecté à cette concentration. Les valeurs soulignées sont en dehors de la plage de validation c'est-à-dire un CV<20 % ou une précision au-delà de 85-115 %	156
Tableau 4: Récapitulatif de la quantité de DabDn libre qui n'a pas réagi extraite de l'échantillon par le MTBE dans chaque Extrait analysé.....	189
Tableau 5: Tableau récapitulatif des protéines uniques détectées lors de l'analyse Top10 de l'échantillon de plasma dérivé séquentiellement avec le DabDn et le DabMal, le nombre de peptides à cystéine unique qu'elles contiennent, ainsi que le nombre de peptides à cystéine unique SH ou SOH dérivés au DabMal ou au DabDn.....	206
Tableau 6: Récapitulatif des différences entre les populations de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (A.D) et les patients sains (Contrôle).	229
Tableau 7: Liste des transitions PRM des 33 peptides à cystéine SOH dérivée de la HSA et la TrH suivis. Pour chaque peptide, le numéro correspondant à la position de la cystéine dans la séquence peptidique est indiqué en exposant.....	268
Tableau 8: Transitions PRM des 117 peptides à cystéines SOH dérivées issues des protéines HSA, TrH, CO4a, CO3, A2MG, FIBB et FINC suivies lors de l'analyse des échantillons de plasma. L'astérisque représente les peptides qui n'ont pas été détectés ni en HCD ni en LID.	271
Tableau 9: Quantification relative des peptides à Cys-SOH dérivés détectés en PRM-LID entre les six échantillons de plasma (0154, 0832, S428, 0127, 0185, 0584).....	272
Tableau 10: Quantification relative des peptides dérivés détectés en PRM-HCD entre les six échantillons de plasma (0154, 0832, S428, 0127, 0185, 0584).....	274
Tableau 11: Tableau récapitulatif des coefficients de variation de l'analyse des peptides à Cys-SOH endogènes lié à la répétabilité instrumentale.	275
Tableau 12: Tableau récapitulatif des coefficients de variation de l'analyse des peptides à Cys-SOH endogènes lié à la répétabilité du protocole prenant en compte la variabilité inter-jour parmi la variabilité instrumentale	276
Tableau 13: Liste des transitions PRM des 40 couples Cys-SOH/Cys-SH établies suite à l'analyse Top10 d'un échantillon de plasma dont les Cys-SOH endogènes et Cys-SH ont été dérivées séquentiellement.	277
Tableau 14: Liste des échantillons de la cohorte	278
Tableau 15 : Récapitulatif des ratios m/z et charges des 209 peptides à Cys-SOH et Cys-SH dérivés par le DabDn et le DabMal suivis issus des 32 protéines extracellulaires impliquées dans la maladie d'Alzheimer ainsi que des protéines CXCL7, AACT et Xanthine Oxydase.....	284
Tableau 16 : Liste des transitions PRM de la méthode PRM-LID employée lors de l'analyse des cohortes de patients atteints de la d'Alzheimer, positifs au COVID-19 et de patients sains (contrôles).	288
Tableau 17: Moyenne, écart-type et coefficient de variation des ratios d'oxydation des 73 couples de peptides Cys-SOH/Cys-SH calculés grâce à l'analyse PRM-LID de douze QC avec la cohorte d'échantillons de plasma.....	290

Introduction générale

Les progrès de la médecine permettent de sans cesse rallonger la durée de vie grâce à la prévention et la guérison des maladies. Cela implique un vieillissement de la population, plus susceptible de développer des pathologies lourdes telles que le diabète, le cancer, des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives... La compréhension et le dépistage de ces maladies reposent sur la découverte de biomarqueurs, composés biologiques reflétant l'état physiologique ou pathologique de l'organisme humain. Ces biomarqueurs permettent une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques ou pathologiques du corps humain et peuvent constituer des cibles thérapeutiques de premier choix comme être impliqués dans des stratégies de dépistage ou de prévention des maladies. La recherche et la validation de biomarqueurs sont donc l'un des principaux enjeux de santé de notre ère, et constituent une discipline à part entière qui se heurte à la complexité du corps humain et la compréhension réduite que nous en avons. L'un des axes de développement de la recherche de biomarqueur se concentre sur l'augmentation de la quantité d'analytes détectables, identifiables et quantifiables au sein des matrices biologiques. Pour cela, sont mises au point des stratégies analytiques variées comme l'acquisition non ciblée conjointe avec la conception d'algorithmes et de bases de données pour améliorer la vitesse et la qualité de l'identification des analytes présents dans le milieu analysé. Ces améliorations ont également pour objectif de mettre en évidence des phénomènes minoritaires au sein de l'organisme par la détection de molécules de faibles concentrations, d'états de transition résultant de mécanismes spécifiques. Ainsi l'augmentation de la sensibilité analytique constitue un autre axe de développement essentiel à la découverte de biomarqueurs, au travers d'améliorations physiques des appareils analytiques, du couplage de différentes techniques, de l'optimisation de la préparation d'échantillon (dérivations spécifiques, purifications, enrichissements), ou du développement de stratégies analytiques inédites.

La spectrométrie de masse est une technique reposant sur la détection et la quantification sélective de molécules grâce au ratio de leur masse sur leur charge (m/z). Elle constitue une technique analytique de premier choix pour l'analyse protéomique en raison de sa sensibilité, sa sélectivité ainsi que sa facilité à être modifiée et couplée à d'autres techniques (comme des techniques séparatives

type HPLC ou mobilité ionique) pour permettre d'augmenter ses performances. Par exemple, la modification du mode de fragmentation classique « CID » (Collision Induced Dissociation) au sein des spectromètres de masse permet d'ajouter une spécificité supplémentaire vis-à-vis des composés ciblés. La photodissociation laser en est un exemple, où les molécules ciblées sont activées en fonction de leurs propriétés optiques, induisant une dissociation hautement spécifique. Les molécules biologiques présentent une quantité réduite de groupements qui permettent l'absorption de photons. En fonction de la longueur d'onde du laser employée (UV, IR, visible), seules les molécules qui absorbent à la longueur d'onde du laser sont fragmentées. Ainsi, la réduction des interférences inhérentes au mode de fragmentation non ciblé (CID) permet un gain notable de la précision de l'identification et de la quantification des composés ciblés.

Cette stratégie a été employée au laboratoire à travers la mise en place de la LID (Laser Induced Photodissociation) couplée à la spectrométrie de masse pour l'analyse des peptides à cystéines. Les cystéines sont des acides aminés rares, présentes en faible occurrence dans plus de 90 % des protéines, et sont l'une des cibles majeures des modifications post-traductionnelles (PTM). Elles ont donc un rôle prépondérant dans les mécanismes de régulation biologiques au travers de phénomènes parfois transitoires et difficiles à mesurer. La dérivation de leurs fonctions thiols libres par un chromophore, le dabcyI maléimide, permet leur photo-fragmentation spécifique lors d'une irradiation laser dans le visible (à 473 nm). Il en résulte à la fois un gain en spécificité et en sensibilité propice à l'emploi de techniques d'analyse non ciblées telles que la DIA pour la recherche et la quantification des cystéines dérivées.

C'est dans cette optique d'augmentation de la sensibilité analytique par l'ajout d'une spécificité optique au travers du couplage de la spectrométrie de masse avec la photodissociation laser que s'inscrit mon travail de thèse. Ce dernier s'est concentré sur le développement et l'application de ce couplage pour la détection et la quantification spécifique d'une modification induite par le stress oxydant : l'oxydation des fonctions thiols des cystéines en acides sulféniques.

Ce manuscrit de thèse est divisé en quatre chapitres :

Le premier chapitre est une étude bibliographique consacrée à la définition du stress oxydant. Les principaux oxydants et antioxydants du corps humain ainsi que leurs modes d'action et de production y sont passés en revue puis illustrés par la description des mécanismes de régulation physiologique dans lesquels ils s'inscrivent. La dérégulation de ces systèmes mène à un stress oxydant, phénomène ici décrit à travers différents mécanismes pathologiques dans lesquels il est impliqué, entraînant le développement de diverses pathologies lourdes. Une attention particulière est portée aux biomarqueurs actuellement employés pour détecter et quantifier les dégâts induits par le stress oxydant, ainsi qu'une potentielle piste de recherche de nouveaux biomarqueurs : l'oxydation des fonctions thiol des cystéines en acides sulféniques.

Le second chapitre présente un état de l'art des techniques analytiques dédiées à la détection et la quantification des acides sulféniques. Différentes stratégies analytiques y sont présentées, se basant sur une détection globale ou localisée des oxydations de façon indirecte ou directe (avec ou sans réduction des cystéines oxydées). Les méthodes de préparation d'échantillon et les techniques analytiques correspondantes y sont décrites, mettant en avant leurs avantages et leurs inconvénients. Parmi les techniques employées, la spectrométrie de masse est particulièrement adaptée à l'analyse des cystéines oxydées et largement employée en protéomique. La description de son utilisation pour la quantification de protéines au travers des différentes stratégies analytiques, des modes d'acquisition et de fragmentation employés constitue la seconde partie de ce chapitre.

Le troisième chapitre est dédié au développement de la méthode d'analyse directe des peptides à cystéines oxydées d'échantillons biologiques par leur dérivation avec un chromophore et leur quantification par le couplage de la spectrométrie de masse avec la photodissociation laser. Ce développement débute par la caractérisation du chromophore employé pour dériver spécifiquement les acides sulféniques des échantillons, le dabcyloxydicyclohexanedione. La réaction d'oxydation et de dérivation de peptides à cystéine et mélange de protéines modèles est ensuite présentée ainsi que le gain en sensibilité apporté par la technique LID grâce à la fragmentation spécifique. La méthodologie est finalement appliquée à la quantification relative des acides sulféniques endogènes d'échantillons biologiques.

Le dernier chapitre porte sur détection et la quantification des acides sulféniques endogènes d'une cohorte de patients atteint de la maladie d'Alzheimer, positifs au COVID-19 et sains. Pour cela, la dérivation des acides sulféniques endogènes est d'abord optimisée au travers de l'amélioration des étapes du protocole de dérivation et de l'ajout d'une référence interne permettant de s'affranchir des biais analytiques et des variations de la quantité de protéine totale entre les individus. Les fonctions thiols libres des protéines sont dérivées avec un second chromophore, le dabcyI maléimide, afin de remplir cette fonction, qui fait également l'objet d'une optimisation. La dérivation séquentielle des échantillons avec les deux chromophores et leur analyse PRM-LID permet la détection et la quantification des variations des acides sulféniques endogènes de façon directe, reproductible et non biaisée. Aucune piste de biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer n'est mise en évidence suite à l'analyse de la cohorte tandis que cinq peptides issus de quatre protéines présentent taux d'oxydation des cystéines différents du reste de la cohorte pour les échantillons de patients positifs au COVID-19. Ces résultats sont encourageants, mais leur faible représentativité (4 échantillons) impose l'analyse d'une cohorte plus importante pour les confirmer.

Chapitre I. Notions générales sur le stress oxydant

Introduction

Le fonctionnement cellulaire implique l'absorption et la dissolution de composés externes (O_2 , sucres, minéraux, acides aminés) qui fournissent l'énergie et les matériaux nécessaires à la synthèse et à la modification de petites molécules, protéines et lipides. Ces molécules organiques serviront à la création, la réparation, et à l'alimentation de structures internes elles-mêmes responsables de mécanismes physiologiques variés, le tout déterminé selon une architecture contenue dans le noyau de la cellule.

Parmi les mécanismes de régulation/signalisation mis en place au sein des cellules (kinases, ubiquitinylation, neurotransmetteurs...), il existe l'équilibre redox. Cet équilibre consiste en un maintien de proportions spécifiques d'espèces oxydantes et réductrices dans le milieu cellulaire, elles-mêmes impliquées dans des mécanismes de signalisation régulant de nombreux processus de la cellule. Ainsi, des changements subtils dans l'équilibre redox, ou l'utilisation de certaines espèces oxydantes précises, va impacter entre autres l'expression de gènes, les mécanismes d'apoptose, la synthèse ou le rôle de molécules physiologiques (hormones thyroïdiennes, facteurs de croissance, cytokines, bradykinine...), et ce par l'induction de modifications précises et réversibles au sein des protéines impliquées dans les mécanismes ciblés.^{1,2}

L'équilibre redox est rompu si la cellule est exposée à des facteurs externes tels que des rayonnements ionisants, des polluants chimiques, ou à des mécanismes de défense contre les infections ou les inflammations qui vont augmenter la quantité intracellulaire d'espèces oxydantes au-delà de la capacité tampon des antioxydants ([Figure 1](#)). Il en est de même si la quantité d'antioxydants du milieu cellulaire diminue, notamment à cause d'une mauvaise alimentation.³

Cette surabondance d'espèces oxydantes entraîne une dérégulation des mécanismes de signalisation cellulaires dans lesquels elles sont impliquées, ainsi que la dégradation de diverses molécules, dont les protéines (oxydation de la chaîne latérale, carbonylations...), les lipides (peroxydation lipidique), et l'ADN (mutations, lésions...). Ce phénomène est désigné comme le stress oxydant, et les dégâts causés

sont associés à de nombreuses pathologies telles que le cancer,⁴ le diabète,⁵ les maladies cardiovasculaires⁶ et neurodégénératives.⁷

Une attention particulière a été portée sur certaines espèces oxydantes de faibles masses moléculaires, désignées sous le nom d'« espèces réactives », qui se trouvent être au cœur de

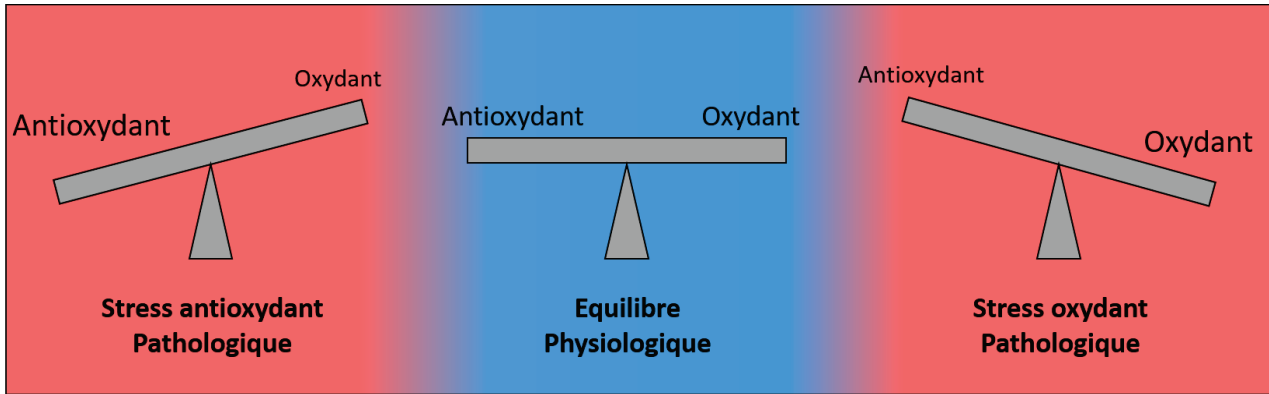


Figure 1: Illustration de l'équilibre redox. Lorsque la production et l'élimination des espèces réactives oxygénées (ROS) sont équilibrées, le système cellulaire fonctionne dans ses conditions physiologiques. Lorsque la production de ROS devient plus importante que ce que le système peut éliminer, l'équilibre est rompu en faveur du stress oxydant, une condition pathologique due aux dérèglements induits par les ROS non contrôlés. De même, si l'élimination des ROS est plus importante que leur production, le système entre en état de stress antioxydant, également pathologique.

phénomènes de régulation en conditions physiologiques, et génératrices d'effets délétères en cas de stress oxydant.⁸

La régulation de ces espèces réactives et la défense contre leur surabondance sont assurées par les antioxydants. Leur action peut être ciblée à l'instar de composés tels que SOD, CAT, enzymes, Vitamine C, E (et autres), qui vont directement agir sur l'espèce réactive concernée. Le tampon redox majoritairement représenté par les fonctions thiols des cystéines au sein des protéines (notamment le glutathion GSH/GSSG...) va quant à lui permettre une action globale et intervenir sur différents types de composés. L'oxydation d'une fonction thiol par un oxydant est neutralisée, entre autres, par des enzymes antioxydantes qui permettent de maintenir en place les ratios oxydés/réduits des différents acteurs du tampon.⁹

Au cours de ce chapitre, je commencerai par contextualiser l'équilibre redox cellulaire en détaillant les principales sources d'espèces réactives, différents antioxydants et leurs fonctionnements, ainsi que certains mécanismes physiologiques qui le régissent. J'expliciterai ensuite l'impact du stress oxydant

en présentant son implication dans le développement de pathologies variées ainsi que les biomarqueurs utilisés pour l'identifier.

I. L'équilibre redox au sein de la cellule

I. 1. Les oxydants : espèces réactives et systèmes de production

Constituant la majeure partie des composés oxydants et issues du métabolisme aérobie, les espèces réactives sont de petites molécules très réactives que l'on distingue par leurs groupements actifs, et qui font actuellement l'objet de recherches extensives parmi lesquelles on retrouve les espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species, ROS), nitrées (RNS), sulfurées (RSS), électrophiles (RES), halogénées (RHS)...

J'ai choisi de me concentrer sur les espèces réactives oxygénées, les ROS, dont j'exposerai les modes de production et de défense majeurs, divers mécanismes physiologiques et pathologiques dans lesquels elles sont impliquées ainsi que les modalités de leur détection.

Ces espèces sont de deux types : radicalaires ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet}), ou non radicalaires (H_2O_2 , $ROOH$, $LOOH...$). Les espèces radicalaires réagissent avec tous types de composés, elles ne possèdent pas de cibles spécifiques, leur durée de vie est généralement plus courte que les espèces non radicalaires, elles sont donc plutôt impliquées dans la formation d'autres molécules, comme $O_2^{\bullet-}$ qui est transformé en H_2O_2 . Les espèces non radicalaires, telles que H_2O_2 , sont moins réactives et peuvent être utilisées pour induire des modifications à la fois très spécifiques et réversibles sur différents acteurs du mécanisme cellulaire.

Les ROS sont produits par différentes structures internes de la cellule que ce soit de façon physiologique ou induite par des composés pathogènes. En plus de leur propre rôle dans le système

cellulaire, les espèces interagissent également entre elles pour assurer le maintien de l'équilibre redox.¹⁰ Ci-dessous sont présentés les principaux systèmes de production de ROS au sein de la cellule.

I. 1. a. Chaîne de transport d'électrons mitochondriale

Principale source de ROS intracellulaire, la mitochondrie est une structure interne qui permet la production d'ATP (Adenosine TriPhosphate), médiateur de l'énergie cellulaire, par la transformation d'O₂ en 2 H₂O selon $O_2 + 4 H^+ + 4 e^- \rightarrow 2 H_2O$.¹¹

Cette réaction est accomplie grâce aux complexes mitochondriaux I, II, III et IV qui constituent la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (CTEM), et permettent l'expulsion de protons de la matrice mitochondriale ainsi que l'acheminement d'électrons qui fourniront l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de l'ATP synthase (F1Fo ATP synthase).¹²

Au cours de la métabolisation de l'O₂ et du fonctionnement des complexes dans des conditions physiologiques, une partie de l'oxygène est transformée en ion superoxyde (O₂^{•-}), qui est converti en H₂O₂ par la superoxyde dismutase (SOD) et, en plus faible proportion, en ONOO⁻ par réaction directe avec NO[•].⁸

Les études menées *in vitro* estiment qu'entre 0,12 et 2 % de l'O₂ acheminé est transformé en superoxyde. Cependant, ces études ne tiennent pas compte des mécanismes cellulaires externes à la mitochondrie. Il est donc impossible de conclure sur la quantité *in vivo* d'O₂^{•-} produite.⁸

Cette superoxydation se produit majoritairement dans le complexe I ([Figure 2](#)) dans lequel une augmentation du ratio NADH/NAD⁺ permet à l'O₂ de capter des électrons au niveau du complexe de la FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) ainsi qu'au niveau du transporteur CoQ (Coenzyme Q) par un phénomène de RET (Reverse Electron Transport). Ces deux unités du complexe I sont localisées dans la matrice mitochondriale, d'où une production d'O₂^{•-} uniquement interne.^{11,13} Le complexe III quant à lui est à même de produire des ions superoxydes à la fois dans la matrice et dans le milieu intermédiaire (entre la membrane interne et la membrane externe de la mitochondrie), rendant plus simple la libération d'H₂O₂ dans le cytosol.¹³

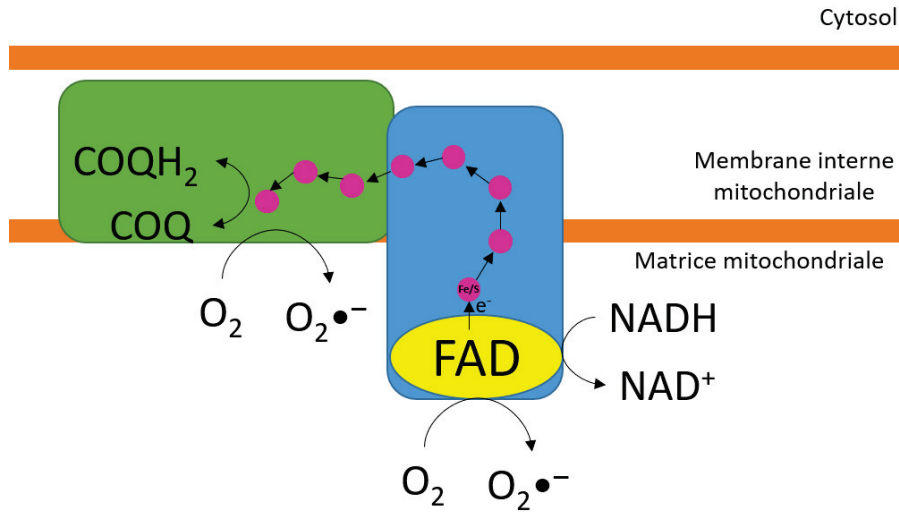


Figure 2: Illustration du complexe I mitochondrial. La production d' $O_2^{\bullet-}$ se fait uniquement au sein de la matrice mitochondriale, lors de la capture d'électrons soit au niveau du complexe FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), soit au niveau du transporteur COQ, après leur acheminement depuis le FAD par un phénomène de RET (Reverse Electron Transport).

Il existe de nombreux autres phénomènes de production de ROS au sein de la mitochondrie qui sont largement minoritaires ; en dresser une liste exhaustive est cependant peine perdue puisque tout n'a potentiellement pas encore été découvert.⁸

I. 1. b. NADPH Oxydase

Les NADPH Oxydase (NOX) sont des protéines transmembranaires transportant les électrons au travers des membranes biologiques pour réduire l'oxygène en ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$.^{14,15} Les NOX forment une famille nombreuse, mais possèdent des propriétés structurales communes à tous les membres : un site de liaison NADPH en C-terminal, une région de liaison à la FAD à proximité du domaine transmembranaire le plus C-terminal, six domaines transmembranaires, ainsi que quatre histidines liant les hèmes.¹⁴

Le mécanisme général de la formation d' $O_2^{\bullet-}$ peut être décrit en prenant NOX2, intervenant majoritaire des NOX, pour exemple (Figure 3) : deux électrons issus de NADPH sont transférés à la FAD, qui est alors réduite en $FADH_2$ par les protons matriciels. Ils sont ensuite transférés aux hèmes un par

un, les hèmes ne pouvant transporter qu'un électron à la fois. Un tel transfert n'étant pas énergétiquement favorable, il y a donc besoin d'un médiateur, O_2 , qui formera l'ion $O_2^{\bullet-}$.^{14,16}

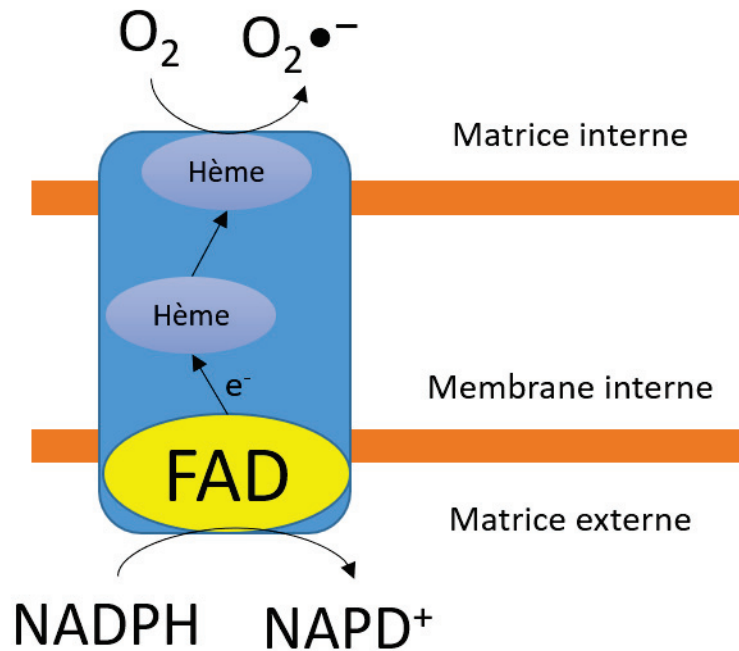
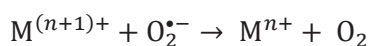
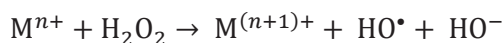


Figure 3: Représentation schématique simplifiée du fonctionnement de NOX2 : les électrons issus de NADPH sont transmis à la FAD, puis conduits au travers des hèmes grâce à un médiateur, O_2 , qui sera oxydé en $O_2^{\bullet-}$.

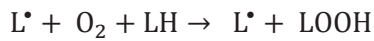
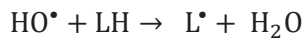
I. 1. c. Métaux de transition

De nombreux métaux de transition tels que Cu(I,II), Fe(II), Co(II), Ti(III), Cr(V) et V(II, III, IV)¹⁷ interviennent dans l'équilibre redox cellulaire. En réagissant avec les ROS, ils permettent de générer des radicaux libres bien plus réactifs, selon la réaction de Fenton et Haber-Weiss¹⁸ sous la forme :



Dans l'exemple du Fe(II), environ 5 % du Fe est désigné comme la « réserve labile de fer » (*the labile iron pool*), localisée dans le cytosol, la matrice mitochondriale et les lysosomes en tant que réserve redox utilisable pour la génération de ROS.¹⁹

Les radicaux hydroxyles produits sont extrêmement réactifs vis-à-vis des molécules biologiques, notamment les lipides avec lesquels ils vont générer des peroxydes lipidiques puis des peroxydes lipidiques radicalaires selon la série de réactions suivante :¹⁹



Ce phénomène s'appelle la peroxydation lipidique. Les produits de cette réaction en chaîne vont à leur tour réagir avec les protéines, lipides, et autres petites molécules présentes dans le milieu cellulaire pour former des espèces cytotoxiques endommageant l'ADN et les architectures internes de la cellule,¹⁸ pouvant aller jusqu'à induire une mort cellulaire spécifique : la ferroptose.^{19,20,21}

En cas de stress oxydant, les ROS peuvent attaquer les enzymes contenant des clusters Fe, induisant l'inactivation de ces enzymes par relargage de Fe libre qui amplifiera la transformation des ROS surabondants en radicaux libres.¹⁹

I. 1. d. Xanthine Oxydase

La Xanthine Oxyréductase (XOR) est une flavoprotéine dimérique cytosolique dont les deux sous-unités identiques de 145 kDa contiennent un cofacteur molybdoptérine (servant à l'oxydation de la purine), un cofacteur FAD (pour la réduction de NAD^+ et O_2) ainsi que deux centres redox Fe/S qui dirigent le flux d'électrons entre les deux cofacteurs ([Figure 4](#)).²²

XOR est présente sous sa forme xanthine déshydrogénase (XDH), qui peut être convertie chez les mammifères en xanthine oxydase (XO) par l'oxydation de ses groupements thiols (formation d'un pont disulfure (pont S-S) entre les résidus Cys992 (peptide trypsique ENCWK) et Cys535 (peptide trypsique CGK)) ou par intervention enzymatique.^{23,24}

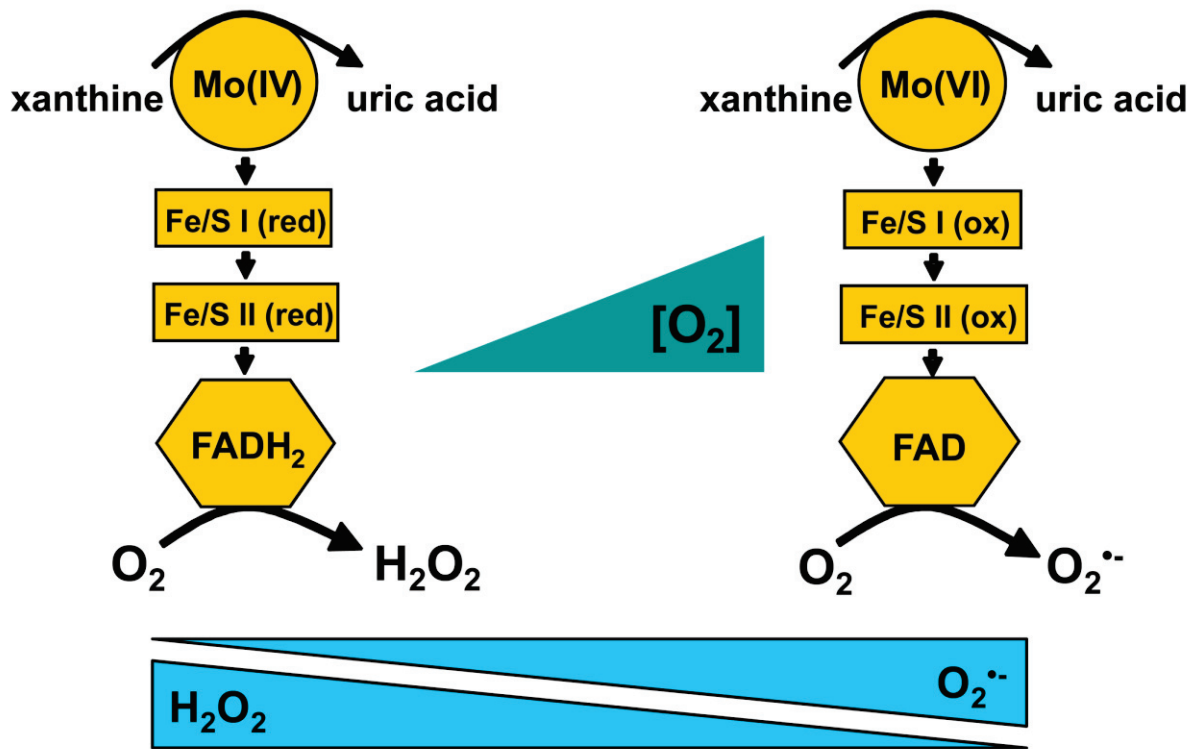


Figure 4: Deux formes de la XOR en fonction de la concentration en O_2 du milieu : une faible concentration en O_2 (conditions physiologiques) induit une production majoritaire d' H_2O_2 (gauche). L'augmentation de la concentration en O_2 du milieu va conduire à une production plus importante d' $O_2^{\bullet-}$ (droite).²⁷

XO génère deux types de ROS : $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 via le transport d'un et deux électrons vers O_2 . H_2O_2 est majoritairement produit en conditions physiologiques, sa formation est favorisée par un pH réduit et un taux en O_2 cytosolique faible.^{25,26,27}

I. 1. e. Peroxysomes

Les peroxysomes sont des structures internes qui ne contiennent pas de matériel génétique ni de ribosomes, mais un grand nombre de protéines synthétisées dans le cytosol. Selon C. de Duve, les peroxysomes sont des organites cellulaires contenant des oxydases réduisant O_2 en H_2O_2 ainsi que de grandes quantités de catalase (CAT) permettant de réduire H_2O_2 en H_2O .²⁸ Cela implique que les peroxysomes sont à la fois l'une des sources de ROS au sein de la cellule, mais également l'une des défenses contre le stress oxydant (Figure 5).

Parmi les oxydases présentes, on retrouve majoritairement des flavoprotéines, ainsi que la xanthine oxydase citée précédemment (cf. [I. 1. d](#)). Par ailleurs, les métaux de transitions y sont abondants, dont le Fe libre catalysant H_2O_2 en OH^\bullet via la réaction de Fenton (cf. [I. 1. c](#)).^{29,30}

Outre la catalase évoquée plus haut, les peroxysomes sont riches en antioxydants variés comprenant la famille des SOD (SOD1, MnSOD, Cu-ZnSOD), les peroxyredoxines (cf. [I. 2. c](#)) et la Glutathion S-transférase Kappa 1 (GSTK1).^{28,29,30}

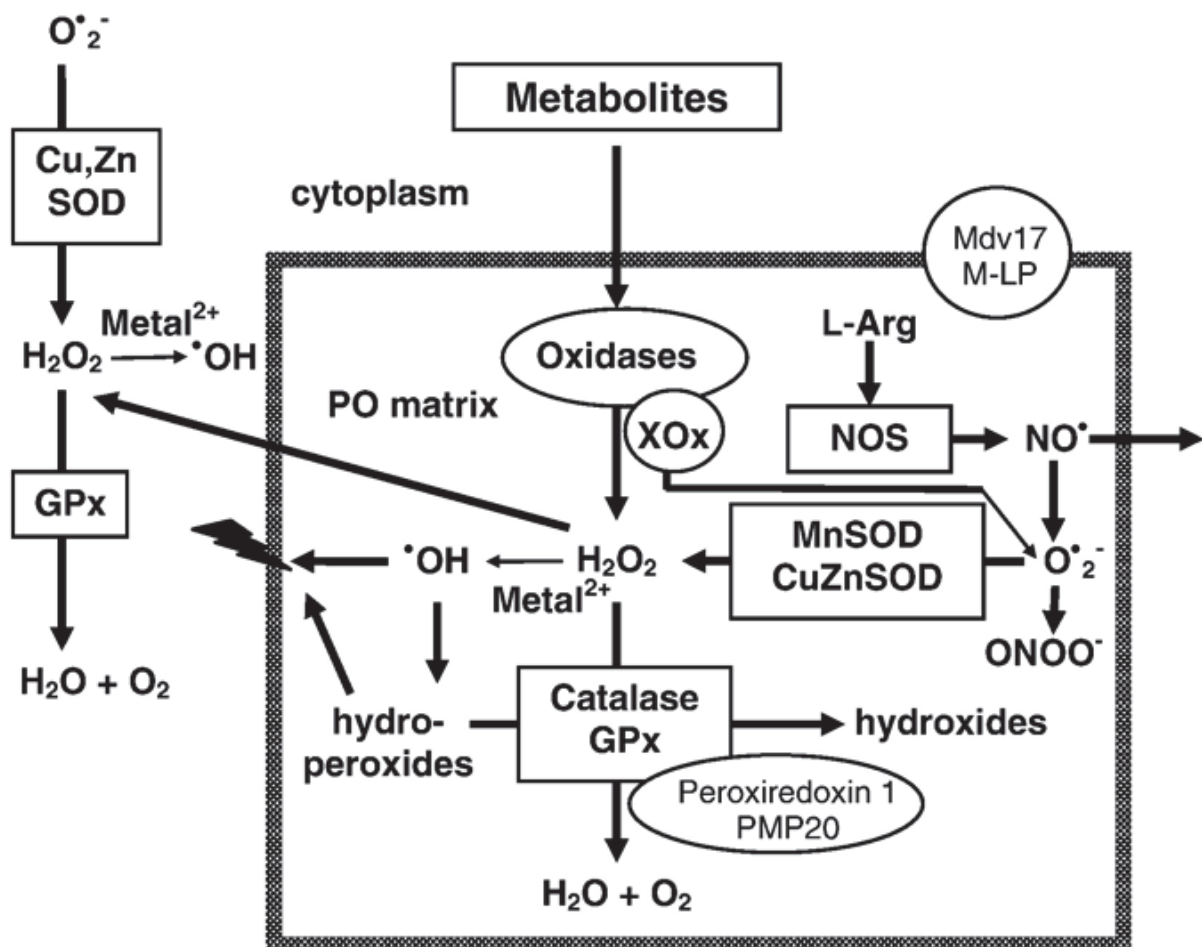


Figure 5: Illustration des divers mécanismes de production et réduction des ROS ayant lieu au sein d'un peroxysome (PO).²⁹

I. 1. f. Réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est une organelle constituant un réservoir cellulaire majeur de Ca^{2+} au sein de laquelle les protéines nouvellement synthétisées vont acquérir leur conformation.^{31,32} Pour ce faire, les fonctions thiols (SH) des cystéines vont être oxydées par H_2O_2 , formant des ponts disulfures (S-S) entre les cystéines de la protéine, induisant un repliement de ses chaînes.^{31,32,33} L' H_2O_2 est produit par l'antioxydant Ero1 (ER Resident Oxydoréductase 1), dont la FAD permet la réduction d' O_2 en $\text{O}_2^{\bullet-}$, qui sera rapidement dismuté en H_2O_2 ([Figure 6](#)).³³

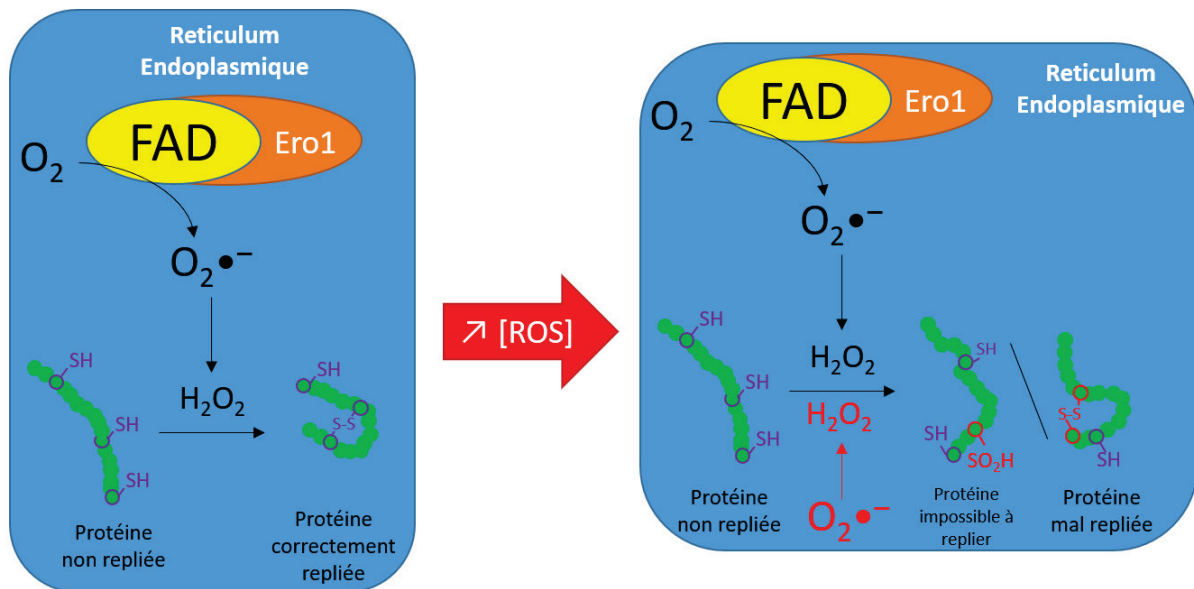


Figure 6: Représentation simplifiée du repliement de la chaîne protéique au sein du réticulum endoplasmique suite à la génération d' H_2O_2 par dismutation d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ produit par réaction d' O_2 avec la FAD de l'antioxydant Ero1 de façon physiologique (gauche) et pathologique suite à l'accroissement de la quantité de ROS intra et extraréticulique (droite).

Un excès de ROS (cytosolique ou réticulique) peut entraîner le mauvais repliement des protéines qui peuvent alors déclencher une réaction en chaîne : le stress du RE. La mauvaise conformation va conduire à un dérèglement de la formation des ponts S-S, donc à l'accumulation de protéines mal repliées et de ROS non utilisés.³¹

Ces phénomènes vont déclencher l'Unfolded Protein Response (UPR), un mécanisme de défense du RE qui va stimuler l'activité de la Protein Disulfide Isomerase (PDI) pour réduire les ponts S-S mal placés.

Toutefois, la stimulation de la PDI amplifie également l'activité de la NADPH oxydase et d'Ero1, entraînant une formation excessive de ROS au sein du RE.^{31,32,33}

Dans un contexte physiologique, les ROS issus de la NADPH oxydase permettent la libération du Ca²⁺ nécessaire à la contraction des muscles squelettiques.¹⁴ Dans le cas d'un stress du RE, l'activation de la NADPH oxydase conduit à un relargage massif de Ca²⁺ dans le cytosol, engendrant chez la mitochondrie une importante production de ROS.^{32,33}

I. 1. g. Sources exogènes

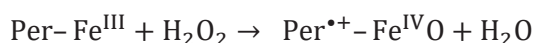
Une importante quantité de ROS cellulaire peut également être due à l'exposition du corps humain à la pollution environnementale. Celle-ci comprend les fumées issues des procédés industriels, de pots d'échappement, de cigarettes, divers types de poussières, les rayonnements et radiations non ionisantes (UV) ainsi que divers composés pathogènes qui peuvent être liés à une alimentation peu saine.^{7,14,33,34,35,36}

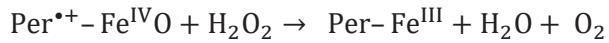
I. 2. Les antioxydants

Régulateurs des ROS et première ligne de défense contre le stress oxydant, les antioxydants sont des molécules, protéines et enzymes qui permettent de convertir les ROS en molécules plus stables ou de minimiser les dégâts oxydatifs causés. Au cours de cette partie, je détaillerai le fonctionnement d'une sélection des principaux antioxydants.

I. 2. a. Peroxydases

Les peroxydases sont une catégorie d'oxydoréductases qui ont pour fonction principale la détoxification du peroxyde d'hydrogène grâce à leur cœur hème, selon la réaction suivante :^{37,38}



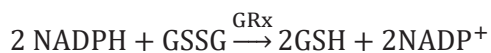
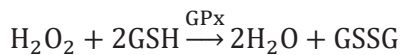


Les peroxydases comprennent une trentaine d'enzymes³⁹ dont notamment la catalase, qui est composée de quatre sous-unités, chacune contenant un cœur hème. Majoritairement localisée dans le peroxysome, sa métabolisation d'H₂O₂ permet à la fois de contrer un excès de ROS cellulaire et de maintenir une balance redox propice aux mécanismes signalétiques dans lesquels H₂O₂ est impliqué.⁴⁰

I. 2. b. Glutathion

Le Glutathion (GSH) est un peptide (de séquence acide glutamique, cystéine, glycine - ECG) donneur d'électrons abondamment présent chez l'humain. Ses propriétés réductrices lui permettent de réagir avec les ROS de la cellule, mais également de régénérer d'autres molécules comme l'acide ascorbique (vitamine C).^{9,41}

Grâce au jeu des enzymes glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GRx), la réduction des ROS convertit 2 molécules de GSH en leur homologue oxydé GSSG, qui sera recyclé en GSH selon les réactions suivantes :⁹



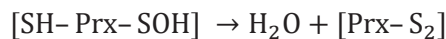
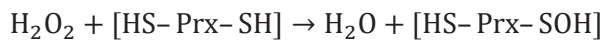
La forme GSH du glutathion prédomine la forme GSSG, en étant cent fois plus concentrée dans les cellules⁴¹ et deux fois plus concentrée dans le plasma que son homologue GSSG.⁴² Le glutathion peut également former des ponts disulfures avec les thiols libres et en être libéré via la glutathion S-transférase (GST) ou la glutaredoxine (Grx).^{43,44,45} Ce phénomène appelé la S-gluthionylation permet de réguler différents facteurs de transcription de façon protectrice comme délétère pour la cellule, promouvant une réponse antioxydante comme prooxydante en fonction de son utilisation.^{9,41}

I. 2. c. Redoxines

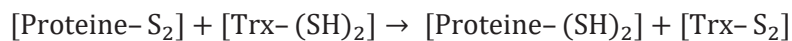
Les redoxines sont des enzymes antioxydantes à cystéines qui assurent l'équilibre redox de la cellule en oxydant les fonctions thiols de leurs propres cystéines en ponts disulfures, permettant la réduction de protéines et la détoxification des ROS.⁹

Plusieurs familles se distinguent chez les redoxines :

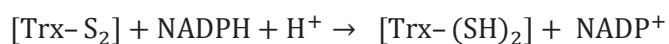
- Les peroxyredoxines (Prx) ont pour fonction principale la chasse aux ROS, plus spécifiquement H₂O₂, qu'une première sous-unité de la Prx va détoxifier avec l'une de ses cystéines en formant un acide sulfénique. Une seconde sous-unité interviendra alors pour former un pont disulfure interne entre sa cystéine et la cystéine oxydée de la première sous-unité, selon les réactions :^{9,42,43,46}



- Les thioredoxines (Trx) renouvellent l'état redox des protéines (notamment des peroxyredoxines) selon le système :

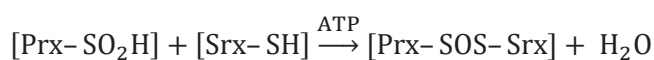


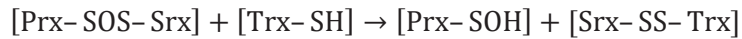
Une fois formés, les ponts disulfures des thioredoxines sont réduits de deux façons : avec une enzyme spécifique, les thioredoxines réductases (TrxR), ou avec l'utilisation de NADPH selon la réaction suivante :^{44,46}



- Les sulfiredoxines (Srx) sont des enzymes spécifiques de la réduction des peroxyredoxines qui interviennent dans deux cas particuliers :⁴³

- Lors de l'hyperoxydation en acide sulfinique (SO₂H) de la fonction thiol : au moyen d'ATP, Srx peut réduire le premier niveau d'hyperoxydation des thiols en créant un intermédiaire thiosulfinate, qui sera réduit par une thioredoxine (ou par GRx) selon la réaction :





L'acide sulfénique nouvellement formé de la peroxyredoxine sera ensuite réduit en SH selon la voie classique.

○ Lors de la glutathionylation de la Cys-SOH d'une peroxyredoxine : les sulfiredoxines possèdent une plus grande affinité que l'enzyme habituelle (GRx) pour effectuer la réduction du pont disulfure, c'est donc elles qui réalisent les réductions correspondantes.

I. 2. d. SOD

Les superoxyde dismutases (SOD) sont une famille d'enzymes antioxydantes qui catalysent la dismutation de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Deux formes majoritaires se distinguent par leur localisation et leur ligand interne : SOD1 est localisée dans le cytosol et les peroxysomes et contient un cœur Cu/Zn, tandis que SOD2 est située dans la matrice mitochondriale, possédant un cœur Mn.^{9,47}

I. 2. e. Acides divers

L'acide ascorbique (vitamine C) est un acide organique présent en faible concentration dans les cellules. Il réagit avec les radicaux libres pour former un radical acide semi-hydro/dehydroascorbique, qui sera ensuite régénéré par des enzymes antioxydantes comme les semihydro/dehydroascorbic acid réductases ou par le peptide GSH.^{48,49,50,51}

La vitamine C est impliquée dans la régénération de l'acide urique, un antioxydant hydrophile généré par XO, qui exerce les deux tiers de l'activité décontaminante de l'oxygène dans le sérum sanguin. Elle peut également régénérer la vitamine E, un antioxydant spécialisé dans la capture des radicaux issus de la peroxydation lipidique, dont les propriétés lipophiles forcent sa localisation au niveau des membranes cellulaires ([Figure 7](#)).^{48,49,52}

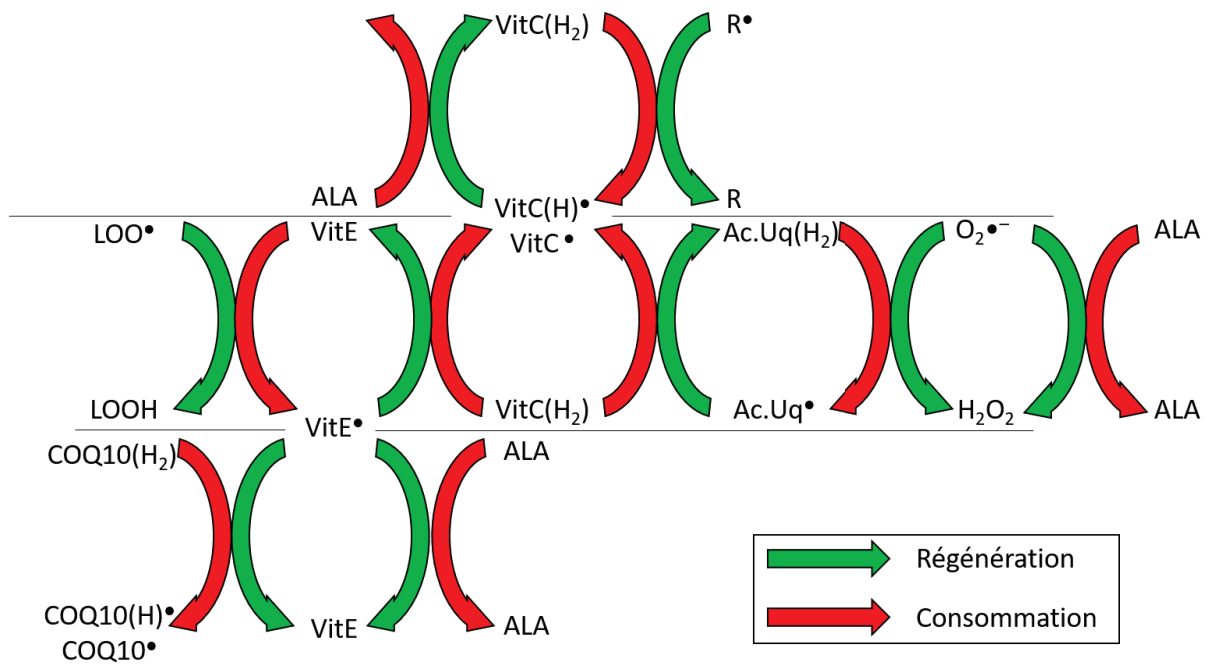


Figure 7: Schématisation des différentes voies de régénération des vitamines C (Vit C), E (Vit E), de l'acide urique (Ac.Uq), de l'acide α -lipoïque (ALA) et de la CoenzymeQ10 (COQ10) entre eux.

Ce dernier protège SOD1 et SOD3 de leur désactivation par H₂O₂. Ses capacités antioxydantes s'illustrent durant l'exercice physique sur l'endothélium vasculaire et il est impliqué dans la protection des neurones (sa déficience est un marqueur de la maladie de Parkinson). Il est également capable de neutraliser le cuivre et le fer libre.⁴¹

L'acide α -lipoïque (ALA) est un antioxydant dont les propriétés amphiphiles lui accordent une grande mobilité cellulaire, lui permettant de régénérer les formes radicalaires des vitamines C (hydrophile) et E (lipophile) lui-même devenir un radical. Outre la régénération, il est à même de détoxifier les ROS (O₂^{•-}, HO[•]) et de former des complexes stables avec différents métaux (Mn(II), Cu(II), Fe(II), Zn(II)).⁵³

I. 2. f. MBP

Les Metal-Binding Proteins (MBPs) sont les premiers antioxydants à avoir été décrits. Ce sont des protéines non enzymatiques qui regroupent l'albumine, la céruloplasmine, les metallothionéines, la ferritine, la myoglobine, la transferrine et la lactoferrine. Ce sont les antioxydants qui participent le

plus à la régulation des ROS plasmatiques grâce à leur capacité à se lier aux métaux libres (notamment Fe(II), Cu(II)) et à leur retirer leur capacité prooxydante (cf [I. 1. c](#)).⁴¹

- La sérotransferrine est le principal transporteur de Fe dans le plasma.
- La ferritine a une fonction de capture et de relargage du Fe en fonction des besoins cytosoliques.
- La lactoferrine possède des propriétés antibactériennes en privant les bactéries d'ions Fe libres nécessaires à leur croissance. Elle permet également l'assimilation du Fe alimentaire.
- L'albumine régule la pression osmotique et la distribution des fluides (bile, pigments, cholestérol, acides gras, drogues/médicaments) entre les compartiments du corps. Elle constitue un important piège à radicaux hydroxyles grâce à la Cys58^a qui n'est pas impliquée dans un pont disulfure (peptide tryptique ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK).⁵⁴ Son rôle d'antioxydant est particulièrement prononcé dans les cas de diabète, et une diminution de la quantité d'albumine dans le plasma est un marqueur de certaines maladies cardiovasculaires.
- La céruloplasmine (CERU) est un transporteur de Cu. Une faible quantité plasmatique de CERU est débattue en tant que marqueur de maladies neurodégénératives comme Alzheimer, Parkinson et l'autisme.
- La myoglobine sert à stocker l'oxygène dans les cellules musculaires et s'avère être un important détoxificateur d'H₂O₂.
- Les metallothionéines (MTs) constituent une défense majeure contre le cadmium (Cd) tout en étant capables de complexer les autres métaux libres (Cu, Zn, Fe, Hg, Ni, Ag).

I. 2. g. CoQ10

La Coenzyme Q10 (CoQ10) (ou ubiquinone/ubiquinol selon l'état d'oxydation) assiste les enzymes déshydrogénases et cytochromes dans leur réactivité redox. Elle peut elle-même neutraliser les radicaux libres (grâce au système CoQ10/CoQ10H/CoQ10H₂). Son utilisation thérapeutique entraîne

^a La séquence de l'albumine utilisée par les références ⁴¹ et ⁵⁴ ne comprend pas le peptide messager, elles situent donc la cystéine en position Cys34 au lieu de Cys58, qui est la position canonique. Séquence canonique : <https://www.uniprot.org/uniprot/P02768#P02768-2>

une diminution du stress oxydant conjointe à l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes chez les patients souffrant d'insuffisance coronarienne et elle est même parfois employée en cosmétologie pour ses propriétés réparatrices de la peau et anti-âge. Elle participe également à la régénération de la vitamine E ([Figure 7](#)).⁴¹

I. 2. h. Mélatonine

La mélatonine est une hormone stéroïdienne et un antioxydant indirect : elle stimule l'activité d'autres antioxydants qui vont chasser les espèces réactives. Sa structure lui permet de franchir les membranes biologiques, donc d'intervenir aussi bien en milieu aqueux qu'aliphatique. Elle peut également détoxifier certains ROS et RNS comme 1O_2 , $ONOO^-$ et NO^\bullet .⁴¹

I. 2. i. Polyphénols

Les polyphénols sont des composés ayant une importante activité enzymatique et sont très présents dans l'alimentation (plantes, légumes, fruits). Leurs propriétés antioxydantes incluent la détoxification de ROS, la chélation des métaux libres Fe et Cu, la stimulation des enzymes SOD, GPx et du facteur de transcription Nrf2 (qui régule les réponses cytoprotectrices⁹), l'inhibition de la XOR ainsi qu'une protection contre la peroxydation lipidique.⁵⁵

Les polyphénols peuvent être répartis en familles (définies selon les fonctions chimiques qui les caractérisent) possédant des propriétés antioxydantes uniques. À titre d'exemple, peuvent être citées :⁵⁵

- Les flavonoïdes : divisée en trois sous-catégories majeures (Flavonols, Proanthocyanidines et Anthocyanines), cette famille inhibe les voies métaboliques NF-κB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) et MAPK (Mitogen-activated protein kinase). Elle gère également la perméabilité mitochondriale en influant sur son potentiel membranaire.

- Les acides phénoliques : comprenant l'acide chlorogénique et l'acide gallique, cette famille stimule l'activité de l'antioxydant CAT ainsi que la production de NADPH cellulaire. Elle inhibe également l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

I. 2. j. Antioxydants et effets délétères

Certains antioxydants peuvent se comporter comme des prooxydants si leur concentration dépasse les concentrations physiologiques ou s'ils sont soumis à un stress. C'est le cas du glutathion, qui peut former des ponts disulfures avec des facteurs de régulation critiques et ainsi bloquer les mécanismes qu'ils régissent.^{9,41} L'acide ascorbique (Vit C) réduit les métaux libres du milieu (normalement réduits en neutralisant $O_2^{\bullet-}$), stimulant la production de radicaux libres selon la réaction de Fenton et Haber-Weiss (cf. [I. 1. c](#)).^{49,50,51} L'hyper uricémie (excès d'acide urique) est un facteur de risque cardiovasculaire chez les patients diabétiques, peut causer de l'hypertension pulmonaire, et est associée à la détérioration des reins.⁴¹

Ces dernières années ont également connu une forte émergence de publications établissant les effets bénéfiques d'antioxydants nutraceutiques (issus de l'alimentation et ayant des propriétés bénéfiques sur la santé), notamment dans la prévention du cancer et la réduction des effets secondaires liés à son traitement.³⁶ Cet engouement pour les antioxydants nutraceutiques, et l'encouragement de leur prise par certains médecins, notamment en parallèle d'un traitement thérapeutique, suscite toutefois une importante controverse dans le milieu médical : si certains bénéfices ont bien été observés pour les patients, les antioxydants sont également utilisés par la tumeur ciblée pour prolonger sa durée de vie (cf. [II. 1. b](#)).^{4,56}

I. 3. Mécanismes physiologiques impliquant les ROS

Les ROS et antioxydants agissent conjointement pour assurer l'équilibre redox de la cellule. Au cours de cette partie, j'illustrerai ces interactions en détaillant certains mécanismes physiologiques.

I. 3. a. L'apoptose

L'apoptose, soit la mort cellulaire, est régie selon divers mécanismes d'activation en fonction du stress ou de la déficience de la cellule. Par ailleurs, différents types de morts cellulaires existent comme l'autophagie,⁵⁷ la ferroptose,²¹ la nécroptose, etc. Leur couverture extensive n'étant pas le sujet de cette thèse, je vous présenterai certains mécanismes dans lesquels les ROS sont impliqués.

Dans le cas des mitochondries, la cytokine TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) met deux mécanismes en compétition : JNK (c-Jun N-terminal kinase), qui va promouvoir l'apoptose, et NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) qui promeut la survie cellulaire.¹³ En présence de TNF- α , la production de ROS mitochondriaux augmente (notamment par NOX1),¹⁹ induisant l'oxydation des cystéines de la JNK phosphatase (cf. [II. 2. b](#)) qui va activer le facteur JNK et entraîner la mort cellulaire ([Figure 8](#)). Le Fe libre cytosolique est par ailleurs, grâce aux ROS qu'il produit, un élément clef pour l'activation et le maintien du facteur JNK.¹⁹ Lorsque le niveau de ROS augmente drastiquement, ces derniers activent NF- κ B,^{14,22} qui régule (entre autres) l'expression de l'antioxydant SOD2 (cf. [I. 2. d](#)) qui va entrer en jeu et limiter l'activation de JNK en réduisant les ROS libres, donc protéger la cellule d'une mort cellulaire.¹³ L'absence de SOD traduit un dysfonctionnement cellulaire sévère, qui mène à l'apoptose.

Dans le cas d'une présence excessive de Fe libre, les ROS produits vont oxyder les cardiolipines (phospholipides mitochondriaux) qui eux-mêmes vont induire la dissociation du cytochrome C de la membrane mitochondriale interne. De là va découler une cascade de signalisations impliquant une production massive de ROS par la mitochondrie qui mènera à l'apoptose de la cellule.¹⁴ Les ROS issus du Fe libre et de XOR peuvent également endommager l'ADN, ce qui entraînera l'activation de p53 qui lui-même activera divers promoteurs de l'apoptose.^{12,14}

En contrepartie, les cellules neuronales utilisent la voie du pentose phosphate pour produire l'antioxydant GSH en abondance et maintenir le cytochrome C à un état réduit, ce qui empêche le déclenchement de l'apoptose.⁵⁸ Il est à noter que les ions superoxydes sont considérés comme anti-apoptotiques et les peroxydes comme proapoptotiques.¹⁴

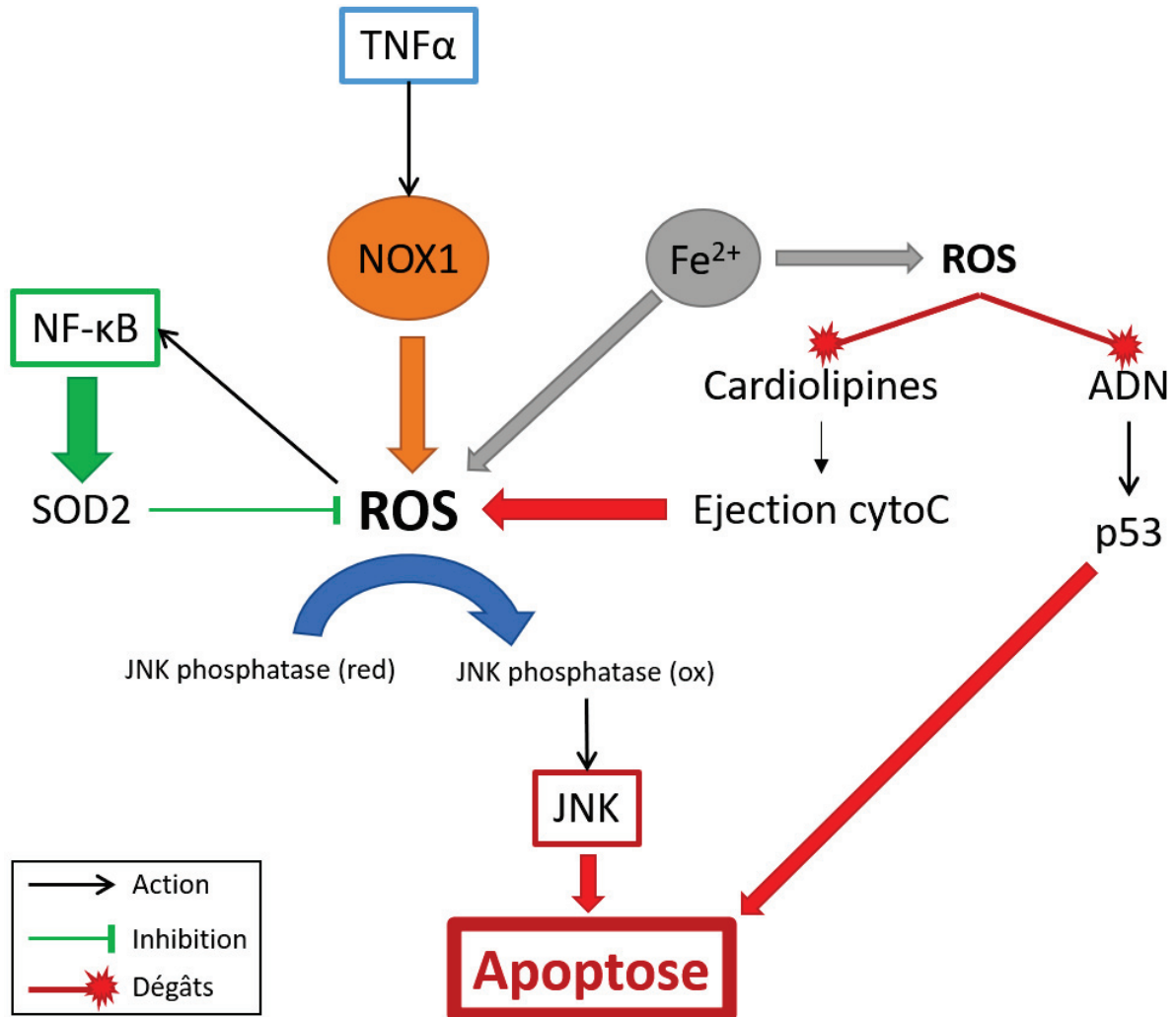


Figure 8: Schéma simplifié de l'implication des ROS dans l'apoptose cellulaire au travers des facteurs TNF- α , JNK et NF- κ B.

1. 3. b. L'hormèse mitochondriale

L'hormèse se définit comme un stress court et non léthal qui induit une réponse de l'organisme visé et augmente à la fois sa résistance et sa durée de vie. Lorsqu'elle est exposée à un stress ou à une

importante demande en énergie, la mitochondrie produit une faible quantité de ROS qui va déclencher une réponse de la part d'enzymes antioxydantes telles que la SOD, catalase et autres...^{9,11,59}

En cas d'hypoxie (concentration d'O₂ qui diminue dans la cellule), les mitochondries produisent massivement des ROS qui serviront à inhiber ou activer certains facteurs défensifs, comme la contraction des artères pulmonaires pour limiter la circulation du sang provenant de régions mal oxygénées du poumon par augmentation de la concentration intra et extracellulaire de calcium.¹³ Les cellules détectent l'hypoxie (notamment) grâce à la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α (dégradé en conditions normoxiques)⁵⁹ et l'inactivation des pompes à K⁺ qui mène à la dépolarisation progressive de la cellule.¹⁴ Ces deux phénomènes dépendent des conditions redox, et sont mis en place grâce au pic de ROS induit par l'hypoxie.¹¹

Cette même production de ROS par les mitochondries est observée lors d'une privation cellulaire en glucose : la glycolyse est un moyen de générer de l'ATP par l'assimilation de glucose, contrairement à la respiration mitochondriale qui génère de l'ATP par l'utilisation d'O₂. La privation de glucose induit une baisse de production d'ATP glycolique qui est compensée par une plus grande activité mitochondriale.^{50,54} Cette suractivité de la mitochondrie induit une augmentation rapide de la quantité de ROS en son sein, puis la mise en place de mécanismes de défense pour pallier cette hausse. Ainsi, les mitochondries sont plus à même de se défendre contre l'attaque de polluants extérieurs, et la durée de vie cellulaire s'en voit plus étendue que pour celles non soumises à la diète.⁶⁰ L'utilisation d'antioxydants pour contrer le pic de ROS avant que la mitochondrie se défende d'elle-même face à une exposition des cellules aux polluants mène à une baisse de l'espérance de vie et du taux de survie cellulaire.⁶⁰

Ces résultats suggèrent que le pic de ROS permet à la mitochondrie de mettre en place des systèmes de défense et de survie, donc que les ROS sont responsables d'un phénomène d'hormèse mitochondriale également à l'œuvre dans les cas d'ischémie-reperfusion.^{11,59,60}

I. 3. c. Transport du glucose

Lors d'un exercice ou d'une contraction, les protéines de la famille GLUT (notamment GLUT1 et 4) se translocalisent à la surface cellulaire pour faciliter le transport du glucose depuis la cellule vers le muscle squelettique. Ce mécanisme est régulé de façon indépendante du chemin lié à l'insuline, mais le mécanisme précis est encore incertain.⁵³

Durant une contraction, le niveau de ROS augmente drastiquement (notamment par l'action de NOX2),⁶¹ conjointement à l'assimilation du glucose par les muscles squelettiques ainsi qu'à l'activation de l'AMP-Protein Kinase (AMPK), candidat largement étudié pour la suggestion de mécanismes d'assimilation glycosidique, notamment en présence d'H₂O₂. L'emploi d'antioxydants entraînant une baisse de l'assimilation du glucose ainsi que de l'activité d'AMPK, les ROS ont logiquement été associés à cette dernière, cependant, Higaki *et al.* suggèrent une autre voie de signalisation via la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K),²⁵ et Merry *et al.* démontrent que l'assimilation du glucose par les ROS est indépendante du système AMPK.⁶²

Dans les tissus adipeux, des ROS caractéristiques des NOX sont générés en réponse à l'insuline. Ces ROS (majoritairement H₂O₂ plus qu'O₂^{•-}) sont connus pour accélérer la différenciation des adipocytes jeunes, mais également pour déclencher une cascade de signalisations insuliniques distales incluant la mobilisation de transporteurs de glucose vers la surface des adipocytes matures. En parallèle, l'antioxydant ALA stimule la redistribution des transporteurs GLUT1 et 4, accroissant l'apport en glucose des adipocytes.^{6,45} Toutefois, une exposition prolongée aux ROS peut diminuer l'expression de ces transporteurs et interférer avec l'assimilation du glucose.¹⁴

I. 3. d. Réponse immunitaire

Pour lutter contre une invasion extérieure, les macrophages produisent massivement des ROS internes (grâce aux NOX) qui vont attaquer et détruire la bactérie incorporée grâce à l'action conjointe de deux antagonistes : les NOX produisent O₂^{•-}, dont la réactivité n'est pas adaptée à un usage défensif. O₂^{•-}

va donc être dismuté par SOD en H_2O_2 , bien plus propice à la lutte antibactérienne. Dans une moindre mesure, XOR peut également être sollicitée pour une production supplémentaire d' $O_2^{\bullet-}$ et la production directe d' H_2O_2 .^{14,22,63} XOR peut également métaboliser de nombreux xénobiotiques et métabolites endogènes.⁵²

Si ce premier niveau de défense se révèle insuffisant, les macrophages savent employer les ressources à leur disposition : $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 peuvent réagir entre eux pour former des radicaux OH^{\bullet} ainsi qu'avec NO et des composés chlorés pour produire respectivement des RNS et RHS. Les macrophages peuvent également fusionner avec des lysosomes pour libérer leur réserve de Fe et produire plus de ROS via la réaction de Fenton (cf [l. 1. c](#)).^{14,63}

L'utilisation intensive des NOX induit un important flux d'électrons au sein du macrophage. Bien qu'il soit compensé par des flux d' H^+ et K^+ cellulaires, il induit un changement d'osmolarité du cytosol qui impacte l'équilibre de la bactérie ingérée. De plus, la production élevée d' H_2O_2 diminue la quantité de protons libres du cytosol, augmentant le pH du milieu et permettant un fonctionnement optimal d'autres mécanismes défensifs.¹⁴

L'agressivité d' H_2O_2 n'est pas totalement directe : H_2O_2 est un messager secondaire qui va activer diverses kinases, inhiber ou stimuler la production d'enzymes défensives ou de facteurs de transcription, et même inactiver certains facteurs de virulence exprimés par la bactérie.^{14,63}

Si ces mécanismes ne suffisent pas à combattre la cible, la mitochondrie est sollicitée pour produire des ROS, comme dans le cas de *staphylococcus aureus* résistant aux attaques antibactériennes ou *mycobacterium tuberculosis* qui empêche la fusion du phagosome avec les lysosomes et inhibe la production de ROS par les NOX. L'utilisation de ROS mitochondriaux permet de tuer la bactérie, mais induit la mort du macrophage hôte à cause d'une suractivation de la cytokine TNF- α .⁶³

Conclusion de la partie I

Les ROS sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et servent de mécanismes de régulation de nombreuses activités cellulaires. Ainsi, les modifications oxydantes induites par les ROS

peuvent résulter de processus de signalisation utiles à la cellule, servir d'intermédiaires pour prévenir les effets liés à un environnement stressant ou traduire un dommage oxydatif.

Le terme « eustress » oxydatif est récemment apparu, désignant un « stress oxydatif physiologique », faisant référence à une production massive de ROS pour le bien de la cellule, décrivant aussi bien l'hormèse mitochondriale, la production de ROS macrophagiques, que l'apoptose.^{63,64} L'apparition de nouveaux termes pour définir les implications des ROS montre l'évolution du niveau de compréhension de ces phénomènes physiologiques.

Toutefois, un dysfonctionnement dans la régulation des ROS, qu'il soit en faveur de leur élimination (stress réducteur) ou de leur accumulation (stress oxydant) mène à l'apparition de pathologies sévères.

Je décrirai par la suite une partie des dysfonctionnements engendrés par l'accumulation de ROS dans les cellules et leur rôle dans le développement de maladies liées au stress oxydant.

II. Stress oxydant

L'accumulation de ROS suite à un dysfonctionnement cellulaire, la présence de composés pathogènes ou la baisse du niveau d'antioxydant impacte l'équilibre redox du milieu, menant au stress oxydant.

Les dégâts oxydatifs causés par le stress oxydant sont nombreux, peuvent affecter différentes biomolécules (lésions et mutations de l'ADN, oxydation des protéines, formation de carbonyles et biomolécules toxiques/cancérogènes, destruction de structures internes de la cellule), et sont étroitement liés au développement et à la progression d'une multitude de maladies dont j'expliciterais certains mécanismes majeurs.

II. 1. Illustrations de l'impact du stress oxydant

II. 1. a. Maladies neurodégénératives

Ces maladies se caractérisent par une dégénérescence progressive des cellules nerveuses, entraînant la perte de fonctions cérébrales. L'appellation regroupant une quantité de maladies trop vaste pour en faire une couverture exhaustive, je me concentrerai plus spécifiquement sur les maladies d'Alzheimer et Parkinson.

Ces deux maladies se caractérisent par la formation d'un corps au niveau du cerveau qui induit la perte de fonctions ou l'apoptose des cellules neuronales. Alzheimer s'illustre par le dépôt de plaques amyloïdes formées par un repliement du peptide β -amyloïde et l'enchevêtrement de la protéine Tau hyperphosphorylée, tandis que Parkinson repose sur la formation de corps de Lewis directement dans les cellules neuronales.^{10,58,65,66,67,68}

Comme évoqué lors de la description de l'apoptose (cf. [I. 3. a](#)), les cellules neuronales maintiennent un équilibre redox et préviennent l'apoptose grâce à la métabolisation de glucides pour produire l'antioxydant GSH en abondance. Dans le cas des maladies d'Alzheimer et Parkinson, ces cellules présentent des dégâts oxydatifs typiques du stress oxydatif.^{10,41,45,58,65,67,68,69,70} En effet, elles contiennent des concentrations élevées de métaux libres, notamment Fe, Cu et Zn, qui sont source de ROS par réaction de Fenton (cf. [I. 1. c](#)). Les radicaux hydroxyles produits sont responsables de lésions de l'ADN, notamment la lésion 8-OH-G, particulièrement étudiée parce qu'elle est facilement formée en cas de stress oxydant. La peroxydation lipidique est également initiée par ces radicaux produits. Des composés dits « produits terminaux de peroxydation lipidique » sont par ailleurs retrouvés en quantité importante dans les cellules neuronales dans le cas d'Alzheimer et Parkinson, dont deux produits en particulier : le malondialdéhyde (MDA), qui est un agent mutagène responsable de la formation d'adduits sur les bases de l'ADN A, G et C, ainsi que de transversions vers T et A, et le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), qui est un agent toxique se liant aux cystéines, lysines et histidines de protéines

impliquées dans le système de réparation de l'ADN, bloquant toute possibilité de régulation des facteurs impactés par le stress oxydant.^{10,41,45,58,65,67,68,69,71}

La présence de produits terminaux de glycosylation (AGE), produits par réaction de ROS avec des glucides et des protéines glycosylées, est un autre effet visible du stress oxydant. Les cellules neuronales employant une voie glucidique pour la production d'antioxydants, une baisse générale de la quantité d'antioxydants cellulaires est observée, plus particulièrement de l'antioxydant GSH.^{10,41,45,58,65,67,68,69} L'absence de régulation des ROS se traduit par une proportion accrue de protéines oxydées (dont la formation de carbonyles), mais également par le dysfonctionnement du complexe I mitochondrial, qui entraîne une baisse de production d'ATP et génère une grande production de ROS.^{10,65,68} Chaque dégât issu du stress oxydatif pouvant lui-même générer des ROS et provoquer d'autres dommages, il est difficile de déterminer quel mécanisme est à l'origine d'un tel emballement. Toujours est-il que tous tendent vers un même résultat : la production de ROS et l'induction de l'apoptose des cellules neuronales. En effet, la montée de ROS provoque une réponse inflammatoire, notamment en promouvant le facteur JNK et des cytokines telles que TNF- α , qui enclenchent les voies apoptotiques cellulaires.^{66,68,72}

Bien que des dégâts communs puissent être observés dans les deux maladies, ces dernières présentent également des mécanismes qui leur sont propres.

À titre d'exemple, la dopamine est impliquée dans la maladie de Parkinson. À cause de son instabilité, cette dernière peut spontanément s'auto-oxyder en H₂O₂ et dopamine-quinone, une molécule neurotoxique ciblant l'antioxydant GSH et induisant des dérèglements du complexe mitochondrial I. De plus, au contact de ROS, la dopamine peut être transformée en 6-hydroxydopamine, un autre neurotoxique.^{10,68}

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la surabondance de β -amyloïde permet à ce dernier de se lier au Cu libre et de favoriser la production de ROS en abaissant la barrière d'activation de la réaction de Fenton. Cette activité catalytique lui permet également de produire des radicaux libres issus de l'ascorbate et de résidus méthionines.¹⁰ La protéine α -1-antichymotrypsine (AACT) est une protéine inflammatoire produite en réponse aux taux élevés de β -amyloïde. L'AACT va activer et promouvoir le

facteur JNK (proapoptotique) de façon à ce qu'il stimule les kinases chargées de la phosphorylation de la protéine Tau. Cette régulation n'étant pas physiologique, il en résultera l'hyperphosphorylation et le mauvais repliement de cette dernière, participant aux enchevêtrements caractéristiques des plaques amyloïdes.⁶⁶

II. 1. b. Cancer

Principale cause du cancer et marqueurs des dégâts oxydatifs, les ROS (notamment les radicaux OH[•]) provoquent diverses lésions à l'ADN comme des fractionnements simple et double brin, la modification des bases ATCG ou de l'arrête désoxyribose, des cross-linking ou la lésion 8-OH-G. Les dégâts oxydatifs générés induisent des arrêts ou démarrages de transcription, des erreurs de réplication, des instabilités génomiques, qui sont tous des phénomènes liés à la carcinogenèse.^{4,5,10} Les mutations peuvent survenir dans l'ADN nucléaire, mais également dans l'ADN mitochondrial, dont les gènes exprimant l'encodage des complexes mitochondriaux ont été altérés dans divers cancers.⁴ Par ailleurs, des fragments d'ADN mitochondriaux ont été retrouvés insérés dans l'ADN nucléaire de cellules cancéreuses.¹⁰

Les cellules tumorales présentent un taux élevé de métaux libres (Fe, Cd, Cr...), qui produisent une forte quantité de ROS par réaction de Fenton, expliquant en partie l'accroissement du taux de ROS radicalaire. À noter que les types de cancers induits varient selon le métal libre en excès.¹⁰ La production de ROS peut également être attribuée à des facteurs externes, comme les composés contenant de l'arsenic qui imitent les ROS en se liant aux thiols libres des protéines, inhibant ou activant certaines enzymes sans possibilités de régulation.^{10,36}

Chaque cancer ayant ses propres voies de progression, je ne peux détailler tous les mécanismes entrant en jeu dans cette thèse, mais il m'est possible de présenter quelques voies métaboliques permettant d'obtenir une idée générale du niveau d'implication du stress oxydant.

Les dégâts oxydatifs de l'ADN conduisent à l'inactivation ou la stimulation de gènes et à changer le destin cellulaire : par exemple, on constate une stimulation de la voie MAPK/AP-1 ainsi que du facteur

NF-κB qui promeuvent la prolifération cellulaire et sa durée de vie, conjointement à l'inhibition du facteur p53 qui est proapoptotique.^{4,10,29} Les cellules tumorales tentent de maintenir un niveau de ROS suffisamment élevé pour stimuler les facteurs de croissance/vie cellulaire, mais suffisamment faible pour ne pas déclencher de facteurs proapoptotiques. Pour se maintenir dans un tel état redox, la cellule va drastiquement augmenter sa production de GSH qui servira à réduire l'excès de ROS, notamment en évitant l'oxydation et le relargage du cytochrome C de la mitochondrie qui mènerait à une mort cellulaire. Ce mécanisme est similaire à celui employé par les cellules neuronales (cf. [I. 3. a](#)).^{4,10,58}

En parallèle de l'immortalisation des cellules tumorales, la vascularisation de la tumeur ainsi que sa migration cellulaire sont des points clefs de sa progression. L'angiogenèse peut être déclenchée par un dysfonctionnement de la capture d'O₂ par la CTEM (dû à des dégâts oxydatifs) qui va créer un important stress mitochondrial mimant un état d'hypoxie cellulaire. Ce stress va stabiliser le facteur HIF-1α qui va à son tour promouvoir l'angiogenèse.^{4,13,36,73} Elle peut également être favorisée par une expression aberrante des métalloprotéinases matricielles qui vont dégrader la matrice extracellulaire, ce qui permet aux cellules endothéliales de se détacher et migrer vers de nouveaux tissus.¹⁰ La migration cellulaire est régie, entre autres, par le facteur COX2, dont le fonctionnement requiert un niveau de ROS élevé, mais pas surabondant. COX2 permet aux cellules cancéreuses de progresser dans le tissu impacté, mais également d'induire des métastases.²²

Les cellules cancéreuses cherchant à maintenir un état redox réduit, l'utilisation d'antioxydants comme agents thérapeutiques est découragée, dans la mesure où ces derniers encourageraient la prolifération cellulaire plutôt que l'apoptose des cellules malignes (comme le montre l'exemple MnSOD³⁶).^{4,10} C'est pourquoi les thérapies actuelles (la controverse sur les thérapies à base d'antioxydants nutraceutiques mise à part, cf. [I. 2. i](#)) emploient deux stratégies : l'utilisation d'inhibiteurs d'antioxydants pour empêcher les cellules tumorales de contrôler leur production de ROS, ou le déclenchement d'évènements oxydatifs. Par exemple, XOR est conjuguée à des anticorps monoclonaux, qui permettront de livrer spécifiquement XOR dans les cellules tumorales et provoquer une augmentation drastique de la quantité de ROS cellulaires induisant l'apoptose.^{4,22}

II. 1. c. Maladies cardiovasculaires

L'accroissement de la quantité de produits terminaux de peroxydation lipidiques comme MDA et 4-HNE dans les cellules musculaires entraîne une baisse des activités ATPases mitochondriales ainsi qu'une perturbation du transport de Ca^{2+} cellulaire, qui s'accumule dans les cellules. Cette perturbation est induite par l'oxydation des protéines chargées du transport calcique ou par la dégradation de la membrane entraînant sa dépolarisation et l'inactivation de porines.^{10,71} Le transport de Ca^{2+} est un élément clef de la contraction cellulaire, son accumulation dans les cellules est un dénominateur commun entre l'athérosclérose, l'hypertension et l'hypertrophie cardiaque.¹⁰

La présence d'une forte quantité de ROS dans les cellules endothéliales va stimuler le facteur inflammatoire Angiotensine II, qui va à son tour pousser les NOX à produire plus de ROS. À terme, on observe une détérioration de l'endothélium vasculaire pouvant mener à des complications cardiovasculaires. Dans le cas de ROS produits par XOR lors d'une réaction immunitaire, ces derniers vont favoriser l'adhésion des phagocytes à l'endothélium, ce qui peut mener à la formation de plaques athéromateuses elles-mêmes à l'origine de thromboses et athéroscléroses.^{10,22} Les cardiolipines sont des phospholipides très présents dans les cellules du myocarde et très sensibles à la peroxydation lipidique. Leur attaque par les ROS provoque des perturbations dans le fonctionnement des structures internes du muscle cardiaque et peut mener à l'apoptose lorsque les cardiolipines mitochondriales, qui maintiennent le cytochrome C en place, sont oxydées.¹⁰ Les ROS peuvent également oxyder les kinases et phosphatases régulant divers facteurs de croissance essentiels au développement cardiovasculaire (cf. [II. 2. b.](#)).⁴⁷

En conditions physiologiques, NO^\bullet (un RNS) module de nombreuses fonctions cardiaques par S-nitrosylation des cystéines de diverses protéines contractiles. La présence du ROS $\text{O}_2^{\bullet-}$ en faible proportion favorise la formation de S-nitrosylation. En cas de surabondance du ROS, il peut directement interagir avec NO^\bullet ou avec ses cibles (en oxydant les cystéines), bloquant les mécanismes cardiaques que ce dernier régule.¹⁰

Après une période d'occlusion coronaire, la restauration du sang dans le myocarde induit un pic massif de ROS (produit notamment par XO) qui vont endommager les tissus, générant des complications sérieuses dans les cas d'infarctus du myocarde, d'arrêts cardiaques ou de transplantations d'organes. Ce type de dégât est appelé blessure par ischémie-reperfusion.^{3,53}

II. 1. d. Le diabète

Le diabète de type II (non-dépendant à l'insuline) provoque une métabolisation anormale des carbohydrates, lipides et protéines, associée à une résistance à l'insuline et une sécrétion insulinaire déficiente.¹⁰ Le glucose peut réagir avec H_2O_2 en présence de Fe et Cu pour former des radicaux hydroxyles. Une hyperglycémie entraîne donc une importante formation de ROS induisant notamment la lésion de l'ADN 8-OH-G, la production de MDA, carbonyles et d'AGE.^{5,10}

La montée de ROS engendrée par l'hyperglycémie altère le complexe I mitochondrial, donnant lieu à une baisse de production d'ATP. Pour compenser, notamment dans les cellules musculaires très demandeuses en ATP, la mitochondrie emploie la β -oxydation, un mécanisme de production d'énergie par clivage des acides gras. Toutefois, cette voie mène à une production de triglycérides plus importante qu'à l'accoutumée. De plus, les ROS induisent des défauts de phosphorylation des protéines chargées d'évacuer les triglycérides, ce qui entraîne de fortes accumulations de triglycérides, tout particulièrement dans les muscles et le foie.^{5,10}

Dans un contexte physiologique, les cellules pancréatiques β (qui sécrètent l'insuline) compensent l'accumulation de triglycérides par une production massive d'insuline. Mais ces cellules sont très sensibles au stress oxydant à cause de leur faible contenu en antioxydants. L'augmentation de ROS va ainsi induire des mutations et des oxydations dans les mécanismes de production d'insuline, et stimuler le développement de facteurs comme plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) et TNF- α qui inhibent l'expression de l'hormone anti-atherogénique adiponectine, responsable de la sensibilité à l'insuline.^{6,10,65,74} L'accumulation de triglycérides et l'impossibilité de produire massivement de l'insuline pour l'évacuer mènent à la résistance à l'insuline des personnes diabétiques. Ce mécanisme instaure une hyperglycémie globale prolongée à l'origine de l'obésité et des problèmes

cardiovasculaires fréquemment rencontrés chez ces patients.^{5,10} Cette prolongation induit la production permanente de ROS qui stimulent les cytokines comme TNF- α ou IL-6, déclenchant des réactions inflammatoires chroniques dans les cellules musculaires et les tissus adipeux. Dans les vaisseaux et les reins, l'hyperglycémie stimule les NOX, déclenchant une réponse du facteur inflammatoire Angiotensine II, qui sera à l'origine de complications cardiovasculaires. Par ailleurs, la prolongation de l'hyperglycémie provoque l'apoptose des cellules pancréatiques β en promouvant le facteur JNK sur la durée, ce qui mène à une production d'insuline encore plus limitée et une persistance de l'hyperglycémie.^{5,10}

D'autres marqueurs du stress oxydant sont observables dans les cas de diabète : une expression plus importante des lipo-oxygénases et de XO ainsi qu'une baisse de l'expression des antioxydants tels que GSH, les vitamines C et E ainsi que les enzymes SOD et Prx.^{5,10}

II. 1. e. Pneumopathies

Lors d'une attaque virale (ou bactérienne), les organismes étrangers utilisent les cellules produisant le mucus pulmonaire (fait de longues glycoprotéines), sécrété par réponse inflammatoire, pour produire leurs propres glycoprotéines.³¹ Ces protéines sont généralement des versions mal repliées des glycoprotéines classiques, dont leurs défauts de repliement combiné à leur production intensive induisent un stress du réticulum endoplasmique qui devrait mener au déclenchement de mécanismes proapoptotiques, tuant la cellule avec l'agresseur.³¹

Toutefois, les virus utilisent des mécanismes spécifiques pour bloquer l'UPR (la réponse au stress du RE, cf. [I. 1. f](#)), pour préserver la vie cellulaire ainsi que la production de protéines mal repliées dont ils peuvent se servir comme milieu de prolifération.³¹ Certaines voies métaboliques de l'UPR peuvent également être stimulées pour que le virus en bénéficie : le virus influenza A amplifie l'activation de IRE1 α tout en coupant les autres voies (ATF6 et PERK) pour faciliter sa propre réplication, tandis que le Virus Respiratoire Syncytial (RSV) atténue PERK pour promouvoir ATF6 ainsi qu'IRE α en quantité restreinte.³¹ Les défauts de repliement (et donc l'accumulation de protéines mal repliées) peuvent

également être stimulés par la présence de ROS extracellulaires provenant des macrophages et granulocytes tentant de combattre l'infection.³¹

Dans le cas de l'asthme, l'inhibition du facteur Nrf2 et une dérégulation des tyrosines phosphatases SHP-1 et SHIP-1 par les ROS mènent au développement d'inflammations bronchiques allergiques ainsi qu'à l'importante sécrétion de mucus caractéristique de la maladie.⁷⁵

II. 2. Biomarqueurs du stress oxydant

Selon le BEST (Biomarkers EndpointS, and other Tools), un biomarqueur est une caractéristique définie mesurée en tant qu'indicateur d'un processus biologique normal, pathogénique ou de réponse à une exposition ou une intervention.⁷⁶

Dans le domaine de la santé, les biomarqueurs sont des molécules dosables dans les tissus et les fluides biologiques. Ils sont employés pour la détection d'altérations de la santé ainsi que la compréhension de mécanismes physiologiques ou pathologiques permettant de fournir des cibles thérapeutiques. La découverte et la validation de biomarqueurs sont donc des étapes cruciales dans les processus de recherche et développement.

II. 2. a. Biomarqueurs de maladies liées au stress oxydant

Plusieurs critères ont été établis pour valider l'utilisation d'un biomarqueur de maladie liée au stress oxydant. L'analyte suivi doit être une molécule stable chimiquement, directement impliquée dans l'initiation ou la progression de la maladie, il doit être accessible par un prélèvement le moins invasif possible et doit également avoir une faible variabilité intra et interindividuelle. Le diagnostic du biomarqueur doit être rapide, précis, spécifique, sensible, ne pas être interféré, doit passer une validation quantitative et pouvoir fixer des valeurs et intervalles de référence du biomarqueur.⁷⁷

Une liste non exhaustive de biomarqueurs du stress oxydant, détectés et quantifiés par de multiples techniques analytiques, peut être dressée. On retrouve MDA et 4HNE (produits de peroxydation

lipidique), les antioxydants (vitamines A, C, E, α -tocophérol, carotènes, l'acide urique, SOD, GPx, GSH et GSSG, Trx, CERU, CQ10, catalase), la lésion 8-OH-G, la mesure directe des ROS (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet}) et de métaux libres, XO, les carbonyles et sulfhydryles et enfin les isoprostanes.⁷⁷

Un classement de ces biomarqueurs a été récemment proposé afin de faciliter l'attribution du rôle du stress oxydant au sein de la maladie rencontrée ([Tableau 1](#)).³ Ce classement divise les biomarqueurs en 5 niveaux :

Type	Biomarqueur
0	Mesure directe d'un ROS (H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$)...
1	Produits d'oxydation (Protéines oxydées, carbonyles, MDA, 4HNE, 8-OH-G, GSH/GSSG...)
2	Produits d'enzymes génératrices de ROS (HOCl, acide urique, allantoïne)
3	Antioxydants (SOD, CAT, GPx, Vit C, E...) ; Enzymes génératrices de ROS (NOX, XO, DUOX...)
4	Mutations et facteurs génétiques

Tableau 1: Classement des biomarqueurs du stress oxydant.

Comme l'évoque l'auteur³, les modifications induites par le stress oxydant ciblent de nombreuses molécules dont la durée de vie est limitée, ce qui les rend très difficiles à quantifier, remettant en question la fiabilité de leur évaluation. Les biomarqueurs utilisés (et ici classés) correspondent à des produits stables. Ils constituent souvent des produits terminaux qui découlent d'un long chemin de réaction et sont plus simples à quantifier que les intermédiaires ou les enzymes initiatrices.

C'est le cas de l'oxydation des cystéines en acides sulféniques, qui constitue une forme intermédiaire destinée à la signalisation cellulaire sous forme d'interrupteur redox, qui n'est donc pas vouée à durer. Au cours ce chapitre, j'ai pu évoquer divers systèmes dans lesquels l'oxydation des cystéines est impliquée, comme l'attribution de la conformation 3D d'une protéine grâce à la création de ponts disulfures internes réalisés au sein du R.E (cf. [I. 1. f](#)), les mécanismes de détoxification et réparation des antioxydants (le glutathion (cf. [I. 2. b](#)), les redoxines (cf. [I. 2. c](#)), les MPBs (cf. [I. 2. f](#)) et l'apoptose (cf. [I. 3. a](#)). La perturbation du système de régulation des acides sulféniques traduit des dysfonctionnements cellulaires sévères, à l'origine de dégâts oxydatifs tels que la suractivité des protéines kinase entraînant l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans le cas de la maladie d'Alzheimer (cf. [II. 1. a](#)), la promotion du facteur JNK conduisant à l'apoptose de la cellule (cf. [I. 3. a](#)),

ou des défauts de phosphorylations qui empêchent l'évacuation des triglycérides cellulaires et mènent au développement du diabète (cf [II. 1. d](#)). De ce fait, le suivi de l'oxydation des cystéines en acides sulféniques constitue une piste potentielle pour la découverte de nouveaux biomarqueurs du stress oxydant.

II. 2. b. Oxydation des cystéines

L'oxydation des fonctions thiols (SH) des résidus cystéines des protéines humaines en acides sulféniques (SOH) par les ROS est un phénomène physiologique permettant de transformer celles-ci en messagers secondaires.^{70,78} Le ROS prépondérant dans la formation de Cys-SOH est H₂O₂, dont la durée de vie plus longue que celle des ROS radicalaires (due à une réactivité amoindrie) lui permet d'être transporté dans la cellule pour oxyder rapidement (1 à 10⁷ M⁻¹s⁻¹) les protéines désirées et intervenir efficacement dans les mécanismes de régulation cellulaire.⁷⁸

Les SOH sont des formes intermédiaires dont le degré d'oxydation est de 0, ce qui leur permet de se comporter en tant que nucléophile et électrophile. Relativement instables, les Cys-SOH vont être stabilisés après avoir délivré leur « message » par réaction électrophile (acceptrice d'électrons) avec les thiols libres d'autres protéines, d'autres thiols internes à la protéine, ou avec GSH pour former des ponts disulfures. Ces derniers seront ensuite réduits en thiols libres par les redoxines (cf. [I. 2. c](#)).^{42,47,78,79,80,81} Toutefois, lorsque le niveau de ROS augmente drastiquement dans la cellule, les Cys-SOH peuvent être suroxydés par réaction nucléophile (donneuse d'électrons) en acides sulfiniques (Cys-SO₂H) (réaction réversible grâce à la sulfiredoxine cf. [I. 2. c](#)), puis en acides sulfoniques (Cys-SO₃H) (réaction irréversible) ([Figure 9](#)). La suroxydation des SOH est plus lente que leur formation, avec une vitesse de réaction allant de 0,1 à 100 M⁻¹s⁻¹. Les Cys-SOH peuvent également former des thiosulfates (SOS) avec les thiols libres d'autres protéines.^{42,47,70,78,79,80,81,82}

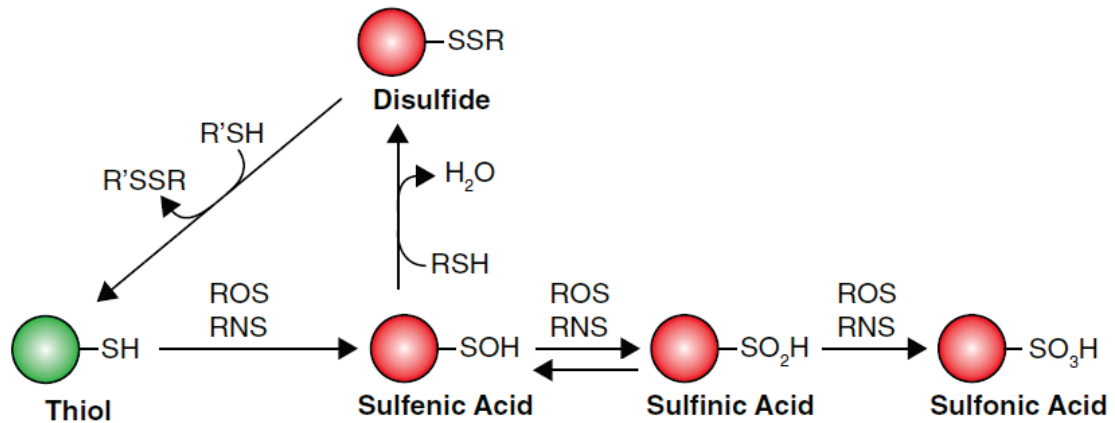


Figure 9: Schéma décrivant les différentes oxydations possibles du groupement thiol (SH, vert) des cystéines : L'oxydation en acide sulfénique (SOH), leur suroxydation en acides sulfiniques et sulfoniques (SO₂H et SO₃H) ou leur dimérisation par la formation d'un pont disulfure avec une fonction thiol libre (S-S), qui pourra être réduite par une enzyme en thiol.⁷⁸

L'oxydation des cystéines en tant que système de régulation physiologique a été premièrement mise en évidence sur des protéines issues des bactéries *E.coli* et *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*.⁸³ Chez *E.coli*, OxyR (Hydrogen peroxide-inducible gene activator) est une protéine contenant deux thiols libres qui, lors d'un accroissement d'H₂O₂, vont former un pont disulfure interne par le biais de l'oxydation de leur fonction SH en SOH. La protéine perd alors sa fonction cellulaire de base pour stimuler la transcription d'antioxydants comme la catalase et l'alkyloperoxyde réductase. Hsp33 (Heat Shock protein 33), une autre protéine à cystéine, possède une activité chaperonne qui est déclenchée lors du changement conformationnel induit par l'oxydation de ses deux fonctions thiols par H₂O₂ en un pont disulfure. De la même manière, le changement conformationnel de RsrA (Regulator of SigmaR, une protéine à cystéine présente chez *Streptomyces coelicolor*) induit par H₂O₂ va promouvoir la synthèse de thioredoxines.^{83,84} OhrR (Organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator) de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* voit son rôle de senseur de peroxydase désactivé par l'oxydation de sa cystéine : la perte de la fonction thiol va induire le détachement de la protéine de son site de liaison à l'ADN et inhiber la transcription d'un gène codant pour une hydroperoxydase.⁸³

Chez l'humain, c'est notamment par les tyrosines phosphatases et les protéines kinase que l'influence du niveau d'oxydation des cystéines sur les processus cellulaires a été mise en évidence en premier lieu. Les protéines tyrosines phosphatase (PTP) sont une famille de protéines chargées d'hydrolyser les résidus tyrosines phosphorylés. Elles possèdent une cystéine dont le groupement thiol permet la

régulation de leur activité : en effet, son oxydation par H_2O_2 en SOH permet l'inactivation de la PTP de façon réversible. Le SOH sera stabilisé par la formation d'un pont disulfure (ce qui empêchera sa suroxydation) qui pourra être réduit en thiol pour rendre la PTP à nouveau fonctionnelle.⁹

Les protéines kinase (PK) exercent la fonction inverse des PTP, phosphorylant les résidus tyrosine, thréonine et sérine. Elles peuvent être activées de deux façons : soit par oxydation directe de leur cystéine comme c'est le cas pour les tyrosines kinases, soit par une cascade de phosphorylations en amont, à l'instar des thréonines/sérines kinase (ou des MAPK). À noter que dans les cellules des muscles lisses vasculaires, l'activation des MAPK peut se faire par oxydation directe des cystéines par les ROS.⁹ Les MAPK constituent une voie de signalisation à part entière qui influence les facteurs Nrf2, la production de l'antioxydant Prx1 (cf [1. 2. c](#)), l'activation de I κ B et NF- κ B parmi d'autres.⁹ On compte également parmi les protéines kinase des facteurs de croissance dont l'activation dépend directement d' H_2O_2 , tels que l'Epidemial Growth Factor Receptor (EGFR), Vascular endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2), Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1).⁴⁷

Les PK et PTP sont donc des protéines aux fonctions antagonistes qui interagissent entre elles : les phosphatases régulent l'action des kinases. Lorsqu'une phosphatase est oxydée (par les ROS), elle s'inactive, permettant aux kinases d'agir, ce qui implique que l'activation des kinases puisse se faire à la fois directement par l'oxydation de leur cystéine, et indirectement par l'inhibition des phosphatases suite à leur oxydation.⁹

Par la suite, divers processus cellulaires régulés par l'oxydation des cystéines en SOH par les ROS ont été mis en lumière : chez les antioxydants, les enzymes thioredoxines et peroxyredoxines (cf [1. 2. c](#)) utilisent leurs cystéines pour détoxifier H_2O_2 ou réduire les ponts disulfures formés et les MPBs (cf [1. 2. f](#)) peuvent former des ponts disulfures avec les SOH. Les facteurs de transcription NF- κ B, AP-1, p53, HIF1 α et HSF sont directement modulés par l'oxydation de leurs cystéines, et les protéines Hsp25, 60, 70 et 90 s'activent ou voient leur activité changer en fonction de l'état redox de leurs cystéines.⁸⁵

Conclusion

Au cours de ce chapitre, j'ai introduit le concept de ROS, des espèces servant de messagers cellulaires, mais également responsables de pathologies sévères lorsqu'elles ne sont pas régulées. J'ai pour cela mis en lumière différents ROS avec leurs principaux modes de production ainsi que les molécules chargées de les réguler. J'ai ensuite détaillé l'interaction des ROS avec le milieu cellulaire au travers de la description de phénomènes de régulations cellulaires dans lesquels ils sont impliqués et de pathologies induites par les dégâts qu'ils peuvent causer.

Si la détection et la quantification des ROS ainsi que des principaux dommages qu'ils causent sont possibles, elles sont souvent difficiles et parfois peu représentatives de l'état biologique cellulaire ou peu informatives sur les mécanismes qui ont mené à ces dégâts.

La recherche de nouveaux biomarqueurs pour caractériser le stress oxydant ainsi que ses cibles est primordiale pour aider à mieux comprendre ses mécanismes d'action et mener à de nouvelles possibilités de traitements thérapeutiques ou de prévention. Cela implique de mettre au point de nouvelles techniques permettant l'analyse représentative de molécules sensibles, à faible durée de vie ou d'intermédiaires jusque-là trop difficiles à quantifier.

C'est le cas des acides sulféniques décrits précédemment. En tant qu'intermédiaires instables impliqués dans de nombreux mécanismes de régulation physiologique, ils constituent une piste solide pour l'identification de biomarqueurs clefs. De nouvelles approches ont émergé puis évolué pour permettre leur détection et leur quantification, qui feront l'objet d'une partie du prochain chapitre.

Chapitre II. État de l'art des techniques de caractérisation des modifications redox des cystéines et quantification de protéines par spectrométrie de masse.

Introduction

Les acides sulféniques ont attiré l'attention de la communauté scientifique grâce à leur implication en tant que messagers secondaires dans de nombreux phénomènes de régulation interne de la cellule, leur conférant un grand potentiel d'exploitation en tant que biomarqueur. Toutefois, ce sont des états intermédiaires, de transition, relativement instables et de courte durée *in vivo* comme *in vitro*. De plus, l'oxydation d'une cystéine en acide sulfénique est un phénomène minoritaire, les acides sulféniques sont donc très peu concentrés face à l'importante gamme dynamique que comprennent les échantillons biologiques. Ceci nécessite l'emploi de stratégies analytiques qui soient à la fois sensibles et spécifiques pour permettre leur détection et leur quantification sans interférences de la matrice. Au cours de ce chapitre, je passerai en revue diverses méthodes de détection et quantification des acides sulféniques, ainsi que le principe de l'analyse peptidique par spectrométrie de masse en tandem.

I. Méthodes de détection et quantification des Cys-SOH

Composés transitoires, les acides sulféniques sont relativement instables et peu concentrés au sein des échantillons biologiques. Ainsi, les techniques mises au point pour leur détection et leur quantification font appel à des technologies variées ayant chacune pour objectif de lever les mystères autour des mécanismes régis par les acides sulféniques. Au cours de cette partie, je détaillerai diverses méthodes de quantification globale des cystéines oxydées permettant une détection et une quantification sans localisation de l'oxydation, puis j'exposerai les stratégies employées pour établir la localisation des oxydations avec (ou sans) quantification.

I. 1. Quantité globale de cystéines oxydées

Ces méthodes permettent la quantification globale de l'oxydation d'un échantillon par le biais de l'analyse des cystéines oxydées, que ce soit par mesure directe ou indirecte (stratégie de réduction/dérivation).

I. 1. a. Détection directe

Ne seront couvertes ici que les méthodes de détection des acides sulféniques, le détail de techniques visant à quantifier les autres formes d'oxydation des cystéines par voie directe étant peu pertinent dans le cadre de cette thèse.

I. 1. a. I. Détection par absorption dans l'ultraviolet (UV) et l'infrarouge (IR)

L'acide sulfénique présente un pic d'absorption caractéristique à 367 nm (distinct des thiols représentés par un épaulement aux alentours de 325 nm) avec un coefficient d'absorption bas ($\epsilon_{367} = 340 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), ce qui nécessite une importante concentration pour que les SOH soient détectés.^{86,87}

Il possède également des bandes d'élongations IR à $3200\text{-}3400 \text{ cm}^{-1}$ (S-OH) et $900\text{-}1100 \text{ cm}^{-1}$ (S-O, anion sulfénate).^{47,88}

Rapides et précises, ces techniques sont généralement employées pour suivre l'oxydation *in vitro* d'une protéine spécifique pour mettre en lumière la présence de cystéines réactives ou pour établir la réactivité d'une sonde vis-à-vis des acides sulféniques.^{47,86,87}

I. 1. a. II. Spectrométrie de masse (MS)

Avec un gain de masse de 16 Da, l'oxydation des thiols en acide sulfénique pourrait être analysée par spectrométrie de masse. Toutefois, l'instabilité des SOH entraîne des réactions parasites, notamment durant la désolvatation induite par l'électrospray qui favorise la suroxydation à l'air libre et la formation de sulfénamides dans la source, ce qui rend leur détection directe par spectrométrie de masse impossible.^{47,80}

Bien que des études caractérisent la formation d'acides sulféniques par spectrométrie de masse native (analyse sur des protéines entières dans des conditions non dénaturantes)⁸⁹, le gain de masse de +16 Da est le même que celui de l'oxydation d'une méthionine en sulfoxyde, de l'hydroxylation des lysines, prolines et tryptophanes ainsi que de diverses autres modifications oxydatives des acides aminés peptidiques. Cette grande diversité isobarique implique de pouvoir séparer et identifier correctement chaque précurseur interférent pour éviter les faux positifs. Les spectres MS/MS correspondants ne sont pas toujours fournis ou ne permettent pas toujours d'ôter toute ambiguïté, ce qui incite à une grande prudence concernant l'interprétation des résultats de ces études.⁸⁰

I. 1. b. Détection indirecte

La plus simple méthode de détection indirecte des oxydations des cystéines consiste à suivre la quantité de cystéines libres dans le temps ([Figure 10](#)). Cette approche permet d'établir le comportement des cystéines des protéines face à un évènement comme un stress oxydatif *in vitro* mais n'est pas adaptée à une utilisation *in vivo*. La quantité de thiols libres obtenue doit impérativement être comparée à un échantillon de référence, ce qui rend la technique sensible aux biais analytiques ainsi qu'aux biais interpersonnels dans le cas d'échantillons biologiques.

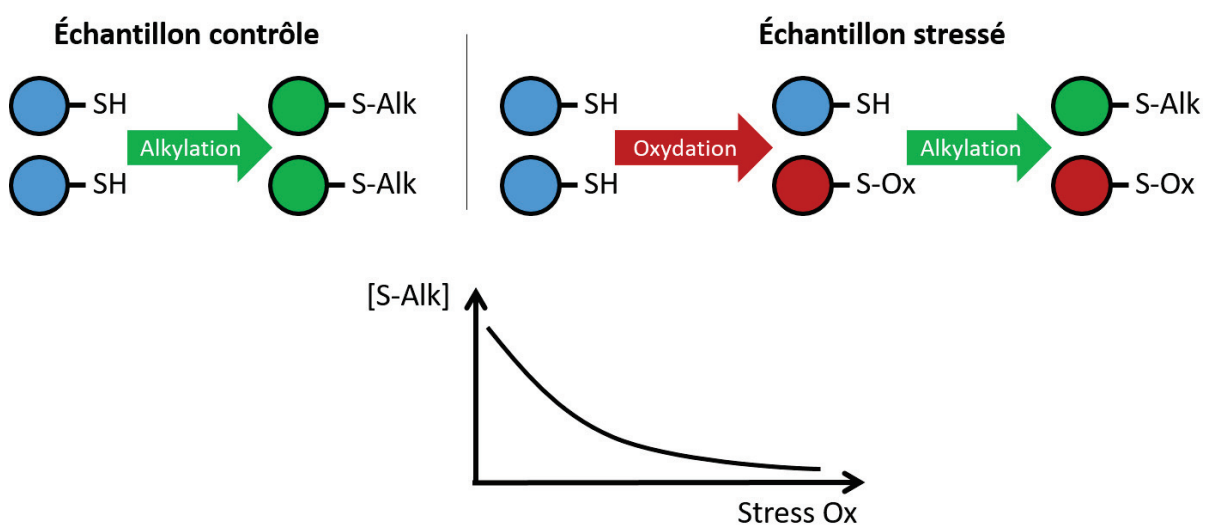


Figure 10: Suivi de l'évolution de la quantité de thiols dans le temps en fonction du stress oxydatif appliqué.

La quantification des cystéines libres au sein de protéines est faite par dérivation de la fonction thiol avec un agent alkylant tel que le *N*-ethylmaléimide (NEM) ou l'iodoacétamide (IAM). Ces agents réagissent plus facilement avec les ions thiolates, exerçant une attaque nucléophile par addition de Michael (NEM) ou par remplacement SN2 (IAM).^{78,90} L'emploi d'agents alkylants peut se faire *in vivo*, permettant de s'affranchir de biais liés à la lyse des cellules lors de la préparation d'échantillons tels que la formation de ponts disulfures supplémentaires.⁹¹ Toutefois, ces agents ne sont pas infaillibles, à l'instar du NEM qui peut également réagir (à moindre mesure) avec les résidus lysine, histidine et tyrosine selon les conditions de réaction, induisant des biais d'identification.⁷⁸

Ces agents alkylants peuvent être conjugués à divers réactifs pour faciliter la détection des thiols libres : le BIAM (biotinylated iodoacetamide) permettant un enrichissement de l'échantillon suivi d'une détection par Western blot (WB) ou Streptavidin blotting en est un exemple. Des fluorophores ou des isotopes radioactifs peuvent également être employés, détectés par fluorescence ou radiodétection après séparation par gel d'électrophorèse.⁷⁸

Il existe d'autres types de sondes pouvant se fixer aux thiols libres, comme la ³⁵S-cystéine, qui permet de former des ponts disulfures avec les cystéines, détectables par SDS-PAGE couplé à de l'autoradiographie ou par LC-MS. Les quinones, qui fragmentent en UVPD (UltraViolet PhotoDissociation) à 266 nm, peuvent être greffées aux thiols par addition de Michael, permettant également d'identifier les cystéines réactives au sein des protéines.^{91,92}

Par ailleurs, l'estimation de l'oxydation obtenue prend en compte l'intégralité des oxydations que sont susceptibles de subir les thiols, qu'elles soient réversibles (S-S, SOH, SNO...) ou irréversibles (SO₂H, SO₃H...), sans permettre de localisation.

Pour pallier ce manque de précision, des méthodes ont été développées pour prendre en compte les cystéines réversiblement oxydées (CysROx), grâce à la réduction de ces dernières. Ces techniques peuvent être généralisées selon le schéma suivant ([Figure 11](#)) : pour un même échantillon, deux aliquots sont préparés. Le premier échantillon dont les thiols oxydés ont été réduits (avec du Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) ou du Dithiothréitol (DTT)), puis tous les thiols libres dérivés avec une

sonde alkylante, est comparé au second dit « référence » où seules les cystéines libres ont été greffées. La comparaison des signaux obtenus grâce aux sondes permet d'estimer l'impact du stress oxydant sur la population de CysROx. Pour obtenir une quantification précise, le signal de la sonde est rationalisé par la quantité totale de protéines, généralement obtenue par révélation au bleu de Coomassie.⁹²

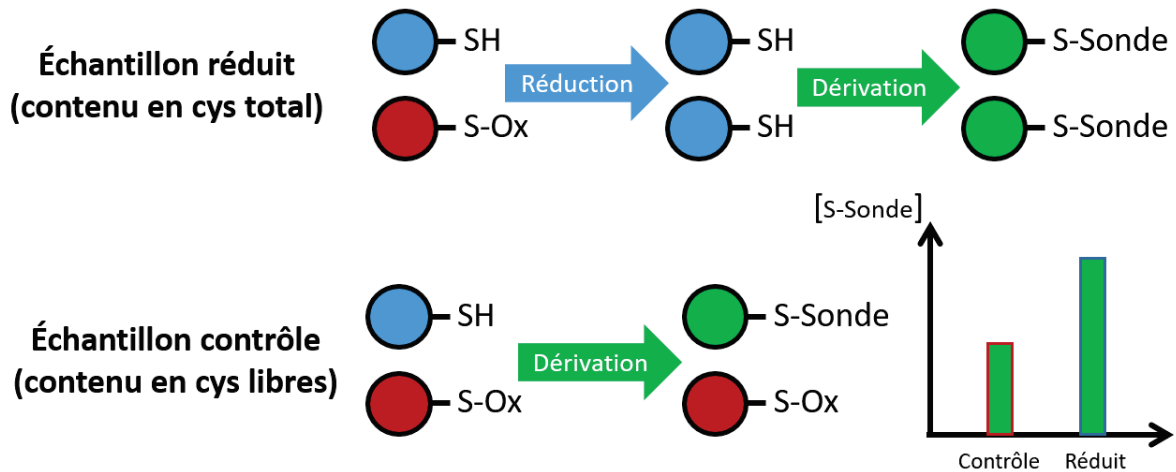


Figure 11: Estimation de la quantité de CysROx par comparaison de la quantité de thiols libres dérivés d'un échantillon avec la quantité de cystéine totale obtenue grâce au même échantillon dont les CysROx ont été réduites et l'intégralité des thiols dérivés.

Différentes techniques de détection, telles que la fluorescence, peuvent être utilisées : l'intensité de dérivés de l'IAM fluorescent à la lumière UV, rationalisée par la quantité totale de protéines permet ainsi l'estimation de la quantité totale d'oxydations réversibles.⁹¹ De même, le DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) est un chromophore jaune aux propriétés alkylantes permettant une détection et quantification colorimétrique (absorbance à 412 nm) de la variation de thiols oxydés entre les échantillons.⁹⁰

L'emploi d'une sonde unique nécessite le recours à un échantillon de référence, donc à des comparaisons externes soumises aux biais analytiques. Le développement de méthodes à deux sondes permet leur analyse simultanée dans un même échantillon et l'établissement de comparaisons internes. La technique DIGE (Differential In Gel Electrophoresis) permet l'emploi de deux sondes fluorescentes différentes dans deux extraits cellulaires distincts. Les thiols libres des extraits sont alkylés (avec un agent type IAM ou NEM), puis les CysROx réduites et dérivées avec l'une ou l'autre des sondes. Leur réunion dans un seul échantillon permet la quantification simultanée des deux signaux optiques après séparation par électrophorèse, et donc la comparaison des conditions de

culture en une seule analyse. Cependant, la réunion des échantillons interfère avec la quantification totale des protéines au bleu de Coomassie.^{90,91} L'utilisation des deux sondes au sein d'un même extrait (une pour les thiols libres, l'autre pour les CysROx réduites) permet de s'affranchir de la quantification au bleu de Coomassie.⁹¹

Une quantification plus précise des dégâts oxydatifs peut être obtenue en réalisant une dérivation à l'IAM ou au NEM des thiols libres, puis la réduction des thiols oxydés et leur dérivation avec un second agent alkylant, comme par l'exemple un isotope radioactif ¹⁴C du premier agent. Après séparation par électrophorèse 2D, les signaux radioactifs (détectés par autoradiographie) sont normalisés par la quantité de protéines estimée par bleu de Coomassie. Cette technique présente l'avantage de ne pas induire de biais pendant la migration sur gel, les deux sondes étant identiques.⁹¹

Il est également possible de capturer les thiols libres grâce à des anticorps spécifiques produits par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays), puis d'effectuer une séparation 2DE ou SDS-PAGE. Toutefois, ces tests manquent de précision et de robustesse lors du ciblage des thiols, les anticorps pouvant accidentellement cibler les formes réduites comme oxydées. Le blocage par un agent alkylant préalable puis la génération d'anticorps spécifiques de l'alkylation est généralement recommandé.⁹⁰

Ces méthodes permettent une estimation plus précise de la quantité de CysROx notamment grâce aux possibilités de rationalisation interne ou de multiplexage. Une sélectivité supplémentaire peut être obtenue en fonction de l'agent réducteur employé ([l. 2. a](#)). Toutefois, la quantification du signal de la sonde ne permet pas d'obtenir d'informations quant à la localisation de ces oxydations, les possibilités de multiplexage sont limitées et nécessitent généralement le recours à un échantillon de référence.

1. 2. Localisation (et quantification) des cystéines oxydées

Contrairement aux méthodes globales, ces méthodes se concentrent sur la localisation des cystéines oxydées au sein des protéines ainsi que sur leur quantification. De même que les méthodes globales,

cette mesure peut être directe (mesure du peptide oxydé) ou indirecte (réduction de la cystéine oxydée puis mesure différentielle).

I. 2. a. Méthodes d'analyse indirectes (Réduction des CysROx et suivi des Cys-SH libres)

Certaines techniques mentionnées en [I. 1. b](#) combinant la séparation par 2DE, WB ou SDS-PAGE et la quantification du signal de la sonde (fluorescence, radiographie...) peuvent également permettre l'identification des analytes par MS en découpant les bandes de gel correspondantes. La 2D-SDS-PAGE (Two dimensional sodium dodecyl sulfate polacrylamide gel electrophoresis)^{78,90} en est un exemple ([Figure 12](#)) : une première séparation des peptides de l'échantillon par électrophorèse dans un sens permet la répartition des protéines/peptides. Les ponts disulfures sont ensuite réduits dans le gel, puis une seconde électrophorèse orthogonale est réalisée (la progression des peptides à cystéines initialement réduites sera identique, ces derniers formeront donc une diagonale sur le gel, tandis que les peptides dont le pont disulfure a été réduit migreront en dehors de cette diagonale).

Le gel peut être découpé à ces endroits précis puis analysé par LC-MS après traitement. Si cette méthodologie promet une certaine pureté de l'analyte, elle souffre de nombreux handicaps : les séparations type WB sont longues, comportent de multiples étapes et nécessitent, en plus d'un opérateur compétent, que l'analyte soit suffisamment concentré pour obtenir un résultat fiable et reproductible, sans compter le découpage et la manipulation des bandes de gel pour l'identification qui sont également des étapes chronophages. Par ailleurs, l'identification protéique par MS ne permet d'évaluer que le nombre de cystéines dérivées, et l'identification de peptides n'est pas sans risque en l'absence de confirmation par MS/MS.^{78,90}

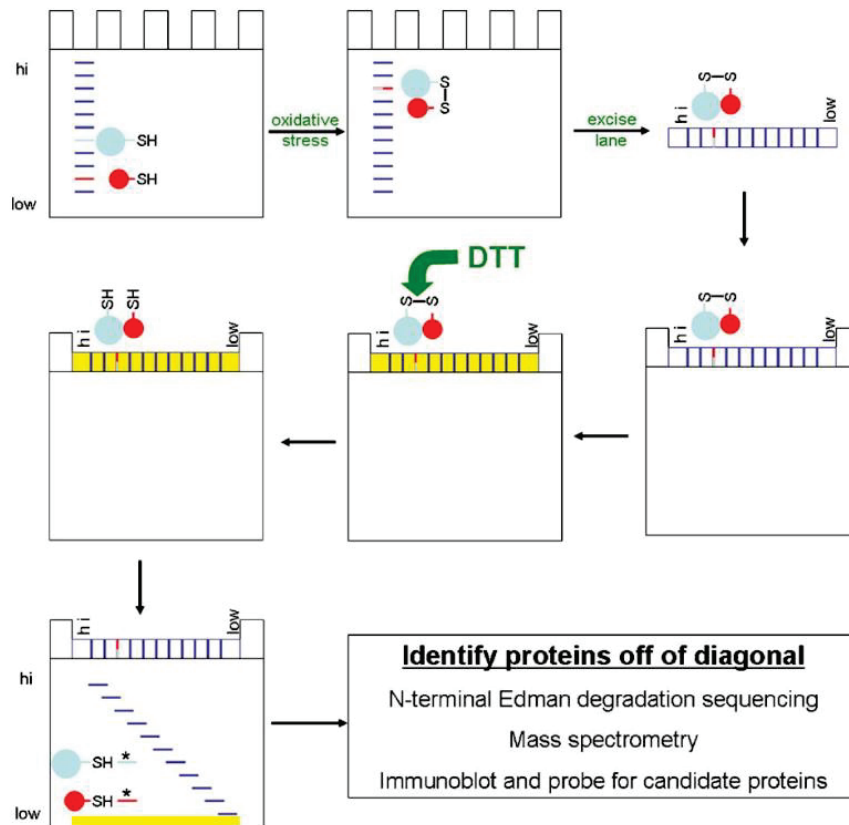


Figure 12: Électrophorèse orthogonale : Les différents peptides d'un échantillon sont séparés selon une première dimension, réduits dans le gel et à nouveau séparés dans une seconde dimension. La distance parcourue par les peptides oxydés qui ont été réduits sera différente entre la première et la seconde séparation, mettant en évidence leur oxydation.⁹⁰

I. 2. a. I. Techniques à sondes isotopiques

L'Isotope-Coded Affinity Tag (ou ICAT) (Figure 13 (a)) est une stratégie reposant sur la quantification des ratios isotopiques légers (^{12}C) et lourds (^{13}C) d'un réactif conjuguant une sonde biotine clivable et une base IAM reliées par une chaîne de neuf carbones.⁹³ Deux aliquots d'un même échantillon sont prélevés. Les thiols libres du premier (condition normale) sont dérivés avec le réactif léger (^{12}C), tandis que le second aliquot est soumis à un stress oxydatif, puis les thiols libres restants sont dérivés avec le réactif lourd (^{13}C). Les deux aliquots sont ensuite réunis, digérés avec de la trypsine, purifiés par séparation sur avidine, et finalement analysés par LC-MS/MS. Les peptides dont les cystéines ne sont pas soumises au stress oxydant sont identifiés grâce aux pics de leurs versions légères et lourdes, dont la masse diffère, mais l'intensité reste identique. En revanche, les peptides dont les cystéines ont été oxydées voient l'intensité du pic de l'isotope lourd (^{13}C) fortement diminuée par rapport à leur homologue contrôle (^{12}C). En faisant le ratio isotope léger/isotope lourd, il est possible de déterminer

le pourcentage d'oxydation des thiols ainsi que de localiser les sites d'oxydation au sein d'un même échantillon sans recourir à une référence.^{78,90,91}

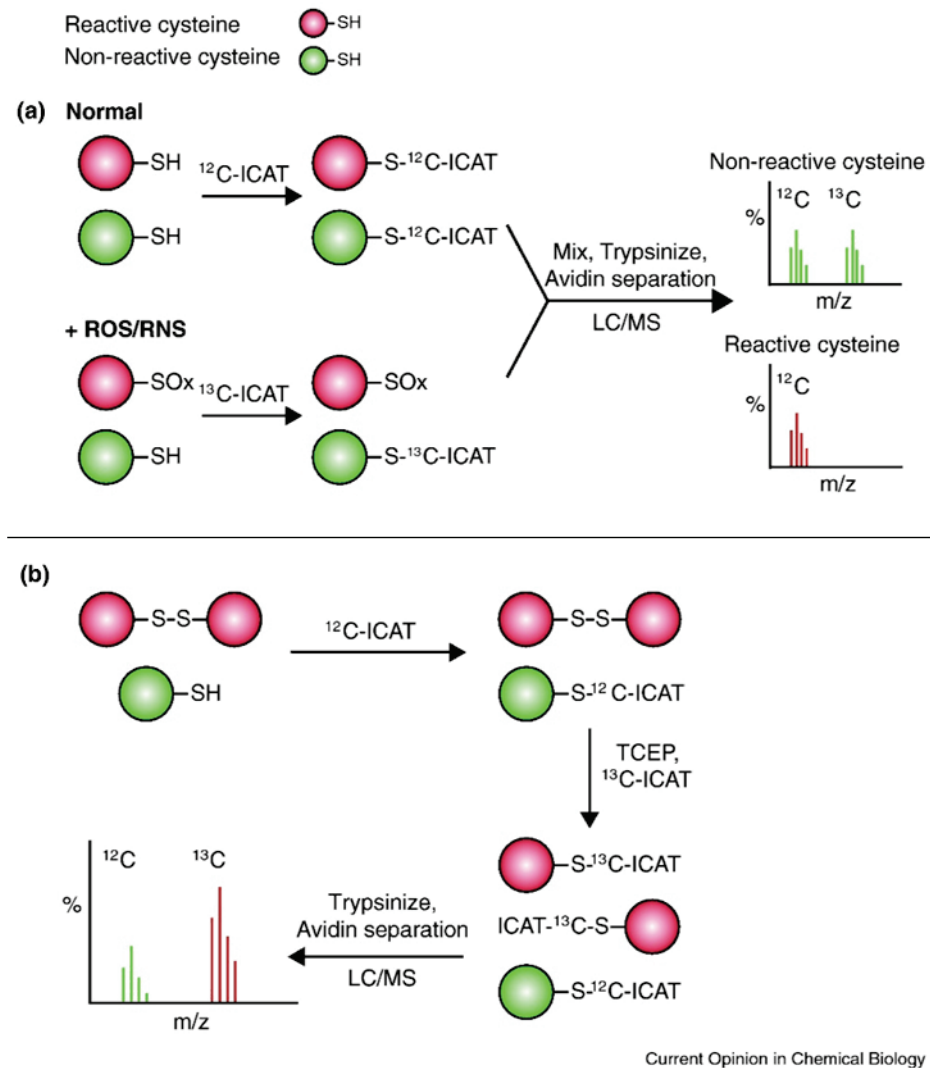


Figure 13: Schéma expliquant la méthodologie des techniques de marquage isotopique des thiols libres a) ICAT ; b) OxICAT et leur détection par spectrométrie de masse.⁷⁸

Toutefois, ICAT ne permet qu'une estimation de l'oxydation totale de l'échantillon par le suivi des cystéines libres résiduelles, ce qui inclut à la fois les dégâts irréversibles (radicaux, acides sulfoniques SO₃H) et les oxydations réversibles (ponts disulfures, SOH, SNO...)⁷⁸

Pour pallier ce manque d'information, les techniques se sont tournées vers l'emploi d'agents réducteurs dans le but de réduire, quantifier et localiser les CysROx induites par un stress oxydant.

Il est possible de réduire spécifiquement les divers types de CysROx en utilisant un agent réducteur adapté. L'arsenite et l'ascorbate de sodium sont des agents respectivement capables de réduire

spécifiquement les Cys-SOH et les Cys-SNO.^{78,80,90,91,94,95,96} Toutefois, leur spécificité est remise en cause notamment pour leur emploi dans la biotin-switch technique (voir plus bas), ces deux réducteurs pouvant également cliver les ponts disulfures internes aux protéines ainsi que les ponts établis entre les thiols libres et l'agent bloquant MMTS (Methylmethane thiosulfonate) ou entre les thiols libres et la biotine-HPDP (biotin-N-[6-(biotinamido)-hexyl]-30-(20-pyridyldithio)-propionamide).^{95,96}

L'intégralité des CysROx (SOH, S-S, SNO...) est généralement réduite par le TCEP, réactif fréquemment employé pour estimer la quantité globale de CysROx dans un échantillon, ou pour réduire toutes les cystéines en vue d'une oxydation spécifique de la protéine. Il peut également interférer avec la dérivation des thiols libres s'il n'est pas retiré du milieu réactionnel.^{78,80,90,91,95,97,98,99,100}

Le DTT est un homologue du TCEP, considéré comme également capable de réduire les ponts disulfures des cystéines et les autres oxydations réversibles, ainsi que les ponts S-S établis entre une sonde et la cystéine.^{80,101,102,103} Toutefois, son rôle précis en tant que réducteur des S-S ou de toutes les CysROx n'est pas toujours clairement précisé, le terme « oxydation » pouvant désigner la réduction des ponts S-S comme celles des CysROx.^{45,91,90,100,104,105,106,107,108,109} Des études se fondant sur le regain d'activité de protéines oxydées (lié à l'état d'oxydation des cystéines) après réduction au DTT ne sont pas très concluantes.^{99,110,111,112} Elles ne permettent pas clairement de démontrer le rôle réducteur du DTT au-delà de la réduction des ponts disulfures.

L'utilisation d'une enzyme réductrice permet de réduire spécifiquement les ponts disulfures des protéines ciblées et d'éviter la réduction des Cys-SOH ou des Cys-SNO. Par exemple, utiliser l'enzyme Trx1 (cf. [Chapitre I.I. 2. c](#)) permet de ne réduire que les ponts disulfures qui y sont sensibles. Ainsi, dans une étude de *Marino et al.*, les thiols libres des protéines testées ont été dérivés à l'IAM, puis l'enzyme placée dans l'échantillon et les ponts disulfures réduits alkylés au BIAM, puis l'échantillon analysé en LC-MS/MS. La comparaison des signaux des peptides dérivés par IAM ou BIAM permet de mettre en évidence les protéines cellulaires régulées par la Trx1 ainsi que les peptides dont les cystéines sont impactées.¹⁰⁹ L'utilisation de Grx permet, d'une façon similaire, d'identifier les peptides régulés par glutathionylation.^{78,93,109}

Étonnamment, l'exposition d'un échantillon à la lumière du jour peut également induire un faible taux de rupture des ponts disulfures.⁹⁵

OxICAT, une stratégie dérivée d'ICAT, ([Figure 13 \(b\)](#)) permet de comparer les quantités de CysROx avec celles de thiols libres. Après avoir bloqué la formation de ponts disulfures avec un traitement à l'acide trichloroacétique, les protéines sont dénaturées et les thiols libres dérivés avec l'isotope ICAT léger (¹²C). Les CysROx sont ensuite réduites avec du TCEP et les thiols nouvellement formés sont dérivés avec l'isotope lourd (¹³C). Les protéines sont digérées avec de la trypsine, les peptides formés purifiés avec de l'avidine puis analysés par LC-MS/MS. Les peptides de même séquence marqués avec les versions lourde et légère du réactif ICAT possèdent la même efficacité d'ionisation. Grâce à la différence de masse des isotopes, il est possible de faire le ratio entre les deux pics et estimer la quantité de CysROx dans l'échantillon.^{78,91,93}

I. 2. a. II. Techniques à sonde biotinylée

La biotin switch technique (BST) ([Figure 14](#)) est une technique où les thiols libres sont alkylés au MMTS, puis les Cys-SOH ou les Cys-SNO sont réduites à l'arsenite et à l'ascorbate de sodium. Les thiols nouvellement formés sont alkylés avec de la biotine-HPDP, purifiés sur une colonne retenant spécifiquement la biotine, puis élués par clivage de la liaison S-Biotine grâce au DTT. L'échantillon est ensuite analysé en LC-MS/MS permettant de localiser et quantifier les peptides à cystéines oxydées. Toutefois, la BST ne peut détecter qu'une large quantité de peptide dérivé, d'où une étape d'enrichissement nécessaire, et, comme évoqué précédemment les agents réducteurs peuvent cliver la liaison S-MMTS, les ponts disulfures ainsi que la liaison S-biotine, induisant des sous ou surestimations de la quantité réelle d'analytes.^{78,80,90,91,94}

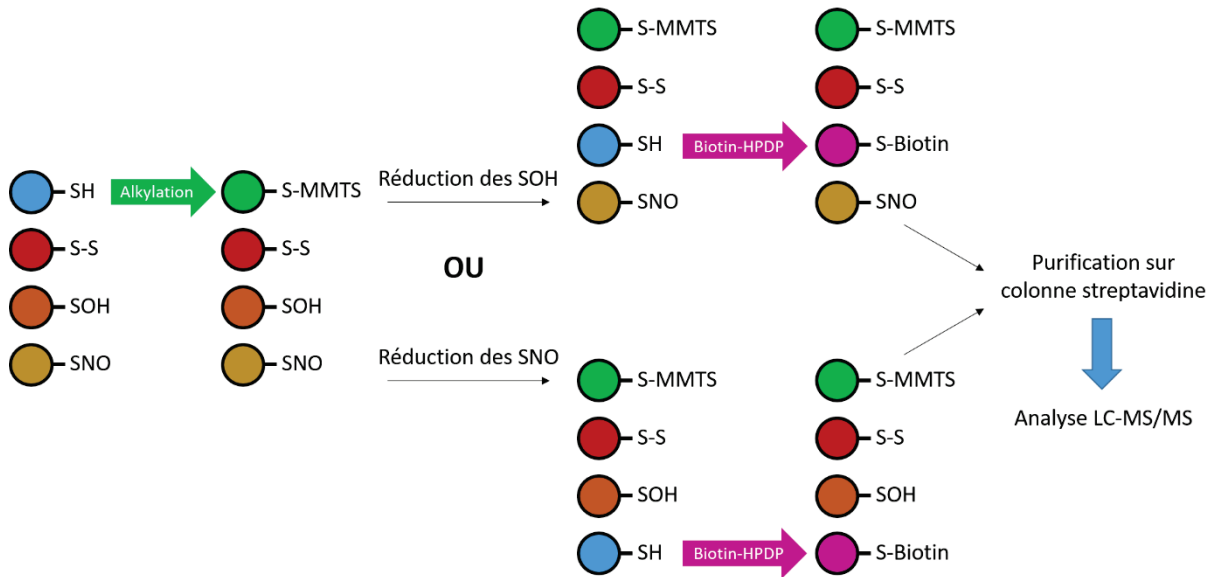


Figure 14: Illustration de la Biotin-Switch Technique dans laquelle les SH libres sont alkylés au MMTS, les SOH ou SNO réduits, les SH nouvellement formés dérivés par biotin-HPDP, puis purifiés sur une colonne streptavidine et analysés en LC-MS/MS.

I. 2. a. III. Techniques à sondes isobares

L'Iodoacetyl Tandem Mass Tag (IodoTMT) (Figure 15) emploie des réactifs alkylants auxquels sont greffées des sondes de masses connues séparées d'1 Da. L'échantillon de culture cellulaire est séparé en six aliquots : trois serviront de solutions contrôles, et les trois autres subiront un stress oxydant. Les thiols libres de chaque aliquot sont bloqués au MMTS, puis les cystéines des six aliquots sont réduites avec différents agents réducteurs en fonction de l'oxydation que l'expérimentateur souhaite suivre, puis dérivées avec leur propre IodoTMT selon le schéma suivant. Les CysROx des aliquots d'un premier couple contrôle/stress seront réduites sans distinction grâce au TCEP puis dérivées avec le réactif IodoTMT-126 (contrôle) et IodoTMT-127 (stress). Les cystéines oxydées en SNO d'un second couple seront réduites à l'ascorbate de sodium puis alkylées avec IodoTMT-128 (contrôle) et IodoTMT-129 (stress). Finalement, les cystéines oxydées en SOH du troisième couple seront réduites à l'arsenite de sodium et dérivées par IodoTMT-130 (contrôle) et IodoTMT-131 (stress). Les six aliquots sont ensuite remélangés au ratio CysROx-SNO-SOH de 1-10-10. Une nouvelle réduction au DTT suivie d'une dérivatisation à l'IAM pour bloquer les thiols se libérant du MMTS est effectuée, puis l'échantillon est digéré avec de la trypsine et purifié par SPE (Solid Phase Extraction – Extraction sur phase solide).^{100,113}

L'échantillon est ensuite enrichi sur des colonnes contenant des anticorps anti-TMT permettant de retenir et éluer spécifiquement les cystéines dérivées avec un réactif IodoTMT. L'échantillon est

ensuite fractionné par chromatographie HILIC, puis analysé par LC-MS/MS. Les peptides dérivés avec les différentes sondes iodo-TMT se fragmentent et produisent un ion rapporteur de rapport m/z spécifique, chaque réactif ayant son propre ion rapporteur (m/z 126, 127, 128, 129...). Leur quantification permet d'établir des ratios entre les différents analytes dérivés, donc de faire des quantifications relatives des taux de CysROx, Cys-SOH et Cys-SNO entre la condition contrôle et la condition stressée. Cette technique possède un haut potentiel de multiplexage puisqu'il suffit d'utiliser plus de réactifs différents pour obtenir plus d'informations (suivi d'une autre oxydation, test de différents stress...). Toutefois, le protocole est lourd, contenant de nombreuses étapes, et bien que les quantités de Cys-SOH et Cys-SNO aient été dopées dans le mélange final, l'échantillon nécessite encore un enrichissement sur une colonne spécifique.¹⁰⁰

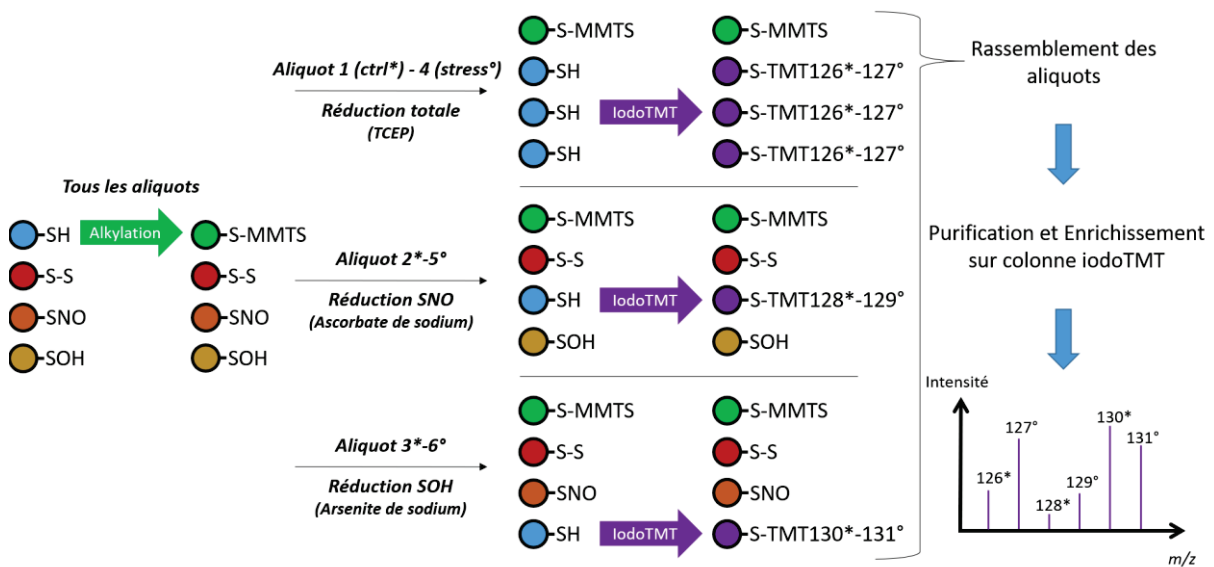


Figure 15: Illustration de la technique IodoTMT où les peptides oxydés issus d'échantillons contrôles (marqués avec un *) et d'échantillons ayant subi un stress oxydant (marqués avec un °) sont spécifiquement réduits et dérivés avec des sondes TMT différentes en fonction de la nature l'oxydation et de la catégorie d'échantillons à laquelle ils appartiennent.

Couplant les techniques IodoTMT et OxICAT, OxiTMT (Figure 16) permet de repousser les limites du multiplexage : plusieurs échantillons (un contrôle et les conditions à tester) sont divisés en deux fractions. Les thiols libres de la première fraction vont être alkylés, puis les CysROx réduites par le DTT et dérivées avec un premier réactif TMT1. Le contenu total en cystéines (thiols libres, ponts disulfures, SOH, SNO...) de la deuxième fraction va être réduit au DTT sans alkylation préalable des thiols libres natifs, puis l'intégralité des thiols libres disponibles va être dérivée avec un autre réactif TMT3, ce qui

permettra de comparer la quantité de CysROx à la quantité totale de cystéines dans l'échantillon. Une fois toutes les fractions dérivées avec des TMT différentes, elles sont rassemblées, digérées par trypsine, enrichies grâce aux anticorps anti-TMT, puis analysées en LC-MS/MS où les intensités des ions rapporteurs issus des CysROx réduites pourront être rationalisées avec la quantité totale de cystéines, et ainsi offrir une comparaison de l'oxydation entre les différentes conditions opératoires. La technique OxiTMT allie donc l'importante capacité de multiplexage d'iodoTMT avec la quantification précise de CysROx liées au stress oxydant.¹¹³

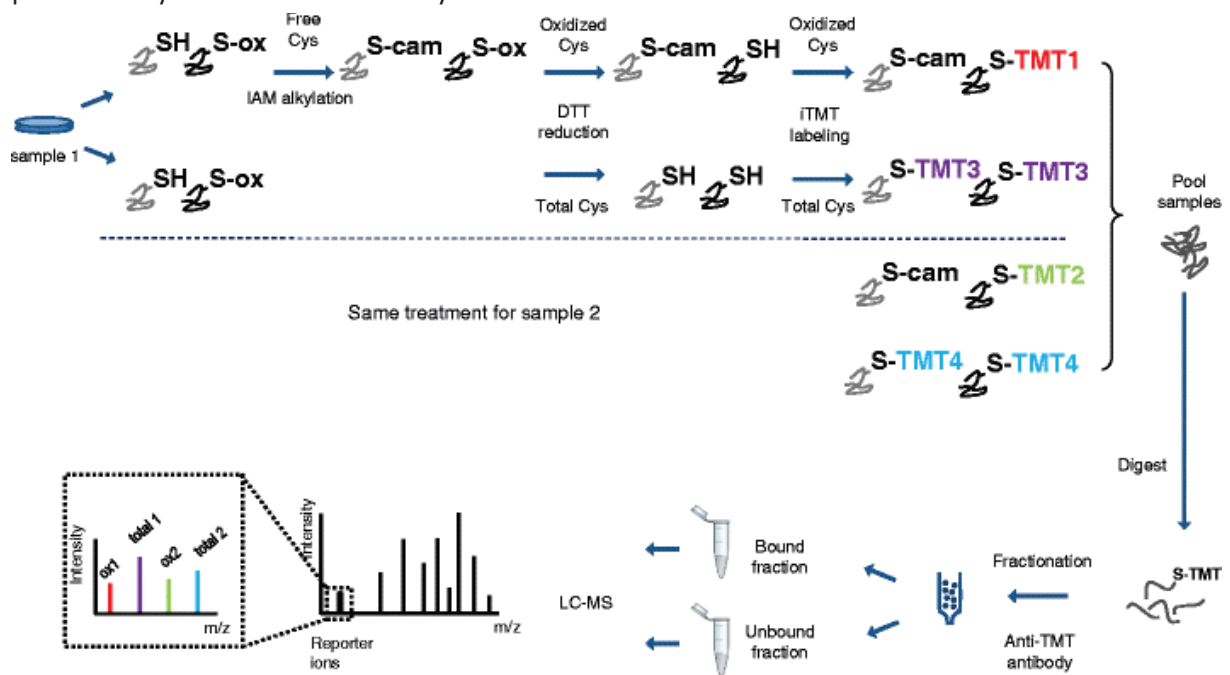


Figure 16: Illustration de la technique OxiTMT, permettant de normaliser les quantités de CysROx par la quantité de cystéines totale de leur échantillon et de les comparer à différents échantillons en une seule analyse grâce à l'utilisation de différentes sondes TMT.¹¹³

I. 2. a. IV. Techniques additionnelles

Jusqu'à présent, seules des sondes ciblant les cystéines ont été présentées. Il existe néanmoins des stratégies employant des sondes clivables ou isotopiques dérivées sur d'autres acides aminés.

Par exemple, OxiTRAQ (Figure 17) est une méthode dérivée d'iTRAQ, technique reposant sur le marquage différentiel des peptides sur leur lysine ou en N-terminal avec un réactif similaire à iodoTMT. Les populations de cellules contrôles et de cellules exposées à H₂O₂ voient les thiols libres de leurs cystéines bloqués par NEM, puis les CysROx sont réduites au DTT et dérivées par biotine-HPDP. Après digestion tryptique, les peptides sont purifiés sur une résine NeutrAvidin, et élués par clivage du

groupement biotine, libérant les thiols des cystéines qui seront ensuite alkylés par IAM. Les lysines et extrémités N-term des peptides à Cys-IAM sont ainsi marquées avec un réactif iTRAQ différent selon l'échantillon, qui, à l'instar d'iodoTMT, fournira un ion rapporteur de rapport m/z spécifique lors de la fragmentation du peptide. Les échantillons sont regroupés, puis analysés en LC-MS/MS où le rapport des intensités des ions rapporteurs permettra d'évaluer dans quelles conditions le stress oxydant a généré des CysROX, et dans quelle proportion.¹⁰²

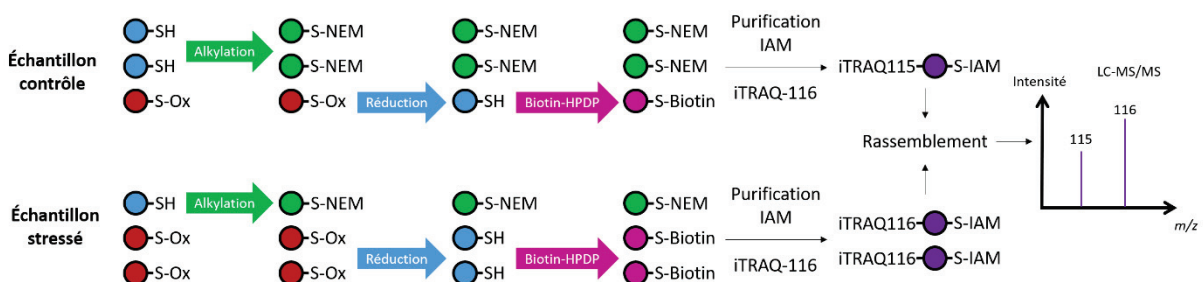


Figure 17: Illustration de la méthode OxiTRAQ, où la quantité de CysROX de différents échantillons peut être comparée en une même analyse grâce à la combinaison de la biotin-switch technique et de sondes iTRAQ.

Oc-SILAC (Figure 18) emploie la technique SILAC où les populations de cellules sont nourries avec des versions isotopiques lourdes d'acides aminés, permettant la synthèse directe de protéines et peptides « lourds » sans emploi de standards ou de greffage de sonde isotopique^{100,111} : deux cultures cellulaires, une contrôle et une « lourde » (soumise au stress oxydant et nourrie avec les acides aminés R10 (Arginine +10 Da) et K8 (Lysine +8 Da)) sont mélangées dans un échantillon. Les cystéines sont alkylées à l'IAM, les CysROX réduites au DTT puis dérivées par biotine–HPDP. Les protéines sont digérées par la trypsine, et les peptides purifiés par streptavidine d'où ils sont élués par clivage de la sonde biotine. L'échantillon est ensuite analysé par LC-MS/MS, où pourront être établis les ratios entre les formes légères (contrôle) et lourdes (stress) des peptides à cystéine initialement oxydée (SH libre après réduction, marquage par biotine–HPDP et purification par streptavidine) et réduite (S-IAM après alkylation). Ces ratios permettront d'estimer l'impact du stress oxydant sur la culture cellulaire. Avantage majeur, le suivi de peptides sans cystéines permet de normaliser les résultats en quantifiant l'altération d'une abondance protéique ou simplement en rectifiant les niveaux de population entre les deux échantillons.¹⁰³

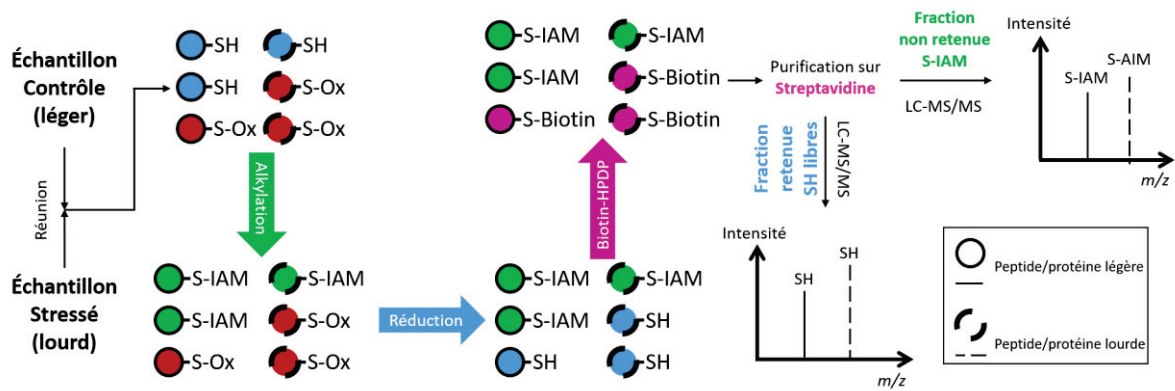


Figure 18: Représentation de la méthode Oc-SILAC, où la quantité de CysROx de différents échantillons peut être comparée en une même analyse grâce à la combinaison de la biotin-switch et de la technique SILAC qui permet d'obtenir des versions isotopiques lourdes et légères d'échantillons à comparer.

Sur un principe similaire, la technique SILAC peut être combinée avec IodoTMT : les cystéines d'une population contrôle (légère) et d'une population stressée (lourde) sont dérivées avec un premier réactif TMT1, les CysROx réduites puis dérivées avec un second réactif TMT2, et analysées en LC-MS/MS permettant d'établir à la fois les ratios d'oxydation grâce aux ions rapporteurs, et de mettre en évidence des changements d'abondance de populations, et ce sans enrichissement.¹¹⁴

Ces méthodes de détection, bien que performantes, sont relativement lourdes : leur protocole comprend de nombreuses étapes, fait appel à une large gamme de réactifs parfois coûteux et nécessite généralement l'emploi de techniques d'enrichissement pour obtenir des résultats satisfaisants, l'oxydation des cystéines en acides sulféniques étant un phénomène largement minoritaire au sein de la cellule.

1. 2. b. Méthodes d'analyse directes (sans réduction des CysROx)

Au cours de cette partie, je décrirai l'observation directe des acides sulféniques par MS/MS suite à leur dérivation spécifique, ainsi que leur observation par cristallographie à rayon X et RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) qui ne nécessitent pas de dérivation préalable.

I. 2. b. I. Dimédones et autres sondes nucléophiles

Les acides sulféniques étant des groupements de transition, leur dérivation permet de les stabiliser, de les manipuler et de les analyser en MS/MS. Les dimédones (5,5-diméthyl-1,3-cyclohexanedione) sont des réactifs se greffant sur les acides sulféniques de façon très spécifique. Leur conjugaison avec des groupements fluorescents, radioactifs, biotnylés... a permis la mise au point de stratégies de détection directe des acides sulféniques. Il existe des dimédones possédant des fonctions terminales alcyne ou azoture, telles que les dimédones de la série DYn ou DAz, respectivement. Ces fonctions sont utilisées pour le greffage d'une sonde spécifique par mécanisme dit « click-ready » dans le cas des dimédones DYn : réaction entre le groupement alcyne de la dimédone et le groupement azoture de la sonde (Figure 19 a)). Dans le cas des composés DAz, la modification se fait par ligation de Staudinger¹¹⁵ : réaction entre le groupement azoture de la dimédone et le groupement phosphane de la sonde (Figure 19 b)). Les dimédones DYn et DAz présentent trois avantages majeurs : une vitesse de dérivation des SOH accrue grâce à un composé dimédone de taille réduite, une haute sélectivité des réactions azoture-alcyne ou phosphane-azide alliée à une importante vitesse de réaction, le tout sans impliquer des réactifs/catalyseurs et produits de réaction toxiques (pour la ligation de Staudinger dite « traceless »).^{78,80}

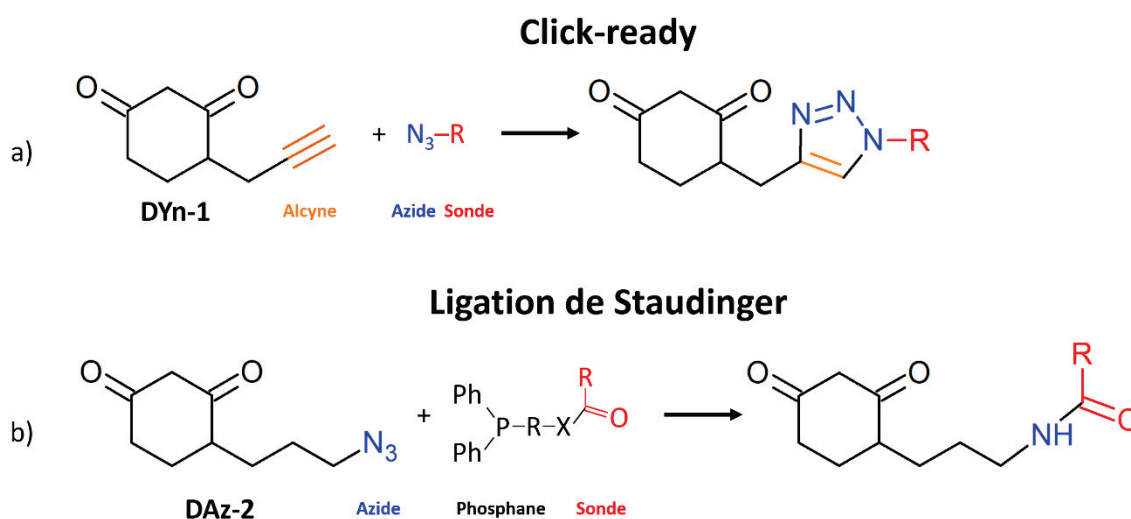


Figure 19: Illustration des mécanismes réactionnels a) Click-ready entre une sonde (R, rouge) conjuguée à un groupement azoture (bleu) et le composé DYn-1 constitué d'un groupement dimédone (noir) et d'un groupement alcyne (orange) b) Ligation de Staudinger entre une sonde (R, rouge) conjuguée à un groupement phosphane (noir) et le composé DAz-2 constitué d'un groupement dimédone (noir) et d'un groupement azoture (bleu).

Ces stratégies nécessitent cependant l'emploi de précautions d'usage : les azides inorganiques et les petits azides organiques doivent être manipulés avec précaution étant donné qu'ils réagissent violemment aux chocs et au chauffage (>150 °C). De plus, la plupart des phosphanes aliphatiques sont sensibles à l'oxygène, qu'il faut protéger avec des boranes dans les échantillons biologiques. Cela implique d'avoir accès à la version azoture/phosphonée du groupement chimique que l'on souhaite employer. Il est également possible de créer un anticorps spécifique à la sonde pour faciliter sa purification et son analyse.^{78,80}

Similaire à ICAT (cf. [1. 2. a](#)), l'Isotope-Coded Dimedone (ICDID) utilise une dimédone marquée au deutérium (d6-dimédone) pour dériver les Cys-SOH et une 2-iododimédone pour alkyler les thiols libres ([Figure 20](#)). Ainsi, les versions oxydée et réduite du même peptide sont chimiquement identiques, mais distinctes d'un décalage de masse de 6 Da observable en MS/MS. Le rapport des pics permet d'obtenir la quantité relative d'acides sulféniques présents dans l'échantillon sans biais de rendement d'ionisation.^{78,116}

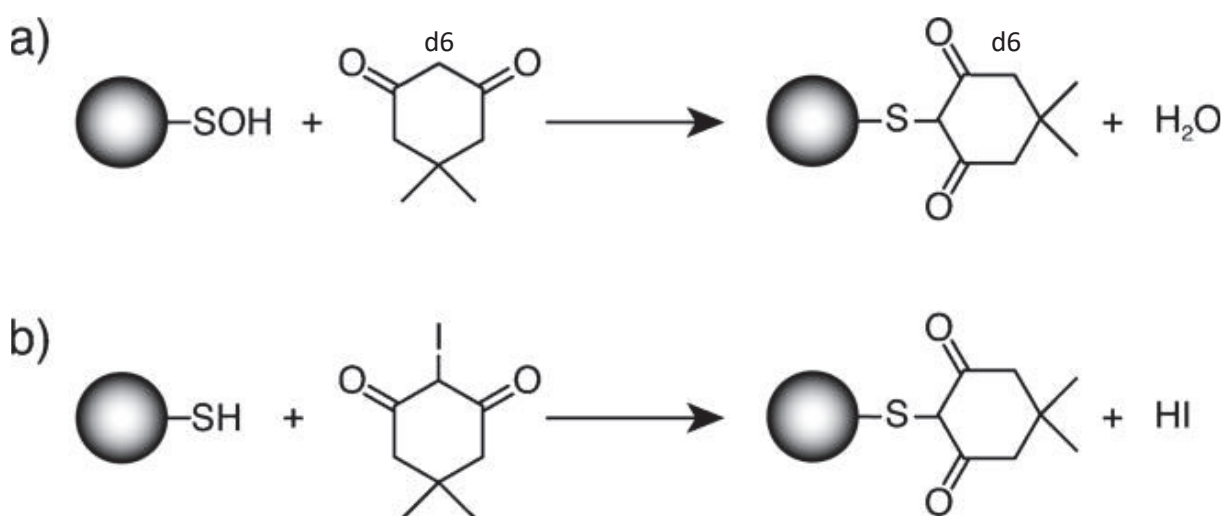


Figure 20: Illustration de la technique Isotope Coded Dimedone permettant la dérivation des SOH et SH d'un échantillon par une sonde d6-dimédone (a)) et une sonde iododimédone (b)), respectivement.¹¹⁶

Bien que les dimédones soient des réactifs hautement sélectifs des acides sulféniques, leur dérivation est relativement lente. Pour y pallier, diverses modifications structurales ou l'emploi d'autres agents de dérivation nucléophiles ont été mis au point. Par exemple, les norbornènes, dont la vitesse de

dérivation est plus importante que celle des dimédones, sont des réactifs non toxiques pour les cellules, adaptés aux dérivations cellulaires *in vivo*.^{47,99}

Toutefois, les dimédones ont certaines limitations : la dimédone peut réagir avec les sulfénamides cycliques bien qu'on ne connaisse pas leur prévalence *in vivo* ou parmi les protéines. La dimédone peut également réagir avec H_2O_2 s'il est présent au-delà de dix équivalents molaires, à prendre impérativement en compte lors des études d'oxydation *in vitro*.¹¹⁷

Dans une approche différente, le NBD chloride (7-chloro-2-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) est un réactif qui peut se conjuguer aussi bien aux thiols libres qu'aux acides sulféniques en formant deux adduits dont les maximums d'absorption sont respectivement situés à 420 nm et 347 nm. Ils peuvent également être identifiés par MS, les deux versions du peptide présentant un décalage de masse de 16 Da, correspondant à l'oxygène du SOH. Bien que le NBD puisse se lier de façon occasionnelle à d'autres acides aminés, les propriétés optiques des adduits formés sont différentes des SH et SOH dérivés, évitant des biais d'identification et de quantification.^{47,80,89,106,112} Les adduits (SH ou SOH) formés avec le NBD présentent une sensibilité au DTT, ce dernier pouvant réduire la dérivation et restaurer le contenu en thiol original, ce qui n'est pas le cas de la dimédone dont les adduits restent inertes¹¹²

Le DNPH (dinitrophenyl hydrazine), un réactif utilisé pour détecter les carbonylations, peut également réagir avec les acides sulféniques, menant à des résultats faussés lors de l'identification et la quantification des protéines carbonylées.⁸⁰

I. 2. b. II. Cristallographie à rayons X

Les SOH sont détectables par cristallographie à rayons X, bien que les premières cristallographies à rayons X d'acide sulféniques réalisées sur la NADH peroxydase furent difficiles en raison de l'importante quantité de radicaux hydroxyles générés par les radiations du synchrotron. L'amélioration des techniques de cristallographie a permis le recensement d'un nombre toujours croissant de protéines (env. 500) présentant des cystéines oxydées en acides sulféniques.^{47,80}

I. 2. b. III. RMN

De même, la NADH peroxydase fut l'une des premières protéines dont l'acide sulfénique a été mis en évidence par RMN grâce à un déplacement chimique de 41,3 ppm, plus important que celui de son homologue thiol (30,8 ppm). Par ailleurs, les suroxydations en acide sulfinique et sulfonique sont distinguables de l'acide sulfénique (déplacement chimique de 57 ppm), mais presque indissociables l'une de l'autre.^{47,80}

Bien qu'elles fournissent une information précise sur les sites de formation d'acides sulféniques, ces méthodes ne s'appliquent qu'à des extraits purifiés des protéines que l'on souhaite étudier. L'application à des échantillons biologiques est très limitée, de même que la quantification.

II. Analyse des protéines par spectrométrie de masse

Comme en témoigne la partie [1.2](#), la spectrométrie de masse est une méthode prépondérante pour la localisation et la quantification des Cys-SOH. Ainsi, ce travail de thèse vise à coupler la spectrométrie de masse à la dissociation induite par laser (LID) pour permettre la détection, quantification et localisation directe des Cys-SOH dérivées par un chromophore possédant une dimédone. Au cours de cette partie, je détaillerai le fonctionnement de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse ainsi que les différents modes d'acquisition et de fragmentation.

Lors d'une analyse en spectrométrie de masse il est nécessaire d'établir, en fonction du/des analyte(s) étudié(s), une stratégie analytique déterminant la préparation d'échantillon correspondante, le mode d'ionisation ainsi que le mode d'acquisition MS/MS souhaité en fonction de l'analyseur utilisé. Ces aspects seront détaillés au cours de cette partie.

II. 1. Stratégies analytiques

L'analyse protéomique par spectrométrie de masse se fait selon deux stratégies : le Top-Down, qui consiste à analyser les protéines entières et à les fragmenter pour obtenir des informations sur leur séquence et conformation 3D, et le Bottom-Up, où les protéines sont préalablement digérées en peptides dont les séquences permettront de reconstituer la séquence protéique. Les spécificités de chacune de ces stratégies seront rapidement explicitées au cours de cette partie.

II. 1. a. Approche Top-Down

L'approche Top-Down se concentre sur l'analyse de protéines entières (généralement plus de 10 kDa) qui peuvent être intactes (dites « label free ») ou bien marquées isotopiquement (SILAC) ou chimiquement (TMT, iTRAQ).¹¹⁸ Elle est employée pour la caractérisation de protéoformes (différentes formes possiblement adoptées par une protéine), l'identification et la quantification des modifications post-traductionnelles (PTM) ainsi que d'éventuelles mutations ([Figure 21 a](#)). Ces analyses permettent de comprendre l'implication des conformations protéiques sur la santé et la découverte potentielle de biomarqueurs.^{118,119}

Le Top-Down nécessite l'utilisation de spectromètres de masse haute résolution tels que l'FTICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance) et l'Orbitrap (cf. [II. 3](#)) couplés à des techniques de séparation. En effet, les protéines larges possèdent de nombreux états de charge, ce qui, en plus d'effets de charge spatiale (notamment dans les analyseurs à piégeage), induit une dispersion de m/z sur le spectre de masse, imposant l'emploi de technique de haute résolution pour distinguer plusieurs protéines coéluées. Cette dispersion est d'autant plus pénalisante que l'intensité des protéines larges est faible, répartie le long des états de charges, et que la plage de m/z disponible est généralement limitée, réduisant le nombre d'états de charge détectables. De plus, la coélution de protéines entraîne une concurrence à l'ionisation, diminuant l'intensité détectable par le spectromètre.¹¹⁸

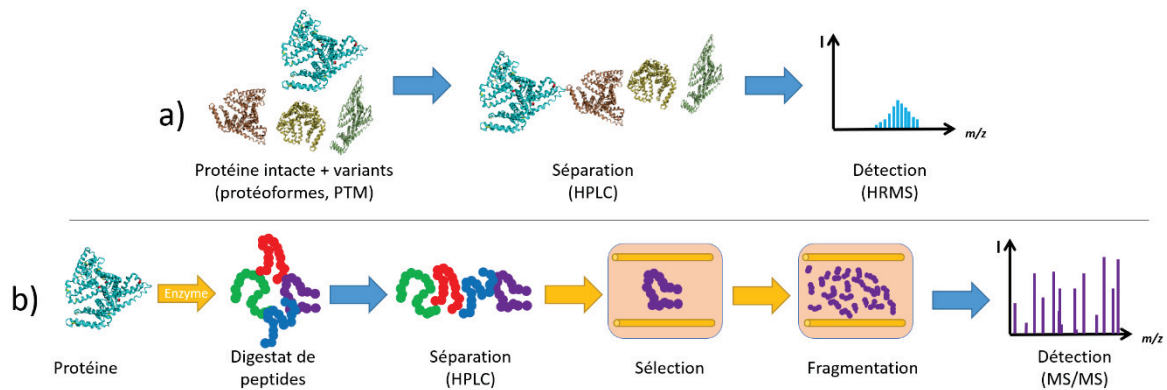


Figure 21: Comparaison des techniques a) Top-Down, où la protéine et ses variants intacts sont séparés et analysés en spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) et b) Bottom-Up où la protéine est digérée en peptides qui sont ensuite séparés, sélectionnés individuellement pour être fragmentés puis analysés en spectrométrie de masse.

II. 1. b. Approche Bottom-Up

Le Bottom-Up regroupe tous les procédés impliquant l'analyse de peptides issus de la digestion enzymatique protéolique et leur attribution grâce à l'emploi d'une base de données à l'instar de la stratégie Shotgun proteomics visant à séquencer tous les peptides tryptiques d'un échantillon biologique.^{120,121} Toutes les protéines d'un échantillon sont enzymatiquement digérées en peptides (dont la taille/séquence dépend directement de l'enzyme employée) allant de 0,1 à plus de 5 kDa (soit de 1 à plus de 50 AA). Les peptides ainsi formés sont ensuite séparés par HPLC (High Performance Liquide Chromatography), ionisés, sélectionnés, fragmentés et analysés par spectrométrie de

masse.¹²² Les fragments détectés permettent de remonter à la séquence des peptides obtenus, qui permettent eux-mêmes de caractériser la/les protéine(s) obtenue(s) (Figure 21 b)).

Comparé à l'analyse de protéines entières, l'échantillon digéré s'homogénéise plus facilement, les peptides sont mieux séparés par chromatographie, présentent un meilleur rendement d'ionisation, moins d'états de charges différents et leur fragmentation est plus prédictible.^{118,121}

L'enzyme la plus employée est la trypsine (utilisée dans 96 % des jeux de donnée de la Global Proteome Machine Database), qui clive la protéine en C-terminal et N-terminal des acides aminés lysine (K) et arginine (R). Les peptides produits possèdent une longueur moyenne de 14 AA, mais la trypsine génère également des petits peptides non spécifiques (< 6 AA) ce qui ne laisse qu'un nombre limité de peptides pour assigner correctement la protéine analysée. Plusieurs alternatives à la trypsine existent comme la Glu-C (V8 protéase GluC endoprotéinase), clivant les peptides en C-terminal et N-terminal des acides asparagiques (D) et glutamiques (E), les Lys-C et Lys-N clivant respectivement les peptides en C-term et N-term d'une lysine (K), et la pepsine rompant les liaisons C-term des tyrosines (Y), phénylalanines (F) et tryptophanes (W).^{118,121,123,124,125}

L'approche Bottom-Up ne permet toutefois pas d'obtenir d'information sur la structure 3D des protéines.¹¹⁸

Le middle-down est une stratégie similaire au Bottom-Up, où la protéine est digérée en peptides larges entre 3 et 10 kDa. Les digestats obtenus sont moins complexes, et permettent d'obtenir une meilleure couverture de séquence. Cependant, peu de réactifs sont disponibles pour générer de façon contrôlée et répétable des peptides suffisamment longs.^{120,126,127}

II. 2. Ionisation de l'échantillon

L'ionisation a pour but de produire, à partir de molécules non volatiles, des ions en phase gazeuse analysables en spectrométrie de masse. Les sources d'ionisations les plus répandues pour l'analyse de peptides et protéines sont l'électrospray (ESI) et le MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization).

L'ionisation par électrospray repose sur la production d'ions analytes intacts par désolvatation d'un échantillon liquide à pression atmosphérique en sortie d'un tube capillaire, qui seront acheminés vers le spectromètre de masse ([Figure 22 a](#)). Le MALDI, également employé à moindre mesure, repose sur la désorption et l'ionisation par laser pulsé d'analytes incorporés dans une matrice ([Figure 22 b](#)). Le détail de ces techniques d'ionisation peut être trouvé en [Annexe I \(page 263\)](#).^{128,129}

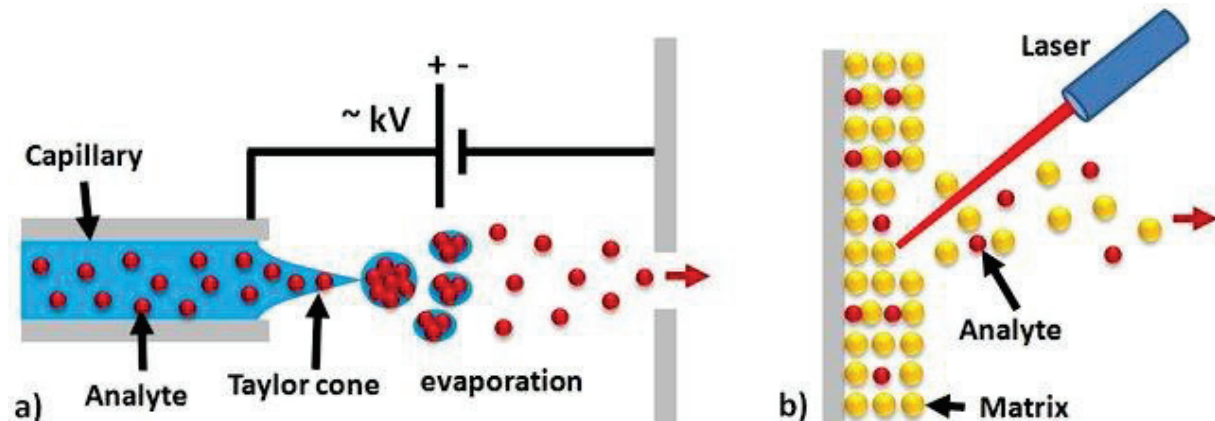


Figure 22: Illustration de l'ionisation a) ESI b) MALDI.²⁷¹

II. 3. Analyseurs

Différents types d'analyseurs peuvent être utilisés pour l'analyse des peptides et protéines en fonction du mode d'acquisition et de la résolution désirée.

La résolution d'un analyseur est définie par sa capacité à distinguer deux ions de m/z proche, exprimée par le pouvoir résolutif R selon $R = \frac{m}{\Delta m}$ avec Δm la différence pour lesquels des ions de masse

m et $m+\Delta m$ sont distinguables. Plus R est grand, plus la différence de masse que l'analyseur est capable de distinguer est faible.¹²⁸

Les analyseurs Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR), temps de vol (Time of Flight, TOF) et Orbitrap permettent l'acquisition de spectres de masse haute résolution ($R > 100\,000$), tandis que le quadripôle fait partie des analyseurs basse résolution ($R < 10\,000$).

Le spectromètre de masse QExactive utilisé au cours de cette thèse, est composé d'un analyseur quadripolaire, d'une C-trap et d'un analyseur Orbitrap. Une revue détaillée de ces analyseurs est présentée en [Annexe I \(page 264\)](#).

II. 4. Modes d'acquisition

L'analyse protéique en MS/MS peut se faire de deux façons : par acquisition ciblée (SRM/MRM, PRM), permettant la quantification des analytes, ou non ciblée (DDA, DIA), principalement utilisée pour la recherche et découverte d'analytes dans un échantillon complexe.

II. 4. a. SRM/MRM

Les appareils triple quadripôle (QqQ) sont des spectromètres combinant trois quadripôles pouvant opérer sur plusieurs modes : le mode balayage où un premier quadripôle (Q1) permet de balayer les ions d'un échantillon qui sont ensuite accélérés et fragmentés par collision avec un gaz inerte dont est rempli le second quadripôle (q2). Ce dernier est laissé en mode « transmission », laissant traverser les ions fragments jusqu'au troisième quadripôle (Q3), où ils seront séquentiellement analysés par un nouveau balayage.

Au-delà d'une analyse par balayage, il est possible de sélectionner en Q1 le rapport m/z d'un ou plusieurs ions précurseurs, de les fragmenter en q2, puis de sélectionner le rapport m/z des ions fragments en Q3 ([Figure 23](#)). Ce mode d'acquisition ciblée nommé SRM (Selected Reaction Monitoring) ou MRM (Multiple Reaction Monitoring) se concentre sur le suivi séquentiel de transitions, c'est-à-dire de couples de m/z précurseur-fragment. Plusieurs fragments par précurseurs et plusieurs précurseurs différents peuvent donc être suivis au cours d'une même analyse.^{122,130,131}

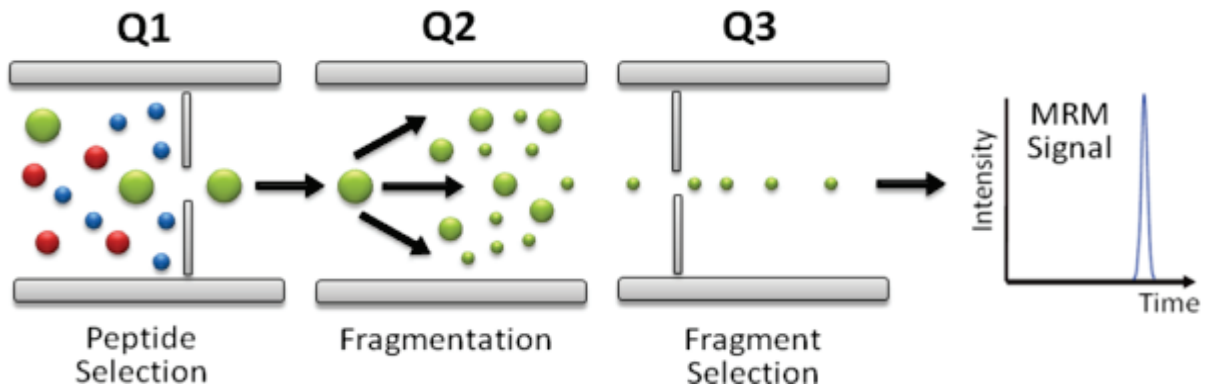


Figure 23: Illustration du mode d'acquisition MRM. Les analytes sont filtrés en fonction de leur m/z en Q1, fragmentés en q2 puis les fragments filtrés selon leur rapport m/z permettant d'obtenir le signal du couple précurseur/fragment en fonction du temps.²⁷²

L'analyse MS/MS d'échantillons biologiques complexes se fait par couplage avec un système de séparation chromatographique des peptides en amont. Au cours de la séparation, la concentration de l'analyte s'étale sous forme de gaussienne. Ainsi, le signal délivré par l'analyte lors de son élution n'est pas uniforme, mais évolue au cours du temps, formant un pic chromatographique. Si la détection du peptide ne nécessite qu'un seul spectre de masse, sa quantification requiert l'acquisition de spectres tout au long de l'élution afin de pouvoir intégrer l'aire sous la courbe formée par le pic chromatographique et estimer la quantité d'analytes présente dans l'échantillon. Pour convenablement définir un pic chromatographique, un minimum de 12 points est requis. L'élution du peptide étant courte (0,5 à 2 minutes), l'analyseur doit être en mesure d'acquérir ces spectres suffisamment rapidement. Le mode balayage est inadapté à de telles analyses : la sélection de tous les précurseurs, leur fragmentation et l'analyse séquentielle de chaque fragment impose un temps considérable (dépendant de la plage de m/z suivie) entre deux acquisitions d'un même analyte, ne permettant pas d'acquérir suffisamment de points pour définir le pic.

L'analyse MRM se focalise sur un nombre réduit de précurseurs et de fragments par précurseurs, ce qui permet de diminuer le temps nécessaire au QqQ pour analyser séquentiellement toutes les transitions, appelé temps de cycle, donc d'acquérir plus de points par pic chromatographique. Ainsi, le nombre maximal de transitions suivies est limité par le temps de cycle et la vitesse d'élution des analytes. Réduire le nombre de transitions correspondant aux fragments d'un même précurseur, définir pour chaque précurseur une fenêtre temporelle d'acquisition correspondant à l'élution du peptide suivi (Scheduled-MRM), ou modifier le temps passé par l'analyseur à acquérir le spectre d'une

transition (appelé « dwell time ») permettent de limiter le temps de cycle en augmentant le nombre de peptides analysés.^{122,131}

Pour s'assurer de la bonne identification de ces peptides, trois transitions par précurseur sont généralement sélectionnées, correspondant à des fragments intenses, non interférés et caractéristiques du peptide en question.^{122,131}

Plusieurs paramètres nécessitent d'être optimisés individuellement pour que chaque transition fournisse un signal d'intensité maximale, tels que l'énergie de collision ion-gaz pour fragmenter totalement le précurseur sans induire de fragmentations secondaires ou le potentiel de dissociation (« deculstering potential ») pour faciliter l'entrée de l'ion dans le spectromètre sans le fragmenter... L'optimisation est généralement réalisée de concert avec la détermination des rapports m/z et la sélection des transitions optimales lors de l'infusion de peptides standards.^{122,131}

La SRM/MRM est un mode d'acquisition quantitatif, robuste et reproductible, largement employé pour l'analyse protéomique d'échantillons biologiques.^{122,131}

II. 4. b. PRM

La PRM est un équivalent de la SRM/MRM employé par les spectromètres de masse à haute résolution. La sélection d'un ion fragment spécifique après la dissociation du précurseur sélectionné est impossible, soit par limitation de l'analyseur (Orbitrap), soit parce que le temps de cycle serait trop important pour rendre l'analyse réalisable (TOF, FTICR) (II. 3). Ainsi, l'ensemble des rapports m/z et l'intensité des fragments sont acquis dans un même spectre de fragmentation ([Figure 24](#)).

Cette technique souffre donc d'une limitation temporelle, l'acquisition d'un spectre de fragmentation complet pour chaque précurseur sélectionné étant plus longue qu'une poignée de transitions.

Pour être performante, une analyse MRM sur QqQ nécessite d'optimiser entre autres l'énergie de collision, les potentiels de dissociation et le dwell time, et ce pour chaque transition de la méthode. L'analyse PRM ne nécessite pas le réglage d'autant de paramètres, simplifiant son optimisation. De plus, l'analyse MRM requiert l'emploi de standards pour sélectionner les transitions les plus

appropriées et réaliser les optimisations nécessaires, ce qui peut s'avérer coûteux en ressources et est inenvisageable en milieu complexe, tandis que seuls le ratio m/z ainsi que la charge du précurseur doivent être connus pour une analyse PRM.¹³²

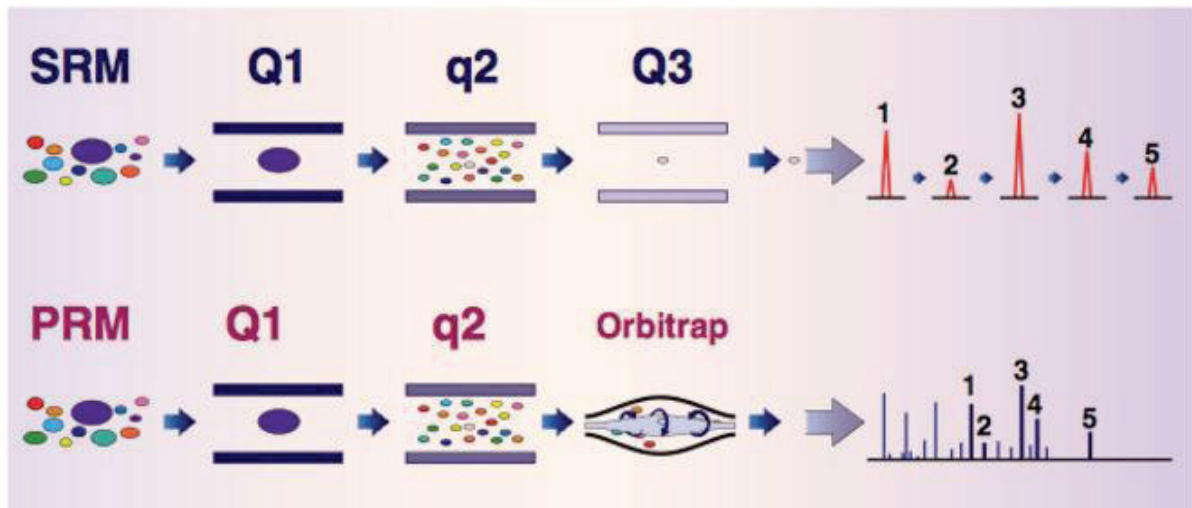


Figure 24: Illustration des différences de fonctionnement entre les méthodes d'acquisition SRM et PRM (haute résolution).²⁷³

La spectrométrie de masse haute résolution permet de distinguer les ions fragments d'interférents indissociables en QqQ. Ainsi, l'acquisition d'un spectre de fragmentation complet permet d'observer simultanément plusieurs dizaines de fragments avec une meilleure sélectivité qu'en QqQ, pour laquelle seuls trois ou quatre fragments non interférés sont suivis pour assurer un faible temps de cycle.¹³²

Les instruments QqQ sont connus pour leur grande sensibilité et leur robustesse lors d'analyses d'échantillons complexes. De nombreuses études ont cherché à évaluer la compatibilité de la spectrométrie de masse haute résolution avec l'analyse d'échantillons protéomiques complexes en comparant les performances d'instruments HRMS (spectrométrie de masse haute résolution) et QqQ sur des analyses ciblées (MRM vs PRM). Ces études montrent que les performances en HRMS sont comparables à celles obtenues en QqQ sur le plan de la linéarité, de la spécificité, de la sélectivité et de la sensibilité, et ce grâce à la haute résolution des spectres acquis ainsi que la plage dynamique étendue qui permet de compenser les effets matrices et donc de garder en robustesse.^{132,133,134,135,136}

L'analyse PRM est donc appropriée à l'analyse de peptides modèles^{134,136} ou d'une large cohorte d'échantillons biologiques complexes.^{132,133,135,137}

II. 4. c. DDA

La DDA (Data Dependent Acquisition) est un mode d'acquisition non ciblé, par lequel un spectre de masse total (MS1) est enregistré à un instant t de la séparation de l'échantillon, dont un nombre n d'ions les plus abondants sont sélectionnés et fragmentés en MS/MS (le nombre n dépend de la capacité de l'appareil à réaliser un scan MS et des scans MS/MS (ou MS2) sur un temps réduit). Chaque spectre MS/MS collecté est ensuite analysé par un algorithme qui établira une correspondance parmi les entrées de la base de données à laquelle il se réfère ([Figure 25 a](#)).^{105,120,122,138,139}

La DDA permet d'identifier, dans un échantillon biologique, les peptides de centaines de protéines différentes et a été employée avec succès pour la caractérisation du réseau signalétique de l'epidermal growth factor receptor (EGFR),¹⁴⁰ du protéome de différents organes de souris,¹⁴¹ de médians d'interactions protéiques,¹⁴² et de l'impact d'infections virales sur le protéome de l'hôte.^{143,144} La méthode est flexible, facile à mettre en place et compatible avec l'emploi de stratégies de quantifications isotopiques (SILAC) ou isobares (iTRAQ).¹²²

Toutefois, la DDA souffre d'une mauvaise répétabilité et d'un manque d'exhaustivité : l'ion précurseur est sélectionné selon un ordre décroissant d'abondance relative, les ions les moins abondants ne sont donc pas analysés. Un échantillon complexe comprenant une large gamme dynamique de concentration, la liste des cibles détectables se réduit à la fraction du protéome la plus intense, estimée à environ 16 % des peptides élués.^{120,122,145}

De plus, l'utilisation d'une liste d'exclusion temporaire pour éviter de sélectionner le même ion trop fréquemment rend l'acquisition d'un ion précurseur à l'apex du pic chromatographique improbable, affectant son identification et sa quantification. Bien qu'une quantification du précurseur sur le spectre MS soit réalisable, rien n'assure qu'il ne soit pas interféré.^{120,122}

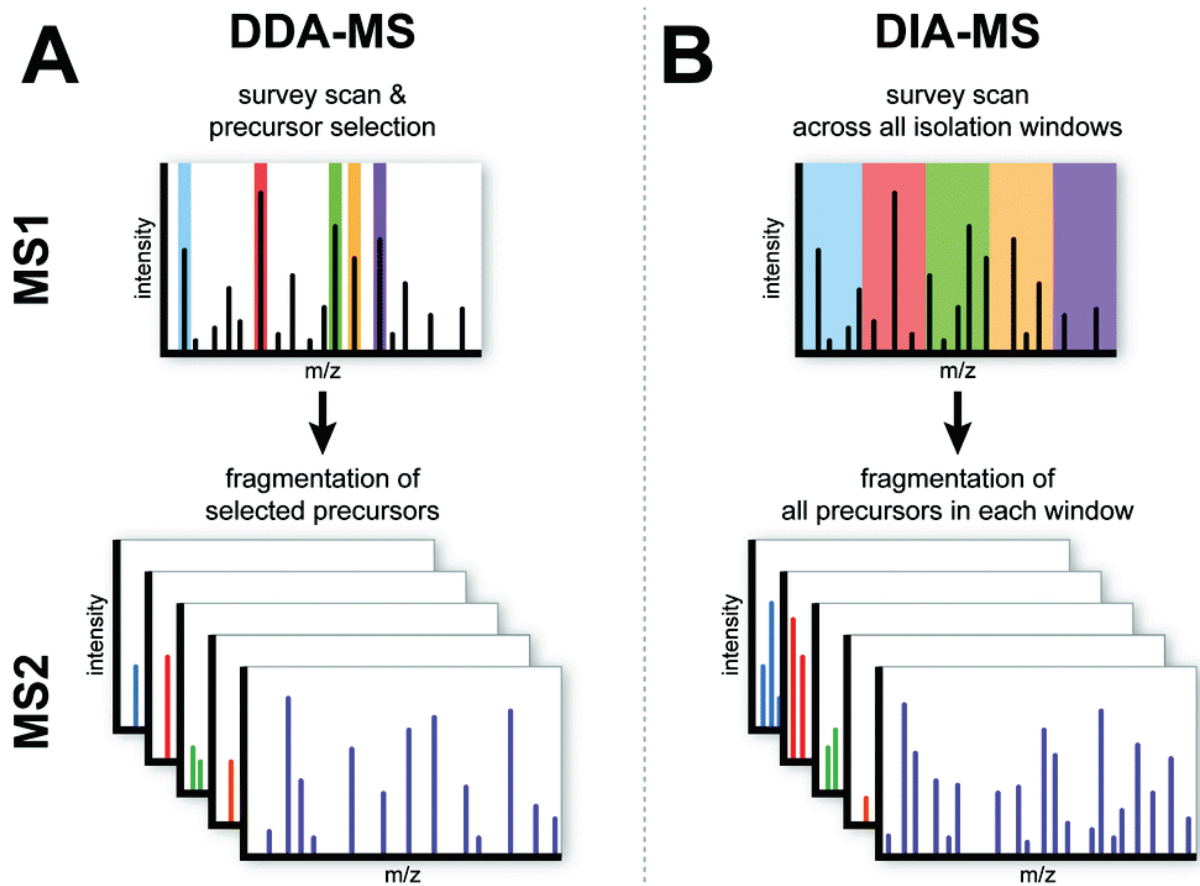


Figure 25: Illustration des différences de fonctionnement des modes Data Dependent Acquisition (DDA) (A) et Data Independent Acquisition (DIA) (B).¹⁴⁶

II. 4. d. DIA

Pour contourner les limitations imposées par la DDA, la DIA (Data Independent Acquisition), une autre méthode non ciblée, a été développée en se fondant sur la fragmentation de tous les ions précurseurs arrivant au spectromètre de masse. S'il est possible de fragmenter l'intégralité des ions à un instant t , la stratégie DIA employée se concentre sur l'acquisition d'un spectre de masse total MS et son découpage en fenêtres de m/z de taille fixe sur une plage de masse allant généralement de 400 à 1200 m/z . Chaque fenêtre est fragmentée l'une après l'autre, et un spectre MS/MS correspondant acquit. Les spectres MS/MS reliés aux spectres MS sont ensuite analysés et attribués grâce à des algorithmes reliés à des bibliothèques de spectres (Figure 25 b).^{120,139,146,147}

Une fenêtre de taille réduite permet de réduire le bruit, la complexité des spectres MS/MS et l'impact des ions surabondants sur les ions moins représentés, mais nécessite plus de temps pour couvrir

l'ensemble de la plage souhaitée. Il existe plusieurs approches DIA possédant toutes le même principe de base, mais variant sur la taille de la fenêtre (2,5 m/z se recoupant sur 1,5 m/z pour PaLFIC, 20 m/z pour XDIA, 25 m/z pour SWATH et 100 m/z pour FT-Arm), les modes de fragmentation autres que CID (ETD – Electron Transfer Dissociation - pour XDIA, IRMPD – Infrared Multiphoton Dissociation - pour FT-Arm)... La DIA possède une excellente capacité à cataloguer un protéome et permet un suivi quantitatif des variations de concentration, même très faibles, dans les échantillons biologiques et un important multiplexage. Comparée à la DDA, la DIA présente une meilleure reproductibilité, une meilleure sensibilité et offre une meilleure couverture de séquence protéique.^{120,139,146,147} Toutefois, la DIA nécessite d'employer un spectromètre de masse de haute résolution capable d'acquérir des spectres de masse rapidement, un algorithme capable de manipuler une quantité conséquente de données ainsi qu'éventuellement d'utiliser des bibliothèques spectrales (bien que des méthodes sans librairie existent).¹³⁹

II. 5. Modes de fragmentation

La fragmentation peptidique est soumise à une nomenclature universelle, proposée par Roepstorff et Fohlman en 1984,¹⁴⁸ puis modifiée en 1988 par Biemann,¹⁴⁹ présentée en [Figure 26](#).

Par défaut, la séquence d'un peptide est définie depuis son extrémité N-terminale (fonction amine libre) jusqu'à son extrémité C-terminale (fonction acide carboxylique libre). Lors de la rupture d'une liaison peptidique, la charge va être conservée du côté C-term ou du côté N-term, on constatera l'apparition de couples de fragments N-term/C-term :^{128,149,150,151}

- Le couple a/x, dont la charge est respectivement située en N-term et C-term, issu de la rupture de la liaison C-C α ,
- Le couple b/y, généré par une cassure de la liaison C-N
- Le couple c/z, provenant de la dissociation de la liaison N-C α sous forme radicalaire.

L'appellation de l'ion est également indiquée par le nombre d'acides aminés de la chaîne peptidique qu'il comporte. Par exemple, un fragment y5 est un fragment comprenant 5 acides aminés depuis

l'extrémité C-terminale. De même, un fragment c3 est constitué des 3 acides aminés qui composaient le peptide depuis l'extrémité N-terminale.^{128,149,150,151}

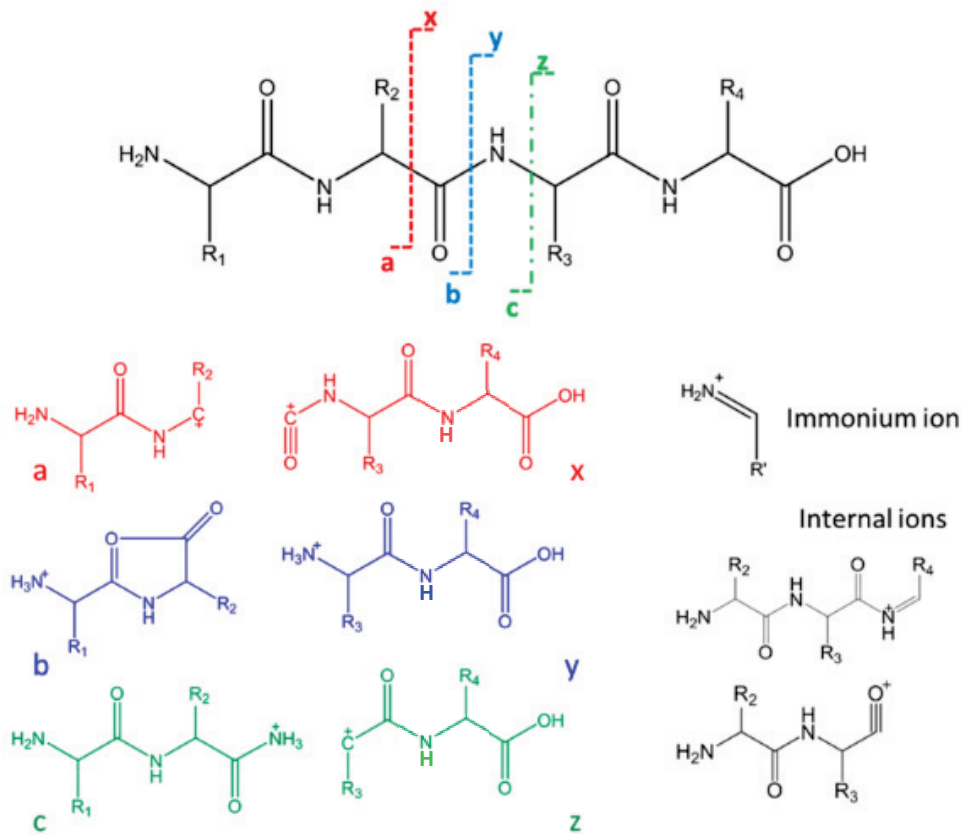


Figure 26: illustration de la nomenclature universelle des différents types de fragments observés lors de la fragmentation d'un peptide.¹³⁹

D'autres types de fragments existent, tels que les fragments v, w et d qui sont des fragments issus de la perte de chaîne latérale des acides aminés :^{126,152,153}

- Les fragments v sont des fragments de charge en C-terminale qui indiquent la perte de chaîne latérale de l'acide aminé N-terminal du fragment.
- Les fragments w, également de charge C-terminale, sont caractéristiques de la perte de la fonction amine de l'extrémité N-terminale du fragment.
- Les fragments d de charge N-terminale, traduisent une perte de CO à l'extrémité C-terminale du fragment.

D'autres fragments existent, tels que l'ion immonium, les fragments internes ayant subi une fragmentation C et N-term ainsi que la perte de fragments neutres à l'instar de H₂O, NH₃ en fonction de la composition en acides aminés des peptides fragmentés.^{126,128,149,150,151,152,153}

Au cours de cette partie seront passés en revue les principaux modes de fragmentation des peptides employés pour la spectrométrie de masse en tandem : la fragmentation par collision, par absorption de photons et par capture d'électrons. Certaines hybridations de ces modes seront également passées en revue.

II. 5. a. CID/HCD

La CID (Collisional Induced Dissociation) est une méthode de fragmentation des analytes par collision avec un gaz neutre (hélium, argon, diazote) au sein d'une cellule de collision, implémentée et implémentable dans tous les types de spectromètres de masse en tandem.

Au cours de la collision, une partie de l'énergie cinétique de l'ion est convertie en énergie interne. Les collisions répétées mènent à l'accumulation d'énergie interne qui induira la dissociation de l'ion par rupture des liaisons les plus faibles, correspondant à la génération d'ion b/y ainsi qu'à des pertes de neutres (notamment H₂O, NH₃, CO₂) ou à la rupture des modifications post-traductionnelles (PTM).^{139,154,155}

La quantité d'énergie potentiellement transformée en énergie interne dépend des masses respectives de l'ion et de l'espèce neutre, exprimées selon la formule suivante :

$$E_{max} = \left(\frac{N}{m_p + N} \right) E_{cin}$$

Avec E_{max} la quantité maximale d'énergie possiblement convertible en énergie interne, E_{cin} l'énergie cinétique de l'ion, m_p la masse de l'ion et N la masse du gaz neutre. Si l'énergie de collision ainsi que le nombre de collisions sont suffisamment importants, l'énergie interne accumulée permettra l'excitation de l'ion au-delà du seuil de rupture, entraînant une dissociation. Ainsi, on distingue deux types de fragmentation CID selon l'emploi d'une haute ou basse énergie de collision.^{155,156} Les collisions de faible énergie (1-100 eV) sont employées dans les cellules de fragmentation de spectromètres de

masse de type QqQ, trappes à ion, FTICR et QTOF (cf. [Annexe I page 264](#)), et permettent une excitation rapide (de l'ordre de la 10aine de ms) sans perte d'ions dans les cellules quadripolaires. Dans cette configuration, la nature du gaz ainsi que la pression dans la cellule sont primordiales : la quantité d'énergie transférée par collision étant faible, plus la probabilité de collision ion-gaz est élevée, plus la fragmentation des ions de haute masse moléculaire (de faible E_{\max}) sera aisée. Toutefois, un surplus de collisions risque d'entraîner des fragmentations secondaires desquelles résultera une perte d'information à cause du low m/z cutoff (problème de transmission des ions fragments de faible m/z). Les collisions de haute énergie (keV) sont réservées aux instruments type secteurs magnétiques et TOF/TOF et permettent une rupture directe de l'analyte sans réarrangements, menant à la génération d'ions additionnels d, v et w et de spectres plus riches que ceux obtenus par collision faiblement énergétique.^{155,156}

Les voies de fragmentation des peptides protonés ont été mieux comprises grâce au modèle du proton labile : les protons ionisants sont localisés au niveau des sites à forte affinité protonique du peptide comme la partie N-terminale et les résidus lysine, arginine et histidine. Lors d'une activation collisionnelle, un ou plusieurs de ces protons peuvent migrer vers les sites moins basiques du peptide, ce qui facilite divers mécanismes de rupture de la chaîne peptidique dépendants de la charge. Un proton labile peut induire la N-protonation de la liaison amide, menant à la génération de fragments b et y. Des ruptures non spécifiques ainsi que des fragments internes sont également produits lorsque le nombre d'états de charges du peptide est plus important que le nombre de sites basiques qu'il contient.^{139,157,158}

Par ailleurs, la CID des peptides anioniques génère une plus importante perte de neutres (CO_2 , H_2O , PO_3^-) que d'ions issus du squelette peptidique.¹³⁹

La HCD (Higher-Energy C-trap Dissociation) est une version de la CID implémentée au sein des appareils QExactive et hybrid dans laquelle les ions accumulés dans la C-trap sont accélérés avant leur entrée dans la cellule de collision plutôt qu'au cœur de celle-ci. L'activation est donc indépendante des conditions de piégeage, ce qui n'entraîne pas de low m/z cutoff, permettant l'observation de spectres de masse beaucoup plus riches. L'énergie déposée est plus importante en HCD qu'en CID.^{139,159} La HCD

produit des ions y plus courts et a des fragmentations préférentielles, comme la rupture des liaisons proches des AA hydrophobes (I,L,V,F,Y,W).¹³⁹

II. 5. b. Photodissociation

L'irradiation photonique des analytes par un laser peut mener à leur dissociation en fonction de l'énergie des photons, du flux laser ainsi que l'emploi de chromophores spécifiques. Au cours de cette partie, je détaillerai les fragmentations obtenues par des photons infrarouges, ultraviolets et visibles.

II. 5. b. I. Infrared multiphoton dissociation (IRMPD)

Les photons infrarouges sont des photons faiblement énergétiques (env. 0,1 eV), ils ne permettent donc pas de franchir individuellement la barrière de dissociation (Figure 27). Ainsi, la rupture de l'analyte nécessite l'absorption d'un grand nombre de photons, qui vont augmenter progressivement son énergie interne au travers de plusieurs cycles d'excitation/relaxation, jusqu'à ce que la barrière de dissociation soit franchie.

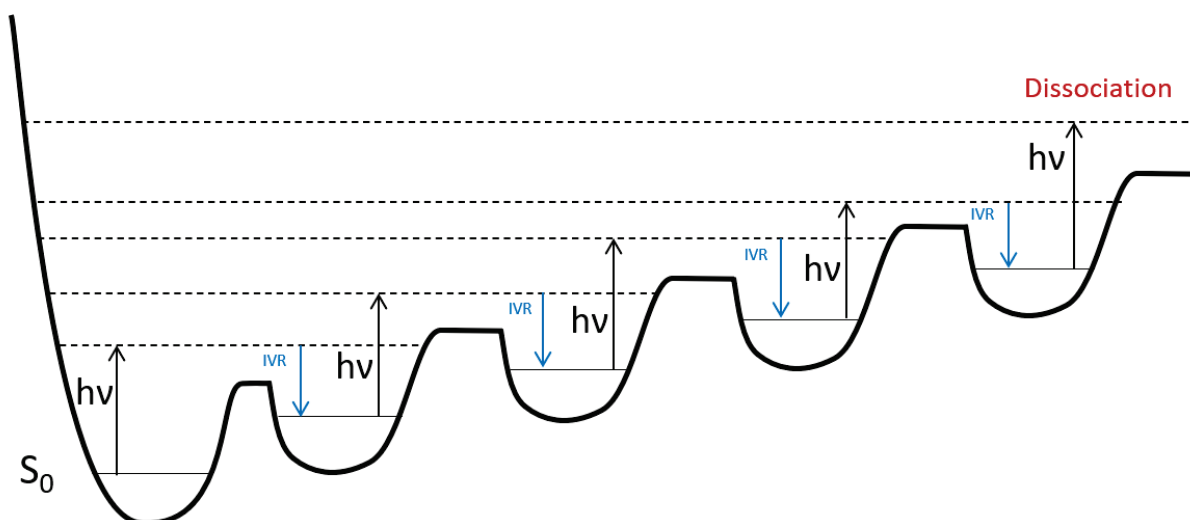


Figure 27: Illustration de l'augmentation de l'énergie interne du précurseur jusqu'à sa dissociation suite à l'absorption successive de photons infrarouges de faible énergie $h\nu$ et la redistribution de l'énergie absorbée par mécanisme vibrationnel (IVR, « Internal Vibrational Redistribution »).

Ce procédé, contrairement à la CID, permet d'induire une dissociation sans affecter le mouvement des ions, ainsi l'IRMPD ne souffre pas de limite d'exclusion, permettant d'observer les ions fragments de faible m/z .^{88,156,160,161,162,163,164,165,166}

Pour assurer un débit de photons suffisant pour induire une rupture, des lasers continus, notamment les lasers à CO₂ (10,6 μm i.e 943 cm⁻¹, photons de 0,117 eV), sont employés à une faible puissance (<100W) et durant un temps d'irradiation long (d'une dizaine à plusieurs centaines de ms) variant selon le refroidissement collisionnel rencontré (perte d'énergie interne due à la collision avec le gaz inerte dans la chambre de fragmentation).

La fragmentation IRMPD, à l'instar de la CID, est dite « ergodique » : la rupture est induite par redistribution de l'énergie vibrationnelle au sein de l'ion, ce qui amène à la rupture des liaisons les plus faibles, et ce de façon statistique. Les photons IR sont absorbés par les modes vibrationnels des liaisons C-C, C-N, donnant lieu à la génération d'ions b et y, et de fragments de faible *m/z* non visibles en CID. L'IRMPD favorise la rupture des ponts S-S et des liaisons C-S chez les peptides anioniques. L'IRMPD n'étant pas une technique sélective, les radiations IR induisent la dissociation des ions précurseurs comme celle des ions fragments.^{88,139,156,160,161,163,164,165,167,168}

L'IRMPD est employée en FTICR et sur les trappes à ions (Linear Ion Trap) (cf. [Annexe I, page 264](#)) grâce à leur capacité de piégeage qui permet une irradiation suffisamment longue pour induire une dissociation. Au sein des cellules quadripolaires, les ions subissent constamment des collisions avec le gaz inerte présent à une pression élevée (10⁻³ Torr), transférant leur énergie interne comme cinétique vers ce dernier. Ce phénomène est appelé refroidissement collisionnel, et freine l'accumulation d'énergie nécessaire aux ions irradiés par IRMPD pour fragmenter. Pour s'en affranchir, il est possible d'amplifier le mouvement des ions dans la trappe, chauffer le gaz, augmenter le flux de photons ou le nombre de passages du faisceau dans le nuage ionique, ou d'employer des chromophores pour doper l'absorption photonique.^{88,139,156,160,161,163} Les FTICR, opérant à très basse pression (10⁻⁹ Torr), n'y sont pas soumis.¹⁶⁹

Les modes d'élongation des liaisons P-O sont extrêmement sensibles aux radiations IR, abaissant la barrière d'énergie nécessaire à la dissociation des peptides phosphorylés, dont le rendement de dissociation en IRMPD avoisine les 95 %. Le temps d'irradiation nécessaire s'en trouve fortement réduit (d'un facteur 10 à 100 pour l'angiotensine phosphorylée par rapport à son homologue non modifié). Ainsi, il est possible de distinguer les peptides phosphorylés qui fragmentent des non phosphorylés restant intacts face à une courte irradiation (la dissociation par absorption des modes

vibrationnels C-C et C-N requiert une exposition plus longue), ce qui n'est pas réalisable en fragmentation collisionnelle.^{165,167,168}

En effet, les méthodes d'activation collisionnelle entraînent la perte des PTM. Les phospho-peptides se fragmentent majoritairement par perte de neutre (H_3PO_4 (98 Da), H_2O (18 Da) et HPO_3 (80 Da)), et nécessitent l'emploi de MS^3 pour produire suffisamment de fragments pour obtenir une couverture de séquence permettant l'identification.^{165,170,171} Cette perte de neutre se produit dans une moindre mesure en IRMPD, n'empêchant pas la fragmentation de la chaîne peptide.^{165,170,171} Si la phosphorylation a lieu sur une tyrosine, la perte de neutre ne sera pas toujours observée à cause du cycle aromatique présent sur la chaîne latérale, renforçant la liaison et empêchant la β -élimination.^{165,167} Par ailleurs, plus le peptide est phosphorylé, meilleur sera son rendement de dissociation.^{165,171} Cette particularité a été exploitée pour la synthèse de chromophores : l'ajout de groupements phosphates et phosphonates sur les peptides ciblés (via des ligands métalliques qui se lieront aux peptides de façon non covalente) permet de stimuler leur absorption des photons IR donc d'induire une meilleure photodissociation des peptides d'intérêt.^{161,166,172}

De même, une fragmentation spécifique des peptides à cystéines sulfinylées et sulfonylées (issus de la suroxydation des acides sulféniques) peut être réalisée grâce à la sensibilité de la liaison S-O aux photons infrarouges. À l'instar des peptides phosphorylés, les peptides aux cystéines suroxydés fragmentent plus facilement que les peptides non oxydés. Par ailleurs, la liaison S=O des méthionines oxydées absorbe les photons IR aux alentours de 9,5 μm , rendant la fragmentation IR très spécifique des cystéines suroxydées.¹⁴⁵

L'absence de low m/z cutoff entraînant une grande diversité de fragments disponibles, la possibilité d'analyser des peptides en modes positif et négatif ainsi que la capacité à fragmenter spécifiquement les peptides phosphorylés (naturellement ou non) font de l'IRMPD une technique de choix pour l'analyse Bottom-Up et le séquençage de novo.^{165,166,167}

II. 5. b. II. UltraViolet Photon Dissociation (UVPD)

En opposition avec l'IRMPD dont la faible énergie des photons impose une irradiation à haut flux pour fragmenter l'analyte, l'UVPD emploie un nombre réduit de photons énergétiques (3 à 8 eV), ne nécessitant qu'un faible temps d'irradiation pour obtenir une fragmentation, ce qui impose le recours à des lasers pulsés. Grâce au contrôle de la longueur et de la durée du pulse, il est possible de réguler le nombre de photons émis et donc d'effectuer des fragmentations sélectives.^{126,139,173}

Les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ du groupe amide, $n \rightarrow \pi^*$ des doublets non-liants de l'oxygène de la cétone ainsi que les cycles aromatiques des acides aminés phénylalanine et tryptophane permettent aux peptides d'absorber naturellement les photons UV à 160, 190, 220 nm et entre 260 et 270 nm, respectivement. Certains chromophores et PTM (cités plus bas) confèrent aux peptides dérivés/modifiés une bande d'absorption des photons avoisinant 350 nm. L'irradiation des peptides à ces longueurs d'onde est accomplie avec des lasers excimers (F_2 à 157 nm, ArF à 193 nm, XeF à 351 nm),^{173,174,175,176,177} solid state (Nd:YAG à 213, 266 et 355 nm)^{178,179} et des lasers OPO (Oscillateur Paramétrique Optique, dont la longueur d'onde peut être modifiée pour correspondre aux besoins de l'analyse).^{125,180,181,182} Ces lasers sont couplés aux spectromètres de masses. Les ions sont accumulés et l'irradiation par le faisceau laser se fait à l'intérieur du spectromètre, comme dans une trappe à ion à l'instar du FTICR, de l'Orbitrap (fragmentation localisée dans la C-trap)¹¹⁹ et des trappes quadripolaires (cf. [II. 3](#)) dont les appareils Q-TOF (Quadripôle-Time of Flight).^{173,174,175,178} Il aura fallu attendre 2017 pour qu'un système commercial UVPD soit déployé, avec un laser à 213 nm implanté dans un système QExactive Orbitrap.¹²⁶

La dissociation UV se fait directement à partir de l'état excité (Figure 28, noté S_1) de la molécule. Ce mode de fragmentation génère non seulement une importante diversité de fragments comprenant les ions classiques (x/a , y/b , z/c), les ions $x+1$, $a+1$ ainsi que les ions d , v , w issus de la fragmentation de la chaîne latérale, mais offre également une couverture de m/z étendue, puisqu'à l'instar de l'infrarouge, l'UVPD n'est pas soumis au low m/z cutoff.^{119,163,175,174,173,176,177,182,183} L'apparition de fragmentations secondaires dues à la haute énergie des photons est fréquente, mais peut être évitée en réduisant la fréquence ou la durée du pulse laser.^{126,139} Le ratio S/B des spectres UVPD est souvent plus bas que les autres modes de fragmentation, notamment à cause de la grande diversité de fragments dont résulte une importante dispersion des ions sans abondance majeure, exacerbée par de possibles fragmentations secondaires.¹²⁶

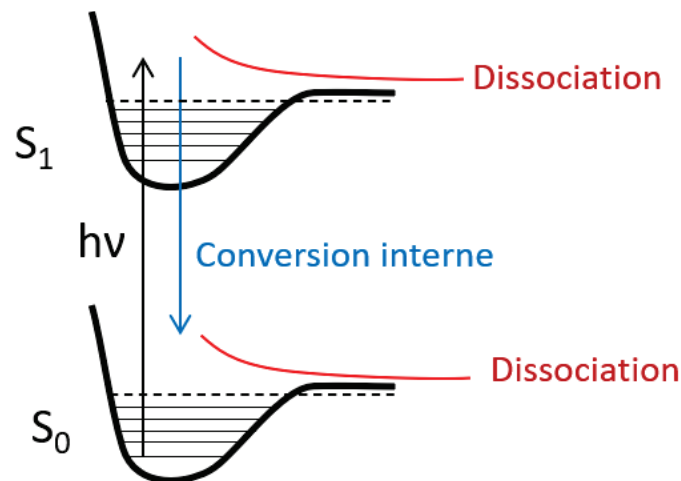


Figure 28: Voies de dissociation à l'état excité en UVPD.

La longueur d'onde comme la composition de la chaîne peptidique influencent directement la distribution des fragments générés en UVPD. Par exemple, la présence d'arginine en C-terminal favorise la production d'ions x , y , v et w , tandis que la présence d'une lysine, augmentant la mobilité du proton labile (cf. [II. 5. a](#)), induit la génération d'une importante quantité d'ions b/y , mais également d'ions x/a , d et v .^{153,184,185} Selon la longueur d'onde employée (193, 213 ou 266 nm), l'irradiation des ponts disulfures donne lieu à une rupture homolytique ainsi qu'à la fragmentation des chaînes latérales et peptidiques des peptides liés.¹⁸⁶ Les peptides déprotonés (anioniques) forment préférentiellement des ions a/x par clivage de la liaison C_{α} -C plutôt que les b/y obtenus par dissociation de leurs homologues protonés (cationiques).¹³⁹

Certaines modifications post-traductionnelles possèdent leur propre spécificité d'absorption, comme les tyrosines nitrées absorbant aux alentours de 350 nm. Les peptides n'absorbant pas naturellement à une telle longueur d'onde, l'irradiation des tyrosines nitrées avec un laser à 355 nm permet leur fragmentation spécifique.¹⁸⁷

Si les peptides n'absorbent pas dans le proche UV (> 350 nm), leur dérivation par un chromophore spécifique permet d'absorber ces photons et d'induire leur dissociation spécifique.^{126,188,189}

Parmi les chromophores existants, nous pouvons citer :

– Alexa Fluor 350,¹⁷⁹ BAH¹⁹⁰ et sulfo-NHS-AMCA¹⁷⁶ dérivant les peptides de façon non spécifique à leurs extrémités C-term ou N-term.

– Le diazonium,¹⁹¹ qui permet de dériver les acides aminés tyrosine et histidine. Bien que ces acides aminés soient abondants au sein des protéines, leur dérivation permet de faciliter le séquençage protéique.

– La NN-probe,^{192,193} qui permet la dérivation des résidus lysines, employée pour cartographier l'accessibilité du solvant aux protéines.

– Alexa Fluor 350 Maléimide,¹⁹⁴ dérivant spécifiquement les cystéines libres (SH) d'un peptide, employé notamment pour mettre en lumière la présence de ponts disulfures intra ou interprotéines.

– Les cystéines peuvent également être greffées avec un chromophore N-(phenylseleno)-phtalimide (NPSP) qui forme une liaison S-Se dont la rupture spécifique est obtenue par absorption de photons à 266 nm. La rupture induit une perte de neutre de 156, permettant de suivre spécifiquement les ions greffés, puis de les fragmenter en CID si besoin.^{126,195,196}

– Les quinones sont des chromophores absorbant la lumière UV et permettent, lorsqu'elles sont greffées aux thiols des cystéines par addition de Michael, d'induire une fragmentation peptidique après leur irradiation à 266 nm. Ainsi, la fragmentation sera spécifique des cystéines greffées.⁹²

L'emploi d'un chromophore permet également d'influer sur son mécanisme de fragmentation UVPD : carbamyle les lysines d'un peptide diminue sa basicité, augmentant son rendement de fragmentation en mode négatif,¹⁹⁷ l'emploi de cycles aromatiques permet de doper le rendement de dissociation des

peptides, et le greffage de certains chromophores (absorbant à 266 ou 351 nm) force la fragmentation à ne générer que des ions y par sulfénylation N-Terminale.^{126,176,198}

En outre, la Radical-Directed Dissociation (RDD) est une stratégie MS³ reposant sur le clivage homolytique d'une liaison facilement rompable issue d'un chromophore à 266 nm (via un laser Nd:YAG) générant des ions radicalaires qui sont ensuite soumis à la CID pour former des ions fragments a/x, c/z, d, v, w.¹⁹⁹ Par exemple, des composés aromatiques iodés absorbants à 266 nm, dont la liaison C-I est rompue de façon homolytique avec un haut rendement de fragmentation et une importante sélectivité pour la formation de radicaux. La RDD est employée pour identifier les sites de phosphorylation,^{200,201,202} les résidus iodotyrosines et divers types de cystéines (oxydées ou réduites).⁹⁹² Elle permet également, par iodination préalable des tyrosines, de détecter des inversions chirales (L vers D) dont la photodissociation mène à différentes voies de fragmentation.^{126,203}

L'UVPD est une technique analytique parfaitement adaptée à la stratégie Bottom-Up^{126,204} grâce à la possibilité de l'employer en modes positif et négatif (bien que plus complexe à cause du détachement d'électrons et de la fragmentation radicalaire),^{182,205,206} ses excellents rendements de fragmentation combinés à l'absence de low m/z cutoff, la préservation des PTM¹⁸³ concomitante à la production de fragments d,v et w qui permettent l'identification des chaînes latérales (donc une différenciation de la leucine et de l'isoleucine),^{207,208} ainsi que la possibilité d'employer des réactifs pour moduler à sa guise l'information obtenue.¹²⁶

II. 5. b. III. Visible

La fragmentation par un laser émettant dans le visible a pour but d'ajouter une spécificité optique supplémentaire à la sélectivité en m/z accordée par la spectrométrie de masse. À l'instar du proche UV, les peptides et protéines n'absorbent pas dans le domaine du visible. La dérivation des analytes ciblés avec des chromophores adaptés permet donc leur fragmentation par irradiation laser, laissant les analytes non dérivés intacts.

Cette technique a largement été employée ici, à Lyon, pour l'analyse protéomique : la cystéine est un acide aminé dit « rare », s'il est présent dans plus de 90 % des protéines son occurrence par protéine est relativement faible en comparaison des autres acides aminés. Ainsi, la fragmentation des peptides

à cystéines est obtenue après greffage avec un chromophore spécifique, le dabcyI maléimide²⁰⁹ (comportant un groupement dabcyI, un quencher dont l'absorption de photons à 425 nm induit sa fragmentation par FRET, et un groupement maléimide spécifique des fonctions thiols des cystéines). Cette dérivation permet de réduire la complexité de l'échantillon sans recourir à une purification/enrichissement préalable.^{211·212·213} Lors de leur photo-fragmentation par LID (Laser Induced Dissociation), les peptides greffés génèrent des ions b et y caractéristiques de la chaîne peptidique, ainsi que des ions rapporteurs caractéristiques du groupement dabcyI du chromophore. Comme seuls les peptides greffés sont fragmentés et aisément identifiables, la sensibilité de l'analyse est augmentée, car il y a une diminution des interférences (donc du bruit analytique). Très performante en mode ciblé (MRM/PRM) et bien qu'ayant également été employée en DIA avec succès,^{189,212} la LID nécessiterait d'être développée avec l'appui des constructeurs pour lui permettre de s'illustrer dans l'acquisition non ciblée.

Le laboratoire a également utilisé d'autres chromophores tels que des variants du dabcyI, notamment sous sa forme dabsyl chloride pouvant se lier aux fonctions OH de métabolites d'œstrogène,²¹³ ainsi qu'un chromophore QSY7, joint à un groupement maléimide qui a également été employé pour la dérivation des thiols des cystéines et leur fragmentation à 545 nm.²¹² C'est d'ailleurs ici qu'a été développé l'action-FRET, où la fragmentation d'un chromophore par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) a lieu en phase gazeuse et dont les ions fragments sont détectés par spectrométrie de masse.^{214,215}

La photodissociation visible appliquée aux peptides en est à ses premiers développements, la possibilité d'employer des chromophores pour cibler les acides aminés et PTM et les fragmenter de façon hautement spécifique permet d'ouvrir le champ des possibles quant au futur de l'analyse protéomique d'échantillons complexes.

II. 5. c. ECD/ETD

Développé en 1998 par l'équipe de McLafferty, l'Electron Capture Dissociation (ECD) implique la capture d'électrons de faible énergie (env. 1 eV) par des ions multichargés positivement, entraînant la réduction de leurs états de charges. Cette réaction est exothermique et induit une fragmentation générée par la migration d'un radical hydrogène. Ainsi, les anions et composés neutres ne réagiront pas, et les fragments d'un précurseur cationique monochargé ne pourront pas être détectés par le spectromètre de masse. Par opposition aux techniques de fragmentation ergodiques (par excitation vibrationnelle comme la CID ou l'IRMPD¹⁶⁰), l'ECD est un processus rapide (10^{-14} s) qui fragmente directement la chaîne peptidique sur la liaison N-C $_{\alpha}$, formant des fragments c $^{\bullet}$ et z $^{\bullet}$, ainsi que sur les ponts disulfures tout en préservant les PTM (Figure 29). Le radical du C $_{\alpha}$ ainsi généré peut également induire la formation de carbonyles, donnant lieu à des ions fragments qui peuvent différer dans leur contenu en hydrogène. L'ECD est également exempt de m/z cutoff.^{139,156,168,170,216,217,218,219}

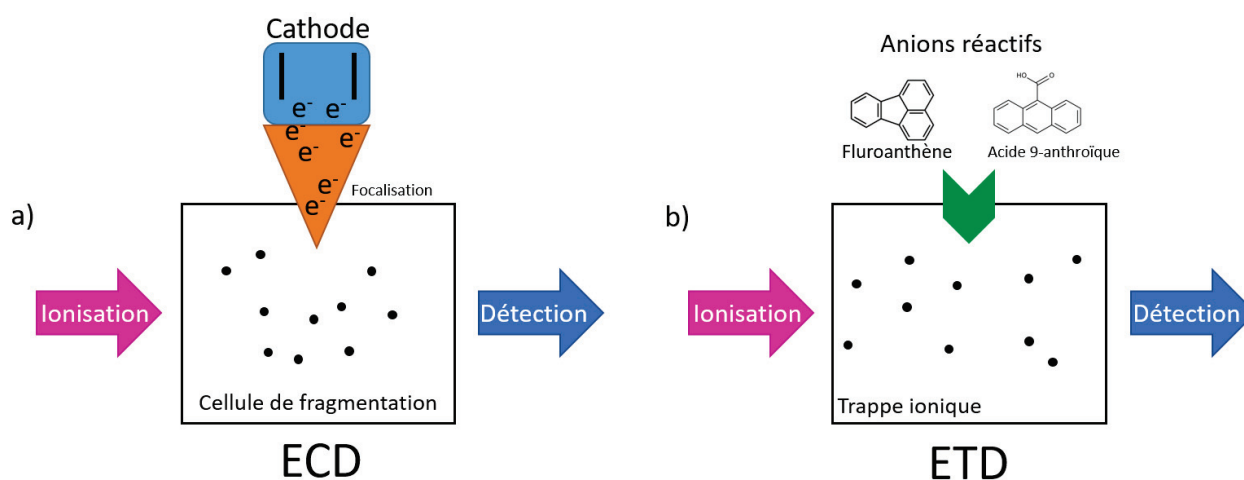


Figure 29: Schéma représentant les modes de fragmentation ECD (a), où la fragmentation du composé d'intérêt se fait par capture d'électrons issus d'un faisceau d'ions, et ETD (b) dont la fragmentation de l'analyte résulte d'un transfert d'électron suite à sa réaction avec un composé anionique.

L'ECD est très employé au sein des FTICR puisque les forts champs magnétiques et les faibles champs électrostatiques de l'appareil ont une influence négligeable sur les électrons,^{139,156} tandis que les radiofréquences (RF) appliquées aux électrodes des quadripôles affectent le mouvement des électrons dans la trappe.

L'ETD est l'équivalent de l'ECD employé dans les trappes à ions. Ces dernières employant des RF aux électrodes des quadripôles qui affectent le mouvement des électrons dans la trappe, l'ECD conventionnelle n'est pas applicable. Toutefois, il est possible de faire réagir les cations multichargés avec des anions radicalaires tels que le fluoranthène ou l'acide 9-anthroïque. Le transfert d'électrons par interaction ion/ion qui s'en suit va venir neutraliser l'une des charges en générant un radical. Cette réaction exothermique induira la rupture de la liaison N-C α . Les ions générés sont de type c/z $^{\bullet}$, et les PTM sont préservées.^{139,168,170,217,220}

Moins populaire, l'Electron Induced Dissociation (EID) implique la réaction d'un peptide simplement protoné avec des électrons de faible énergie, générant des anions radicalaires qui se dissocient.¹³⁹

L'ECD et l'ETD ne permettant d'analyser que des cations multichargés, des alternatives ont été développées pour permettre l'analyse d'anions multichargés. Il est possible d'employer des électrons de haute énergie (10-12 eV) afin de générer un détachement électronique du peptide anionique. Perdant un électron, le peptide subit une réduction de charge exothermique qui engendre une rupture C α -C générant des ions a/x avec quelques ions c/z. Cette technique s'appelle l'EDD (Electron Detachment Dissociation) et est considérée comme l'équivalente négative de l'ECD.^{139,219,221}

À l'instar de l'ECD et l'EDD, la NETD est l'analogue négative de l'ETD : au lieu d'employer un électron sensible aux RF, un électron du peptide anionique multichargé est extrait grâce à un ion cationique radicalaire, générant des ions a $^{\bullet}$ /x par clivage de la liaison C α -C. La NETD entraîne une grande perte de neutres, ainsi que le clivage de certaines PTM (serines phosphorylées et cystéines carbamidométhylées) sans induire la fragmentation de la chaîne peptidique.^{222,223,224}

Il existe également la niECD (Negative Electron Capture Dissociation) grâce à laquelle la capture d'un électron provenant d'un zwitterion (4,5 à 6 eV) par un anion multichargé permet la formation d'ions c'/z $^{\bullet}$.^{225,226}

II. 5. d. Hybrides

Chaque mode de fragmentation présentant ses avantages et ses limites, leur combinaison dans des appareillages hybrides permet d'obtenir des informations différentes, complémentaires ou plus précises que s'ils sont employés seuls. Leur description exhaustive n'étant pas pertinente pour ce travail de thèse, seuls quelques modes de fragmentation hybrides seront décrits ici.

II. 5. d. I. Fragmentation alliant photodissociation et rupture collisionnelle

L'IRMPD ne pouvant être employée au-delà de 10^{-3} Torr à cause du refroidissement collisionnel, l'emploi d'une activation collisionnelle conjointe à l'irradiation IR permet de limiter la perte d'énergie interne et induire une photodissociation exempte de low m/z cutoff dans les appareils type QqQ ou LIT. Par ailleurs, les ions monochargés sont plus facilement dissociés qu'en CID classique.^{161,227}

L'EPD (electron photodetachment), est une technique comparable à l'EDD, où des anions multichargés sont exposés à des photons UV ou visibles qui vont induire un détachement électronique, ce qui mène à la production de versions anioniques radicalaires du précurseur sans dissociation. Ce dernier peut être isolé et fragmenté notamment par CID au niveau des liaisons C_{α} -C pour générer des ions a/x , $a+1$, $a+2$, $x+1$, $x+2$ et $x-1$ ainsi que de nombreux autres fragments anioniques dont b/y , c/z^{\bullet} .^{126,139,228,229}

II. 5. d. II. Fragmentation combinant photodissociation et dissociation électronique

Un couplage IRMPD et ECD a été mis au point dans un FTICR, permettant d'obtenir une plus grande richesse de fragments pour l'identification : b/y issus de l'IRMPD, c/z issus de l'ECD, des ions w , ainsi que l'absence de clivage du groupement H_3PO_4 des phosphopeptides permettant une meilleure localisation de la PTM.^{230,231}

AI ETD et AI ECD, techniques employées dans l'analyse de protéines, permettent d'augmenter l'énergie interne des protéines avec un faisceau IR, induisant la rupture de liaisons covalentes qui gênaient la bonne fragmentation en ECD/ETD, donc d'obtenir un meilleur rendement de fragmentation. De même, pour les peptides anioniques, l'AI-NETD a été employée.^{88,170,173,232}

Les peptides et protéines peuvent également être soumis à l'ECD (ECuvPD) ou à l'ETD (ETuvPD), puis leurs fragments irradiés par UVPD pour changer la distribution des ions fragments a^{\bullet}/x^{\bullet} , b/y , c/z^{\bullet} . Il

est possible de sélectionner les fragments ou de tous les fragmenter sans distinction (broadband UVPD). Dans le cas des peptides phosphorylés, l'ETD génère des fragments z nécessaires à l'identification du peptide, et l'UVPD à 355 nm permet de cliver spécifiquement le phosphopeptide en identifiant son site de phosphorylation.^{126,232,233,234}

La Photoelectron-Transfer Dissociation (PETD) permet, grâce à un laser UV à 266 nm, de générer des ions fragments b/y tout en produisant des fragments c/z par ETD. Les fragments c/z sont issus de sites anioniques parmi les groupements acides du peptide analysé. Ainsi, la présence, la diminution ou l'absence de génération de ces fragments permet d'estimer si le peptide/protéine a un comportement zwitterionique ou non, seuls les fragments b/y étant générés en cas de non zwitterionique.²³⁵

II. 5. d. III. Fragmentation associant rupture électronique et collisionnelle

L'EChcD est une technique générant des ions radicalaires par ECD, qui sont ensuite fragmentés par HCD, générant des ions a[•], b/y, c/z[•].²³¹ De même l'ETHcD, son équivalent par ETD, permet la génération d'ions b/y et c/z.²³⁵ Ces techniques permettent d'obtenir une meilleure couverture de séquence qu'avec les deux techniques séparées, conservent les PTM et confèrent la possibilité de faire varier la distribution des fragments en fonction de l'énergie de collision.²³⁶

Les phosphopeptides présents dans des échantillons complexes sont également analysés en ECciD et ETciD, équivalents CID de l'EChcD et l'ETHcD, permettant une localisation de la phosphorylation pour les peptides à hauts états de charges par ECD/ETD et la fragmentation CID des plus faibles états de charges.¹⁸³

Conclusion

Au cours de ce chapitre, j'ai détaillé différentes approches et méthodes permettant de détecter, quantifier et localiser les oxydations des cystéines, en particulier les acides sulféniques, de façons directe et indirecte. Ces méthodes emploient diverses techniques de détection, notamment la spectrométrie de masse qui permet à la fois la détection, la quantification et la localisation précise des acides sulféniques au sein des protéines oxydées. Ainsi, j'ai passé en revue les stratégies analytiques protéomiques les plus courantes (Top-Down et Bottom-Up), les modes d'acquisition disponibles pour

de tels appareils (MRM, PRM, DDA, DIA) ainsi que différents modes de fragmentation (HCD, Photodissociation IR/UV/Visible, ECD/ETD) potentiellement exploitables pour obtenir une spécificité analytique pour la détection et quantification des acides sulféniques.

Comme j'ai pu l'évoquer précédemment, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) classique permet de détecter, quantifier et localiser les acides sulféniques lorsqu'ils sont stabilisés. Une telle stabilisation peut être obtenue par dérivation de la fonction SOH avec un groupement dimédone, hautement spécifique des acides sulféniques. Cependant, les travaux cités au cours de la première partie de ce chapitre emploient une fragmentation HCD qui, si elle permet de fragmenter le peptide à Cys-SOH dérivé en générant un groupement caractéristique reconnaissable, induit également la fragmentation de tous les précurseurs isobares. L'oxydation des acides sulféniques étant un phénomène très minoritaire, ces derniers peuvent être noyés dans le bruit généré par une fragmentation non spécifique, et donc engendrer une perte de sensibilité de l'analyse. Pour compenser une telle perte, de nombreuses techniques ont recours à des méthodes de purification ou d'enrichissement relativement longues, coûteuses, et pouvant fausser la quantification des Cys-SOH de l'échantillon.

La photodissociation permet une fragmentation plus spécifique des peptides ciblés, notamment la photodissociation dans le proche UV et dans le visible. Les peptides n'absorbant pas dans ce domaine, leur fragmentation nécessite donc leur dérivation préalable par un chromophore qui absorbe à la longueur d'onde du laser. Seules les molécules dérivées sont ainsi fragmentées par LID. Ajouter une spécificité optique à la sélectivité de la spectrométrie de masse au travers de la dérivation avec un chromophore permettrait ainsi d'éviter les fragmentations interférentes, de réduire le bruit de fragmentation et donc d'augmenter la sensibilité de l'analyse.

Le développement et la mise en place d'une telle méthodologie feront l'objet du chapitre suivant, au cours duquel je détaillerai l'appareillage, les réactifs et notamment le chromophore développé et utilisé, ainsi que l'optimisation de la réaction d'oxydation et de dérivation sur des peptides modèles. Les résultats obtenus avec cette nouvelle méthodologie sur des échantillons de protéines oxydées *in vitro* jusqu'à la détection et la quantification relative d'acides sulféniques endogènes d'échantillons de plasma humain seront également présentés.

Chapitre III. Développement d'une méthode dérivation, détection et quantification spécifique des acides sulféniques endogènes de protéines plasmatiques par couplage de la spectrométrie de masse et de la photodissociation.

Introduction

L'oxydation des cystéines en acides sulféniques est un phénomène transitoire minoritaire au sein de la cellule. La détection et la quantification de ces cystéines oxydées sont donc relativement ardues en raison de l'instabilité de celles-ci conjuguée à leur faible concentration dans les échantillons biologiques. Au cours du chapitre précédent, j'ai évoqué différentes stratégies analytiques permettant leur détection directe comme indirecte. Ces stratégies reposent sur des protocoles généralement lourds, parfois coûteux, comprenant souvent des étapes d'enrichissement/purification pour pallier un manque de sensibilité qui peuvent fausser la quantification.

Afin d'améliorer la sensibilité de détection des acides sulféniques, le laboratoire propose d'ajouter une spécificité optique à la sélectivité de la spectrométrie de masse par le remplacement du mode de fragmentation classique HCD par une fragmentation laser (Laser Induced Dissociation, LID) dans le visible à 473 nm. Cette approche vise à réduire le bruit inhérent à la fragmentation non sélective de l'intégralité des molécules entrantes dans la chambre de fragmentation, responsable de biais de mesure et de quantification analytique.¹¹³ Les peptides n'absorbant pas naturellement dans le visible, cette méthodologie repose sur la dérivation des acides sulféniques par un chromophore permettant à la fois leur dérivation spécifique et leur fragmentation lors de l'irradiation laser : le dabcyloxydicyclohexanedione.

Au cours de ce chapitre, j'expliquerai le développement de cette méthode sur un spectromètre de masse haute résolution QExactive (ThermoFischer) modifié de façon à permettre l'irradiation laser à 473 nm des analytes par la description du montage expérimental et la caractérisation de ce nouveau chromophore. Je confirmerai la spécificité de dérivation des acides sulféniques par le chromophore et de fragmentation des peptides à Cys-SOH dérivés par irradiation laser, puis je détaillerai les différentes

optimisations de la réaction de dérivation sur des peptides modèles dans un milieu simple, qui sera adaptée pour la dérivation d'un mélange de protéines modèles. Finalement, je présenterai les résultats obtenus sur la dérivation des Cys-SOH endogènes de six échantillons de plasma humain.

I. Laser Induced Dissociation (LID)

I. 1. Montage expérimental

I. 1. a. Fonctionnement du QExactive (Thermofisher)

Les ions produits par la source électrospray sont acheminés vers le quadripôle grâce à des guides d'ions (funnel et lentilles magnétiques) ([Figure 30](#)). Celui-ci permet de sélectionner les ions en masse selon une plage de m/z souhaitée, ces ions sont accumulés dans la C-trap qui les redirigera soit vers le détecteur Orbitrap (acquisition d'un full MS ou d'un SIM – Single Ion Monitoring), soit vers la cellule HCD pour les fragmenter. Les fragments seront injectés dans l'Orbitrap après leur passage au travers de la C-trap. L'architecture du QExactive permet le « travail en parallèle » : durant l'acquisition d'un spectre de masse, les ions destinés au spectre suivant sont accumulés et/ou fragmentés, permettant de les injecter dès la fin de l'acquisition sans perdre de temps entre les spectres.

I. 1. b. Modification de l'appareillage

L'appareillage a été modifié pour permettre l'irradiation et la photofragmentation des ions avec un laser continu à diode émettant à 473 nm directement dans la cellule HCD. Ainsi, les ions accumulés dans la C-trap qui seront dirigés dans la cellule ne seront plus fragmentés par collision, mais par irradiation laser ([Figure 30](#)).

Pour ce faire, le faisceau d'un laser MBL N 473 (puissance de 500 à 800 mW, de variation < 0,916 %, diamètre 2 mm, divergence env. 1,0 mrad) est dirigé jusqu'à la cellule HCD par un jeu de miroirs, puis

traverse un orifice percé à même le spectromètre où une fenêtre en quartz permet d'assurer l'étanchéité du vide sans absorber le faisceau visible. En raison de l'alignement de la cellule HCD, de la C-trap et du quadripôle, le faisceau pénètre obliquement dans la cellule HCD, sans quoi il fragmenterait les ions sélectionnés directement dans le quadripôle, empêchant leur acheminement jusqu'au détecteur.

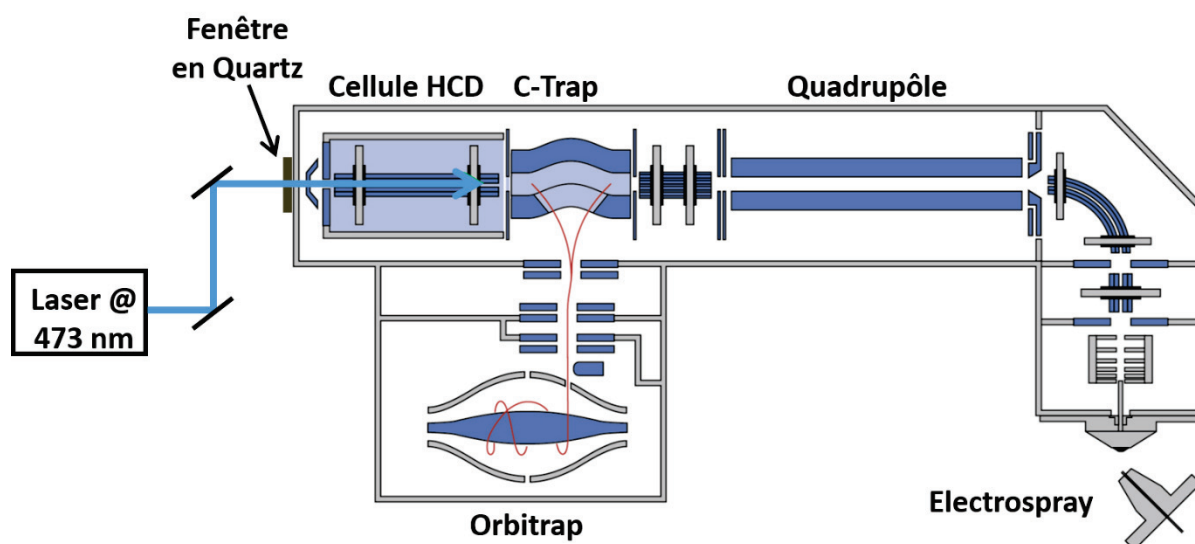


Figure 30: Schéma du QExactive (ThermoFisher) couplé avec un laser continu émettant à 473 nm dans la cellule HCD.

Pour pénétrer dans la cellule HCD, les ions sont accélérés par l'application d'une tension résultant d'une différence de potentiel entre les électrodes de la cellule. L'énergie cinétique ainsi acquise par les ions est exprimée en électrons-volts (eV) et permet leur fragmentation lorsqu'ils entrent en collision avec le gaz neutre (N_2) de la cellule. Une tension comprise entre 19 et 30 eV est généralement employée pour induire la fragmentation des ions. Cette énergie est ici réduite à un minimum de 2 eV, seuil minimal en dessous duquel les ions ne peuvent pénétrer dans la cellule. Une énergie cinétique de 2 eV n'induit pas de fragmentation collisionnelle (ou une fragmentation négligeable) du précurseur, permettant donc de ne fragmenter que les ions sensibles à l'irradiation laser sans parasitage du spectre de fragmentation.

Lors d'une analyse, deux paramètres clés de la C-trap sont à optimiser : l'AGC target, qui correspond à la quantité d'ions maximale accumulée, ainsi que l'injection time (IT) correspondant au temps d'accumulation des ions dans la C-trap au bout duquel, si l'AGC target n'est pas atteint, les ions seront

injectés dans l'Orbitrap ou la cellule HCD (analyse MS ou MS/MS). L'accumulation des ions se faisant en parallèle de l'analyse des ions précédents, ces valeurs sont à régler en accord avec le temps de scan de l'Orbitrap, de sorte à pouvoir accumuler un maximum d'ions sans temps mort dans le cycle.

I. 2. Chromophore dabcyll cyclohexanedione

À l'instar du proche UV, les peptides et protéines n'absorbent pas dans le domaine du visible et nécessitent donc l'emploi de chromophores pour être fragmentés. Cependant, l'absorption des photons visibles par des chromophores est soumise à des contraintes : les photons visibles ne sont pas aussi énergétiques que les photons UV, la dissociation ne peut donc pas être mono-photonique, imposant une accumulation de photons pour augmenter l'énergie interne. Par ailleurs, les chromophores se désexcitent généralement par émission de photons (fluorescence), nécessitant l'emploi d'un chromophore quencher opérant par FRET.

Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est un mécanisme spectroscopique par lequel l'énergie acquise par un fluorophore est transférée de façon non radiative entre les molécules, et ce sur de longues distances (10-100 Å). L'énergie peut être, par exemple, transmise à un autre chromophore qui, lui, se déexcitera par fluorescence. Si aucune fonction susceptible d'accepter l'énergie pour que le chromophore se déexcite n'est présente (que ce soit au sein de la molécule ou dans le milieu de réaction), l'excédent d'énergie donnera lieu à des ruptures internes.^{237,238}

Le dabcyll est un chromophore quencher sans autofluorescence minimale,²⁴² qui absorbe entre 350 et 520 nm avec un maximum autour de 425 nm par FRET. L'énergie accumulée par le chromophore lors de l'absorption de photons est redistribuée le long de sa chaîne carbonée, induisant sa dissociation en différents fragments caractéristiques dits « rapporteurs ». Si le dabcyll est greffé à d'autres composés tels que des peptides, l'énergie sera également redistribuée le long de la chaîne peptidique, fragmentant le peptide avec le chromophore et induisant la génération d'ions issus des deux composés. Un tel réactif, greffé aux peptides à cystéines oxydées en acides sulféniques permettrait leur fragmentation spécifique. Pour cela nous avons, en collaboration avec l'ENS de Lyon, mis au point un chromophore : le dabcyll cyclohexanedione (DabDn).

Bien que l'emploi des systèmes DYn et DAz permette théoriquement des vitesses de dérivation plus courtes, une telle méthode nous obligerait à synthétiser un composé dabcyyl compatible avec les réactifs DYn ou DAz et alourdirait le protocole de réaction ainsi que le coût de l'analyse.

I. 2. a. Structure et synthèse

Le dabcyyl cyclohexanedione est un chromophore orange de formule brute $C_{24}H_{27}N_3O_4$, de masse molaire $421,4970 \text{ g.mol}^{-1}$, composé d'un groupement cyclohexanedione permettant la dérivation spécifique des acides sulféniques (cf. [Chapitre II.I. 2. b. I](#)), conjugué à un groupement dabcyyl permettant l'absorption des photons du laser à 473 nm et sa fragmentation grâce à ses propriétés quencher (cf. [I. 2](#)) ([Figure 31](#)).

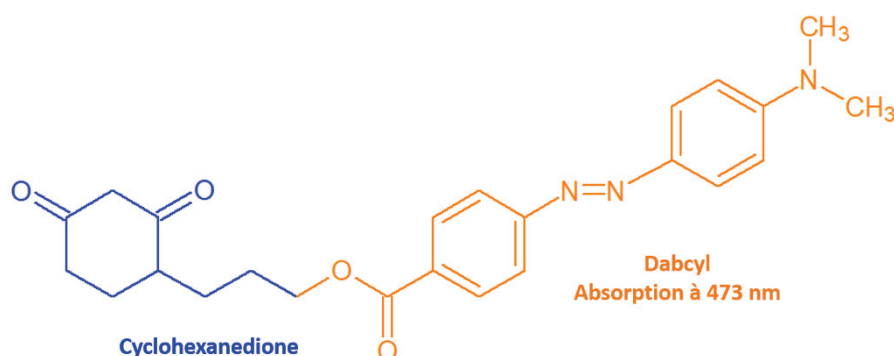


Figure 31: Formule développée du chromophore Dabcyyl Cyclohexanedione comportant un groupement cyclohexanedione dérivant spécifiquement les SOH (bleu) et un groupement dabcyyl qui permet l'absorption des photons à 473 nm, induisant sa fragmentation.

Son élaboration et sa synthèse par estérification de la fonction alcool libre du 3-ethoxy-6-(3-hydroxypropyl)cyclohex-2-enone par le 4-[2-[4-(diméthylamino)phényl]diazenyl]-benzoic acid (Dapcyyl) suivie d'une hydrolyse acide pour libérer la moitié 1,3-cyclohexanedione ont été effectuées par M. Yann Bretonnière et Mme Delphine Pitrat du laboratoire de l'ENS Lyon.²⁴¹

Présenté sous forme de poudre orange foncé, ce chromophore est insoluble dans l'eau, mais peut être solubilisé dans le méthanol (limite de solubilité d'env. 1 mg.mL^{-1}), l'ACN (env. 1 mg.mL^{-1}) et le DMSO ($<27 \text{ g.L}^{-1} - 64 \text{ mM}$), dans lesquels il prendra respectivement une couleur jaune clair et orange vif, illustrant sa limite de solubilité dans le solvant en question.

I. 2. b. Analyse LID

L'analyse par spectrométrie de masse du DabDn en ESI mode positif ([Figure 32](#)) montre un pic de m/z 422,2083 correspondant à l'adduit protoné du DabDn : $[\text{DabDn}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_4$, erreur de masse - 1,5203 ppm) ainsi qu'un adduit dimérisé $[\text{2DabDn}+\text{H}]^+$ de m/z 843,4075. Les autres ions détectés correspondent probablement à des ions produits issus de la réaction de synthèse, et ne fragmentent pas lorsqu'ils sont irradiés au laser à 473 nm.

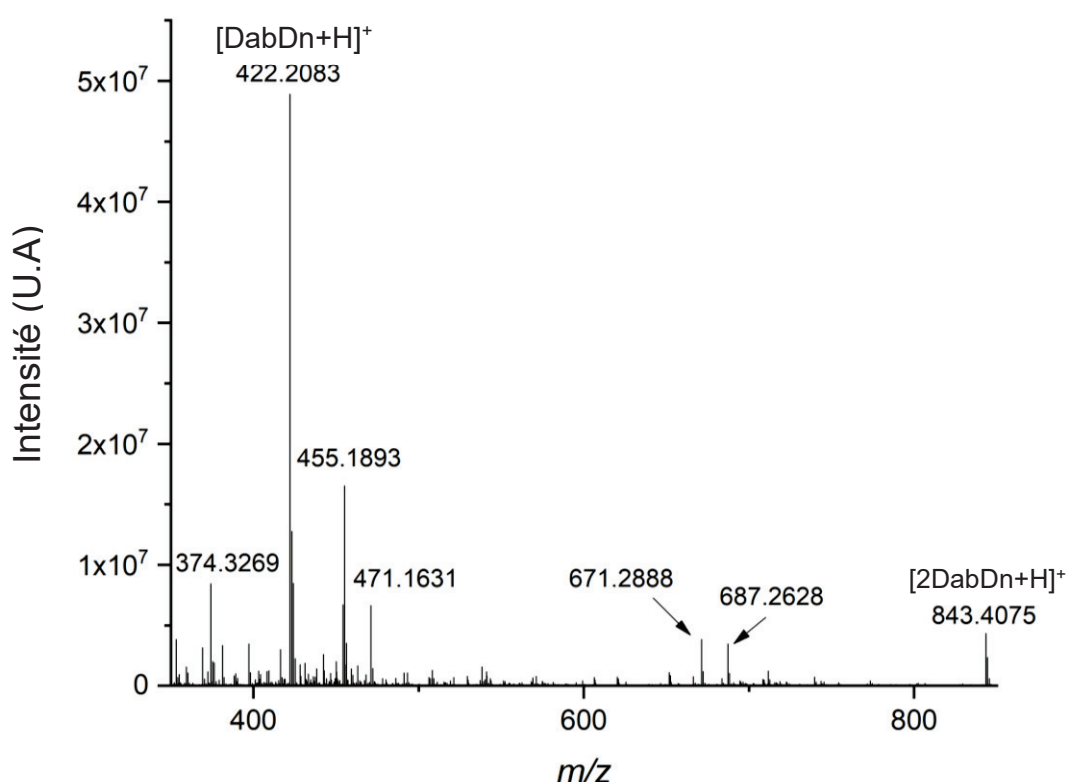


Figure 32: Spectre MS du DabDn solubilisé dans 100 % MeOH, moyenné sur 50 scans acquis en mode positif avec une résolution de 140 000.

La sélection du précurseur protoné $[\text{DabDn}+\text{H}]^+$ et sa fragmentation en LID ([Figure 33](#)) donnent lieu à la déplétion de l'ion m/z 422,2083 au profit de la génération d'un ion rapporteur caractéristique de la fragmentation du groupement dabcyll à m/z 252,1123 ainsi que deux autres ions majoritaires (m/z 120,0809 et 148,0869). Une illustration des sites de ruptures du DabDn menant à la génération des principaux fragments est disponible en [Figure 34](#). Les mécanismes de fragmentation sont détaillés en [I. 2. b. 1.](#)

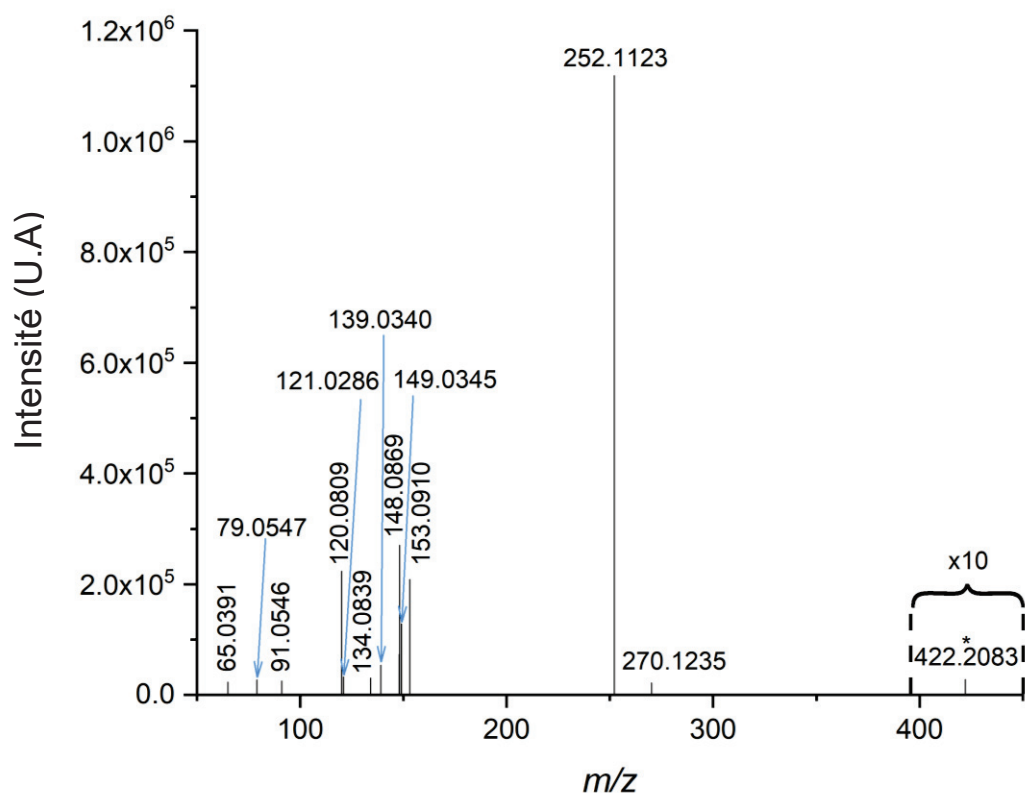


Figure 33: Spectre de fragmentation LID du précurseur $[DabDn+H]^+$ suite à son irradiation laser de puissance 400 mW à 473 nm durant 25 ms avec une énergie de collision de 3 eV, moyenné sur 50 scans acquis avec une résolution de 140 000. L'astérisque marque l'ion précurseur $[DabDn+H]^+$ non fragmenté dont l'intensité a été multipliée par 10 pour être visible sur le spectre de fragmentation.

Le DabDn possède un excellent rendement de fragmentation supérieur à 99 %, déterminé selon

l'équation :

$$\rho_{frag} = \left(1 - \frac{I_{précurseur}}{I_{précurseur} + I_{fragments}}\right) * 100$$

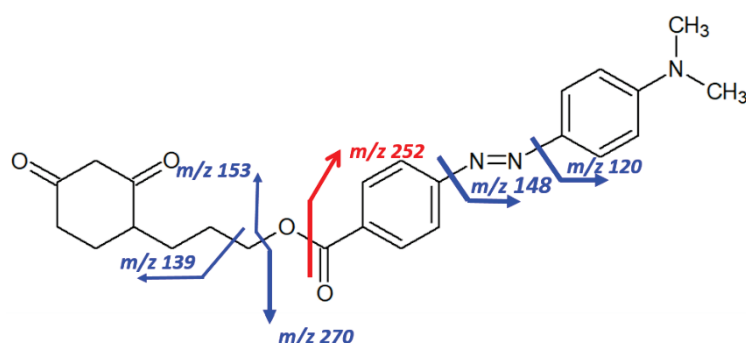


Figure 34: Illustration des différents ions issus de la fragmentation du DabDn. L'ion rapporteur à m/z 252 (rouge) est caractéristique de la dissociation du groupement dabcyyl et du groupement cyclohexanedione au niveau de la liaison ester où seule la partie dabcyyl est détectée.

La fragmentation LID favorise la formation d'une plus grande diversité d'ions en comparaison à la fragmentation HCD (Figure 35) où seuls l'ion rapporteur ainsi que les ions de m/z 153,0910, 120,0809, 270,1235 et 148,0869 sont détectés. La distribution de ces fragments est également différente : l'ion à m/z 153,09 est l'ion secondaire majoritaire en HCD contre celui à m/z 148,08 en LID. Ce dernier est l'ion fragment le moins intense généré en HCD, derrière l'ion à m/z 270, bien plus intense qu'en LID. Par ailleurs, la fragmentation HCD ne donne pas lieu à la déplétion totale du précurseur (m/z 422,2083).

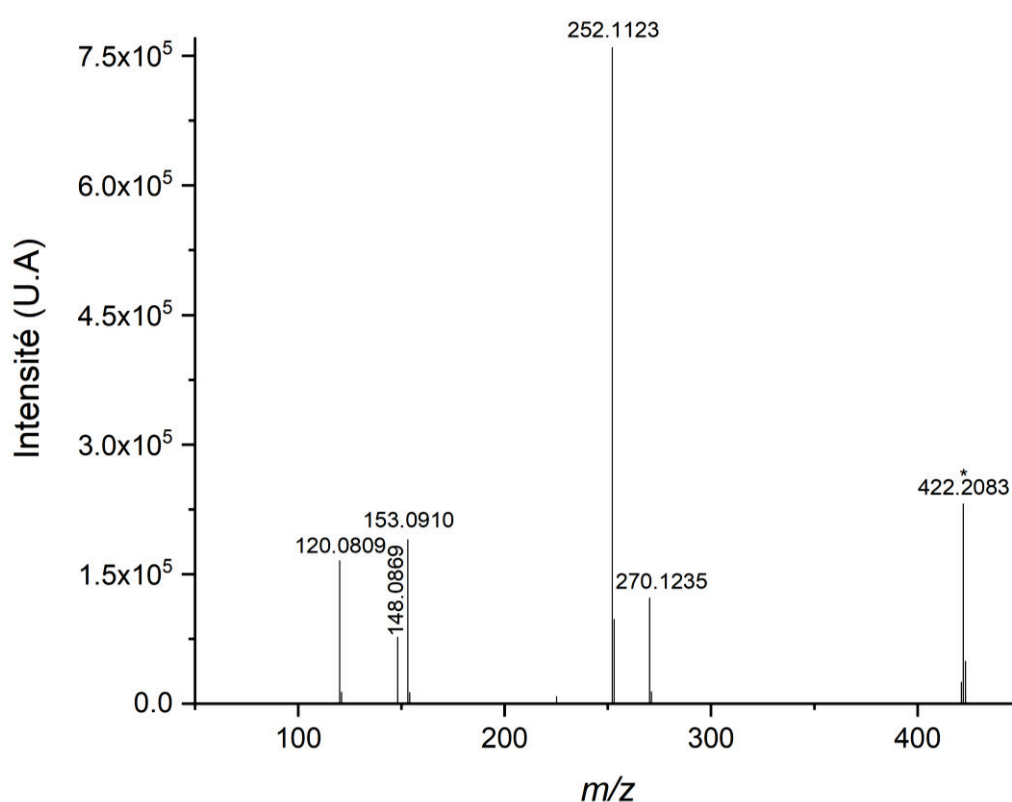


Figure 35: Spectre de fragmentation HCD du précurseur $[DabDn+H]^+$ (marqué d'un astérisque) fragmenté par une énergie de collision de 24 eV, piégé pendant 3 ms et moyenné par 50 scans acquis avec une résolution de 140 000.

Une étude du rendement de fragmentation du DabDn en fonction de la longueur d'onde employée, déterminé selon l'équation :

$$\rho_{frag} = \frac{\ln\left(\frac{I_{frag} + I_{parents}}{I_{parent}}\right)}{P} * \lambda$$

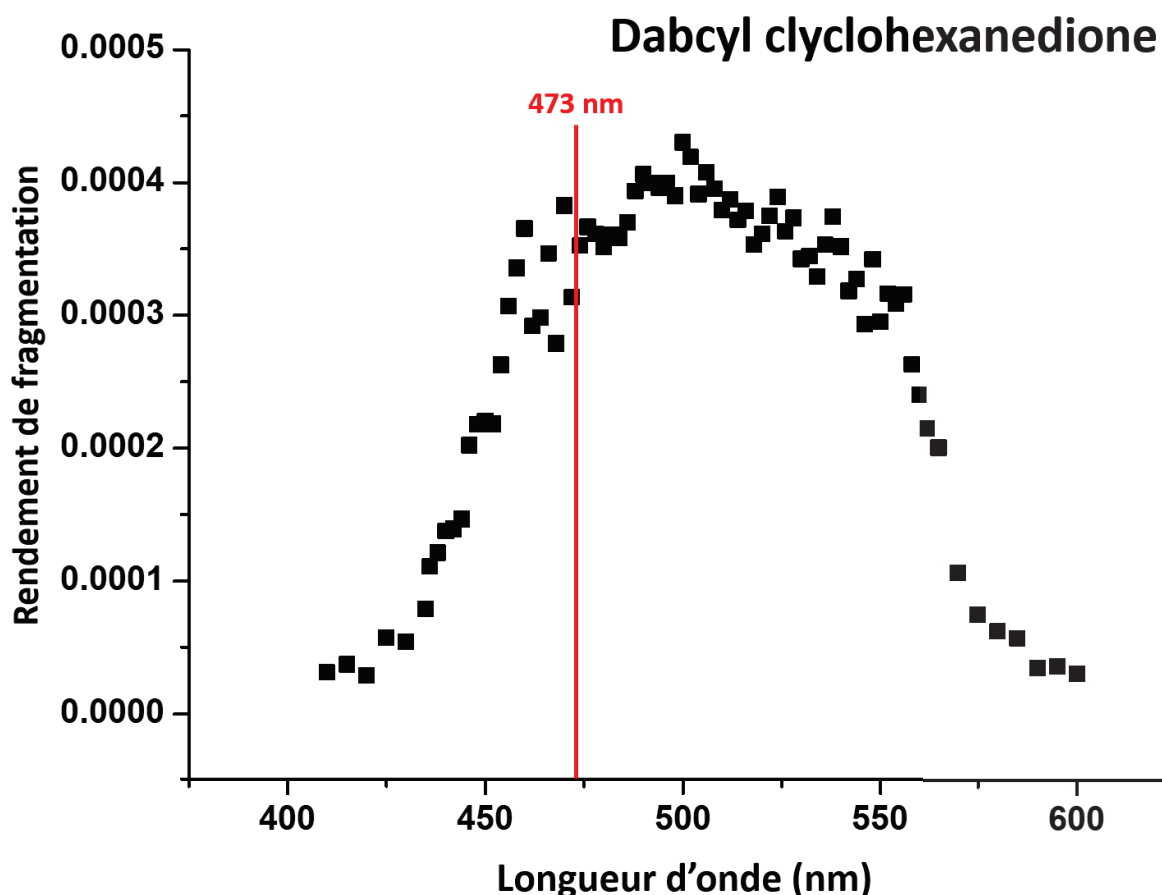
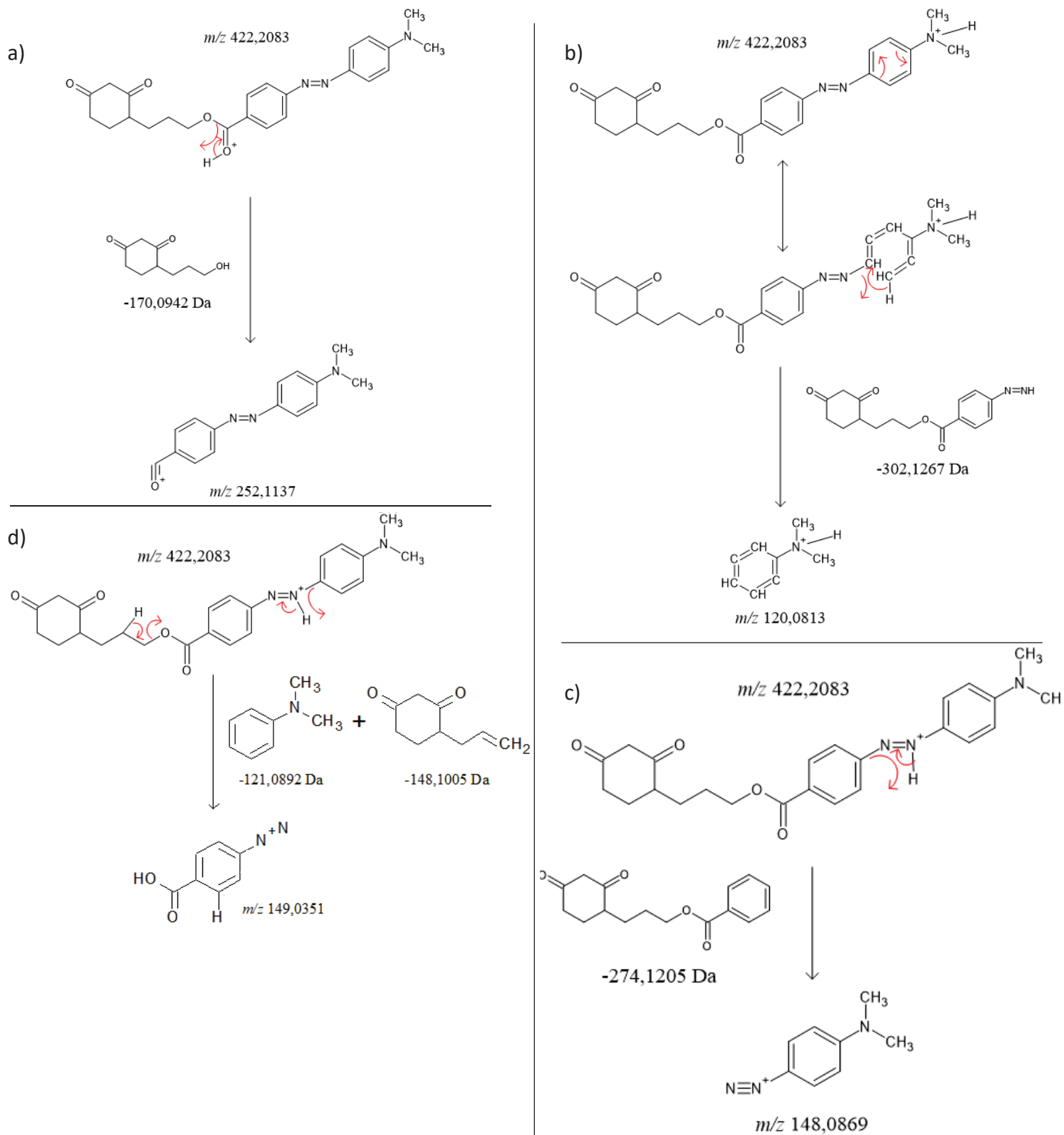


Figure 36: Évolution du rendement de fragmentation du précurseur $[DabDn+H]^+$ en fonction de la longueur d'onde du laser irradiant. La longueur d'onde 473 nm est représentée par un trait rouge.

Avec ρ_{frag} le rendement de fragmentation, I_{frag} et I_{parent} les intensités respectives des ions fragments et parents (U.A), P la puissance du laser (W) à la longueur d'onde λ (nm), a été réalisée sur un spectromètre de masse Velos (Thermofisher) couplé à un laser OPO (Figure 36). Une solution de DabDn dans 100 % MeOH a été ionisée par ESI, le précurseur $[DabDn+H]^+$ sélectionné en masse, piégé puis irradié durant 3 ms dans une trappe linéaire avec un laser OPO pulsé dont la longueur d'onde du faisceau a été variée après chaque acquisition. Le dabcyyl cyclohexanedione fragmente pour des longueurs d'onde comprises entre 425 et 580 nm, avec un plateau maximum de fragmentation entre 470 et 525 nm. La longueur d'onde du laser à 473 nm correspond à un haut rendement de fragmentation et est donc adaptée à la fragmentation LID.

I. 2. b. I. Mécanismes de fragmentation détaillés

Dans cette section sont détaillés les mécanismes de fragmentation proposés pour les principaux fragments du DabDn (Figure 37), comprenant les ions m/z 252,1137 (a), 120,0813 (b), 148,0869 (c), 149,0351 (d), 153,0909 (e), 270,12425 (f) et 139,0759 (g).



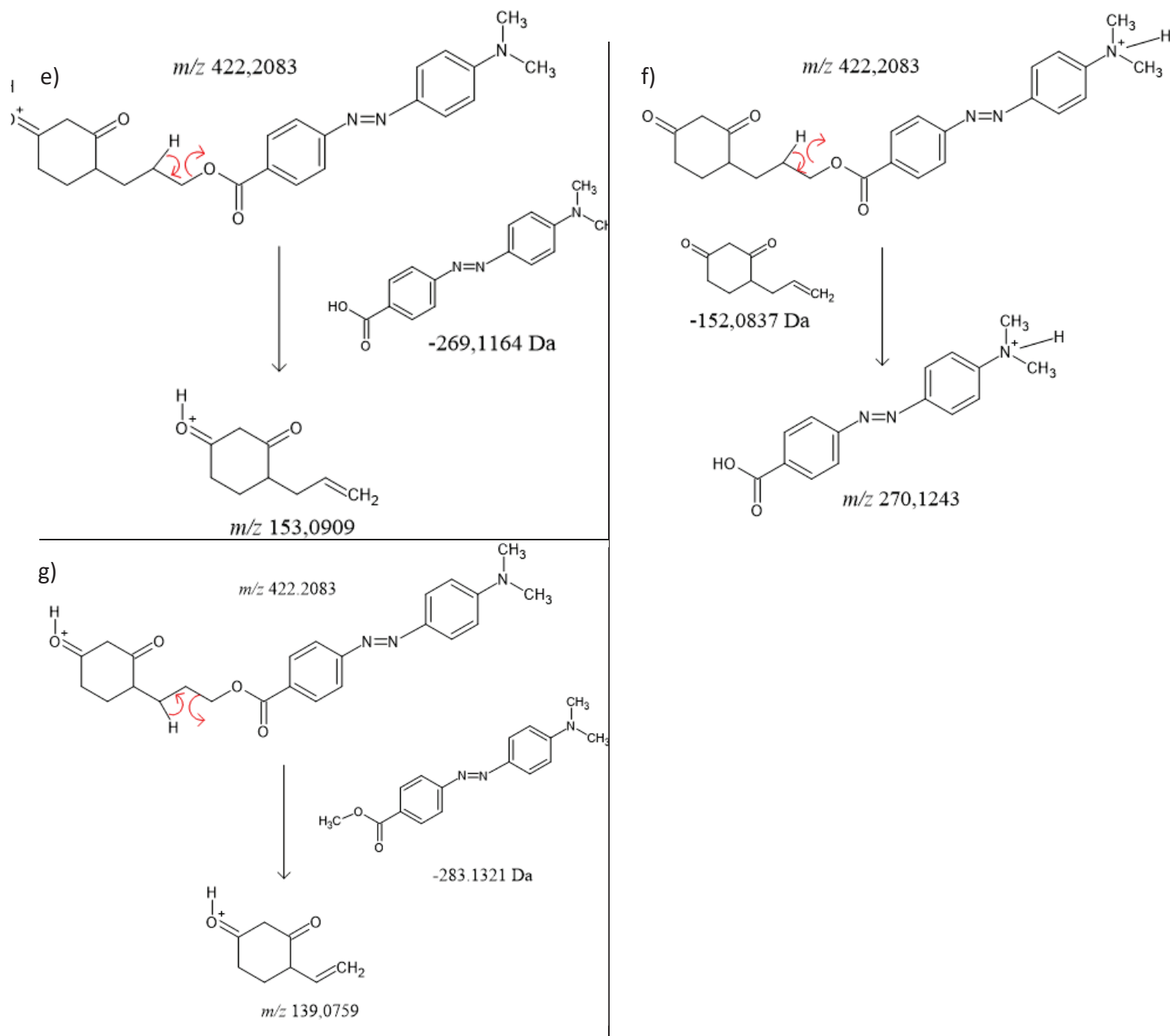


Figure 37: Mécanismes de fragmentation LID du DabDn proposés menant pour la formation des ions a) m/z 252,1137, b) 120,0813, c) 148,0869, d) 149,0351, e) 153,0909, f) 270,1243 et g) 139,0759.

La majorité de ces ions sont des fragments issus du groupement dabcyl du chromophore, ce qui s'explique par le peu de sites du groupement cyclohexanedione sur lesquels le proton labile responsable de la charge positive du chromophore peut se tenir. Si les techniques HCD et LID ont des voies de fragmentation secondaires préférentielles, toutes deux tendent à former majoritairement l'ion m/z 252,1137 où le proton labile est localisé au niveau de la liaison ester du chromophore DabDn.

I. 2. b. II. Temps d'irradiation et énergie de collision dans la cellule HCD

Lors d'une fragmentation HCD, les ions sont conservés dans la cellule HCD durant 3 ms, et l'opérateur ajuste l'énergie de collision de sorte à obtenir le rendement de fragmentation souhaité. Dans le cas d'une fragmentation LID, l'énergie de collision est fixée à 2 eV. Seul le temps d'irradiation des ions permettra d'influer sur la quantité de photons absorbés par le chromophore, et donc sur son rendement de fragmentation. Par ailleurs, si une énergie de 2 eV permet l'entrée des ions dans la cellule HCD sans fragmentation, ces ions sont trop peu accélérés donc trop instables pour pouvoir être correctement piégés longtemps dans la cellule. Dans le cadre d'analyses de peptides dérivés au dabcyll maléimide par LID, l'équipe a déterminé qu'une énergie de 3 eV pour un temps d'irradiation de 25 ms était optimale pour la fragmentation des analytes en LID.²¹³

Ainsi, l'énergie de collision et le temps d'irradiation du chromophore dans la cellule HCD ont dû être optimisés pour assurer une quantité de signal suffisante pour garantir la sensibilité de l'analyse ainsi qu'un rendement de photodissociation suffisamment élevé.

En accord avec la [Figure 38](#), conférer une énergie cinétique de 3 eV à l'ion précurseur $[DabDn+H]^+$ pour entrer dans la cellule HCD induit la détection de plus d'ions qu'avec 2 eV, traduisant une plus grande stabilité des ions sans laser dans la cellule.

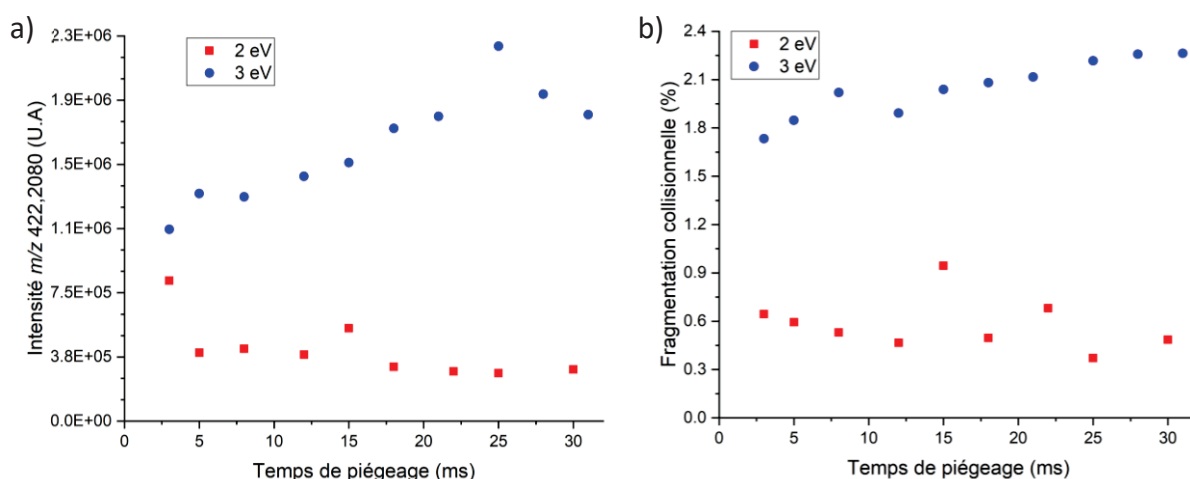


Figure 38: a) Suivi de la quantité d'ions précurseurs $[DabDn+H]^+$ de m/z 422,2080 détectée b) Fragmentation collisionnelle induite par l'accélération de l'ion précurseur $[DabDn+H]^+$ dans la cellule HCD, en fonction du temps de piégeage dans la cellule HCD pour une énergie de collision de 2 eV (rouge) et 3 eV (bleu) sans irradiation laser.

Lorsque l'ion précurseur est accéléré avec une énergie de 2 eV, un temps de piégeage au-delà de 3 ms entraîne une perte d'intensité du signal jusqu'à un plateau minimal atteint à 25 ms. A contrario, un maximum d'intensité est atteint à 25 ms lorsque l'énergie de collision est définie à 3 eV. Un temps de piégeage plus long entraîne une diminution de l'intensité de l'ion m/z 422,20 probablement à cause de la fragmentation collisionnelle de ce dernier (probabilité de collision entre les ions et le gaz de la cellule) bien que les ions entrants soient faiblement accélérés. Le temps de piégeage ne peut donc pas être supérieur à 25 ms.

Si une énergie de collision de 3 eV permet un important gain de sensibilité (facteur 10), l'accélération des ions entraîne une fragmentation par collision qu'il convient de prendre en compte. Le pourcentage d'ions précurseurs fragmentés par collision a été estimé selon la formule suivante :

$$\rho_{fragmentation} = 1 - \left(\frac{I_{422,2080}}{\sum I_{fragments} + I_{422,2080}} \right) * 100$$

Avec $\rho_{fragmentation}$ le rendement de fragmentation (%), $I_{422,2080}$ l'intensité de l'ion précurseur m/z 422,2080 et $I_{fragments}$ l'intensité de tous les ions fragments générés. Ce rendement de fragmentation a été tracé en fonction du temps de piégeage en [Figure 38](#) sans irradiation laser. L'accélération à 3 eV entraîne effectivement une fragmentation collisionnelle plus importante que celle à 2 eV, augmentant avec le temps de piégeage jusqu'à un maximum de 2,3 % à 30 ms. Cette fragmentation se limite à un maximum de 0,9 % à 2 eV, mais fluctue grandement (0,3 à 0,9 %) en raison de l'instabilité des ions dans la cellule pour une telle énergie cinétique.

J'ai étudié l'évolution du rendement de fragmentation de l'ion précurseur (calculé selon la formule précédente) en fonction de son temps de piégeage dans la cellule HCD ([Figure 39](#)). Étant donné que ce rendement est systématiquement supérieur à 98 % lors d'une irradiation avec une puissance du laser de 850 mW, j'ai employé différentes puissances (50 mW et 120 mW) permettant de réduire le rendement de fragmentation et donc d'observer un éventuel effet du temps d'irradiation.

Le rendement de fragmentation de l'ion précurseur augmente de façon non linéaire avec le temps passé dans la cellule de collision pour atteindre un palier de fragmentation supérieur à 99 %. Ce palier est plus rapidement atteint avec une puissance du laser plus importante : avec une puissance laser de 120 mW, 15 ms d'irradiation sont nécessaires pour obtenir 95 % de fragmentation, mais 100 ms sont

nécessaires pour atteindre un rendement de fragmentation de 99 %. Un rendement similaire est obtenu avec seulement 12 ms d'irradiation lorsque la puissance du laser est de 850 mW.

Ainsi, la fragmentation collisionnelle est suffisamment limitée pour garantir la sensibilité des analyses de cette thèse, qui seront donc réalisées avec une énergie de collision de 3 eV. Un temps d'irradiation de 25 ms, pour lequel le taux de fragmentation maximum est déjà atteint, sera également utilisé. Par ailleurs, le temps d'acquisition d'un scan PRM à R=35 000 étant de 128 ms, un temps d'irradiation de 25 ms conjugué à une accumulation de 100 ms permet d'accumuler et fragmenter les ions sans temps mort entre les scans.

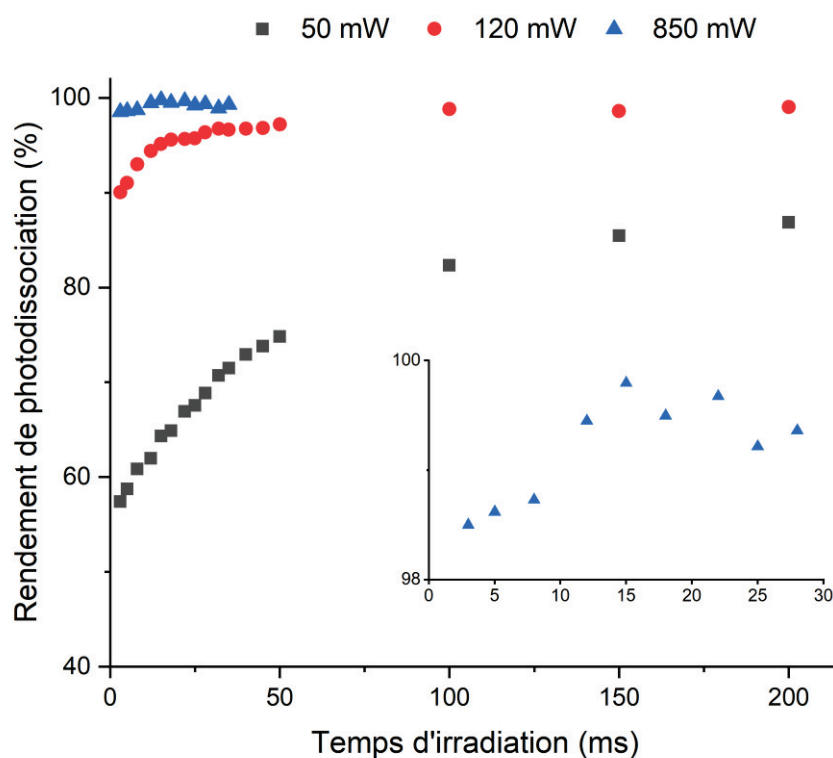


Figure 39: Rendement de fragmentation de l'ion précurseur $[DabDn+H]^+$ en fonction du temps de piégeage dans la cellule HCD lors de son irradiation laser à 473 nm avec une puissance de 50 mW (noir), 120 mW (rouge) et 850 mW (bleu) avec une accélération de 3 eV. Un agrandissement du rendement de fragmentation de l'ion précurseur en fonction du temps d'irradiation à 850 mW est tracé dans le coin inférieur droit de la figure.

I. 2. b. III. Fragmentation en fonction de la puissance du laser

J'ai également étudié le mécanisme de photodissociation du chromophore suite à l'absorption de photons visibles. Si la fragmentation est induite par l'absorption d'un seul photon, alors son rendement de photodissociation dépend directement de la quantité de photons l'irradiant, ce qui se traduit par

une augmentation linéaire du rendement de photodissociation avec l'augmentation de la puissance du faisceau laser. Si ce n'est pas le cas, la fragmentation résulte de l'accumulation d'énergie induite par l'absorption de plusieurs photons. Ceci se traduit par un seuil de fragmentation puis une évolution sigmoïdale du rendement de photodissociation jusqu'à un plateau de saturation avec l'augmentation de la puissance du laser. Le rendement de photodissociation du précurseur $[DabDn+H]^+$ a donc été tracé en fonction de la puissance du laser utilisée (comprise entre 0 et 603 mW), pour des temps d'irradiation de 3 et 25 ms (Figure 40 a).

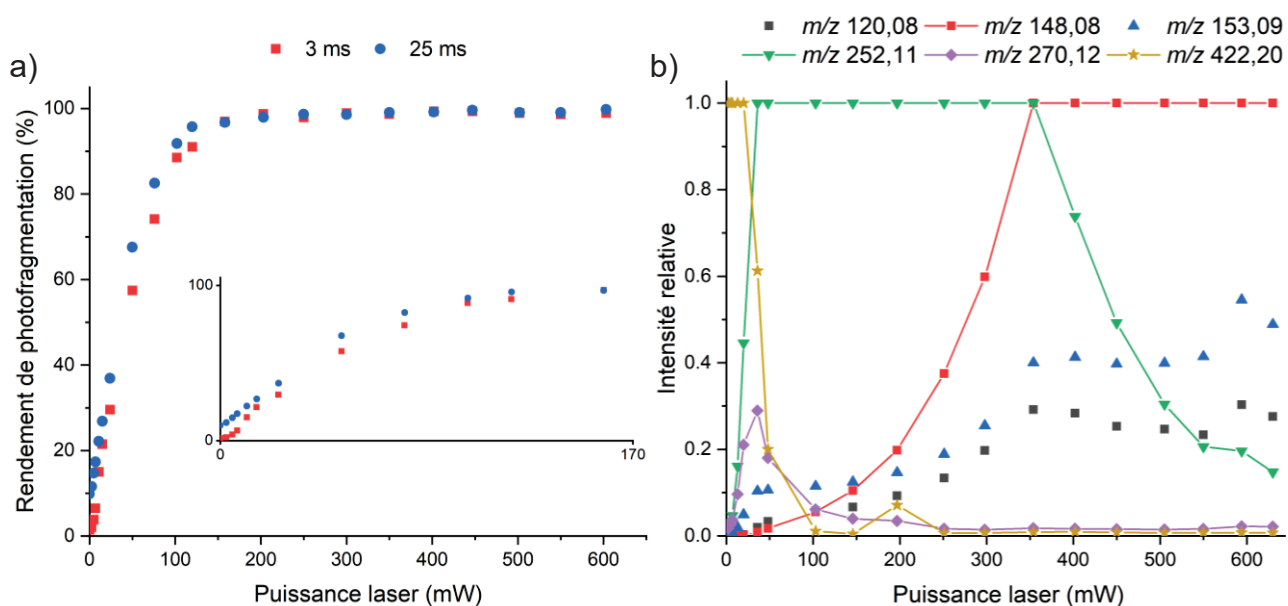


Figure 40: a) Rendement de fragmentation du précurseur $[DabDn+H]^+$ en fonction de la puissance du laser pour un temps d'irradiation de 3 ms (rouge) et 25 ms (bleu). Un agrandissement de cette courbe entre 0 et 170 mW et présenté dans le coin inférieur droit. b) Intensités relatives des ions fragments m/z 120,08 (noir), 148,08 (rouge), 153,09 (bleu), 252,11 (vert) et 270,12 (violet) ainsi que du précurseur m/z 422,20 en fonction de la puissance du laser pour un temps d'irradiation de 25 ms.

Le rendement de photodissociation dépend fortement de la puissance du laser. Tout d'abord, ce rendement augmente légèrement jusqu'à 6, 5% à 3 ms d'irradiation et 17,4 % à 25 ms (également en partie dû à la fragmentation collisionnelle) pour une puissance de 7 mW, puis fortement pour atteindre les 91,0 et 95,7 % à 120 mW. Comme vu précédemment, le rendement de photodissociation est plus important lorsque l'irradiation laser est plus longue pour les plus faibles puissances. À partir de 120 mW, l'augmentation du rendement de fragmentation devient plus douce et la différence de rendement entre les deux temps d'irradiation s'amenuise jusqu'à environ 350 mW avec un rendement de 99 %. Le seuil de photodissociation est rapidement atteint, ce qui limite l'interprétation de la forme

de la courbe bien qu'un léger plateau inférieur puisse être observé entre 0 et 7 mW ainsi qu'un plateau supérieur à partir de 200 mW. Cela indique qu'un mécanisme de fragmentation dû à l'augmentation d'énergie interne au sein du chromophore suite à l'absorption de plusieurs photons semble être à l'œuvre.

L'augmentation de la puissance du laser mène à la déplétion rapide de l'ion précurseur à m/z 422,20 se dissociant en ions fragments m/z 252,11 et m/z 270,12 (Figure 40 b). L'intensité de l'ion m/z 270,12 atteint son maximum à 36 mW pour rapidement décroître au profit des ions m/z 148,08, 120,08 et 153,09, puissance à partir de laquelle l'ion à m/z 252,11 devient l'ion majoritairement formé. L'augmentation de la puissance du laser permet la formation de l'ion m/z 148,08, dont l'intensité égale celle de l'ion à m/z 252,11 à 354 mW. L'intensité relative de l'ion m/z 252,11 chute progressivement avec la puissance du laser tandis que l'ion m/z 140,08 reste l'ion majoritairement formé et que les intensités des ions à m/z 120,08 et 153,12 augmentent légèrement. Un tel croisement des courbes d'intensité relative des ions m/z 252,11 (verte) et 148,08 (rouge) indique clairement que l'ion rapporteur m/z 252,11 est capable d'absorption et de fragmentation secondaire induisant la formation de l'ion m/z 148,08 (l. 2. b. l).

II. Dérivation de peptides à cystéine oxydée (Cys-SOH)

Le chromophore seul présentant un excellent rendement de fragmentation, j'ai ensuite évalué sa capacité à dériver les cystéines oxydées en acides sulféniques de peptides modèles selon la réaction en Figure 41, et à les fragmenter lors de leur analyse en LID.

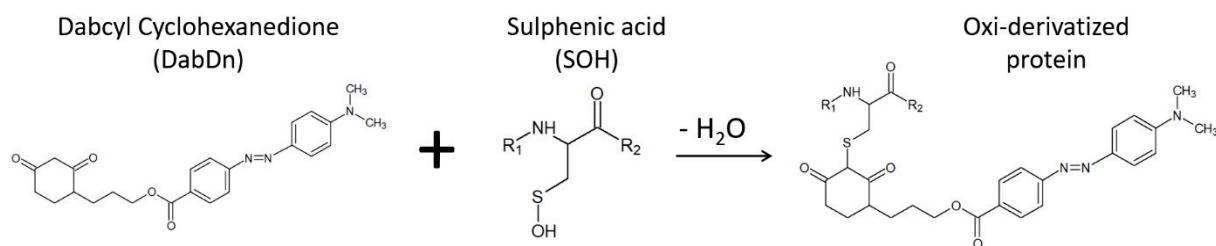


Figure 41: Réaction de dérivation des acides sulféniques par le chromophore dabcyyl cyclohexanedione.

Bien qu'une faible quantité de Cys-SOH peut se former spontanément dans l'échantillon,⁷⁹ j'ai considéré que cette quantité était trop faible pour établir des conclusions quant à la vitesse et au rendement de dérivation des Cys-SOH par le chromophore. En effet, les Cys-SOH ne pouvant être détectés par spectrométrie de masse sans ambiguïté, il est impossible de quantifier directement la proportion de Cys-SOH dérivés. Cette quantification doit donc se faire de façon indirecte, par le suivi de la quantité de DabDn libre dans l'échantillon, dont la variation ne serait pas suffisamment importante pour être établie.

Je présenterai donc au cours de cette partie l'optimisation de l'oxydation des peptides à cystéines uniques en Cys-SOH par H₂O₂ (ROS induisant l'oxydation des Cys-SH et Cys-SOH, cf. [Chapitre I.I. 1](#)) et de leur dérivation par le DabDn (réaction d'oxydérivation), leurs propriétés ainsi que leur fragmentation par LID. L'application de la réaction d'oxydérivation à plusieurs mélanges de peptides complexes sera également présentée.

II. 1. Dérivation des Cys-SOH et fragmentation des peptides dérivés

II. 1. a. Conditions expérimentales : oxydation des Cys-SH libres, dérivation des Cys-SOH et analyse LC-MS/MS

Pour confirmer la dérivation des Cys-SOH avec le chromophore et établir sa spécificité, nous avons sélectionné trois peptides modèles : les peptides LCTVATLR, LGADMEDVCGR contenant une seule cystéine, ainsi que le peptide de référence sans cystéine LGADMEDVR.

Le protocole de préparation est identique pour chaque peptide : les solutions mères de peptides ont été préparées à partir de poudres dissoutes dans H₂O et ramenées à une concentration de 1 mM. L'oxydation des cystéines à SH en SOH est conduite en parallèle de la dérivation des SOH. Pour les réactions de dérivation, un aliquot de 10 µL de peptide a été prélevé, dilué dans 90 µL d'H₂O pour

atteindre une concentration en peptide de 100 μM pour 100 μL . Puis 100 μL de DabDn à 100 μM dans le DMSO ainsi que 100 μL d' H_2O_2 à 100 μM dans l' H_2O sont ajoutés au milieu de réaction pour atteindre un ratio molaire et volumique Cystéine-DabDn- H_2O_2 de 1-1-1, puis la solution est vortexée. Après 8h de réaction, 10 μL de solution sont dilués dans 90 μL d'un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ de 95/5 (v/v) + 0,1 % Acide Formique (A.F) afin de réduire le pourcentage en DMSO de l'échantillon et éviter l'encrassement du spectromètre, puis l'échantillon est placé en vial dans un insert.

Les différentes formes (oxydées, dérivées, intactes) du peptide sont séparées par HPLC avec un système Thermo Accela couplé à une colonne chromatographique Waters Xbridge Peptide BEH C18 (100*2,1 mm, 3,5 μm) au moyen d'un gradient chromatographique linéaire de solvant A : H_2O + 0,1 % A.F et B : ACN + 0,1 % A.F allant de 5 % à 40 % de B en 10 minutes, puis analysés sur un appareil QExactive en mode PRM. La source ESI est chauffée à 320 °C avec une tension de 4 kV et des débits de gaz de 12 et 4 (unités arbitraires) pour permettre l'ionisation du peptide, dont les rapports m/z des formes non oxydées (NO ou $[\text{M}(\text{SH})]^{2+}$), acide sulfinique ($[\text{M}(\text{SO}_2\text{H})]^{2+}$), acide sulfonique ($[\text{M}(\text{SO}_2\text{H})]^{2+}$), oxydérivée ($[\text{M}(\text{SDabDn})]^{3+}$), oxydérivée avec un oxygène supplémentaire ($[\text{M}(\text{SDabDn})+\text{O}]^{3+}$) et dimérisée ($[\text{M}(\text{SS})\text{M}]^{4+}$) sont suivis en parallèle des rapports m/z du chromophore libre et de l'ion rapporteur m/z 252,11 issu de sa fragmentation spécifique. Les analytes ont été accumulés dans la C-trap jusqu'à atteindre une AGC Target de $1 \cdot 10^6$ ou un temps d'accumulation maximum de 100 ms, puis guidés dans la cellule HCD avec une énergie de collision de 3 eV où ils ont été irradiés durant 25 ms à 473 nm, puis finalement injectés dans l'Orbitrap et analysés avec un pouvoir de résolution $R = 35\,000$.

II. 1. b. Formation et caractérisation du peptide LC*TVATLR

Afin de pouvoir distinguer les différents états d'oxydation et dérivaison des peptides, j'ai mis en place une nomenclature spécifique : l'acide aminé d'un peptide oxydé sera noté avec une * (ex. : C*) et sera souligné lorsqu'il sera dérivé au DabDn (ex. : C). Ainsi, les acides aminés oxydés et dérivés seront supplantés d'un astérisque et soulignés dans la séquence peptidique (ex. : C*).

Après réaction d'oxydérivation, un pic correspondant au précurseur triplement protoné $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ du peptide LC*TVATLR, dont la fonction thiol de la cystéine a été oxydée en SOH puis dérivée avec le

chromophore DabDn a été détecté, à m/z 432,564, sélectionné et fragmenté en LID et en HCD ([Figure 42 a\) et b\)](#)). Les deux modes de fragmentation donnent lieu à la génération de l'ion rapporteur du chromophore m/z 252,11 (souligné en orange) et la formation d'ions issus de la séquence peptidique $[y_3]^+$ à $[y_6]^+$ et $[y_6-H_2O]^{2+}$ et de la fragmentation interne du peptide $[TV-H_2O]^+$. Des ions caractéristiques de la rupture de la liaison C_{cystéine}-S $[M-(SDabDn)-H_2O]^{2+}$, $[b_3-(SDabDn)]^+$ (bleu), et $[y_7-(SDabDn)-H_2O]^+$ (bleu) sont également détectés ainsi qu'un ion issu de la perte du groupement dabcyI du chromophore $[b_2-NH_3-269,1]^+$ (violet) résultant d'une rupture après la liaison ester du chromophore (perte d'un groupement de 269,1 Da ([Figure 37 e\)](#)) ou d'une rupture du groupement dabcyI au niveau de la liaison ester (perte de 251,1 Da [Figure 37 a\)](#)) conjuguée à une perte d'H₂O de la chaîne peptidique (perte de 18 Da). La fragmentation LID génère beaucoup moins de fragments que la fragmentation HCD, contrairement à ce qui a été constaté dans l'étude de la fragmentation du chromophore seul ([I. 2. b\)](#)).

Les ions issus du chromophore à m/z 148,08 et 120,08 sont présents en LID, mais totalement absents du spectre de fragmentation HCD, bien que la fragmentation HCD du chromophore seul donne lieu à leur génération. L'inverse est constaté pour le fragment à m/z 270,12, seulement formé en HCD. L'ion à m/z 153,09 est absent des deux spectres, car, à priori, ce dernier serait constitué du groupement cyclohexanedione ([I. 2. b. I e\)](#)) qui est ici greffé au peptide. Les ions de faible occurrence générés lors de la fragmentation du chromophore seul comme ceux à m/z 121,03 et 149,03 ne sont pas non plus observés.

Outre les fragments de m/z 120,08 et 148,08, seul l'ion $[y_6]^{2+}$ est généré uniquement en LID. La HCD, quant à elle, induit la formation du fragment interne $[TV-CO]^+$, des fragments issus de la chaîne peptidique $[b_2]^{2+}$ et $[b_2-NH_3]^{2+}$, $[b_3]^{2+}$, $[b_3-H_2O]^{2+}$ et $[y_7]^{2+}$, qui sont les seuls à inclure la cystéine à SOH dérivé intacte dans leur séquence. Leur double charge provient d'une charge issue de la séquence peptidique et de la charge supplémentaire portée par le chromophore. La HCD produit également deux ions monoprotonés comprenant le chromophore entier : l'ion $[DabDn+H]^+$, et l'ion $[DabDn+S+H]^+$, complémentaire de l'ion $[M-(SDabDn)-H_2O]^{2+}$. La LID privilégie la formation des fragments $[y_6]^+$ et $[y_6-H_2O]^{2+}$; les fragments $[y_3]^+$, $[y_4]^+$ et $[y_5]^+$ représentent respectivement 11, 75 et 30 % de l'intensité de l'ion $[y_6]^+$ contre 16, 80 et 35 % en HCD. Les ions à m/z 252,11 et $[M-(SDabDn)-H_2O]^{2+}$ sont également

beaucoup plus abondants en LID qu'en HCD. Par ailleurs, la fragmentation HCD induit la déplétion complète du précurseur qui est encore détecté en LID ($[M+3H]^{3+}$).

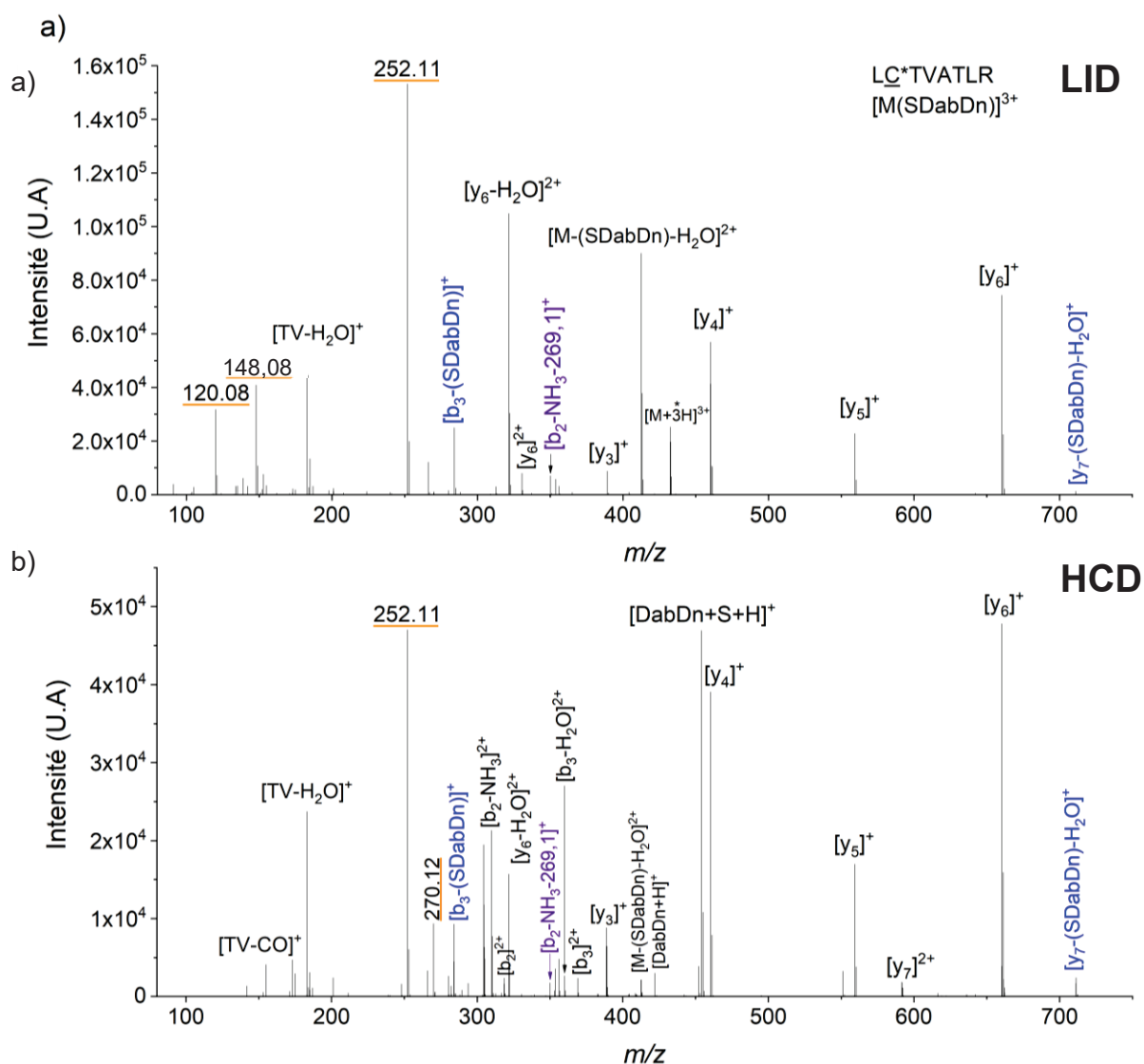


Figure 42: Spectres de fragmentation du précurseur triplement protoné $[M+3H]^{3+}$ du peptide LC*TVATLR a) en LID à 3 eV sous 25 ms d'irradiation à 473 nm avec une puissance de 400 mW et b) en HCD à 24 eV pendant 3 ms.

Le peptide LC*TVATLR présente un rendement de photodissociation de 95 % après 25 ms d'irradiation à 400 mW, assurant la compatibilité de la LID avec l'analyse LC-MS/MS. L'évolution de ce rendement en fonction de la puissance du laser a été retracée en [Figure 43](#).

Le rendement de photodissociation du peptide LC*TVATLR évolue selon une courbe sigmoïdale, très facilement distinguable, dont un agrandissement est tracé dans le coin inférieur droit de la [Figure 43](#).

On peut noter que ce profil de photo-fragmentation en fonction de la puissance du laser ressemble à

ceux obtenus en IRMPD en fonction du temps d'activation.²⁴⁰ Ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle les peptides greffés avec le DabDn fragmenteraient selon un mécanisme d'absorption de

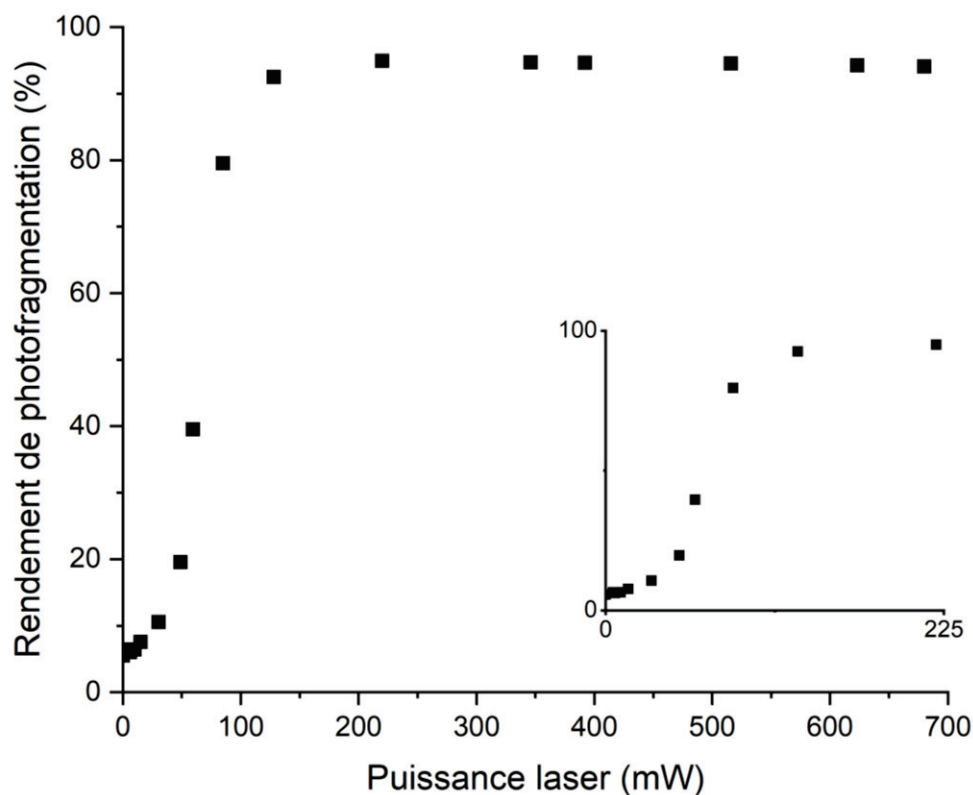


Figure 43: Évolution de rendement de photodissociation du peptide LC*TVATLR en fonction de la puissance du laser irradiant à une longueur d'onde de 473 nm pendant 25 ms.

plusieurs photons. 220 mW sont nécessaires pour atteindre le palier de 95 % de rendement fragmentation du peptide dérivé contrairement au chromophore seul pour lequel ce rendement de photo-fragmentation était obtenu dès 103 mW. Cette différence est due à la taille du composé qui absorbe et fragmente. En effet, pour le peptide greffé, l'énergie absorbée au niveau du chromophore est redistribuée le long de la chaîne peptidique avant fragmentation. L'énergie interne globale du peptide greffé augmente plus lentement que celle du chromophore seul, nécessitant donc une plus grande quantité de photons pour fragmenter.

Les intensités relatives de tous les ions fragments générés issus d'un même spectre LID ont été calculées puis les fragments ont été regroupés selon leur provenance, et les intensités des fragments majoritaires ont été tracées en fonction de la puissance du laser en [Figure 44](#). La fragmentation du précurseur reste rapide malgré la redistribution de l'énergie le long de la chaîne peptidique puisque

les fragments issus de la chaîne peptidique (Figure 44 b) et ceux issus d'une dissociation au niveau du chromophore et de la chaîne peptidique (Figure 44 c) atteignent un palier de génération dès 85 mW. Comme pour la fragmentation du DabDn libre, l'ion m/z 252,11 est le premier ion issu du chromophore à être généré (Figure 44 a) et constitue l'ion fragment majoritairement formé jusqu'à 516 mW. À partir de cette puissance, l'ion $[M-S(DabDn)-H_2O]^{2+}$ (Figure 44 c), ion issu de la rupture de la liaison $C_{\text{cystéine}}-S$ et d'une perte d' H_2O au niveau de la chaîne peptidique devient l'ion le plus abondant, pour être détrôné par l'ion issu de la fragmentation de la chaîne peptidique $[y_6]^+$ (Figure 44 b) avec l'augmentation de la puissance du laser.

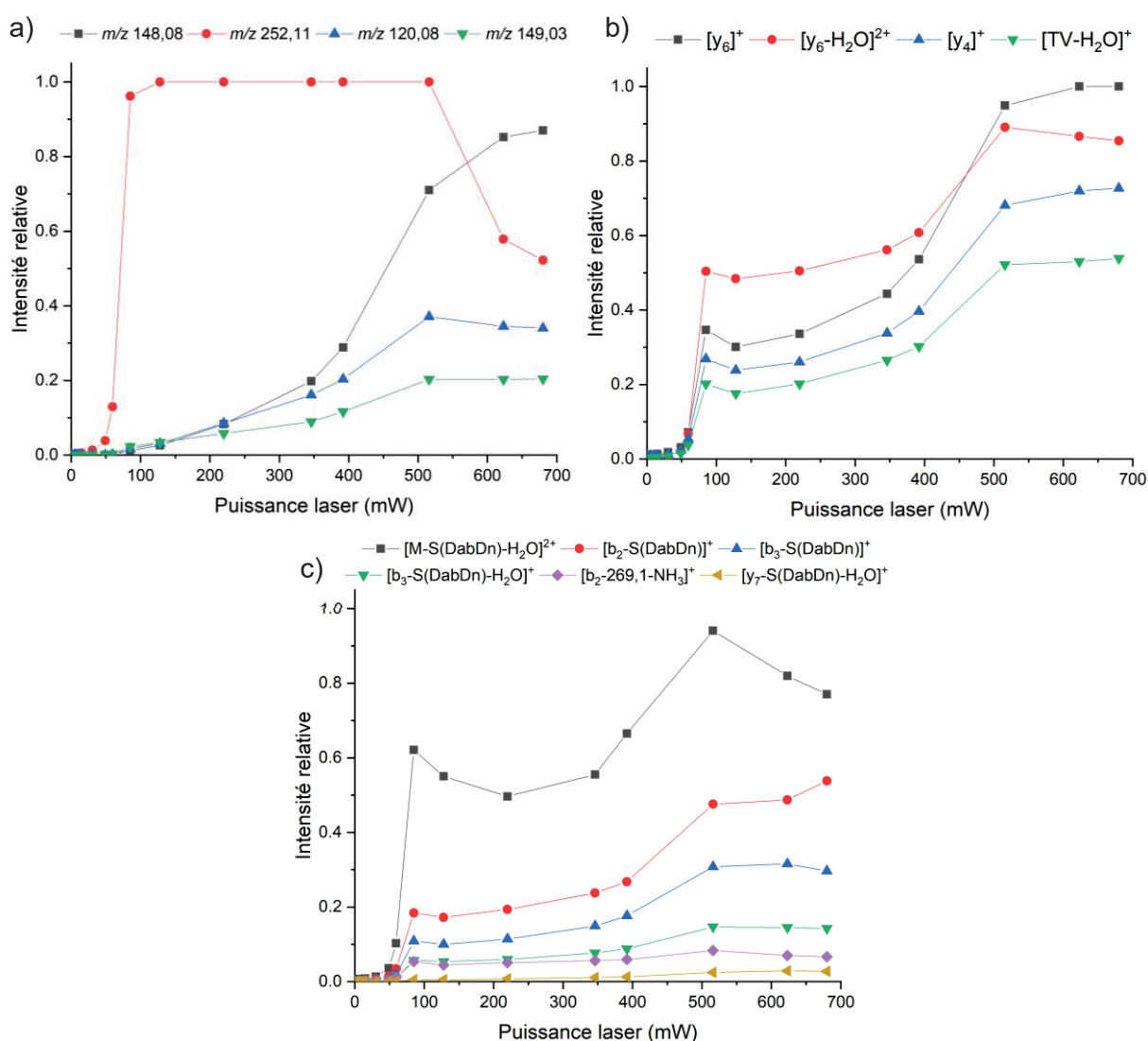


Figure 44: Évolution de l'intensité relative des différents fragments générés par la photodissociation laser du peptide LC*TVATLR à 473 nm pendant 25 ms d'irradiation en fonction de la puissance du laser a) Fragments issus du chromophore b) Fragments issus de la chaîne peptidique c) Fragments issus d'une rupture au niveau la chaîne peptidique et du chromophore.

À noter que, si l'irradiation laser du peptide dérivé induit la dissociation du chromophore et de la chaîne peptidique, l'absence de fragmentation du peptide non oxydé non dérivé $[M(SH)]^{2+}$ (pic à m/z 438,752 correspondant au précurseur doublement protoné $[M+2H]^{2+}$) lorsqu'il est exposé au laser (Figure 45) démontre que ce mode de fragmentation est bien spécifique des seuls peptides à Cys-SOH dérivés avec le chromophore qui absorbent les photons à 473 nm.

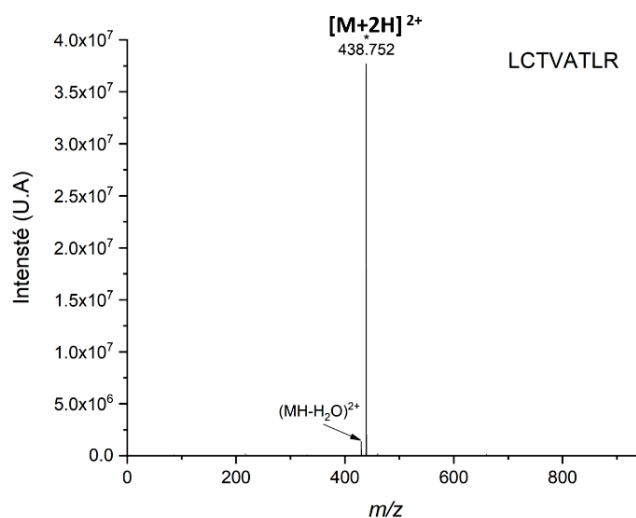


Figure 45: Fragmentation du peptide précurseur $[M(SH)]^{2+}$ du peptide LCTVATLR par LID (3 eV, irradiation 25 ms à 473 nm, 400 mW).

II. 1. c. Différents produits formés

La réactivité d' H_2O_2 est telle qu'il est capable de déclencher un large panel d'oxydations au sein de l'échantillon, dont les figures Figure 46 et Figure 48 sont une illustration : la Figure 46 représente la séparation chromatographique des formes oxydées (dimères, $[M(SS)M]^{4+}$ en rouge) et suroxydées (acides sulfoniques et sulfoniques $[M(SO_2H)]^{2+}$ et $[M(SO_3H)]^{2+}$ respectivement en bleu et vert) du peptide LCTVATLR ($[M(SH)]^{2+}$ en gris) après 9h d'oxydérivation.

Suite à la réaction d'oxydérivation, l'ion $[M(SDabDn)+3H]^{3+}$ est majoritairement détecté, ainsi que deux formes faiblement intenses du peptide oxydérivé comportant un oxygène supplémentaire $[M(SDabDn+O)+3H]^{3+}$, respectivement éluées de la chaîne chromatographique après 14,7 minutes (Figure 46 en bleu ciel) et 15,3 minutes (Figure 46 en or) de séparation.

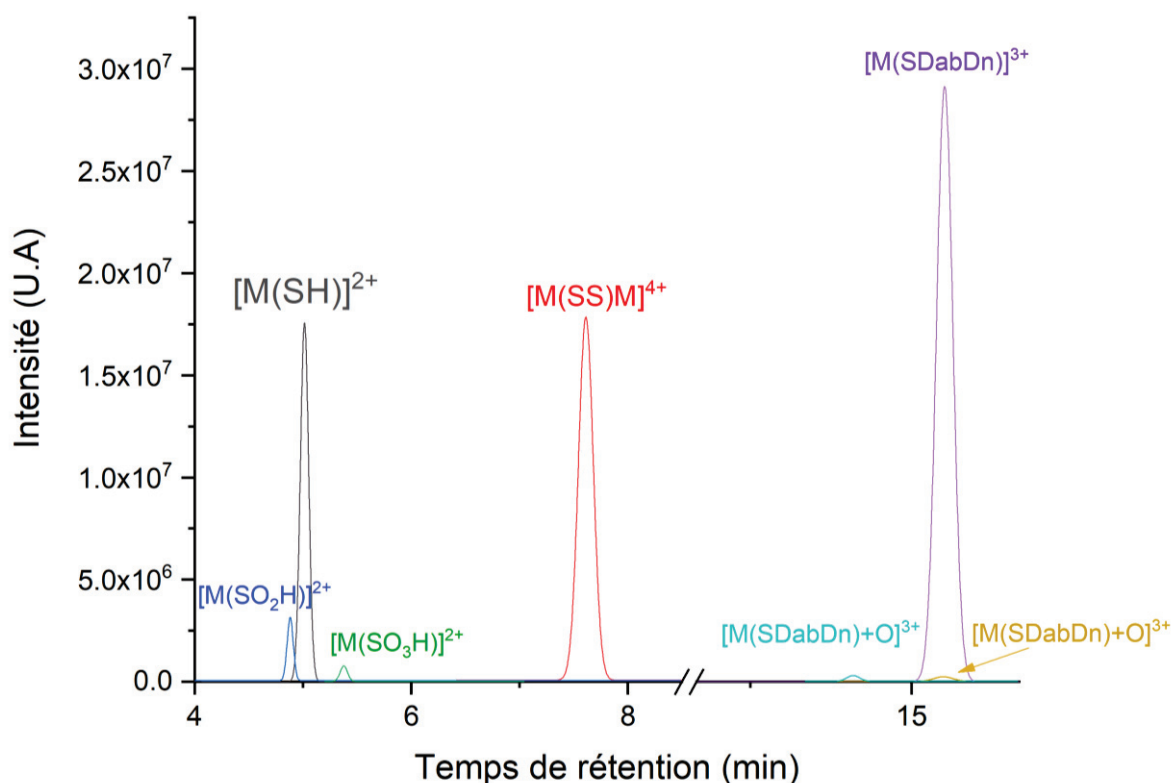


Figure 46: Séparation chromatographique des différentes formes d'oxydation et de dérivation du peptide LCTVATLR après 9h de réaction.

Le spectre de fragmentation du peptide LC^*TVATLR oxydérivé comportant un oxygène supplémentaire élué à $\text{TR} = 14,7$ min (Figure 47 b) permet de localiser la suroxydation au niveau de la chaîne peptidique : les fragments dits « +O » présentent un décalage de m/z 15,99 correspondant à la masse exacte de l'oxygène par rapport aux fragments issus de la chaîne peptidique du peptide LC^*TVATLR non suroxydé (Figure 47 a). Ainsi, la présence du décalage de masse sur le fragment $[\text{M}+\text{O}-\text{S}(\text{DabDn})-\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ indique clairement que l'oxydation se situe sur la chaîne peptidique. L'absence du décalage de masse sur les fragments $[\text{b}_3-(\text{SDabDn})]^+$ et $[\text{b}_3-(\text{SDabDn})-\text{H}_2\text{O}]^+$ ainsi que sur le fragment interne $[\text{TV}-\text{H}_2\text{O}]^+$ indique que l'oxygène supplémentaire n'est pas présent sur les acides aminés LC^*TV du peptide. Les fragments $[\text{y}_6+\text{O}]^+$, $[\text{y}_5+\text{O}]^+$ et $[\text{y}_4+\text{O}]^+$ permettent de confirmer la position de l'oxydation sur la portion C-terminale ATLR du peptide. Malheureusement, l'absence des fragments y_3 , y_2 , y_1 , b_7 , b_6 et b_5 empêche d'identifier plus précisément l'acide aminé oxydé.

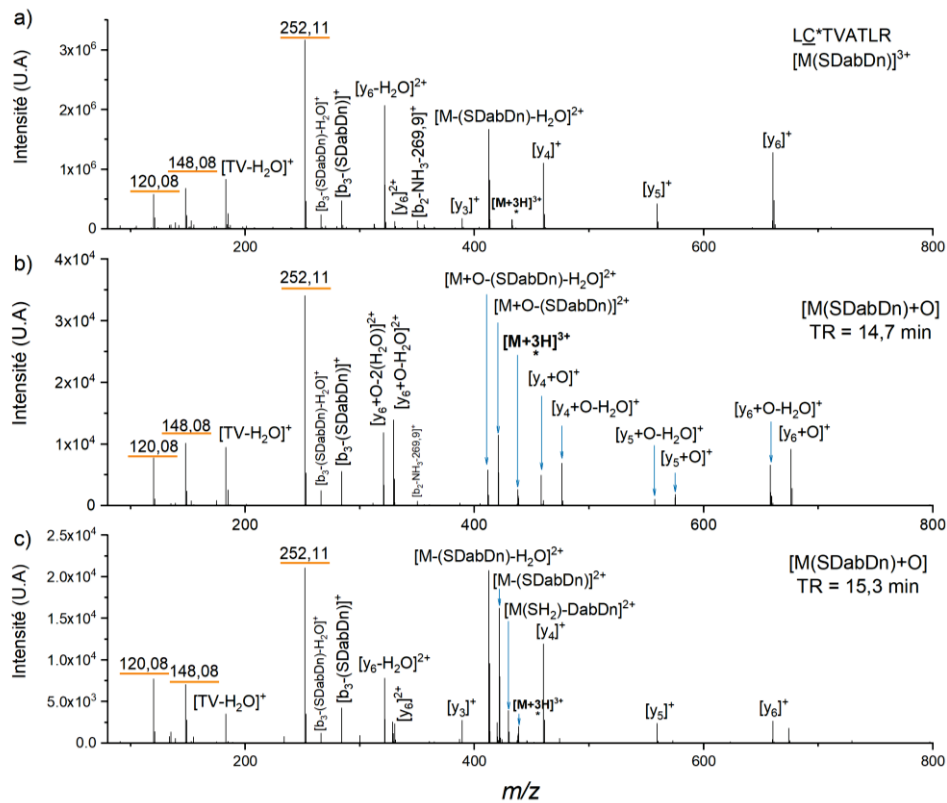


Figure 47: Spectres de fragmentation LID (3 eV 25 ms à 473 nm, 400 mW) du peptide $LC^*TVATLR$ a) oxydérivé $[M(SDabDn)]^{3+}$, b) oxydérivé comportant un oxygène supplémentaire $[M(SDabDn)+O]^{3+}$ élué à 14,7 min, c) oxydérivé comportant un oxygène supplémentaire $[M(SDabDn)+O]^{3+}$ élué à 15,3 min. Les spectres de fragmentation ont été tronqués à un m/z de 800 puisqu'aucun ion n'a été détecté au-delà.

La [Figure 48 a](#)) représente la séparation chromatographique de différentes formes mono-oxydées du peptide après 9h d'oxydération, dont l'acide aminé oxydé (marqué par une *) a été identifié par LC-MS/MS. La forme Cys-SOH, conformément à la littérature (cf. [Chapitre II.I. 1. a. II](#)), n'a jamais pu être détectée. À titre d'exemple est présenté le spectre de fragmentation du peptide $LCTVAT^*LR$ ([Figure 48 b](#)) où la présence des ions $[y_7]^+$ à $[y_3]^+$ présentant un décalage de masse de m/z 15,99 Da (notés « +O »), et des ions $[y_1]^+$ et $[y_2]^+$ sans décalage de masse indique clairement la position de l'oxygène sur l'acide aminé T C-terminal (en position y_3), confirmé par la présence des fragments $[b_2]^+$ à $[b_5]^+$. Le spectre de fragmentation du peptide $LCTVATLR^*$ ([Figure 48 c](#)) est également fourni. La génération d'ions $[b_7]^+$ concomitante à la formation du fragment interne $[TVATL]^+$ permet d'attribuer l'emplacement de l'oxydation sur l'acide aminé R. Les acides aminés L, V, T et R sont donc sensibles à la forte réactivité d' H_2O_2 , induisant des oxydations parasites. Ceci explique la présence du peptide $LC^*TVATLR$ oxydérivé suroxydé $[M(SDabDn)+O]^{3+}$ élué à TR = 14,7 minutes, due à l'oxydation des

acides aminés C-terminaux T, L et R en amont ou en aval de l'oxydation de la cystéine (SH) en SOH et de sa dérivation.

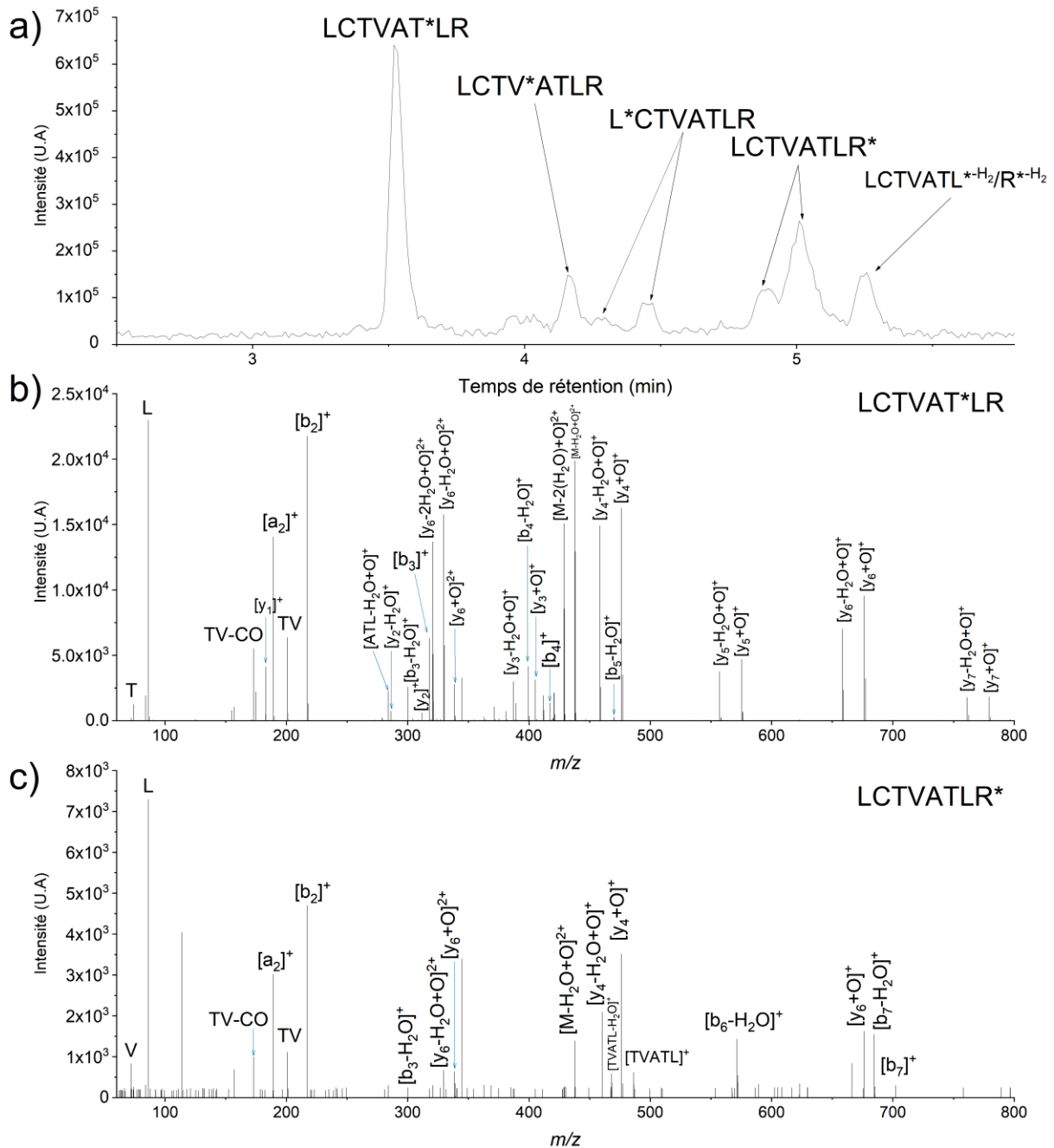


Figure 48: a) Chromatogramme représentant les différentes formes mono-oxydées du peptide LCTVATLR induites par H₂O₂ après 9h de réaction, où * marque l'acide aminé oxydé; b) Spectre de fragmentation HCD (19 eV, 3 ms) du peptide LCTVAT*LR; c) Spectre de fragmentation HCD (19 eV, 3 ms) du peptide LCTVATLR*.

La fragmentation LID du peptide LCTVATLR oxydérivé comprenant un oxygène supplémentaire élué à TR = 15,3 min (Figure 47, c) produit les mêmes fragments de la chaîne peptidique que le peptide

LC*TVATLR ([Figure 47 a](#)) sans décalage de masse de m/z 15,99. La présence du fragment $[M(\text{SH}_2)\text{-DabDn}]^{2+}$ montre que le soufre de la cystéine ne contient pas d'oxygène donc que la cystéine dérivée était bien une cystéine oxydée en SOH et non pas en SO_2H . Ces observations indiqueraient que l'oxydation se situe au niveau du chromophore DabDn. La présence de l'ion rapporteur à m/z 252,11 et des ions de m/z 120,08 et 148,08 impliquerait que l'oxydation n'a pas eu lieu au niveau du groupement dabcyL. L'absence du fragment $[\text{b}_3\text{-NH}_3\text{-269,9}]^+$ semblerait indiquer une oxydation sur le groupement cyclohexanedione.

Afin de confirmer que le peptide LC*TVATLR oxydérivé suroxydé élué à 15,3 min soit le résultat d'une oxydation du chromophore par H_2O_2 plutôt que de la dérivation d'une cystéine oxydée en SO_2H , j'ai comparé l'évolution des quantités de $[M(\text{SO}_2\text{H})]^{2+}$ et de $[M(\text{SDabDn})+\text{O}]^{3+}$ TR = 15,3 formées au cours de la réaction d'oxydation, présentée en [Figure 49](#).

L'augmentation constante de leurs quantités formées respectives suggère que les deux phénomènes sont indépendants : la formation de $[M(\text{SO}_2\text{H})]^{2+}$ est probablement liée à l'oxydation de Cys-SOH libres par H_2O_2 et la formation de $[M(\text{SDabDn})+\text{O}]^{3+}$ à la dérivation d'une cystéine SOH par un chromophore oxydé comme établi précédemment.

Selon la littérature (cf. [Chapitre II.I. 2. b. I](#)), les dimédones ne réagissent pas avec les acides sulfiniques (SO_2H), mais peuvent réagir avec H_2O_2 lorsqu'il est en large excès (>10 eq. molaires), ce qui rejoint mes conclusions quant à l'attribution d'oxydations supplémentaires sur la chaîne peptidique ou sur le chromophore expliquant la détection des peptides oxydérivés possédant un oxygène supplémentaire $[M(\text{SDabDn})+\text{O}]^{3+}$: la présence d' H_2O_2 induit de divers acides aminés du peptide ainsi que celle du groupement cyclohexanedione du chromophore, et ce sans perturber sa réactivité avec les Cys-SOH.

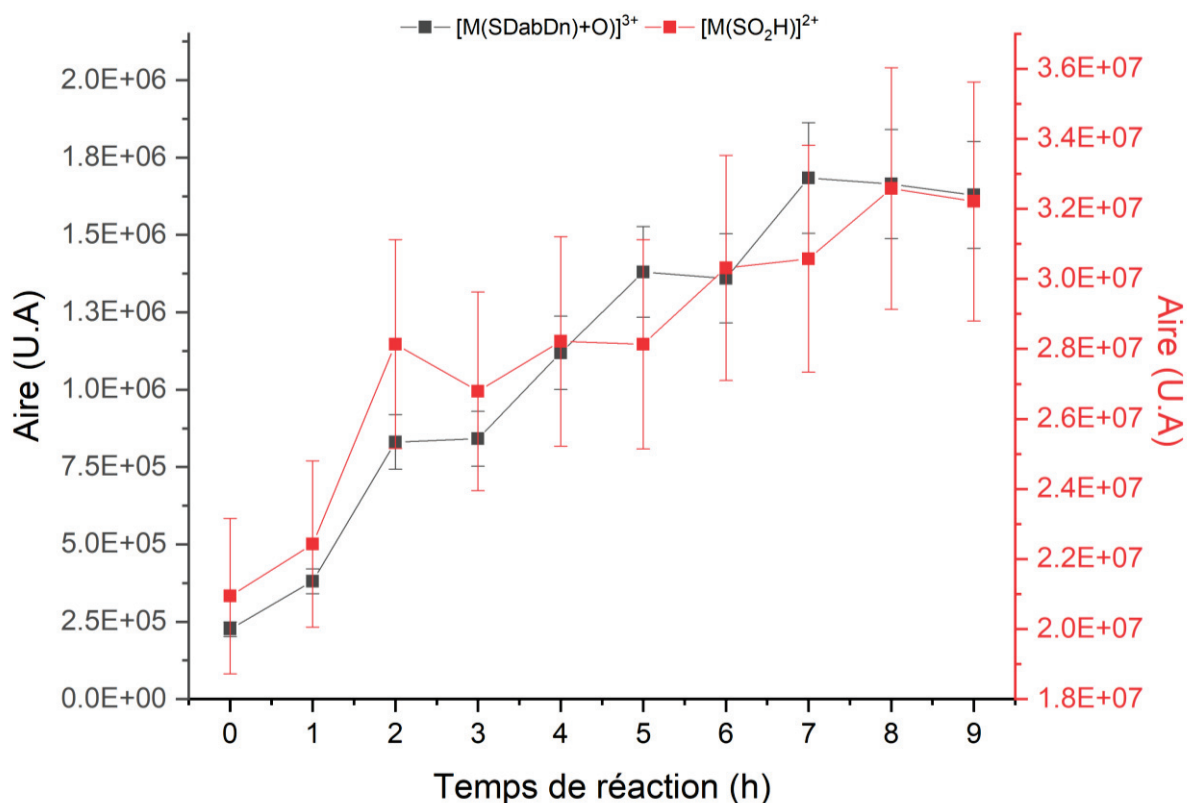


Figure 49: Évolution de la quantité de peptide suroxydé en $[M(SO_2H)]^{2+}$ (noir) et oxydérivé suroxydé en $[M(SDabDn)+O]^{3+}$ (rouge) en fonction du temps de réaction en présence d' H_2O_2 et de DabDn.

À noter qu'aucun pic correspondant aux versions $[M(SDabDn+2O)+3H]^{3+}$ et $[M(SDabDn+3O)+3H]^{3+}$ n'a été détecté.

II. 1. d. Spécificité de la réaction du DabDn

J'ai ensuite cherché à confirmer la spécificité de la réaction DabDn-SOH grâce aux peptides LGADMEDVR et LGADMEDVCGR, possédant tous deux une méthionine (seul autre acide aminé sulfuré, celui-ci étant inclus dans une fonction thioéther (R-S-R) facilement oxydable en sulfoxyde (R-(S=O)-R).

Après oxydation de la méthionine et réaction avec le DabDn, seul un pic correspondant au précurseur $[M+2H]^{2+}$ du peptide LGADM*EDVR oxydé (identifié par fragmentation HCD, [Figure 50 a](#)) est observé ([Figure 50 b](#)). Aucun signal correspondant au précurseur oxydé dérivé $[M+3H]^{3+}$ (m/z 457,556) n'a pu être détecté, démontrant l'absence d'affinité de réaction entre le groupement sulfoxyde de la méthionine et la fonction cyclohexanedione du DabDn.

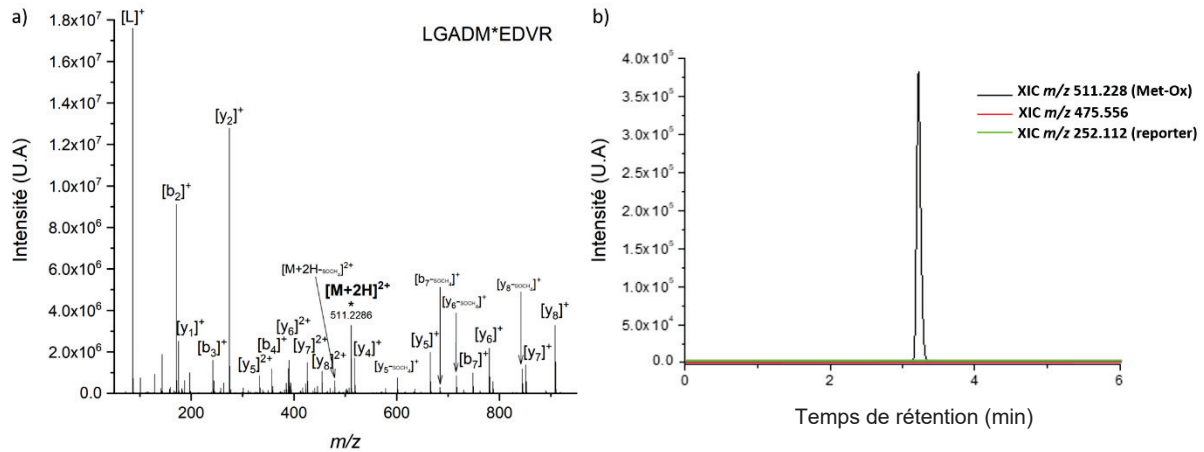


Figure 50: a) Schéma de fragmentation HCD (19 eV, 3 ms) du peptide LGADM*EDVR à méthionine oxydée b) Chromatogramme représentant l'Extracted Ion Current (XIC) des rapports m/z de l'ion précurseur du peptide à méthionine oxydée (noir), à méthionine oxydérivée (rouge) et de l'ion rapporteur issu de la fragmentation du chromophore (vert).

Le DabDn ne dérivant pas les méthionines seules, j'ai tenu à vérifier s'il était possible d'observer la dérivation de cystéine oxydée d'un peptide comprenant une méthionine elle aussi oxydée.

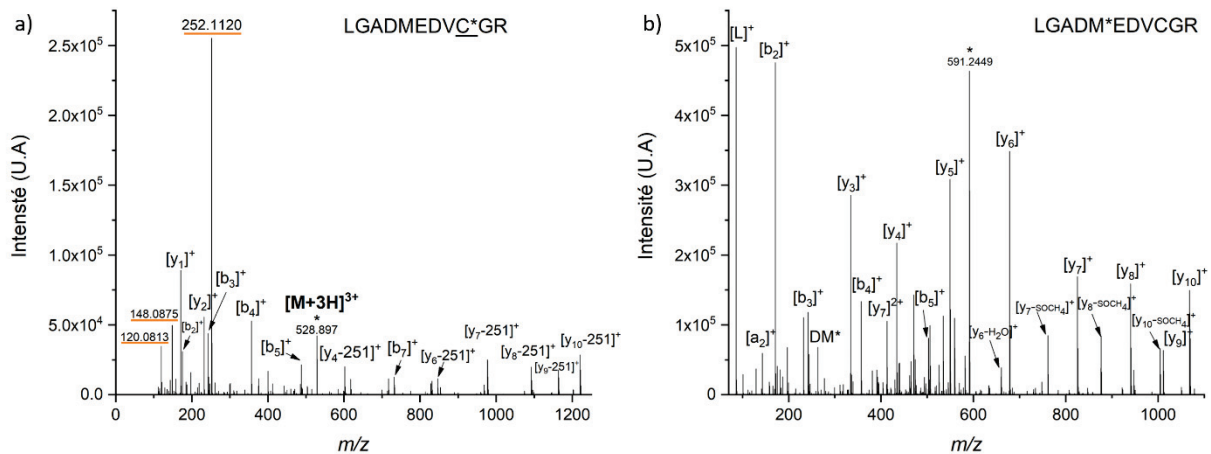


Figure 51: a) Spectre de fragmentation LID (3 eV, 25 ms à 473 nm, 400 mW) du peptide LGADMEDVC*GR b) Spectre de fragmentation HCD du peptide LGADM*EDVCGR (19 eV, 3 ms).

De même que précédemment, le peptide LGADMEDVCGR a été oxydé puis exposé au DabDn. Un pic à m/z 528,897 correspondant au précurseur triplement protoné $[M+3H]^{3+}$ du peptide LGADMEDVC*GR oxydérivé est détecté et se fragmente avec un rendement de photo-fragmentation de 95,7 % lorsqu'il est exposé au laser (Figure 51 a). La présence de l'ion rapporteur m/z 252,1114 et des ions de m/z 148,0875 et 120,0813 concomitante à la génération d'ions b et y confirme la présence du

chromophore. De plus, un plus grand nombre de fragments b est généré ($[b_2]^+$ à $[b_8]^+$), seuls les fragments $[y_1]^+$ et $[y_2]^+$ étant présents. La rupture de la chaîne peptidique semble donc dépendre de la position de la cystéine. La cystéine oxydérivée proche du C-term favorise la génération d'ions b tandis que la localisation proche du N-term induit la formation d'ions y.

Dans le cas présent, des ions y monochargés ayant subi une perte de neutre de 251,1059 Da correspondant à la perte du groupement dabcyI du chromophore au niveau de la liaison ester (cf. fragment m/z 252 [Figure 34](#)) sont observés et couvrent une grande partie de la séquence peptidique (y_3 à y_{10}). La couverture de séquence offerte par la quantité d'ions b, y et y-251 permet de confirmer l'oxydation et la dérivation de la cystéine oxydée et non pas de la méthionine. Cependant, la multiplication des ions fragments induit une diminution de leur signal, qui pourrait s'avérer problématique lors de l'analyse de peptides endogènes faiblement concentrés.

Un pic de m/z 591,2449 correspondant au précurseur $[M+2H]^{2+}$ du peptide LGADM*EDVCGR à méthionine oxydée a été observé et fragmenté en HCD ([Figure 51 b](#)). Par ailleurs, aucun pic correspondant au peptide LGADM*EDVC*GR à cystéine oxydérivée et méthionine oxydée n'a pu être identifié.

Seul le peptide à cystéine oxydérivée ayant été détecté malgré la présence d'une importante quantité de peptide à méthionine oxydée tend à démontrer la spécificité de la réaction du DabDn envers les groupements SOH des cystéines oxydées.

II. 2. Optimisation de la réaction d'oxydérivation

II. 2. a. Paramètres d'optimisation

La dérivation des SOH des cystéines ainsi que la fragmentation des peptides dérivés ayant été réalisées avec succès de façon spécifique, j'ai cherché à optimiser la réaction d'oxydérivation. Cette optimisation restera sommaire, son objectif n'étant pas d'obtenir un rendement d'oxydérivation total des peptides

à cystéines, mais de comprendre les mécanismes de dérivation en jeu pour faciliter les futures manipulations visant à dériver les cystéines oxydées endogènes d'échantillons biologiques complexes.

Trois paramètres ont premièrement été évalués :

Le ratio molaire d'H₂O₂ : Les ratios molaires cystéine-H₂O₂ de 1-1 et 1-10 ont été choisis pour limiter les suroxydations des peptides (au niveau des cystéines ou de la chaîne peptidique) ainsi que des réactions parasites entre H₂O₂ et les dimédones (chromophore) pouvant survenir au-delà d'un ratio H₂O₂-dimédone de 10-1 selon la littérature (cf. [Chapitre II.I. 2. b. I](#))).

Le pourcentage de phase organique du milieu de réaction (%_{org}) : Les groupes fonctionnels d'une Cys-SOH peuvent établir des interactions non-liantes avec les molécules d'eau environnantes (1, 2 et 3 molécules). La barrière d'activation de la réaction entre une Cys-SOH et une dimédone est abaissée d'un facteur 2 en présence d'une et trois molécules d'H₂O, et d'un facteur 2,5 voire 3 avec deux molécules d'H₂O aidant à la formation d'une structure de transition qui facilite le transfert du proton depuis la dimédone.⁸¹ Ainsi, un solvant réactionnel comportant deux molécules d'eau pour une molécule tierce (soit 33%_{org}) permettrait d'abaisser la barrière d'activation de la réaction de dérivation et ainsi d'atteindre un meilleur rendement de dérivation.

Cependant, le DabDn étant insoluble dans l'eau, une trop faible quantité de phase organique conduira à sa précipitation. L'utilisation de 25%_{org} conduit à la précipitation partielle du DabDn dans le milieu de réaction. Ainsi seules les conditions 33%_{org} et 50%_{org} ont été prises en compte en accord avec la littérature.

Le solvant organique employé (S_{org}) : Le méthanol et l'acétonitrile sont les deux solvants organiques les plus employés en spectrométrie de masse en raison de leur grande volatilité (P_{sat} à 20 °C respectives de 12,9²⁴¹ et 9,9 kPa²⁴²) qui facilite l'ionisation des ions sans polluer l'environnement. Toutefois, la solubilité du DabDn dans ces solvants est limitée. Le DMSO quant à lui est un solvant organique dans lequel le DabDn est bien plus soluble, mais son utilisation en spectrométrie de masse est déconseillée ou à utiliser avec prudence, ce dernier étant peu volatil (P_{sat} à 20 °C = 59 Pa²⁴³), nuisant donc à l'efficacité d'ionisation de la source ESI (cf. [Annexe I page 263](#)) tout en étant difficile à nettoyer de l'appareil.

L'emploi d'acétonitrile au cours de mes expérimentations préliminaires n'a mené qu'à une absence ou une production faible de peptide dérivé, ce solvant a donc été écarté de la liste des potentiels solvants de réaction, mais a été conservé en tant solvant de reprise pour stopper la réaction d'oxydérivation.

Un quatrième paramètre potentiel, le ratio molaire de DabDn, a fait l'objet d'une évaluation séparée (cf. [II. 3](#)). Ce chromophore étant fabriqué à façon par l'équipe de M. Bretonniere, il n'est disponible qu'en quantité limitée, avec des délais de synthèse qui peuvent être relativement longs et peu prévisibles. Ne cherchant pas à obtenir le meilleur rendement d'oxydérivation, mais à comprendre les mécanismes en jeu, j'ai choisi de ne pas inclure d'expérimentations impliquant un emploi excessif de DabDn, ce qui m'a mené à conduire une étude séparée. Ainsi, j'ai utilisé pour l'optimisation à trois facteurs un ratio molaire cystéine-DabDn de 1-1 permettant de virtuellement dériver tous les peptides si toutes les cystéines venaient à être oxydées en SOH.

J'ai choisi de réaliser cette optimisation sous forme d'étude cinétique de la réaction d'oxydérivation. La vitesse d'oxydation des Cys-SH par H_2O_2 étant très rapide (10^7 s^{-1}),⁷⁸ la vitesse de réaction entre Cys-SOH et le groupement cyclohexanedione est le paramètre limitant de la réaction d'oxydérivation, possiblement impactée par les conditions $\%_{\text{org}}$ et S_{org} . Ainsi, la comparaison des rendements de dérivation au fur et à mesure de la réaction permettra de statuer sur un optimum entre les différents paramètres évoqués plus haut et le temps de réaction.

L'optimisation ne s'est portée que sur le peptide LCTVATLR (LR8), présentant le meilleur rendement de photofragmentation ainsi que des fragments caractéristiques intenses.

II. 2. b. Protocole d'optimisation de la réaction d'oxydérivation

Le protocole de dérivation est similaire à celui défini en [II. 1. a](#), adapté pour les conditions suivantes : 50%_{org} : les 100 μL de DabDn dans le solvant sont dilués par 100 μL de solvant correspondant puis ajoutés au milieu réactionnel.

Ratio cystéine- H_2O_2 1-10 : la concentration d' H_2O_2 est fixée à 1 mM dans H_2O .

Méthanol : le DabDn est dissous dans le MeOH de façon à atteindre une concentration de 100 μ M dans MeOH.

L'optimisation s'est déroulée sur deux jours, le premier jour étant consacré à l'analyse des variations du protocole avec un ratio Cystéine-H₂O₂ de 1-1, le second jour à l'analyse des variations du protocole avec un ratio Cystéine-H₂O₂ de 1-10.

Une fois réalisés, les échantillons sont pipetés, mis en vial et directement analysés à T0 puis une fois par heure pendant 7 heures. Les différentes conditions sont préparées à 15 minutes d'intervalle pour permettre le prélèvement et l'analyse des quatre conditions une fois par heure. Un point supplémentaire a été réalisé après 24h de réaction, les horaires d'ouverture du laboratoire ne permettant pas de manipuler entre ces deux marqueurs de temps. L'échantillon de ratio molaire cystéine-DabDn-H₂O₂ 1-1-1 dans 33 % de DMSO ayant réagi pendant 7h a ensuite été analysé 3 fois supplémentaires pour obtenir une répétabilité analytique.

II. 2. c. Résultats

Les aires des pics chromatographiques de l'ion précurseur [M+3H]⁺ de chaque échantillon sont tracées en [Figure 52](#), auxquelles a été appliqué sous forme de barres d'erreur le coefficient de variation calculé grâce à la répétabilité analytique. L'emploi de DMSO (données noires) permet la dérivation d'un plus grand nombre de peptides à Cys-SOH que le MeOH (données bleues), dû à une meilleure solubilité du DabDn dans le DMSO et la formation de liaisons hydrogène parasites dues au MeOH. Pour les deux solvants, un milieu de réaction constitué à 33 % de phase organique est plus favorable à la dérivation des Cys-SOH, grâce à la présence de deux molécules d'H₂O dans le milieu, en accord avec la littérature.⁸¹

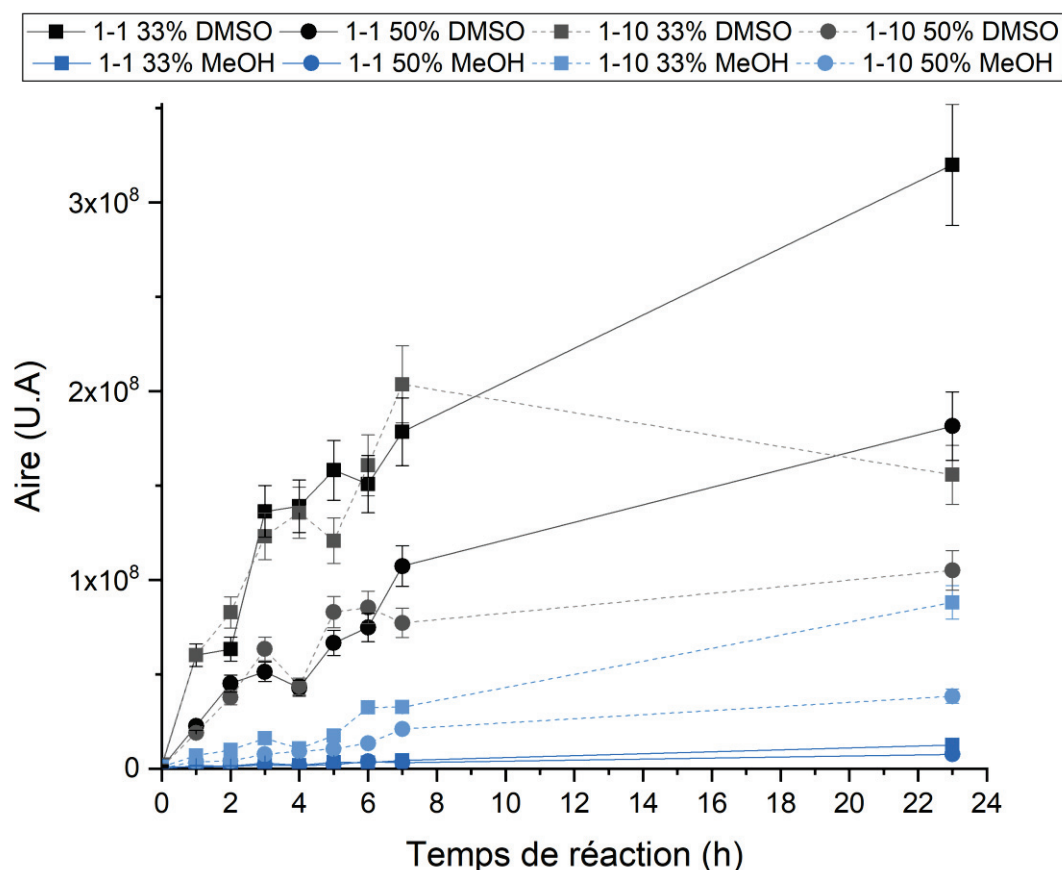


Figure 52: Évolution de la quantité de peptide LC*TVATLR oxydérivé sur 24h en fonction du solvant (Bleu - MeOH ; Noir - DMSO), du pourcentage de phase organique (Carré : 33 % de phase organique ; Rond : 50 %) et du ratio molaire cystéine-H₂O₂ (Foncé : ratio 1-1 ; clair : ratio 1-10).

L'emploi d'un ratio de cystéine-H₂O₂ de 1-10 ou 1-1 ne semble pas avoir d'impact significatif sur la quantité de peptides oxydérivés jusqu'à 7h de réaction. La réaction d'oxydérivation continue au-delà de 24h pour un ratio de 1-1 tandis qu'elle tend à diminuer avec un ratio de 1-10. J'ai pu constater, en parallèle de cette chute, une élévation de la quantité de peptides oxydérivés suroxydés ([M(SDabDn)+O]³⁺), menant à penser qu'une suroxydation parasitaire liée à l'action d'H₂O₂ pourrait être en jeu. Cependant, l'augmentation de la quantité de peptides dérivés au-delà de 7h n'est pas suffisamment importante pour justifier 17h de réaction supplémentaire. L'utilisation d'un ratio de 1-10 stimulant la génération de peptides oxydérivés suroxydés en parallèle de la dérivation des Cys-SOH avec celle des autres formes d'oxydation (SO₂H, SO₃H, dimères), l'emploi d'un ratio cystéine-H₂O₂ de 1-1 m'a paru plus optimal.

Ainsi, la réaction d'oxydérivation permet un rendement de dérivation maximal lorsque le milieu réactionnel comprend 33 % de DMSO avec un ratio cystéine-H₂O₂ de 1-1.

De façon à obtenir une sensibilité optimale lors de l'analyse, j'ai étudié l'influence du pourcentage en ACN du solvant de dilution utilisé lors de la mise en vial (Figure 53). Pour cela, quatre échantillons ont été préparés avec les conditions optimales selon le protocole en II. 2. b à 15 minutes d'intervalle puis respectivement dilués dans des solutions de 60/40, 70/30, 80/20 et 95/5 d'H₂O/ACN (v/v) + 0,1 % A.F. L'augmentation du pourcentage d'ACN dans le solvant de dilution (courbes bleues, rouges et noires) mène à une plus grande quantité de peptide oxydérivé détectée qu'avec le pourcentage initial utilisé (courbe verte). 30 % d'ACN dans le solvant permettent une détection optimale de la quantité de peptide oxydérivé jusqu'à la phase de plateau où l'optimum est atteint avec 20 % d'ACN, puis les deux paramètres ne sont plus distinguables au-delà de 6h. Les différents solvants n'entraînant pas d'élargissement du pic (contrôlé par sa largeur à mi-hauteur) ni d'étalement lié à une dispersion externe, j'ai choisi d'employer un solvant composé de 70/30 H₂O/ACN + 0,1 % A.F, pourcentage médian entre les conditions 60/40 et 80/20.

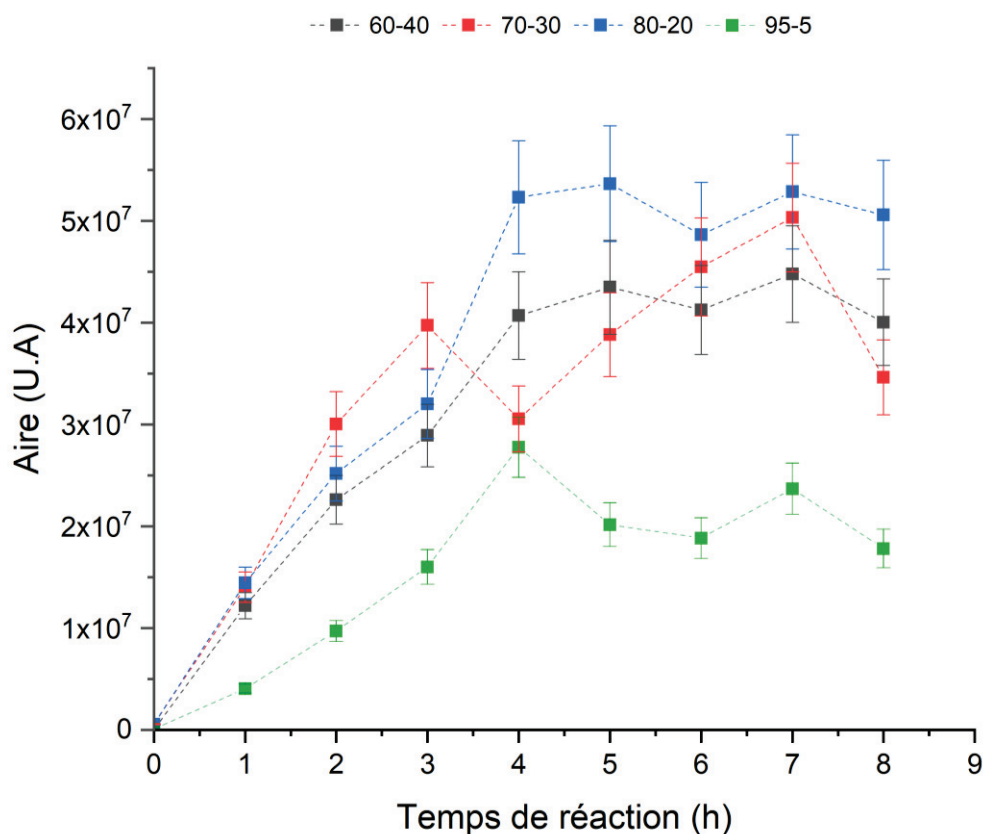


Figure 53: Évolution de la quantité de peptide LC*TVATLR oxydérivé détectée en fonction du solvant de dilution, exprimée en H₂O-ACN (v/v).

Une fois les principaux paramètres optimisés, j'ai tenu à vérifier l'impact de deux paramètres supplémentaires qui devront être pris en compte lors de la dérivation des Cys-SOH protéiques et endogènes à un échantillon biologique : la température et le pH du milieu de réaction. La digestion des protéines en peptides se fait à 37 °C sur plusieurs heures, il est donc nécessaire de savoir si une telle température est délétère pour la stabilité du chromophore ou des peptides dérivés. Lorsque le pH du milieu est acide, le chromophore vire de l'orange au rose, traduisant une sensibilité au pH qu'il convient d'évaluer.

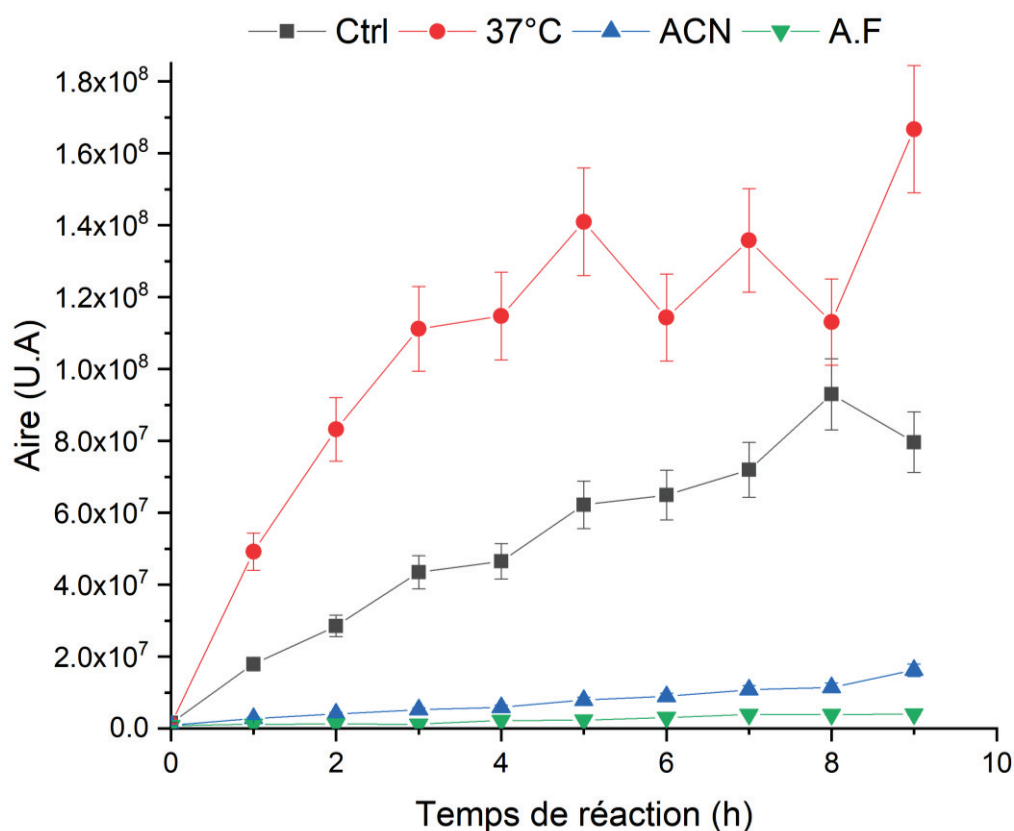


Figure 54: Évolution de la quantité de peptide LC*TVATLR oxydé formée en fonction du temps et des conditions de réaction : conditions optimales (noir), réaction à 37 °C (rouge), utilisation d'ACN comme solvant organique au lieu du DMSO (bleu), ajout de 2 % (v) d'A.F dans le milieu (vert).

Ainsi, j'ai réalisé quatre échantillons selon le protocole optimisé [II. 2. b](#), dilués dans un solvant de reprise composé de 70/30 H₂O/ACN + 0,1 % A.F, avec les modifications suivantes :

- Un échantillon contrôle pour lequel aucune modification du protocole optimisé n'a eu lieu (noté « Ctrl » sur les [Figure 55](#) et [Figure 54](#)).
- Un échantillon oxydé à 37 °C (noté « 37 °C »).

– Un échantillon où 6 μL (2 % du volume) d'A.F ont été ajoutés avant l' H_2O_2 et le DabDn, abaissant le pH du milieu à 2 en induisant le changement de couleur du DabDn (noté « A.F »).

– Un dernier échantillon où les 100 μL de DabDn 100 μM dans DMSO ont été remplacés par 100 μL de DabDn 100 μM dans ACN, ramenant le %_{org} de l'échantillon à 33 % ACN (noté « ACN »).

Les quantités de peptide LC^*TVATLR oxydérivé détectées en fonction du temps de réaction sont représentées en [Figure 54](#).

Confirmant les estimations établies au cours de mes expérimentations préliminaires, l'emploi d'ACN comme solvant organique de réaction n'est pas favorable à la réaction d'oxydérivation. Il constitue donc un bon solvant de reprise permettant de conserver la quantité de peptide oxydérivé formée. De même, le changement de coloration acido-basique du DabDn empêche fortement la réaction d'oxydérivation, le pH du milieu sera donc un paramètre à contrôler lors de la dérivation protéique. En revanche, l'emploi d'une température de 37 °C permet une bien meilleure oxydérivation des peptides qu'à température ambiante. Toutefois, cela entraîne également une plus grande génération de peptide oxydérivé présentant un oxygène supplémentaire et une reformation des dimères beaucoup plus rapide ([Figure 55](#)). Ainsi, l'étape de digestion trypsique ne pourra être que bénéfique pour la dérivation des Cys-SOH endogènes.

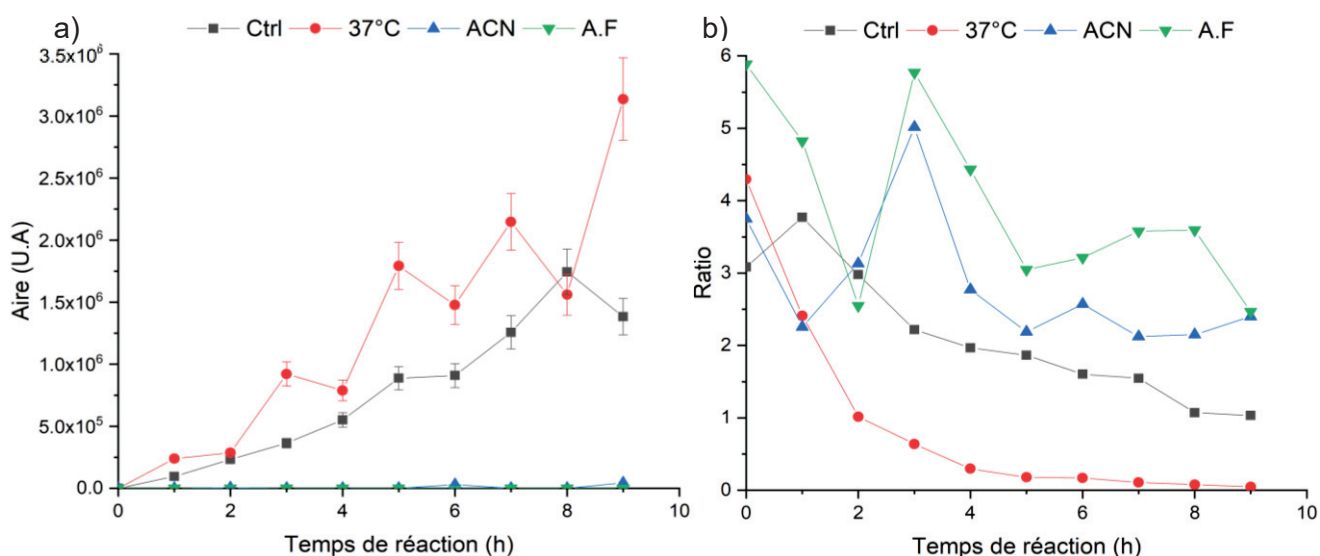


Figure 55: Évolution a) de la quantité de peptide LC^*TVATLR oxydérivé présentant un oxygène supplémentaire ($[\text{M}(\text{SDabDn})+\text{O}]^{3+}$) b) du ratio des quantités de peptides libres ($[\text{M}(\text{SH})]^{2+}$) et de dimères ($[\text{M}(\text{SS})\text{M}]^{4+}$) en fonction du temps et des conditions de réaction : conditions optimales (noir), réaction à 37 °C (rouge), utilisation d'ACN comme solvant organique au lieu du DMSO (bleu), ajout de 2 % (v) d'A.F dans le milieu (vert).

II. 3. Impact de la quantité de DabDn sur le milieu de réaction

Comme le suggèrent les courbes tracées en [Figure 52](#), la vitesse de dérivation des Cys-SOH par le DabDn n'est pas linéaire. J'ai ainsi cherché à établir si l'excès de DabDn dans le milieu de réaction avait un impact sur la vitesse de dérivation des Cys-SOH. Pour cela le protocole [II. 2. b](#) a été réadapté pour prendre en compte la quantité d'H₂O₂, le pourcentage et le type de phase organique ainsi que la composition du solvant de reprise optimaux. Des solutions de DabDn à 5, 10, 50 et 100 µM dans le DMSO ont été préparées et employées pour les différents échantillons réalisés à 15 minutes d'intervalle.

Afin de préserver la quantité de chromophore, cette étude se limite à l'emploi de solutions d'un ratio cystéine-DabDn de 20-1, 10-1, 2-1 et 1-1 (correspondant à des concentrations de 5, 10, 50 et 100 µM), les effets d'une quantité supérieure à un ratio cystéine-DabDn de 1-1 n'ont pas été étudiés.

Des concentrations en DabDn de 100 et 50 µM conduisent à un palier en quantité de peptides dérivés en 3 et 4h de réaction ([Figure 56](#)), ce qui n'est pas le cas de concentrations de 10 et 5 µM, dont la dérivation progresse continuellement même après 9h de réaction. Pour les concentrations de 100 et 50 µM ce palier semble correspondre à une quantité équivalente de peptide oxydérivé formé, quantité qui n'est pas atteinte par les concentrations inférieures. Ces données suggèrent qu'une concentration plus importante en DabDn permet d'augmenter la vitesse de réaction de façon non linéaire.

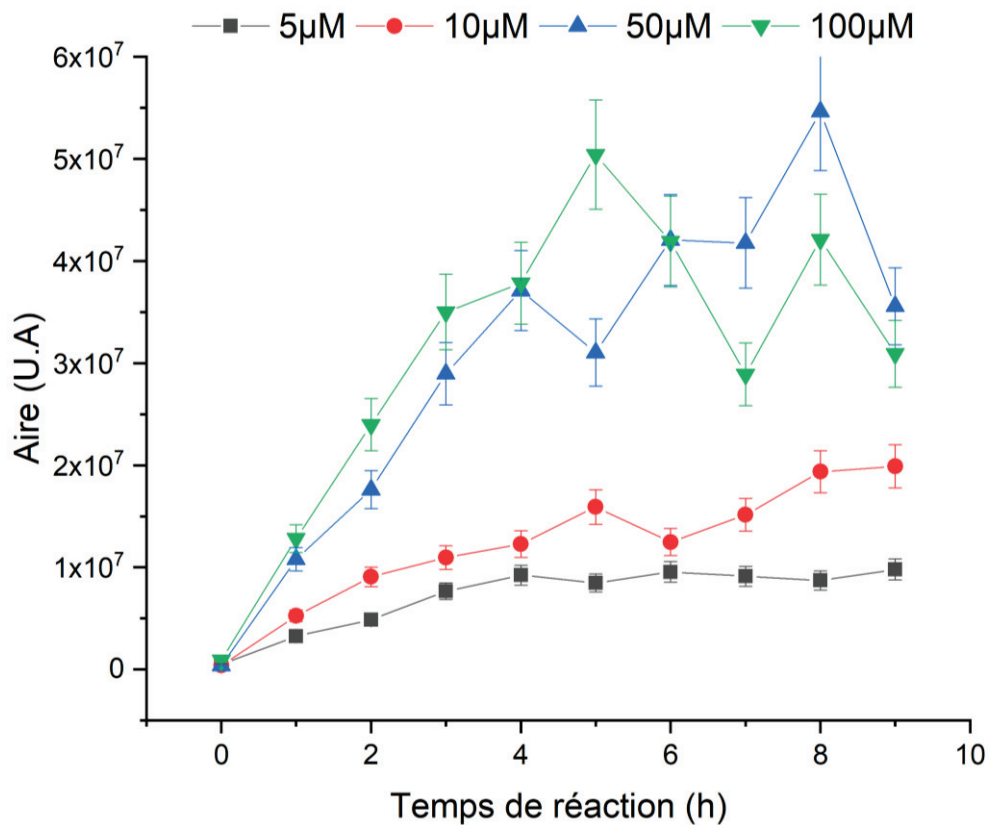


Figure 56: Quantité de peptide LC*TVATLR oxydérivé en fonction de la concentration en DabDn employée lors de la réaction d'oxydérivation.

Cette hypothèse est vérifiable par le tracé de la quantité de peptide à cystéine oxydée dérivée formée en fonction de la concentration de DabDn introduite dans le milieu après chaque heure de réaction (Figure 57). Cette quantité évolue selon un modèle logarithmique d'équation $y = a \cdot \ln(x) + b$, confirmant un impact non linéaire de la quantité de DabDn du milieu sur la vitesse de dérivation jusqu'à atteindre le palier de réaction. La quantité de Cys-SOH formées dans l'échantillon étant largement inférieure à la quantité de cystéine totale (la réaction d'oxydérivation n'est pas totale puisqu'il reste du peptide libre $[M(SH)]^{2+}$) et générant divers produits d'oxydation non dérivables (cf. Figure 46), utiliser un ratio cystéine-DabDn de 1-1 induit un large excès de DabDn libre dans le milieu, augmentant ainsi la vitesse de dérivation. La formation biologique de Cys-SOH étant un phénomène minoritaire, ces derniers sont très peu concentrés dans les échantillons biologiques. Utiliser un ratio cystéine-DabDn de 1-1 entraînerait un excès de chromophore dans l'échantillon biologique suffisamment important pour atteindre rapidement le plateau de quantité de peptide oxydérivé formé.

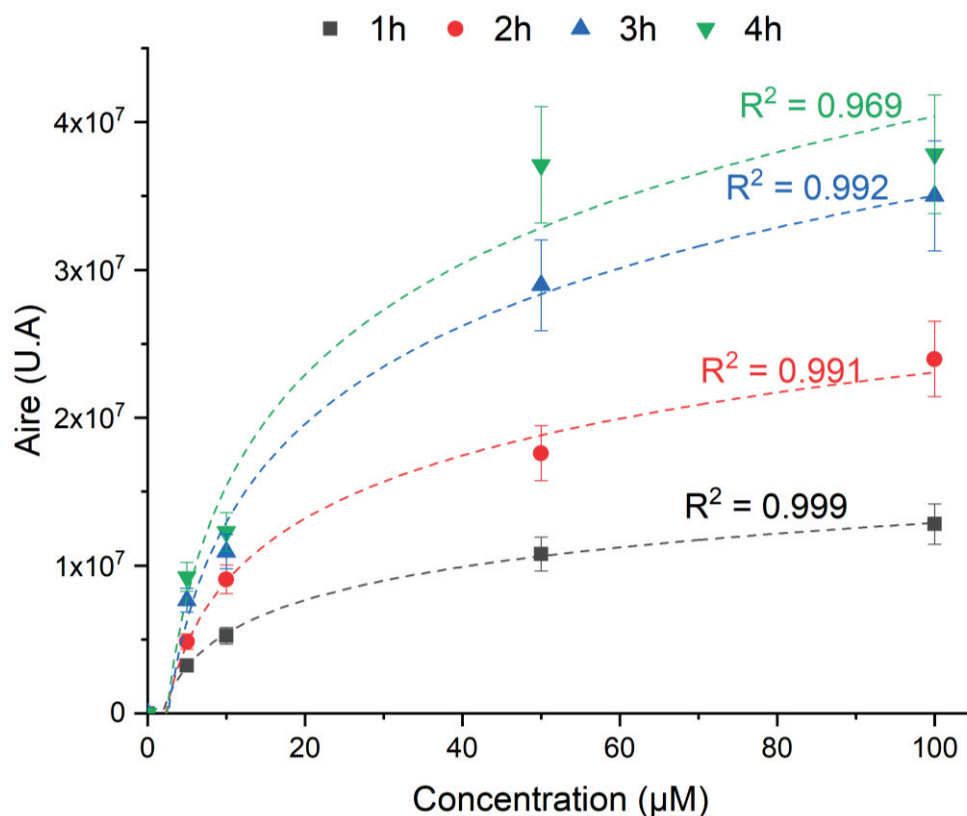


Figure 57: Variation de la quantité de peptide $LC^*TVATLR$ oxydé en fonction de la concentration en DabDn utilisée.

Ainsi, j'ai cherché à estimer le rendement d'oxydation/dérivation de la réaction, défini par :

$$\rho_{réaction} = \frac{n_{oxydé}}{n_{peptide}} * 100$$

Avec $n_{oxydé}$ la quantité molaire de peptide oxydé et dérivé, et $n_{peptide}$ la quantité initiale de peptide non oxydé.

Étant donné qu'aucun standard de peptide $LC^*TVATLR$ oxydé n'existe et que son rendement d'ionisation est inconnu, il est impossible de réaliser une quantification directe des acides sulféniques dérivés. L'estimation du rendement de dérivation doit donc se faire de façon indirecte par le suivi du DabDn consommé au cours de la réaction, atteignant un palier de consommation après 4h de réaction correspondant au plateau de formation du peptide oxydé (Figure 58).^b

^b La quantification des peptides oxydés par la mesure de la quantité de SOH consommée est impossible puisque les SOH ne sont pas directement détectables. S'il est possible d'estimer la quantité de SOH formés au travers du suivi de la quantité de SH consommée par H_2O_2 , cela implique de quantifier également toutes les formes d'oxydation, réversibles et irréversibles (SO_2H , SO_3H , Dimères, SNO...), une procédure complexe et coûteuse en standard. Ainsi, ces deux méthodes de quantification ne seront pas employées.

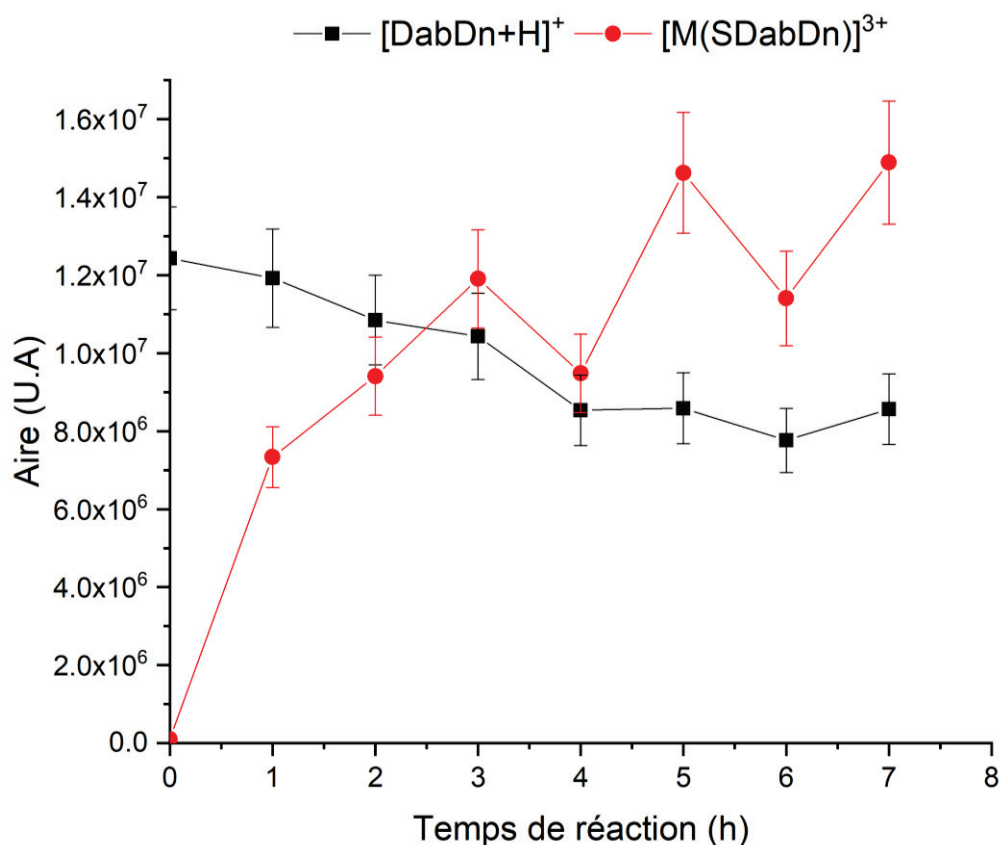


Figure 58: Suivi de la quantité de DabDn libre (noir) et de peptide LC*TVAlTR oxydé (rouge) en fonction du temps de réaction.

L'expression de la quantité molaire de peptide oxydé s'écrit donc en fonction de l'aire du DabDn comme ceci :

$$n_{\text{oxydé}} = \frac{\text{Aire}(DabDn)_{T_0} - \text{Aire}(DabDn)_{T_f}}{A(DabDn)_{T_0}} * n_{DabDn}$$

Où $\text{Aire}(DabDn)_{T_0}$ est l'aire initiale du pic de DabDn au début de la réaction, $\text{Aire}(DabDn)_{T_f}$ l'aire du pic de DabDn en fin de réaction et n_{DabDn} la quantité molaire de DabDn introduite dans l'échantillon.

Ainsi, le rendement de réaction s'exprime selon :

$$\rho_{\text{réaction}} = \frac{\text{Aire}(DabDn)_{T_0} - \text{Aire}(DabDn)_{T_f}}{A(DabDn)_{T_0}} * \frac{n_{DabDn}}{n_{\text{peptide}}} * 100$$

La réaction de dérivation se faisant à un ratio molaire $n_{DabDn}-n_{\text{peptide}}$ de 1-1, l'équation se simplifie en :

$$\rho_{\text{réaction}} = \frac{\text{Aire}(DabDn)_{T_0} - \text{Aire}(DabDn)_{T_f}}{A(DabDn)_{T_0}} * 100$$

En fonction des conditions, le rendement de dérivation varie entre 20 % et 40 %, générant une quantité de peptide oxydé de :

$$\begin{aligned}
 n_{\text{oxydérivé}} &= \rho_{\text{réaction}} * n_{\text{DabDn}} = \rho_{\text{réaction}} * C_{\text{DabDn}} * V_{\text{DabDn}} = \rho_{\text{réaction}} * 1.10^{-4} * 1.10^{-4} \\
 &= \rho_{\text{réaction}} * 1.10^{-8} \text{ mol}
 \end{aligned}$$

Soit une quantité de 2 à 4 nmol de peptide oxydérivé et détecté, pour une concentration dans le milieu de $C_{\text{oxydérivé}} = \frac{n_{\text{oxydérivé}}}{V_{\text{réaction}}}$ de 6,7 à 13,3 μM , ainsi qu'une concentration injectée dans le spectromètre de masse de $C_{\text{inj}} = C_{\text{oxydérivé}} * \frac{V_{\text{prelevement}}}{V_{\text{insert}}} = 670$ à 1333 nM.

II. 4. Comparaison de la sensibilité des techniques LID et HCD

Ayant établi une estimation chiffrée du rendement d'oxydération, j'ai cherché à déterminer les limites de détection et de quantification (respectivement LDD et LDQ) des Cys-SOH dérivés avec le DabDn et établir si la spécificité optique de la LID permet un gain en sensibilité par rapport à la HCD.

Ma thèse ayant pour objectif la détection et quantification des acides sulféniques endogènes, la comparaison de la sensibilité des techniques de fragmentation par leurs LDD et LDQ respectives doit prendre en compte les effets matrices induits par les matrices biologiques complexes. Pour cela, j'ai ajouté le peptide LC*TVATLR dans un digestat trypsique de plasma humain en diverses quantités connues.

II. 4. a. Protocole

Un échantillon de peptide LCTVATLR a été oxydéré selon le protocole optimisé ([II. 2. b](#) et [II. 2. c](#)), laissé 9h à réagir, analysé en LID pour obtenir le rendement d'oxydération (20 %), puis trois aliquots ont été dilués dans un mélange H₂O/ACN/DMSO 74,1/22,5/3,3 (v/v/v) pour obtenir trois solutions mères de concentration respectives 67, 670 et 2680 nM qui ont été mises au congélateur. ([Tableau 2](#))

Le lendemain, différents volumes de ces solutions mères ont été ajoutés dans les plasmas pour former une gamme allant de 0,67 à 67 nM selon le schéma de dilution ([Tableau 2](#)), chaque point de la gamme ayant été réalisé en triplicat puis mis au congélateur et dégelé juste avant l'analyse LID ou HCD.

V _{échantillon} (μL)	V _{dilution} (μL)	C _{mère} (nM)	V _{mère} (μL)	V _{solvant de reprise} (μL)	C _{finale} (nM)
10	990	67	2	198	0,67
			5	195	1,675
10	90	670	2	198	6,7
			6	194	20,1
20	80	2680	2,5	197,5	33,5
			3	197	40,2
			3,5	196,5	46,9
			4	196	53,6
			4,5	195,5	60,3
			5	195	67

Tableau 2: Schéma de dilution utilisé pour la préparation des ajouts de peptide LC*TVATLR oxydé dans des digestats tryptiques de plasma humain.

Préparation des 30 digestats tryptiques de plasma humain :

10 μL de plasma humain ont été mélangés à 40 μL d'urée (8 M) et 5,5 μL de DTT (150 mM dans l'AMBIC (Bicarbonate d'ammonium) 50 mM) et placés à 60 °C pendant 40 minutes pour permettre la rupture des ponts disulfures protéiques et leur dénaturation, puis refroidis à température ambiante. Les cystéines libres ont été bloquées avec 17 μL d'IAM, les échantillons étant mis à réagir à l'abri de la lumière pendant 40 minutes, et diluées par 3 mL d'AMBIC après réaction. 10 μL de trypsine à 2 mg/mL ont été ajoutés aux échantillons qui ont été mis à digérer à 37 °C pendant la nuit.

Après digestion, les échantillons ont été dessalés et concentrés par Extraction sur Phase Solide (SPE) grâce à des cartouches Oasis HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) 3cc 60 mg conditionnées avec 1 mL de MeOH puis un 1 mL d'H₂O + 0,5 % A.F, chaque échantillon chargé, rincé avec 1 mL d'H₂O + 0,5 % A.F puis élué par 1,5 mL de MeOH. Les échantillons élués ont ensuite été séchés à 40 °C sous flux de diazote, et repris avec le volume de solvant H₂O/ACN 70/30 (v/v) + 0,1 % A.F indiqué dans le schéma de dilution, de sorte que le volume total de l'échantillon (solvant et LC*TVATLR oxydé) atteigne 200 μL (voir [Tableau 2](#)).

L'intégralité de la gamme et des triplicats a été analysée une première fois en LC-MS/MS en mode PRM-LID selon les conditions d'analyse établies en [II. 1. a](#), puis en mode PRM-HCD avec une énergie de collision à 24 eV et un temps d'activation de 3 ms. Pour chaque mode, les transitions non interférées les plus intenses issues de la fragmentation du peptide (3) ainsi que celle de l'ion rapporteur m/z 252,11 ont été sélectionnées. L'absence d'une ou plusieurs de ces transitions empêche la confirmation de l'identification du peptide oxydérivé, qui sera considéré comme non détecté. Pour chaque échantillon, les aires des transitions ont été sommées et moyennées avec les sommes des aires de chaque triplicat d'une même concentration, puis l'écart-type et le coefficient de variation (disponible en [Tableau 3](#)) de chaque moyenne ont été établis. Suite à un imprévu analytique, le triplicat de concentration 46,9 μM a été écarté de l'étude.

Les courbes de calibration issues du tracé de l'aire moyenne de peptide LC*TVATLR détectée en LID (noir) et HCD (rouge) selon la concentration injectée, puis modélisées par régression linéaire d'équation ($y = ax$) sont tracées en [Figure 59](#). À partir de l'équation de régression linéaire obtenue pour chaque mode de fragmentation, les concentrations moyennes de chaque triplicat ont été recalculées et la justesse (écart entre la concentration injectée et la concentration détectée, exprimée en pourcentage) ainsi que le coefficient de variation (CV) de la mesure ont été calculés ([Tableau 3](#)).

II. 4. b. Résultats

Bien que les régressions linéaires obtenues par les modes de fragmentations LID et HCD présentent toutes deux d'excellents R^2 ($>0,99$) ([Figure 59](#)), la HCD ne permet pas de détecter la présence de peptide oxydérivé en deçà d'une concentration dans l'échantillon de 1,675 nM ([Figure 59](#), [Tableau 3](#)). Par ailleurs, le coefficient de variation obtenu à la première concentration détectée (1,675 nM) est de 74 %, dépassant la limite maximale de 20 % requise pour valider cette concentration comme quantifiable. Ainsi, la limite de détection atteignable en HCD est fixée à 1,675 nM et la limite de quantification à 6,7 nM, bien que la justesse correspondant à cette concentration (138 %) dépasse les bornes de validation fixées à 85-115 %.

La LID, grâce à un CV $\leq 20\%$ et une justesse comprise entre 86 et 115 % pour toutes les concentrations analysées, permet de définir une même limite de détection et quantification du peptide LR8 oxydé à 0,67 nM, démontrant un important gain en sensibilité apporté par la spécificité optique de la fragmentation LID.

Concentration (nM)	LID			HCD		
	Concentration moyenne recalculée (nM)	Justesse (%)	CV (%)	Concentration moyenne recalculée (nM)	Justesse (%)	CV (%)
0,67	0,769	115	20	N.D	N.D	N.D
1,675	1,467	88	17	0,574	<u>34</u>	<u>74</u>
6,7	6,2176	93	9	9.222	<u>138</u>	9
20,1	17,316	86	16	25.363	<u>126</u>	9
33,5	34,036	102	13	31.118	93	5
40,2	42,210	105	16	43.924	109	6
53,6	54,833	102	8	49.074	92	11
60,3	61,747	102	12	59.423	99	15
67	65,258	98	18	68.570	102	5

Tableau 3: Précision et justesse des triplicats de peptide LC*TVATLR oxydé ajouté dans un digestat tryptique de plasma humain à différentes concentrations, analysés en LID et HCD. La mention « N.D » indique que le peptide n'a pas été détecté à cette concentration. Les valeurs soulignées sont en dehors de la plage de validation c'est-à-dire un CV < 20 % ou une précision au-delà de 85-115 %.

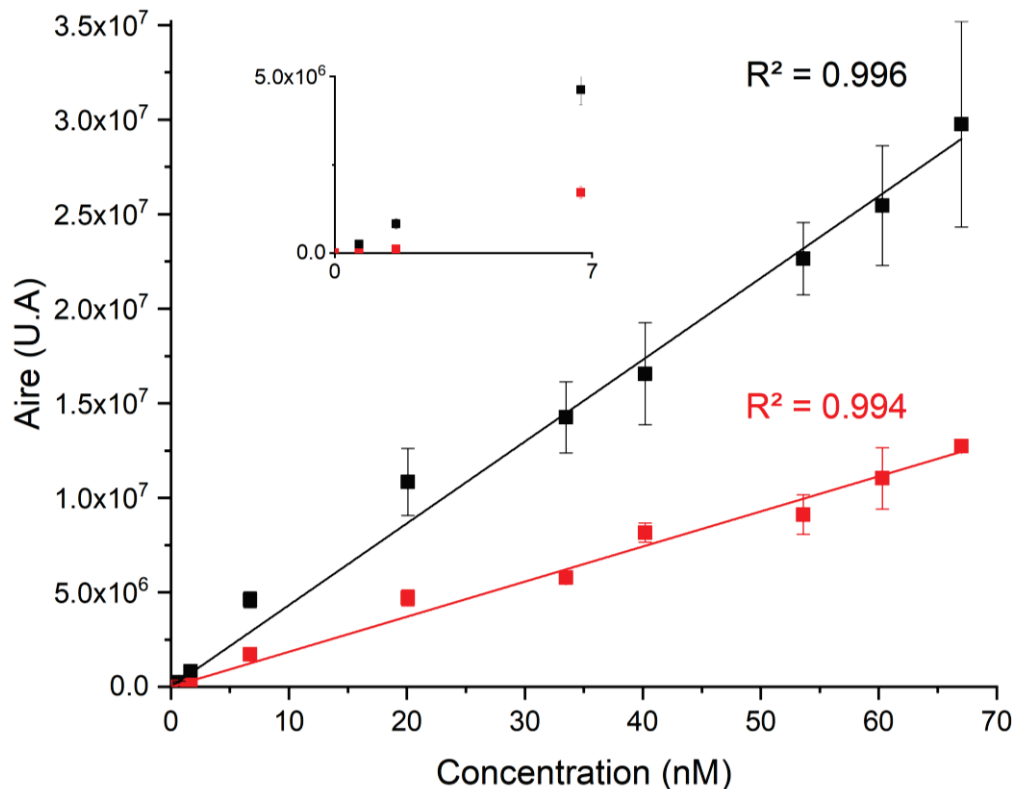


Figure 59: Courbes de calibration linéaires (y = ax) issues de la moyenne de trois échantillons de peptide LC*TVATLR oxydé ajouté dans un digestat tryptique de plasma fragmenté en LID (noir) et HCD (rouge), pour des concentrations allant de 0,67 à 67 nM.

II. 5. Application de la réaction d'oxydérivation à un mélange complexe de peptides

Ayant démontré que la technique LID confère un gain de sensibilité majeur par rapport à la technique HCD, j'ai souhaité vérifier que la réaction d'oxydérivation était compatible avec la complexification du milieu de réaction en employant un mélange de peptides variés simulant une digestion trypsique peu complexe. Pour cela, une solution de 10 peptides (VCNPIITK, ALEAGGCAVVR, EAPPCHLLIHR, LDEAQEAECQVLK, LQGINCGPDFTPSFANLGR, LTSVVG TILYSCPEVLK, NTGIICTIGPASR, SNCITENPAGPYGQR, TAAQCLEHYEFLLDK, VLDANSCQSELHEK) à 50 μM chacun a été oxydérivé avec un ratio cys-DabDn-H₂O₂ de 1-1-1 durant 9 heures. 10 μL de la solution ont été dilués dans 90 μL d'un solvant de dilution de 75/25 H₂O/ACN + 0,1 % A.F, mis en vial et analysés en PRM-LID. Pour chaque peptide, le rapport m/z du précurseur $[M(\text{SDabDn})]^{x+}$ a été renseigné, puis trois transitions issues de la fragmentation du peptide (3) ainsi que celle de l'ion rapporteur à m/z 252,11 ont été sélectionnées, sommées, puis les pics chromatographiques modélisés par une gaussienne ([Figure 60](#)). Les précurseurs des dix peptides ont été détectés et fragmentés en LID donnant lieu à la génération d'ion b et y, confirmant la séquence peptidique et la localisation de la dérivation, ainsi que de l'ion de rapport m/z 252,11, confirmant la fragmentation du chromophore. Les spectres de fragmentation des peptides NTGIIC*TIGPASR et VC*NPIITK sont représentés en [Figure 61](#) à titre d'exemple.

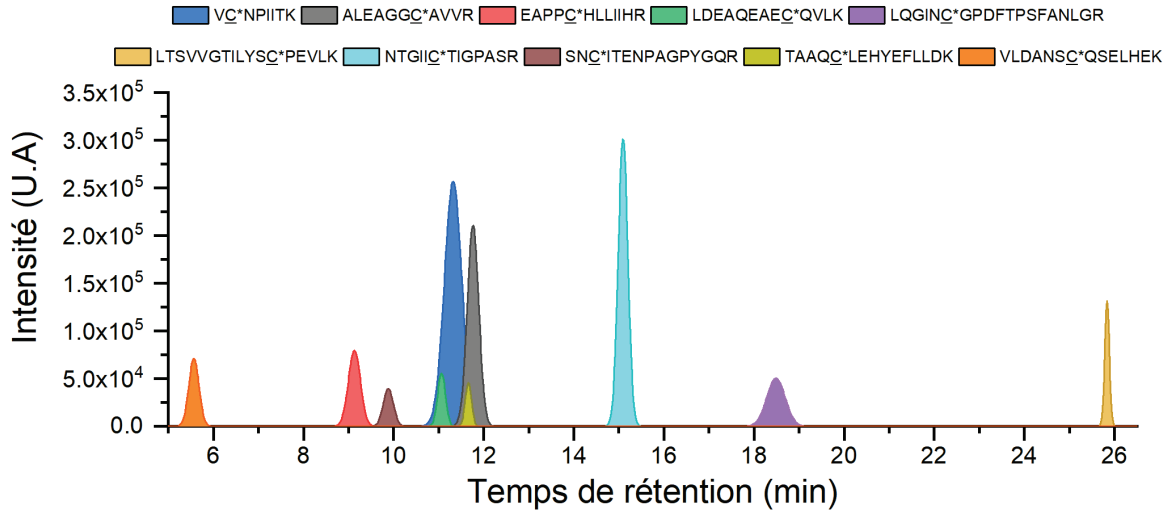


Figure 60: Représentation chromatographique de la séparation des 10 peptides oxydérivés après 9h de réaction. Pour chaque peptide les intensités des 3 transitions issues de la fragmentation de la chaîne peptidique et les 3 issues de la fragmentation du chromophore ont été sommées, puis les pics chromatographiques modélisés par des gaussiennes.

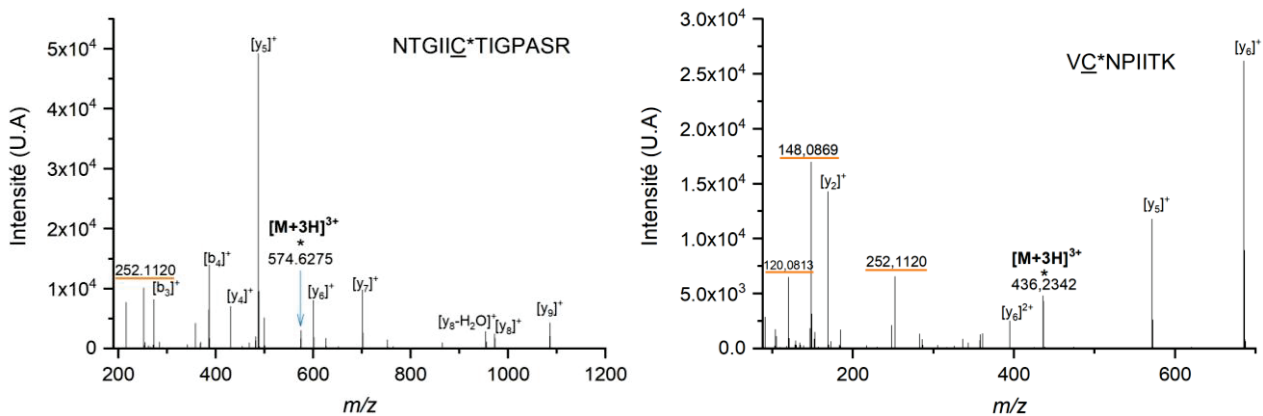


Figure 61: Spectres de fragmentation des peptides NTGIIC*TIGPASR et VC*NPIITK oxydérivés sur lesquels sont distinguables les fragments b et y issus de la séquence peptidique ainsi que l'ion rapporteur m/z 252,11 issu du chromophore dabcyf.

III. Oxydation dérivation protéique

L'oxydération ayant été accomplie sur un mélange de peptides, il convient maintenant de vérifier si cette technique permet d'oxyder, dériver et détecter les cystéines libres de protéines modèles.

La conformation 3D des protéines est donnée en partie grâce aux ponts disulfures internes formés entre les cystéines. La préparation d'échantillons nécessite la rupture de ces ponts disulfures pour compléter la dénaturation thermique et ainsi faciliter l'accès de la protéine aux agents dérivants et à la trypsine pour la digestion tryptique. Le chromophore étant d'une taille importante, l'encombrement stérique l'empêche de circuler à l'intérieur des conformations 3D et donc de dériver de potentielles cystéines oxydées internes. Les deux agents communément employés pour la rupture des ponts disulfures sont le TCEP et le DTT. Comme vu précédemment dans la littérature (cf. [Chapitre II.I. 2. a](#)), le TCEP permet de réduire les ponts S-S, mais également toutes les autres formes de CysROx, dont les Cys-SOH, ce qui n'est pas souhaitable. Le rôle réducteur du DTT envers les Cys-SOH n'a quant à lui pas été clairement démontré.

III. 1. Effet de la réduction des ponts disulfures par le DTT

Ainsi, j'ai souhaité confirmer l'absence de réduction des Cys-SOH par le DTT en introduisant dans la réaction d'oxydérivation du peptide LCTVATLR une quantité de DTT supérieure (ratio molaire cystéine-DTT 1-15) à la quantité de DTT habituellement employée dans la littérature (ratio molaire cystéine-DTT 1-3). Pour cela, j'ai réalisé quatre échantillons, préparés selon le protocole d'oxydérivation peptidique optimisé avec les modifications suivantes :

- L'échantillon contrôle (noté Ctrl \emptyset DTT sur les [Figure 62](#) et [Figure 63](#)) n'a pas subi de modifications (oxydérivation sans réduction par le DTT).
- Dans l'échantillon noté DTT_ \emptyset Oxydation, les 100 μ L de peptide LCTVATLR 100 μ M ont été réduits avec 6 μ L de DTT 15 mM (dans AMBIC 150 mM, ratio molaire cystéine-DTT 1-15) pendant 15 minutes, puis 100 μ L de chromophore DabDn 100 μ M dans le DMSO ont été introduits et l' H_2O_2 remplacé par 100 μ L d' H_2O . Cet échantillon est donc réduit sans être oxydé pour permettre d'évaluer si le DTT affecte les Cys-SOH déjà présents dans le milieu.
- Dans l'échantillon noté « Oxydérivation+DTT », les 100 μ L de peptide LCTVATLR 100 μ M ont été réduits avec 6 μ L de DTT 15 mM (dans AMBIC 150 mM, ratio molaire cystéine-DTT 1-15) pendant 15

minutes, puis les peptides ont été oxydérivés avec 100 μL de DabDn 100 μM dans le DMSO et 100 μL d' H_2O_2 100 μM .

– Les 100 μL de peptide LCTVATLR 100 μM de l'échantillon « DTT_2h » ont été oxydérivés sans réduction préalable durant 2h, puis l'échantillon a été réduit avec 6 μL de DTT 15 mM (dans AMBIC 150 mM, ratio molaire cystéine-DTT 1-15) pendant 15 minutes. Cet échantillon est donc réduit après oxydation des Cys-SH en Cys-SOH pour mettre en évidence une réduction par le DTT des Cys-SOH nouvellement formés.

Les quantités de peptides LCTVATLR oxydérivés détectés en fonction du temps de réaction sont tracées en [Figure 62](#), ainsi que les quantités de peptides oxydérivés suroxydés $[\text{M}(\text{SDabDn})+\text{O}]^{3+}$ avec le ratio des quantités de peptides $[\text{M}(\text{SH})]^{2+}$ et $[\text{M}(\text{SS})\text{M}]^{2+}$ en [Figure 63](#).

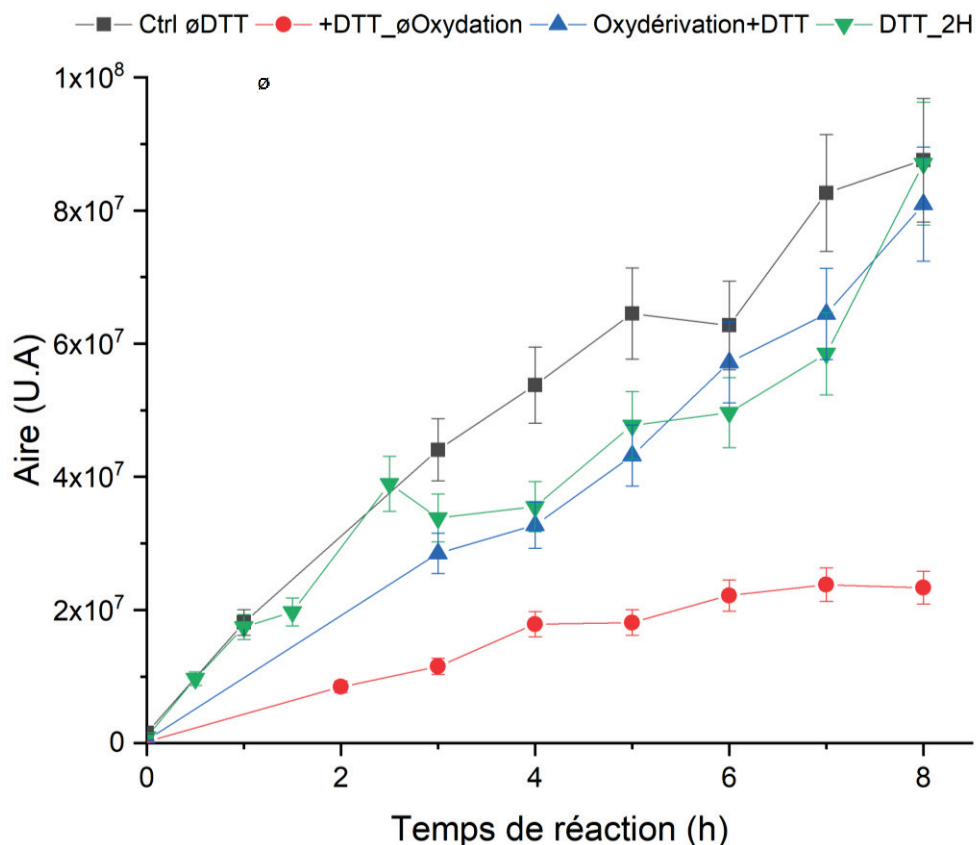


Figure 62: Évolution de la quantité de peptide LCTVATLR oxydérivé en fonction du temps et des conditions de réaction : conditions optimisées sans DTT (noir), ajout de DTT avant dérivation des SOH internes (rouge), ajout de DTT avant l'oxydérivation (bleu), ajout de DTT après 2h d'oxydérivation (vert).

Le DTT ne semble avoir aucun impact sur la quantité de peptide LCTVATLR oxydérivé formé, et ce peu importe si la réduction intervient avant ou après l'oxydérivation, bien que la quantité finale de peptide

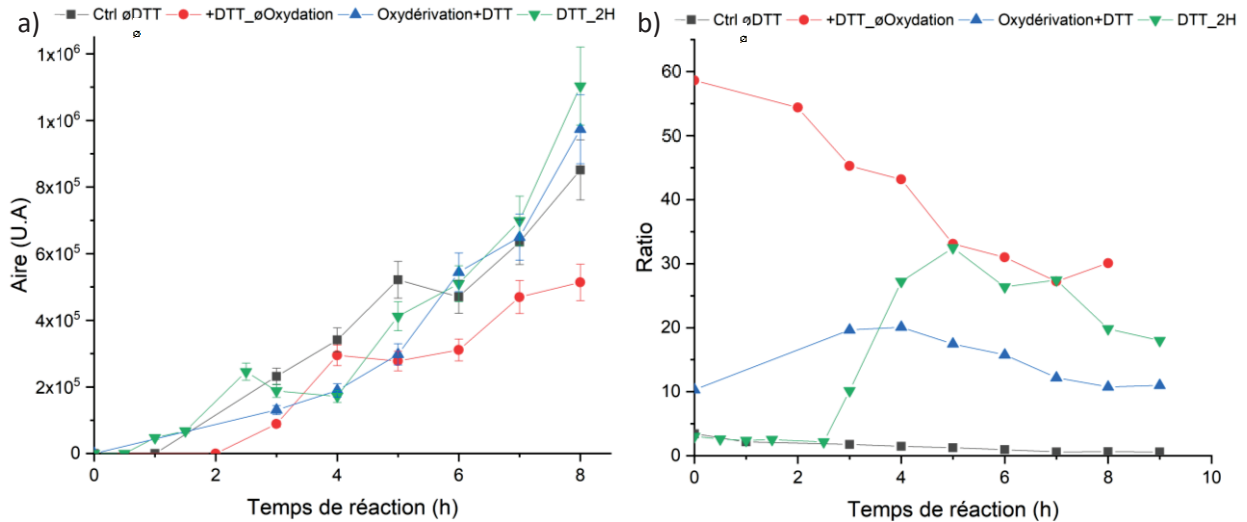


Figure 63: Évolution a) de la quantité de peptide $LC^*TVATLR$ oxydé suroxydé ($[M(SDabDn)+O]^{3+}$) b) Du ratio des quantités de peptides libres ($[M(SH)]^{2+}$) et de dimères ($[M(SS)M]^{4+}$) en fonction du temps et des conditions de réaction : conditions optimisées sans DTT (noir), ajout de DTT avant dérivation des SOH internes (rouge), ajout de DTT avant l'oxydération (bleu), ajout de DTT après 2h d'oxydération (vert).

oxydé soit atteinte légèrement plus tardivement dans les échantillons réduits (Figure 62, courbes bleues et vertes). La dérivation des Cys-SOH sans oxydation par H_2O_2 amène à une quantité réduite de peptide $LC^*TVATLR$ détectée, ce qui est logique puisqu'il n'y a pas eu d'oxydation des Cys-SH par H_2O_2 pour augmenter la quantité de Cys-SOH du milieu. Une réduction préalable de l'échantillon au DTT n'induit donc pas la réduction des Cys-SOH endogènes, et ce même avec une quantité largement supérieure à celle que nous comptons utiliser. De même, les formes suroxydées $[M(SDabDn)+O]^{3+}$ du peptide ne semblent pas avoir été impactées par la réduction au DTT (Figure 63 a)). Les différents ratios des peptides libres ($[M(SH)]^{2+}$) avec les peptides dimérisés ($[M(SS)M]^{4+}$) entre les échantillons confirment qu'une forte réduction a eu lieu, le ratio augmentant drastiquement lors de l'introduction du DTT (Figure 63 b)), bien qu'il est limité par la présence d' H_2O_2 dans le milieu de réaction (courbes bleues et vertes).

J'ai donc opté pour l'utilisation des conditions suivantes pour adapter le protocole d'oxydération aux protéines modèles HSA (Albumine Sérique Humaine) et TrH (Sérot transferrine) : un ratio cystéine-DabDn- H_2O_2 de 1-1-1 comprenant un %_{org} de 33 % de DMSO pendant 8h de réaction, ainsi qu'un ratio cystéine-DTT de 1-3 appliqué durant l'étape de dénaturation des protéines.

III. 2. Protocole d'oxydérivation protéique

250 µL de deux solutions de protéines HSA et TrH (1 mg/mL chacune) ont été mélangés afin d'obtenir un total de 500 µg de protéines dans l'échantillon (tube Eppendorf® Protein LoBind de 1,5 mL). 40 µL d'urée 8 M ainsi que 5,4 µL d'une solution de DTT 150 mM (faite dans 50 mM de bicarbonate d'ammonium (AMBIC)), ont été ajoutés de façon à obtenir un ratio molaire cystéine-DTT de 1-3, puis l'échantillon dénaturé à 60 °C pendant 40 min. 500 µL de DabDn 538 µM dans le DMSO ainsi que 500 µL d'H₂O₂ 538 µM ont été ajoutés, vortexés, puis mis à réagir durant 8 h. L'échantillon a ensuite été dilué avec 3 mL de tampon AMBIC 50 mM pour diminuer la concentration d'urée, puis digéré avec 10 µL de trypsine porcine type IX-S (poudre lyophilisée) 2 mg/mL sur toute la nuit (14 h). L'échantillon a ensuite été purifié par SPE ([II. 4. a](#)), évaporé à sec à 40 °C sous flux de N₂, repris dans 200 µL d'une solution de 70/30 H₂O/ACN (v/v) + 0,1 % A.F et analysé en PRM-LID.

III. 3. Résultats

Les protéines HSA et TrH ont été préalablement digérées *in silico* grâce au logiciel Skyline et 33 peptides à cystéine unique ont été sélectionnés et oxydérivés afin d'obtenir les ratios m/z et états de charge des peptides $[M(\text{SDabDn})]^{x+}$, à partir desquels j'ai construit une méthode de suivi PRM-LID (liste des transitions PRM disponibles dans le [Tableau 7](#) en [Annexe II](#)).

L'oxydérivation de ces deux protéines est concluante, permettant de détecter un total de 78 % des peptides à cystéine unique oxydérivés ciblés, représentant 26 sur les 33 peptides à cystéine unique issus de la HSA et la TrH suivis. Une représentation chromatographique de la séparation de ces peptides en LC-MS/MS est tracée en [Figure 64](#).

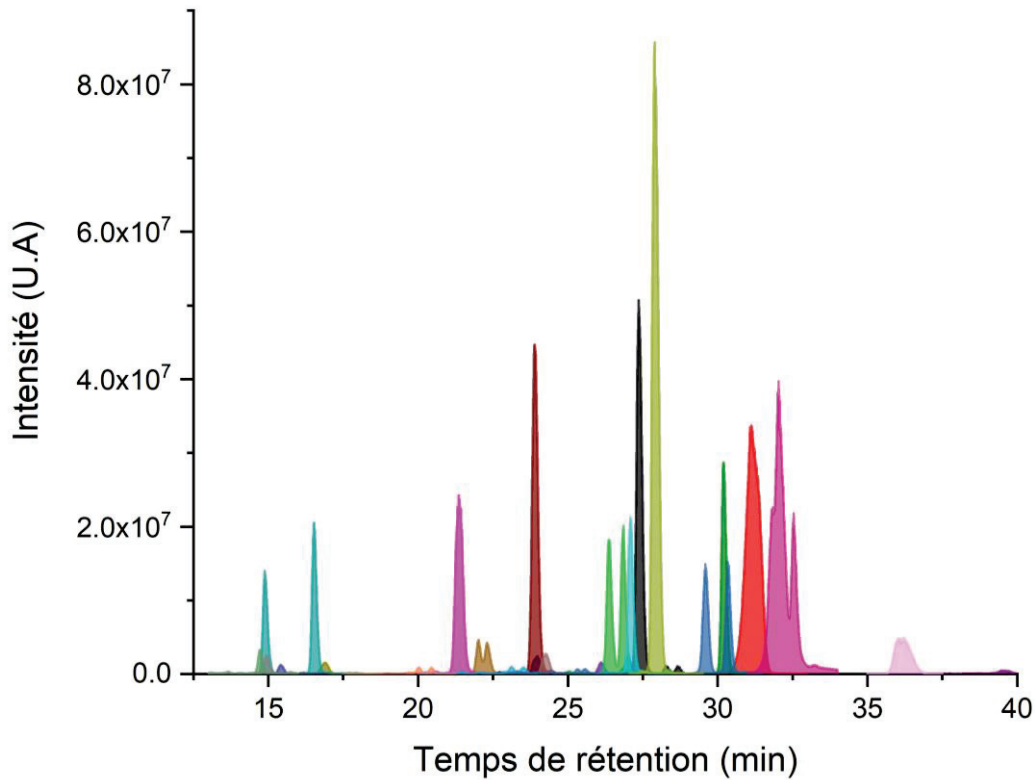


Figure 64: Chromatogramme reconstitué des 33 peptides à cystéine unique oxydérivés de la HSA et la TrH.

En plus de l'exacerbation de la sensibilité apportée par la LID, j'ai comparé la fragmentation parasite induite par la HCD pour la détection des peptides oxydérivés en analysant un digestat trypsique des deux protéines dans lequel le chromophore DabDn n'a pas été ajouté en HCD et en LID. Comme en témoigne la [Figure 65](#), aucun signal n'est détecté en LID, puisqu'aucun chromophore n'a été introduit. Toutefois, la fragmentation non sélective d'analytes non dérivés avec le chromophore induite par la HCD donne lieu à la production d'ions isobares à l'ion rapporteur de m/z 252,11. Ainsi, le gain en sensibilité apporté par la LID est au moins en partie dû à sa sélectivité de fragmentation ne générant pas d'interférences.

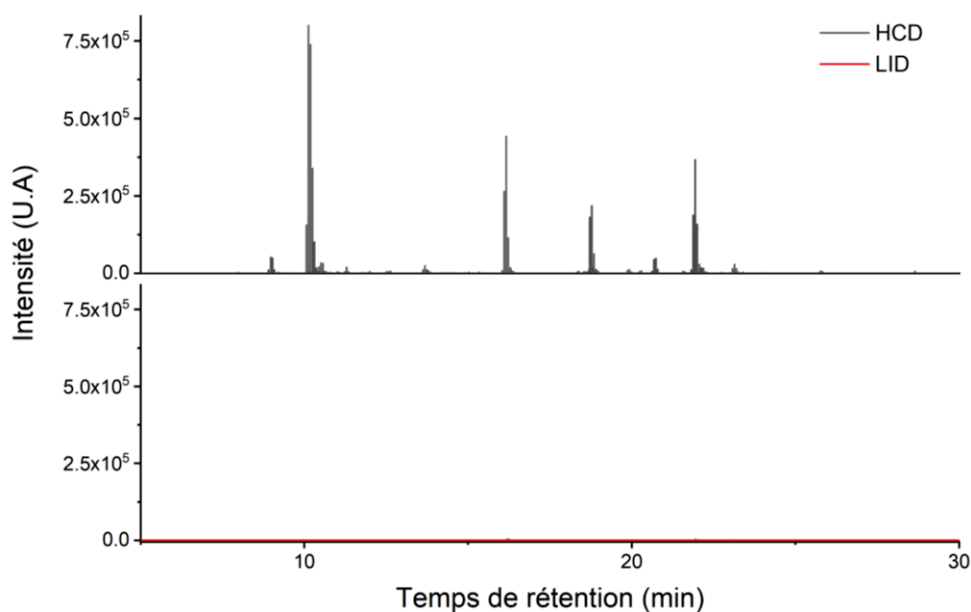


Figure 65: Chromatogramme reconstitué à partir du signal de l'ion rapporteur m/z 252,11 (tolérance en m/z de 10 ppm) issu de la fragmentation du chromophore dans un digestat tryptique des protéines HSA et TrH en HCD (noir) et LID (rouge).

IV. Dérivation des Cys-SOH endogènes dans des plasmas humains

L'oxydérivation d'un mélange complexe de deux protéines étant concluante, j'ai adapté le protocole d'oxydérivation en un protocole de dérivation seule des cystéines oxydées endogènes à un échantillon de plasma humain.

Le protocole d'oxydérivation prenant déjà en compte les paramètres optimisés, c'est-à-dire l'emploi d'un ratio cystéine-DabDn 1-1 avec un milieu réactionnel comportant 33 % de DMSO et 67 % d' H_2O , l' H_2O_2 utilisé pour oxyder les cystéines a été remplacé par H_2O , sa matrice aqueuse. Ici, les volumes de réaction (auparavant 500 μ L de chacun menant à un volume d'échantillon total de 1,5 mL) ont été réduits à 250 μ L pour ramener le volume d'échantillon total à 750 μ L et pour faciliter sa manipulation. Le ratio cystéine-DabDn a été recalculé par rapport à la concentration de thiol dans le plasma humain.²⁴⁴

IV. 1. Protocole

Six échantillons de plasma humain ont été préparés comme suit : 10 μL de plasma (représentant 500 μg de protéines) ont été mélangés avec 40 μL d'urée 8 M et 5,4 μL de DTT (150 mM dans AMBIC) et dénaturés à 60 °C pendant 40 minutes. Les échantillons ont été refroidis, dilués avec 194,5 μL d' H_2O , puis 250 μL de DabDn à 1,637 mM dans le DMSO suivi de 250 μL d' H_2O . Après vortex, les échantillons ont réagi pendant 7h à température ambiante, puis ont été digérés sur toute la nuit grâce à l'ajout de 10 μL de trypsine à 2 mg/mL et à leur chauffage à 37 °C. Une fois digérés, les échantillons ont été purifiés et concentrés par SPE, évaporés à sec à 40 °C sous flux de N_2 , et repris dans 200 μL d'une solution d' $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 75/25 + 0,1 % A.F. Les six échantillons ont été analysés en PRM-LID et PRM-HCD au travers de 117 peptides à cystéines uniques répartis sur sept protéines. Les paramètres de l'analyse Top10 sont les suivants : paramètres MS1 : résolution de 70 000 sur une plage de m/z de 200 à 1500, AGC target d' 1e^6 , IT de 100 ms ; paramètres MS2 : résolution de 17 500, AGC Target d' 1e^5 , IT de 50 ms, fenêtre d'isolation de 3 m/z , exclusion dynamique de 10 secondes, Intensity Thresh de $1,6\text{e}^5$; paramètres HCD : 24 eV, 3 ms.

IV. 2. Résultats

Sept protéines plasmatiques cibles ont été sélectionnées suite à l'analyse Top10 d'un digestat tryptique de plasma humain sans chromophore, à la conversion des données au format .txt par le logiciel Pavaa et à leur traitement par le logiciel ProteinProspector (base de données Swissprot, Taxonomie Homo Sapiens, Digestion par trypsine avec 1 misscleavage, modificateur constant « Carbamidomethyl (C) » présent dans la liste de modifications prédéfinies (ajout de +57,0214 Da), aucun modificateur variable).²⁴⁵ Les protéines identifiées ont été triées selon leur « Best Discrimant Score », un score permettant d'estimer la bonne attribution des peptides à la protéine en évaluant la part d'attribution aléatoire et la quantité de peptides correctement attribuée. Plus le score est élevé, plus l'attribution est fiable. Les sept protéines présentant le meilleur score ont ainsi été sélectionnées (HSA, TrH, α -2 Macroglobuline (A2MG), Complément C3 (CO3), Complément C4A (CO4A), Fibrogen β

chain (FIBB) et Fibronectine (FINC)), digérées *in silico* et les peptides à cystéine unique dérivés à l'instar de la HSA et TrH ([III. 3](#)) pour établir une méthode PRM-LID de 117 peptides à cystéine unique dont les transitions sont disponibles dans le [Tableau 8](#) en [Annexe II](#).

Au total, 46 peptides à cystéine oxydée endogène dérivée ont été détectés, correspondant à 39,3 % des potentielles cystéines oxydables. De même que pour la quantification des peptides oxydés issus de protéines standards (cf [III. 3](#)), les trois transitions les plus intenses non interférées issues de la rupture de la chaîne peptidique ainsi que la transition de l'ion rapporteur m/z 252,11 liée à la fragmentation du chromophore ont été sélectionnées puis sommées. Un exemple des différentes transitions observées pour différents peptides est présenté en [Figure 66](#).

Comme il n'existe aucun standard permettant de réaliser une quantification absolue des acides sulféniques dérivés par le DabDn, la quantification des Cys-SOH se fait par quantification relative entre les six échantillons. En rationalisant l'aire du pic d'un peptide d'un échantillon $A_{\text{échantillon}}$ avec l'aire maximale détectée parmi tous les échantillons A_{max} pour le même peptide, j'obtiens le ratio d'oxydation suivant :

$$Rox_{\text{peptide}} = \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{max}}}$$

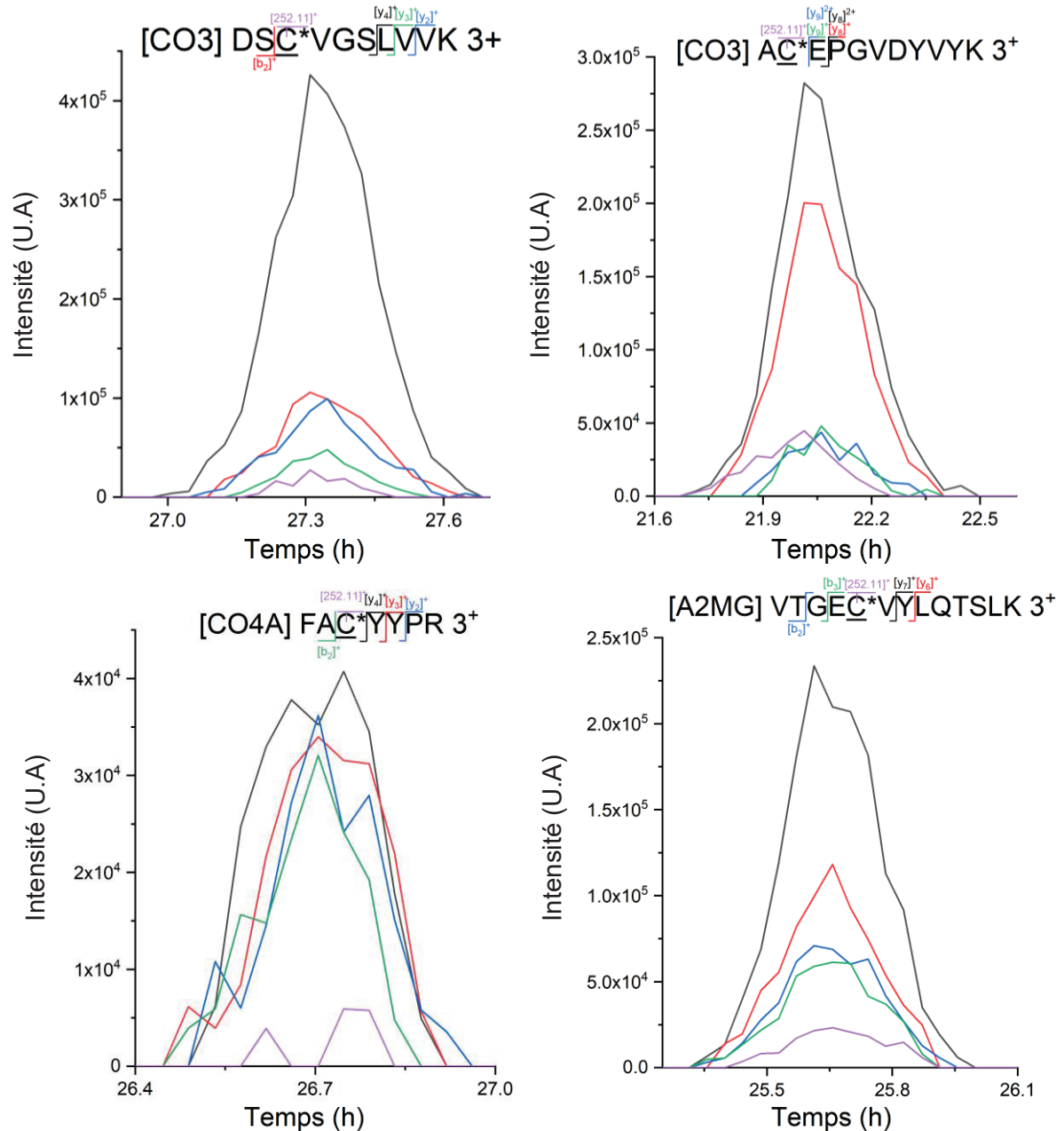


Figure 66: XIC de cinq ions fragments détectés pour quatre peptides à cystéine unique oxydée endogène dérivés par le DabDn dans un échantillon de plasma et fragmentés en PRM-LID. Contrairement aux précédents spectres de fragmentation, l'ion rapporteur à m/z 252,1120 n'est pas le fragment le plus intense. Cela est dû à un changement du laser au cours de ma thèse pour un laser continu irradiant toujours à 473 nm avec une puissance de 800 mW.

Ce ratio d'oxydation ensuite peut être comparé à celui des autres échantillons (valeurs disponibles dans le [Tableau 9](#) en [Annexe II](#)). Pour cela, le ratio moyen de chaque peptide de la protéine pour un même échantillon a été moyenné, traduisant une oxydation moyenne de la protéine représentée en [Figure 67](#). Ainsi, il apparaît clairement que les protéines minoritaires au sein du plasma (CO4a, FIBB, A2MG, CO3 et FINC) expriment une plus grande variabilité en Cys-SOH que les protéines HSA et TrH,

plus concentrées. Par ailleurs, les ratios d'oxydations des différentes protéines ne suivant pas les mêmes tendances, un biais de mesure ou de protocole est à écarter.

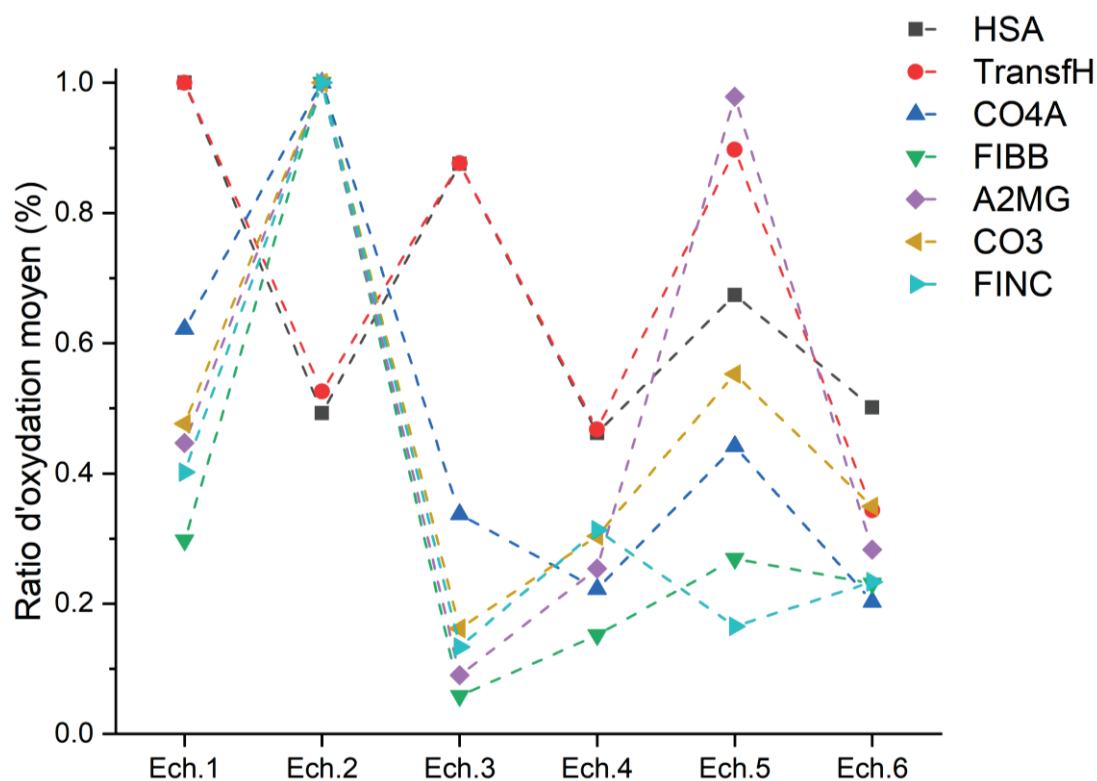


Figure 67: Quantité relative de protéines à Cys-SOH endogènes dérivée entre les différents échantillons. Cette quantité a été obtenue en moyennant les ratios obtenus avec l'aire du pic chromatographique de chaque peptide à Cys-SOH endogène dérivé normalisée par l'aire du pic maximale du même peptide parmi les six échantillons, et ce pour les sept protéines (albumine humaine en noir, sérotransferrine humaine en rouge, complément C4a en bleu, fibronectine β en vert, α -2 macroglobuline en violet, complément C3 en jaune et fibronectine en bleu ciel).

J'ai ensuite comparé la sensibilité des techniques de fragmentation HCD et LID pour la détection des Cys-SOH endogènes dérivés en évaluant, pour chaque peptide à Cys-SOH endogène dérivé détecté, le nombre d'échantillons dans lequel celui-ci est détecté lors des analyses PRM-LID et PRM-HCD (Figure 68). Les peptides dérivés sont répartis par protéine et, dans chaque case, est inscrit le nombre d'échantillons dans lequel ceux-ci ont été détectés. Plus le nombre d'échantillons est élevé, plus la couleur verte de la case est foncée. En revanche, si le peptide dérivé n'a été détecté dans aucun des échantillons, la case correspondante est rouge. Cette comparaison ne s'étend pas à la HSA, puisque tous les peptides dérivés suivis ont été détectés dans tous les échantillons pour les deux modes de

fragmentation. La HSA représentant 99 % du contenu protéique plasmatique, les peptides qui en sont issus sont les plus abondants et souffrent moins d'une différence de sensibilité.

CO4A	LID	HCD	TransfH	LID	HCD	CO3	LID	HCD
SCGLHQLLR	3		SVIPSDGPSVACK	6	6	DSCVGSLLVVK	6	5
SCEQR	6	5	DCHLAQVPSHTVVAR	6	1	ADIGCTPGSGK	6	5
FACYPR	6	5	DQYELLCLDNTR	6	6	DIQEEQVNSLPGSITK	6	5
FIBB	LID	HCD	SCHTGLGR / SHTAVGR	6	6	NTMILEICTR	6	5
LESDVSAQMEYCR	6	5	WCAVSEHEATK	6	6	VYAYYNLEESCTR	6	5
ECEEIIR	6	5	DDTVCLAK	6	6	ACEPGVDYVYK	6	5
VYCDMNTENGGWTVIQNR	6	5	DYELLCLDGTR	6	6	A2MG	LID	HCD
NYCGLPGEYWLGNDK	6	5	FDEFFSAGCAPGSK	6	6	YDVENCLANK	6	5
FINC	LID	HCD	EACVHK	6		MCPQLQQYEMHGPEGLR	4	
ISCTIANR	6	5	ASYLDCIR	6	6	NALFLES AWK	6	5
TFYSCTEGR	4	2	KPVEEYANCHLAR	6	6	VTGEGCVYLQTSK	6	5
GEWTCIAYSQLR	2		DSSLCK	3		ETTFNSLLCPSGGEVSEELSK	6	5
			INHCR	4	2	VYDYYETDEFAIAEYNAPCSK	5	
			WCALSHHER	6				
			SAGWNIPIGLLYCDLPEPR	6	6			

Figure 68: Comparaison des sensibilités atteintes en LID et HCD pour la détection de peptides à cystéines oxydées endogènes dérivés par le chromophore DabDn issus de six protéines plasmatiques, sur six échantillons de plasma. Les chiffres et l'intensité de la couleur verte représentent le nombre d'échantillons de plasma dans lesquels le peptide a été détecté. La couleur rouge sans chiffre indique que le peptide n'a pas été détecté.

Les peptides à Cys-SOH endogènes dérivés sont systématiquement détectés dans un plus grand nombre d'échantillons lorsqu'ils sont analysés en PRM-LID. En effet, seuls 39 peptides à Cys-SOH endogènes dérivés ont pu être détectés lors de l'analyse PRM-HCD. Les peptides non détectés correspondent aux peptides les moins concentrés, c'est-à-dire présentant un faible ratio d'oxydation lors de l'analyse PRM-LID. L'absence totale de détection de certains peptides parmi six des sept protéines suivies lors de leur analyse en PRM-HCD, et ce sur six échantillons différents, confirme l'important gain en sensibilité apporté par la technique LID.

Bien que la LID permette une plus grande LDD/LDQ, de nombreux peptides à cystéines oxydées n'ont pas été détectés parmi les protéines ciblées. Une telle absence peut se justifier par l'absence d'oxydation naturelle pour les cystéines des peptides concernés, par un défaut d'optimisation du protocole de dérivation endogène, ou par un défaut lors de la préparation et du conditionnement des échantillons en amont de la dérivation. Cette dernière piste est à écarter puisqu'aucun réducteur justifiant une diminution de la quantité de Cys-SOH n'est employé lors du conditionnement des

échantillons. De plus, la suroxydation des Cys-SOH en Cys-SO₂H et Cys-SO₃H est possible, mais suffisamment mineure pour ne pas impacter sensiblement un échantillon de plasma correctement traité.

Pour les protéines HSA et TrH, seuls un (HSA, C487) et deux (TrH C19 et C345) sites précédemment détectés lors de l'étude *in vitro* n'ont pas été détectés *in vivo*. Une telle différence peut être due à une réactivité réduite sur ces sites liée à la conformation de la protéine *in vivo*. En traçant la structure 3D de ces deux protéines et en surlignant les cystéines-SOH détectées en jaune et non détectées en rouge ([Figure 69](#)), j'ai cherché à savoir si les sites non détectés sous forme oxydée-dérivée étaient localisés sur des structures secondaires spécifiques. Par exemple, pour la protéine TrH, l'un de ces résidus (C19) ainsi que 4 autres qui n'ont pas été détectés sous forme SOH dérivée ni *in vitro* ni *in vivo* (C355, C402 et C418 et C523) sont localisés sur des hélices alpha, bien que les résidus C345 et C402 font partie d'un feuillet plissé bêta. Pour la protéine HSA, le résidu non détecté sous la forme oxydée-dérivée (C487) ainsi que deux autres résidus jamais détectés sont situés au niveau du cœur hydrophobe de la protéine tandis que le résidu C316, jamais détecté non plus, est situé à la surface protéique. Ainsi, la structure secondaire n'explique pas à elle seule la diminution de la réactivité de certaines cystéines. D'autres facteurs tels que le pH/pKa, l'accessibilité du site au solvant et au chromophore, l'encombrement stérique dû à la proximité d'autres cystéines et d'autres liaisons internes peuvent avoir un impact majeur sur la dérivation des Cys-SOH.

En plus de la quantification des Cys-SOH dérivés entre les échantillons, cette méthode pourrait permettre d'étudier les relations entre structure protéique et susceptibilité d'oxydation. Les résultats obtenus pourraient être comparés avec ceux issus d'expérimentations en mobilité ionique pour établir si l'oxydation induit un changement de conformation de la protéine, ou si le changement de conformation induit une oxydation.

Bien que les conditions optimales de dérivation aient été établies, la totalité du protocole de dérivation n'a pas fait l'objet de suffisamment d'optimisations pour garantir la dérivation et la détection de l'intégralité des Cys-SOH de l'échantillon, ce qui en fait une piste majeure à explorer.

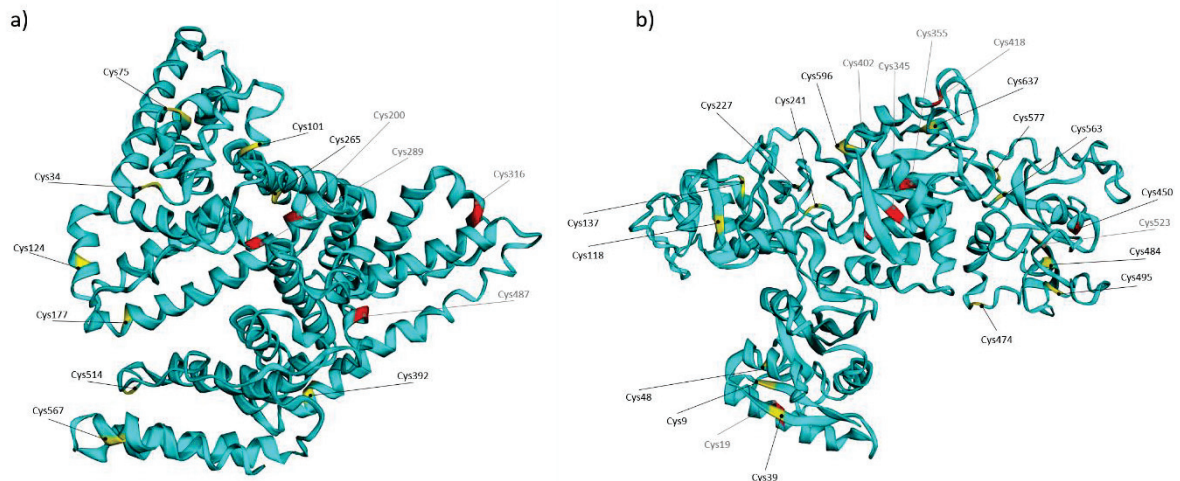


Figure 69: Structure secondaire PDB de : a) l'albumine humaine ; b) la transferrine humaine. Les cystéines oxydées et détectées avec succès sont mises en surbrillance jaune et étiquetées en noir, tandis que les cystéines oxydées non détectées sont mises en surbrillance rouge et étiquetées en gris. Les figures ont été réalisées grâce au logiciel Ezmol.

Conclusion

Au cours de ce chapitre, j'ai réussi à détecter spécifiquement les peptides à cystéine unique dont les cystéines ont été oxydées en acides sulféniques grâce à la spectrométrie de masse haute résolution couplée à la fragmentation LID à 473 nm. Cette approche repose sur la dérivation des groupements SOH des cystéines avec un chromophore fabriqué sur mesure, le dabcyI cyclohexanedione (DabDn), qui comprend un groupement dabcyI qui fragmente suite à une irradiation laser à 473 nm conjugué à un groupement cyclohexanedione permettant de dériver spécifiquement les acides sulféniques. Les conditions de dérivation des Cys-SOH par le DabDn ont été établies et optimisées *in vitro* grâce à l'utilisation de peptides et protéines modèles dont les cystéines ont été oxydées par l'action d' H_2O_2 . La spécificité de dérivation a été établie au travers de l'absence de dérivation des peptides à méthionine oxydée ainsi que des peptides à cystéines suroxydées en acides sulfoniques et sulfoniques. Une fois dérivés, les peptides sont fragmentés en LID, dont les spectres de fragmentation montrent la

génération de fragments spécifiques issus de la dissociation du chromophore comme de la rupture de la chaîne peptidique (ions b et y). Ceux-ci sont essentiels pour confirmer la séquence du peptide lors d'analyses protéomiques dites de « shotgun proteomics ».

Les peptides à cystéines oxydées endogènes dérivées issus de sept protéines plasmatiques humaines ont pu être directement détectés dans six échantillons de plasma humain par PRM-LID après leur dérivaison avec le chromophore DabDn, sans recourir à des étapes d'enrichissement. La LID permet la détection de 46 peptides à Cys-SOH endogènes dérivés contre seulement 39 détectés par PRM-HCD. Ainsi, la spécificité optique de la LID apportée à la sélectivité de la spectrométrie de masse permet d'augmenter la sensibilité de détection des acides sulféniques endogènes lors de l'analyse d'un échantillon biologique. De telles analyses peuvent être entreprises pour l'évaluation à grande échelle de la relation entre stress oxydant et pathologies humaines telles que le vieillissement ou les maladies neurodégénératives.

La dérivaison et détection des acides sulféniques endogènes de protéines dans un milieu biologique complexe ayant été accomplie avec succès, il est important d'établir si l'absence de détection de certains peptides à Cys-SOH endogènes dérivés des différentes protéines est due à un phénomène biologique naturel ou à un défaut du protocole, dont les étapes de digestion et de SPE n'ont pas été optimisées. Pour cela, ce dernier fera l'objet d'une optimisation développée au cours du prochain chapitre.

De plus, la quantification relative employée ici est soumise aux biais analytiques (stabilité du laser dans le temps, encrassement de l'appareil) ; elle ne peut se faire qu'entre échantillons d'une même analyse (pas de comparaisons dans le temps) et nécessite le recours à un échantillon de référence stable pour valider les comparaisons entre les échantillons. Pour pallier ces inconvénients, j'ai mis en place une seconde dérivaison par un chromophore dabcyI maléimide (DabMal) se greffant spécifiquement aux fonctions SH. Cela permettra d'évaluer la quantité de Cys-SOH et Cys-SH libres d'un même peptide au sein d'un même échantillon et ainsi d'établir leur ratio pour réaliser une quantification interne exempte de biais. Le développement de cette nouvelle méthodologie en parallèle de l'optimisation du protocole de dérivaison des Cys-SOH endogènes sera explicité durant le chapitre suivant

Chapitre IV. Détection spécifique et quantification relative multiplexée des acides sulféniques de protéines plasmatiques par couplage de la spectrométrie de masse et de la photodissociation : application à une cohorte de patients Alzheimer

Introduction

La détection directe et la quantification relative des Cys-SOH endogènes d'échantillons biologiques complexes (plasmas) sont un succès grâce au gain en sensibilité apporté par leur fragmentation LID, rendue possible par leur dérivation avec le dabcyI cyclohexanedione. Cependant, seules des quantifications relatives entre les échantillons peuvent être réalisées. Ce type de quantification est sensible à de nombreux biais analytiques qui peuvent drastiquement compromettre la fiabilité de l'analyse, tels que la variation de la puissance du laser, la variation de la sensibilité de l'appareil comme lors d'une perte d'efficacité d'ionisation suite à l'encrassement de la source (bien que les sels et le DMSO des échantillons soient retirés, le DabDn est un chromophore relativement polluant), des écarts de mesure suite à une mauvaise stabilité des échantillons dans le temps... Ces biais nécessitent l'emploi d'un échantillon de référence (contrôle qualité, QC) qui permettra de corriger les valeurs défectueuses. L'analyse LID étant relativement longue (1h de séparation pour 20 minutes de rinçage et rééquilibrage), l'ajout fréquent d'un échantillon supplémentaire entraîne un allongement du temps d'analyse de la séquence, peu propice à l'analyse de cohortes. Un tel échantillon requiert d'être stable dans le temps, ce qui, faute de standards dont la qualité de conservation est connue, nous contraint à utiliser un échantillon fait à façon, dont la stabilité est à déterminer avec précaution.

La quantification interne permet de pallier les biais de la quantification relative : en normalisant le signal de l'analyte par le signal d'une référence au sein d'une même analyse, les biais de variations journalières liées au laser, à la sensibilité, à l'encrassement sont identiques pour les deux cibles. La quantification est généralement faite avec l'ajout d'une référence chimiquement similaire à l'analyte, lui permettant d'être aussi sensible que ce dernier aux variations analytiques. Cependant, la fragmentation LID requiert d'utiliser une référence qui puisse être photo-fragmentée puisque la

confirmation par MS/MS de la détection et de la quantification permet de réduire dus aux ions isobares issus de l'échantillon. Un standard isotopiquement marqué remplirait toutes les conditions requises : parfaite similarité chimique avec l'analyte (donc rendement d'ionisation et temps de rétention identiques), fragmentable en LID et observable par un décalage de masse égal à la différence isotopique entre l'analyte et sa référence, donnant accès à une quantification absolue puisque la quantité de standards introduite est connue. Malheureusement, il n'existe pas de standard de peptide à Cys-SOH dérivé par le dabcyI cyclohexanedione. Le dabcyI cyclohexanedione libre ne peut non plus être pris comme référence : étant beaucoup plus concentré dans l'échantillon et possédant un très fort rendement d'ionisation, le signal détecté est tel qu'il dépasse la limite de linéarité de l'analyseur. Ainsi, la normalisation ne pourra être réalisée que grâce une référence interne.

La LID a déjà été employée au laboratoire pour l'analyse des peptides à cystéines via la dérivation des fonctions thiols des cystéines par un chromophore dabcyI conjugué à une fonction maléimide.²¹³ Une telle dérivation permet aux peptides Cys-SH d'absorber dans le visible et de fragmenter lors de l'irradiation laser à 473 nm, à l'instar d'une dérivation des Cys-SOH par le DabDn. Les ponts S-S des protéines étant réduits au DTT au cours du protocole de dérivation des Cys-SOH d'un échantillon, les versions non oxydées (Cys-SH) des cystéines des peptides sont disponibles pour être dérivées par le chromophore dabcyI maléimide (DabMal). Ainsi, chaque peptide à Cys-SOH dérivé au DabDn posséderait son homologue Cys-SH dérivé au DabMal. La normalisation du signal du peptide Cys-SOH dérivé par celui du peptide Cys-SH dérivé permettrait d'établir un ratio d'oxydation comparable à celui des autres échantillons, indépendant des biais analytiques.

Au cours de ce chapitre, je développerai l'optimisation de la dérivation des Cys-SOH endogènes d'échantillons de plasmas en parallèle de la mise en place de la double dérivation pour la normalisation interne, puis je présenterai les résultats obtenus lors de l'analyse PRM-LID pour la quantification relative des oxydations des cystéines au sein d'une cohorte de 54 plasmas issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, positifs au COVID-19 et de patients contrôles sains.

I. Optimisation de la dérivation des Cys-SOH

Bien que les conditions de dérivation optimales déterminées dans le Chapitre III aient été utilisées et l'influence du DTT vérifiée, de nombreuses parts du protocole de dérivation ont été définies arbitrairement en accord avec les pratiques courantes de la littérature, telles que la digestion trypsique et la séparation sur phase solide (SPE). Il est possible que certaines de ces étapes soient à l'origine des absences de détection mentionnées au cours du chapitre III, et nécessitent d'être à minima contrôlées, au mieux optimisées pour la mise en place de la dérivation séquentielle des Cys-SH et Cys-SOH endogènes d'un échantillon de plasma.

I. 1. Optimisation de la dérivation/digestion des protéines oxydées

I. 1. a. Importance du temps de digestion trypsique

Le protocole de dérivation actuel fait état d'une étape de dérivation des protéines dénaturées durant 8h, suivie d'une étape de digestion trypsique de ces protéines sur toute la nuit (de 14 à 16h). Ces deux étapes cumulées durant à minima 22h, j'ai cherché à déterminer si le temps de digestion trypsique pouvait être réduit soit en faisant varier le temps de digestion trypsique entre 1h et 8h, soit en employant un Diagenode®, un appareil à ultrasons initialement conçu pour cliver l'ADN. Ce dernier est fréquemment utilisé par l'une des équipes du laboratoire, et permet d'achever la lyse et la digestion trypsique d'une culture bactérienne en 3 minutes à 50 °C.

I. 1. a. I. Protocole

6 échantillons de plasma de femme obtenus par l'Établissement Français du Sang (EFS) ont été préparés selon le protocole suivant : 10 µL de plasma a été prélevé, 40 µL d'urée 8 M ainsi que 5,4 µL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM, ratio cystéine-DTT 1-3) ont été ajoutés dans chaque échantillon, qui ont été mis à dénaturer à 60 °C pendant 40 minutes. Les échantillons ont été refroidis à

température ambiante, dilués dans 194,6 μL d' H_2O , puis 250 μL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO ont été ajoutés, suivis de 250 μL d' H_2O pour atteindre un $\%_{\text{org}}$ de 33 %. Les échantillons ont été mis à réagir à température ambiante durant toute la nuit (14h).

Caractérisation du temps de digestion classique : Dans trois échantillons de plasmas dénaturés et dérivés ont été rajoutés 10 μL de trypsine 2 mg/mL, les échantillons mis à digérer à 37 °C durant 1, 4 et 8h, puis ont été purifiés par SPE (cartouche conditionnée avec 1 mL de MeOH, 1 mL d' H_2O + 0,5 % A.F, l'échantillon chargé, rincé avec 1 mL d' H_2O + 0,5 % A.F et élué avec 2 mL de MeOH + 0,5 % A.F), évaporés à 40 °C sous flux de N_2 , repris dans 200 μL d'un solvant composé de 75/25 $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ + 0,1 % A.F, mis en vial et analysés en PRM-LID.

Digestion par Diagenode® : 10 μL de trypsine 2 mg/mL ont été ajoutés aux trois autres échantillons de plasmas dénaturés et dérivés, puis digérés comme suit : un premier échantillon (noté « Dia_3min » en [Figure 70](#)) a été digéré à 50 °C avec un cycle ultrasons/repos de 30 secondes/30 secondes durant 3 minutes. Un second échantillon (noté « Dia_15min ») a été digéré à 50 °C avec un cycle ultrasons/repos de 30 secondes/30 secondes durant 15 minutes. Le dernier échantillon (noté « Dia_30min ») a quant à lui été digéré à 37 °C avec un cycle ultrasons/repos de 30 secondes/30 secondes durant 30 minutes. La température de digestion de ce dernier échantillon diffère volontairement des autres, le groupement dabcyl est un chromophore fragile qui supporte mal les températures élevées. Abaisser la température à 37 °C, permettrait de préserver le chromophore, mais nécessite de rallonger le temps passé dans le Diagenode® pour une meilleure efficacité de digestion. Les échantillons ont ensuite été purifiés par SPE, évaporés, repris et analysés en PRM-LID comme les échantillons précédents.

I. 1. a. II. Résultats

Pour chaque échantillon, le signal de chaque peptide à Cys-SOH endogène dérivé a été rationalisé par le signal le plus intense du même peptide parmi les six échantillons, puis une moyenne par protéine de ces ratios a été établie et représentée en [Figure 70](#).

Plus le temps de digestion classique augmente, plus la quantité de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés détectée est importante puisque de plus en plus de protéines dérivées sont digérées par la

trypsine, et ce pour toutes les protéines. La digestion trypsique classique ne peut à priori pas être écourtée en dessous d'un minima de 8h de digestion.

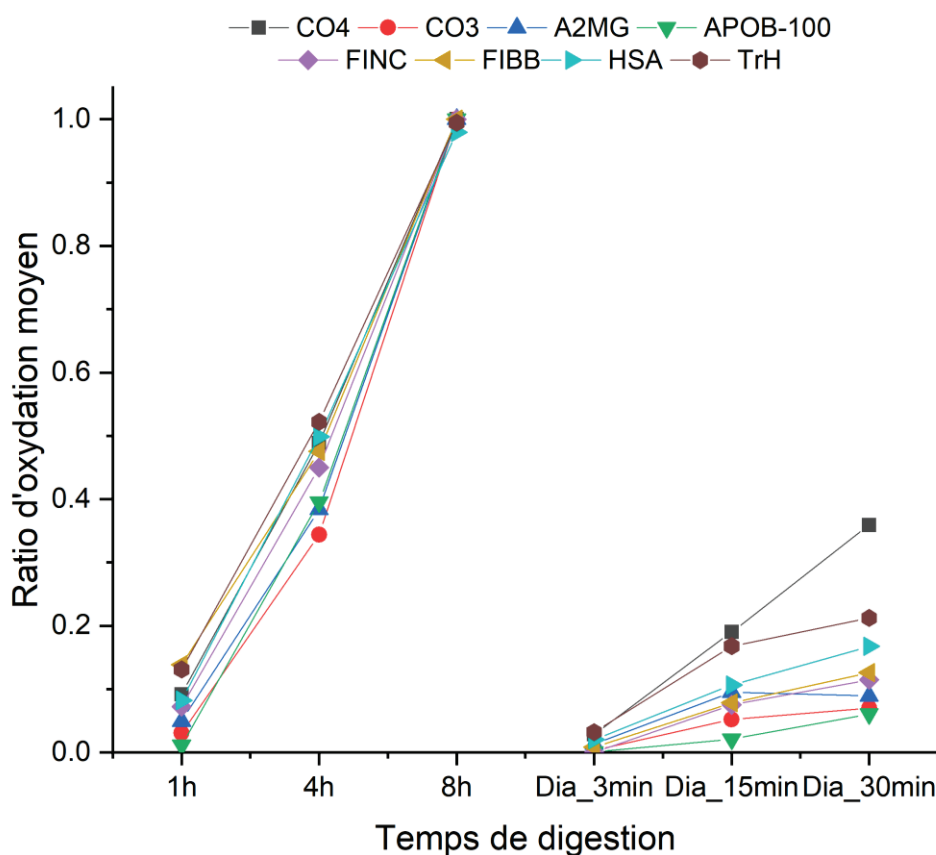


Figure 70: Évolution du ratio moyen de peptides à Cys-SOH endogène dérivés par protéine en fonction du temps et du protocole de digestion.

La digestion par le Diagenode®, ne donne pas lieu à une détection de peptides dérivés aussi élevée qu'une digestion classique, bien que son efficacité de digestion soit telle qu'en 15 minutes à 50 °C (Dia_15min) et en 30 minutes à 37 °C (Dia_30min) elle permette de détecter autant (FINC, FIBB) et deux à trois fois plus (CO4a, A2MG, HSA, CO4, APOB-100, TrH) de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés qu'une digestion classique d'une heure.

Les Cys-SOH endogènes des protéines dénaturées ayant été mises à dériver par le DabDn durant 14h, la digestion au Diagenode® aurait dû fournir des résultats comparables à un temps de digestion trypsique élevé. Une telle différence peut s'expliquer par une mauvaise digestion des protéines au Diagenode®, ce qui me paraît peu probable, la technologie étant maîtrisée au laboratoire et 15 minutes de digestion au Diagenode® garantissent la digestion totale de n'importe quel échantillon biologique. Une autre hypothèse repose sur un effet délétère des ultrasons (et éventuellement de la température)

sur la stabilité des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés, pouvant potentiellement induire des fragmentations internes du DabDn ou des ruptures au niveau de la liaison C_{cystéine}-S, donc une diminution de la quantité de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés détectés.

Pour des raisons pratiques, la digestion au Diagenode® a été écartée et ne fera donc pas l'objet d'une étude spécifique. Le protocole de digestion trypsique est conservé avec un temps minimal incompressible de 8h de digestion à 37 °C.

I. 1. b. Digestion trypsique des protéines en parallèle de la dérivation des Cys-SOH par le DabDn

Établi au chapitre 3, la dérivation des Cys-SOH endogènes est lente, mais favorisée par un milieu chauffé à 37 °C (cf. [Chapitre III.II. 2. c](#)). La digestion trypsique nécessitant à minima 8h de réaction à 37 °C, combiner l'étape de dérivation des Cys-SOH avec l'étape de digestion trypsique permettrait de réduire le temps de manipulation général tout en favorisant les conditions de réaction (température de 37 °C, Cys-SOH sous forme peptidique donc plus accessibles).

Pour cela, plusieurs échantillons ont été réalisés avec 10 µL de plasma, 40 µL d'urée 8 M ainsi que 5,4 µL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM, ratio cystéine-DTT 1-3), mis à dénaturer à 60 °C pendant 40 minutes, puis ont été mis à dériver et digérer simultanément. 184,6 µL d'H₂O, puis 250 µL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO ont été ajoutés, suivis de 250 µL d'H₂O et 10 µL de trypsine 2 mg/mL pour atteindre un %_{org} de 33 %. Les échantillons ont été mis à dériver/digérer durant 6, 8, 14, 16, 18 et 20h, purifiés par SPE, évaporés, repris, et analysés en PRM-LID de la même façon que précédemment ([I. 1. a. II](#))

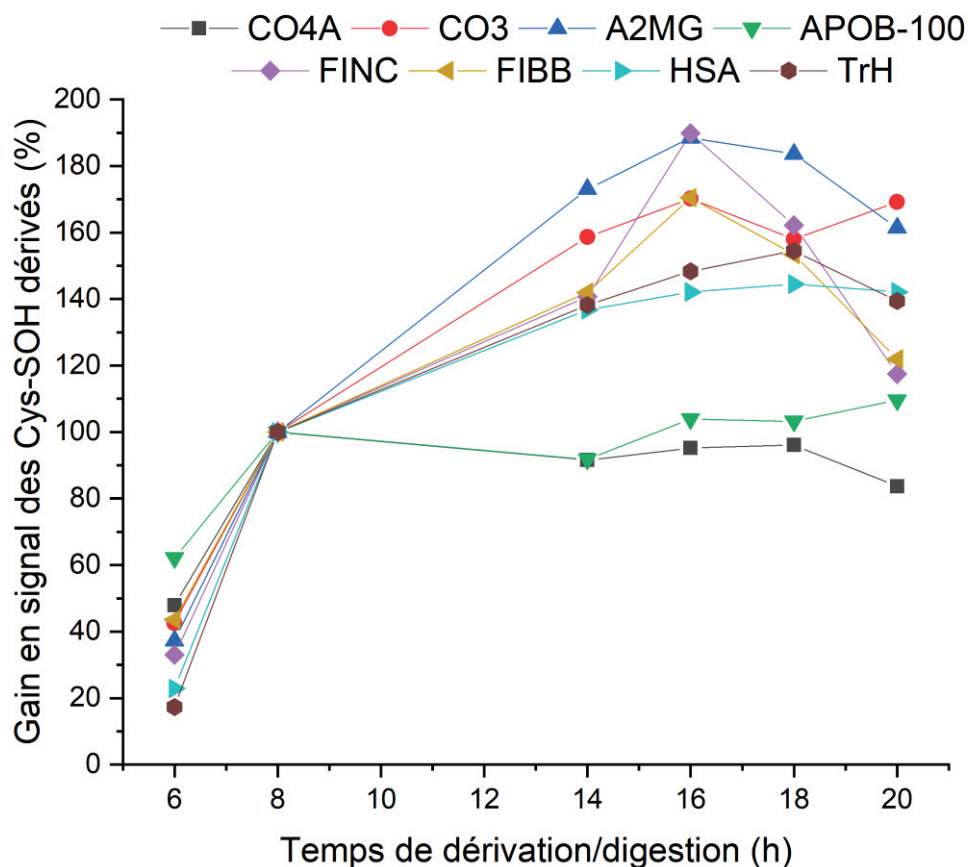


Figure 71: Évolution de la quantité de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés des protéines CO4A, CO3, A2MG, APOB-100, FINC, FIBB, HSA et TrH détectés selon le gain moyen en signal de Cys-SOH par protéine obtenu en fonction du temps de dérivation/digestion.

Le gain en signal détecté de chaque peptide à Cys-SOH endogène dérivé entre l'échantillon analysé et l'échantillon de référence (8h) a été estimé puis moyenné entre les peptides d'une même protéine. J'ai choisi d'établir la moyenne du gain par protéine, car la représentation du gain de tous les peptides à Cys-SOH dérivés suivis est trop complexe pour être pertinente. Cette méthode nécessite tout de même d'analyser les ratios individuels, puisqu'un gain ou une perte de signal conséquente d'un seul des peptides suivis peut grandement faire varier la moyenne sans être représentatif de l'ensemble des peptides qui la constituent. Ce gain moyen a ensuite été tracé en fonction du temps de digestion en [Figure 71](#).

Comme attendu, une durée de dérivation/digestion inférieure à 8h entraîne une baisse de la détection des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés, puisque les protéines plasmatiques ne sont pas totalement digérées. Une nette augmentation de la quantité de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés détectée est observable pour un temps de digestion supérieur à 8h. Un maximum de dérivation semble atteint

pour les Cys-SOH du peptide unique de la protéine APOB-100 et des peptides de la protéine CO3 après 20h de dérivation/digestion, ce qui n'est pas le cas de ceux des autres protéines dont le signal détecté décroît au-delà de 16h (FINC, A2MG, FIBB) et 18h (TrH, CO4A, HSA). Aucune différence significative entre 16h et 18h de dérivation/digestion n'est observée pour les peptides à Cys-SOH dérivés des protéines CO4A, A2MG, et APOB-100, à l'instar de ceux de la protéine HSA dont les quantités dérivées détectées après 16, 18 et 20h de dérivation/digestion sont comparables.

Un optimum de détection est donc atteint après une durée de dérivation/digestion comprise entre 16 et 18h. Pour des raisons pratiques, j'ai situé mon optimal à 14h de dérivation/digestion correspondant à une réaction sur la nuit, tout en sachant que cette dernière peut être étendue à 4h de plus si les conditions de manipulation le permettent.

I. 2. Ajout d'acide formique et vérification du %_{org}

Après avoir optimisé le temps de dérivation/digestion, j'ai cherché à établir la pertinence des différentes étapes de mon protocole. Les protocoles de digestion protéique incluent habituellement un ajout d'acide formique de 2 % du volume de l'échantillon après la digestion pour stopper l'activité de la trypsine, sensible au pH, notamment pour limiter son autodigestion donc la multiplication de peptides interférents dans l'échantillon. Cette étape permet également un meilleur rendement d'éluion des analytes en SPE, les cartouches HLB favorisant la rétention des analytes acidifiés, bien que le pH acide n'ait pas été optimal pour la dérivation des Cys-SOH des peptides modèles (cf. [Chapitre III.II. 2. c](#)). En parallèle, j'ai également souhaité vérifier si l'emploi de 33 % de phase organique dans le milieu était bien optimal dans le cadre d'une dérivation en milieu biologique complexe, en accord avec les conditions de dérivation optimales établies dans le Chapitre III.

I. 2. a. I. Protocole

Trois échantillons ont été réalisés selon le protocole suivant : 10 µL de plasma ont été pipetés, auxquels 40 µL d'urée 8 M et 5,4 µL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM) ont été ajoutés, puis les plasmas mis

à dénaturer à 60 °C pendant 40 minutes. Après dénaturation, 195 µL d'H₂O ont été rajoutés pour diluer l'échantillon et permettre son refroidissement rapide, puis 250 µL de DabDn à 1,06 mM dans le DMSO ont été rajoutés.

Dans l'échantillon contrôle et l'échantillon qui sera acidifié après la réaction de dérivation/digestion (noté « 2 % A.F » sur la [Figure 72](#)) 250 µL d'H₂O ont été ajoutés pour obtenir un pourcentage en DMSO du milieu de réaction de 33 %.

Cette étape a été ignorée dans l'échantillon noté « 50%org », pour obtenir un pourcentage en DMSO du milieu de réaction de 50 %.

Pour tous les échantillons, la dérivation/digestion a été réalisée avec l'ajout 10 µL de trypsine 2 mg/mL, les échantillons placés à 37 °C pendant 8h. L'échantillon « 2 % A.F » a été acidifié avec 15 µL (2 % du volume de l'échantillon) d'A.F. Les échantillons ont ensuite été purifiés par SPE, évaporés, repris, et analysés en PRM-LID de la même façon que précédemment ([I. 1. a. II](#)).

I. 2. a. II. Résultats

Pour les deux conditions à tester, le signal de chaque peptide à Cys-SOH endogène dérivé détecté a été normalisé par le signal du même peptide issu de l'échantillon contrôle, qui a ensuite été moyenné par protéine. Le gain en signal de protéine Cys-SOH dérivée moyen par échantillon est tracé en [Figure 72](#).

L'ajout d'acide formique après dérivation/digestion permet un gain en signal de peptide Cys-SOH dérivé pour toutes les protéines allant de 9 % (FIBB) à 49 % (A2MG) supplémentaires par rapport aux conditions contrôles. Un tel gain peut s'expliquer par une amélioration du rendement d'élution des peptides lors de l'étape SPE grâce à l'affinité des cartouches HLB pour les peptides acidifiés.

Une augmentation du pourcentage de phase organique dans le milieu de réaction à hauteur de 50%_{org} amène à une perte intense de signal des Cys-SOH dérivées (supérieure à 40 %) pour la majorité des protéines, excepté pour CO4a et TrH présentant un gain en signal de peptide à Cys-SOH dérivé moyen respectif de 34 et 17 % par rapport à la condition contrôle. Après examen, ce gain est porté par seulement 33 et 37,5 % des peptides à Cys-SOH dérivés de ces protéines, dont le signal a suffisamment augmenté pour compenser la baisse des autres. Par comparaison, le gain induit par l'ajout d'A.F

représente entre 81 et 100 % des peptides à Cys-SOH de chaque protéine sur les huit protéines évaluées.

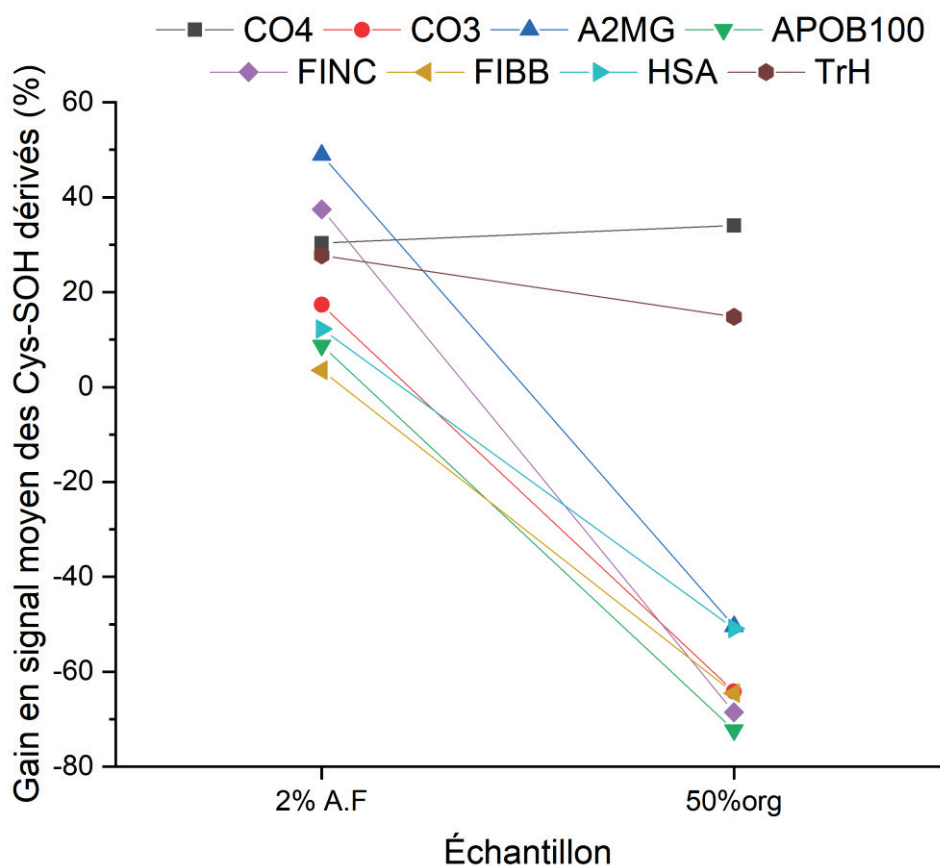


Figure 72: Gain en signal des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés moyen par protéine apporté par l'acidification de l'échantillon avec 2 % du volume de l'échantillon en A.F ou par l'élévation du pourcentage de DMSO dans le milieu de réaction à 50 % par rapport au signal de l'échantillon contrôle (sans A.F et 33%_{org}).

Le pourcentage de phase organique est donc maintenu à 33%_{org}, en accord avec les conditions de dérivation optimales établies au cours du [Chapitre III](#) ainsi qu'avec l'étude menée par Sirotin *et al.*²⁴⁶ sur l'activité de la trypsine en fonction de la nature du solvant de digestion, 2 % volumiques d'A.F seront ajoutés après l'étape de digestion-dérivation, améliorant la qualité de la SPE donc la détection des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés.

I. 3. Évaluation des performances de la SPE

L'Extraction sur Phase Solide (SPE) est une technique de purification d'échantillon où un échantillon est chargé et retenu sur un support solide sur lequel sont greffées des fonctions chimiques permettant des interactions d'affinités plus fortes avec l'analyte qu'avec le solvant, entraînant sa rétention (Figure 73 – étape 2). L'échantillon retenu est « lavé » (ou « rincé ») en faisant couler dans la cartouche un solvant permettant l'élution d'interférents matriciels sans éluer les analytes (Figure 73 – étape 3) qui, eux, seront élués avec un solvant pour lequel ils auront une plus forte affinité d'interaction qu'avec la phase stationnaire, les décrochant de cette dernière (Figure 73 – étape 4).

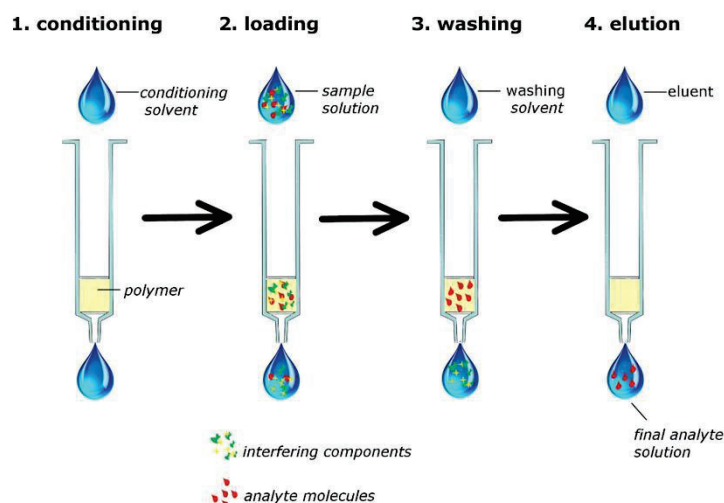


Figure 73: Principe général d'une purification SPE.²⁷⁴

Il existe de nombreux types de supports solides utilisables en fonction de l'analyte ciblé (supports à interaction apolaire, mixte, échange cationique/anionique fort/faible...). J'utilise des cartouches SPE Oasis® HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) de la marque Waters qui sont particulièrement adaptées pour la rétention et l'élution de peptides. Ces cartouches nécessitent d'être conditionnées par l'emploi d'1 mL de MeOH, permettant le déploiement des chaînes greffées, et 1 mL d'H₂O + 0,5 % A.F pour vider le MeOH de la cartouche et doper l'affinité entre la phase solide et les analytes hydrophobes par l'instauration d'un milieu fortement hydrophile. L'échantillon est chargé et les différents analytes sont retenus en fonction de leur hydrophobicité : les composés très polaires tels que les sels ayant une plus

grande affinité pour la phase mobile hydrophile traversent ainsi la cartouche sans être retenus. Un rinçage avec 1 mL d'H₂O + 0,5 % A.F permet d'aider à décrocher les analytes les moins apolaires (indésirables) éventuellement retenus lors de la charge, puis l'élution des analytes se fait grâce un solvant contenant un pourcentage élevé de phase organique. J'utilise un solvant à 100 % de MeOH + 0,5 % A.F pour permettre l'élution de l'intégralité des analytes retenus sur la cartouche.

Le protocole d'extraction sur phase solide employé est un protocole standard, non optimisé. De ce fait, l'intégralité des analytes est récupérée après élution, mais également la totalité du DabDn en excès ainsi qu'une partie d'éléments matriciels de faible polarité non élués lors du rinçage comme des peptides trop courts pour présenter un intérêt analytique ou des acides aminés libres. Faire varier le pourcentage de MeOH lors de la phase d'élution ou rajouter une faible quantité de MeOH dans le solvant de rinçage pourrait permettre d'éluer les peptides à Cys-SOH endogènes dérivés sans éluer le DabDn (bien plus hydrophobe que les peptides dérivés), ainsi que d'éluer au lavage une plus grande quantité d'interférents matriciels. Ainsi, l'échantillon serait moins complexe, et son analyse moins polluante pour le système analytique, augmentant la durée de vie de la colonne chromatographique et réduisant le risque de « carryover » (accumulation d'analyte mal élué dans la colonne chromatographique donnant lieu à un biais de mesure) ou de suppression ionique en source due à l'encrassement.

I. 3. a. Évaluation de la rétention des Cys-SOH au sein des cartouches Oasis[®] HLB 3 cc 60 mg (Waters)

Pour évaluer les bornes de rétention des analytes, un échantillon a été préparé selon le protocole optimisé ([I. 2. a. I](#)) comprenant l'ajout de 15 µL d'A.F après la digestion.

Une gamme de solvants d'élution allant de 100/0 d'H₂O/MeOH (v/v) + 0,5 % A.F à 0/100 d'H₂O/MeOH (v/v) + 0,5 % A.F par palier de 5 % MeOH a été réalisée.

La cartouche a été conditionnée avec 1 mL de MeOH puis 1 mL d'H₂O + 0,5 % A.F, puis l'échantillon chargé. Pour chaque solvant d'élution de la gamme, 2 mL du solvant ont été introduits, la fraction

éluée récupérée, mise à évaporer à 40 °C sous flux de N₂ puis reprise dans 200 µL d'une solution de 70/30 H₂O/ACN + 0,1 % A.F et analysée en PRM-LID.

Les quantités de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés élués ont été déterminées pour chaque solvant d'élution puis sommées pour obtenir la quantité de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés élués cumulée en fonction de la quantité de MeOH du solvant d'élution. Les quantités éluées cumulées ont été normalisées par le total élué, puis le cumul de chaque peptide à Cys-SOH endogènes dérivés élué a été moyenné par protéine pour chaque solvant d'élution et tracé en [Figure 74](#). Le signal cumulé du chromophore résiduel libre (DabDn) élué a également été évalué.

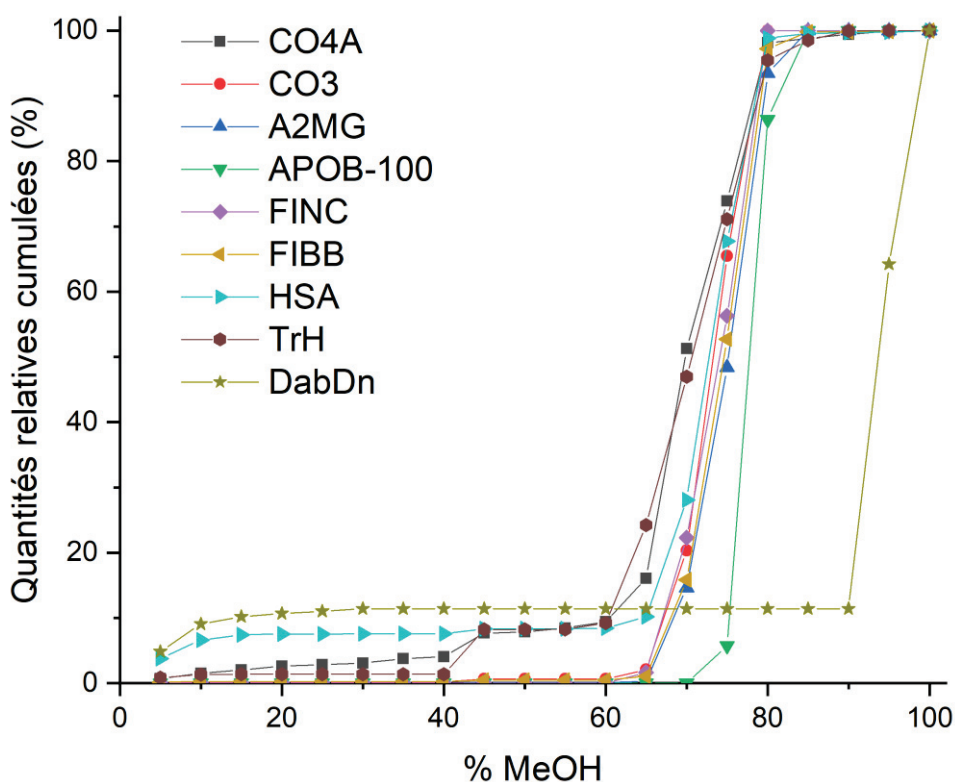


Figure 74: Quantité relative cumulée de peptides à Cys-SOH dérivés élués par protéine en fonction du pourcentage en MeOH du solvant d'élution utilisé avec une cartouche SPE Oasis® HLB 3cc 60 mg.

L'utilisation d'un faible pourcentage de MeOH (5 %) dans le solvant de rinçage donne lieu à l'élution indésirée d'une faible proportion de peptides à Cys-SOH dérivés issus des protéines CO4A, CO3, FIBB, HSA, TrH (0,1 à 3,7 %) ainsi qu'à l'élution de 4,8 % de DabDn libre. Le DabDn et les peptides à Cys-SOH dérivés étant bien plus apolaires que les peptides normaux, 5 % de MeOH ne devrait pas suffire à les

éluer. Les peptides à Cys-SOH dérivés continuent d'être élués en faible proportion (0,2 à 7,4 %) jusqu'à 15 % de MeOH. Entre 15 % et 40 % de MeOH, seuls les peptides à Cys-SOH dérivés issus des protéines HSA et CO4A sont progressivement élués (la quantité cumulée de peptides à Cys-SOH endogènes élués augmentant respectivement de 7,4 à 7,6 % et de 2 à 3,7 %). À 40 % de MeOH, une nouvelle élution partielle des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés de toutes les protéines a lieu, sauf pour celui issu de la protéine APOB-100. Ceux des protéines HSA, TrH et CO4A continuent d'être partiellement élués jusqu'à 65 % de MeOH, pourcentage à partir duquel les peptides à Cys-SOH endogènes dérivés de toutes les protéines sont fortement élués (excepté celui de la protéine APOB-100 dont l'élution débute à partir 75 % MeOH). L'intégralité des peptides à Cys-SOH endogènes de la protéine FINC est élue avec un pourcentage en MeOH dans le solvant de reprise de 80 %. Ce pourcentage est de 85 % pour les peptides à Cys-SOH endogènes dérivés issus des protéines CO3, A2MG et APOB-100, de 95 % pour ceux issus de la protéine TrH, et de 100 % pour ceux issus des protéines CO4A, FIBB et HSA.

De même que pour les peptides Cys-SOH endogènes dérivés, une élution partielle indésirée du DabDn libre a lieu avec des pourcentages en MeOH compris entre 5 et 25 %. Le DabDn est à nouveau élué avec 95 % MeOH pour être totalement récupéré avec 100 % MeOH.

Une telle élution anticipée du DabDn et des peptides dérivés est le signe d'un défaut de rétention de la cartouche qui peut être causé soit par sa surcharge (échantillon trop concentré), soit par la présence du DMSO qui modifie les propriétés de rétention de la cartouche. Le dabcyll maléimide ayant été fréquemment utilisé au laboratoire avec des ratios molaires largement plus importants (ratio molaire cystéine-dabcyll maléimide 1-5) sans qu'aucune élution partielle à faible %MeOH n'ait été constatée, il semblerait que l'impact délétère DMSO sur la cartouche prime devant la surcharge pour expliquer ce phénomène. Tant que ce dernier sera présent, seul un rinçage avec 100 % d'H₂O + 0,5 % A.F pourra être utilisé pour éviter une élution intempestive des peptides à Cys-SOH dérivés durant le rinçage. L'élution des peptides à Cys-SOH dérivés sera réalisée avec 100 % de MeOH + 0,5 % A.F.

I. 3. b. Extraction Liquide-Liquide par le MTBE

En plus des données obtenues par l'étude de la rétention des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés sur la cartouche SPE, j'ai pu constater la survenue d'écoulements intempestifs de liquide jaune hors de la cartouche lors de la charge et du rinçage de divers échantillons, traduisant une élution partielle même en l'absence de MeOH dans le solvant de rinçage. Après récupération, évaporation, reprise et analyse de ces écoulements, ces derniers ne contiennent que du chromophore libre, hormis quelques rares exceptions où un faible pourcentage (<0,5 %) de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés issus de la protéine HSA a pu être détecté.

Pour lutter contre ces éluions partielles indésirées qui risqueraient d'entraîner celle des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés, une dilution de l'échantillon peut être envisagée. Cependant, celle-ci devra être réalisée avec de l'H₂O, l'augmentation du pourcentage de phase organique de l'échantillon ne mènerait qu'à une augmentation de l'affinité entre les analytes et la phase mobile au détriment de celle avec la phase stationnaire, donc une élution intempestive des composés les plus apolaires plus prononcée. La dilution avec un solvant aqueux pose problème : le DabDn est insoluble dans l'eau, ainsi les peptides à Cys-SOH dérivés risquent de précipiter et d'être donc mal récupérés.

Si le fort pourcentage de DMSO ne peut être modifié sans compromettre l'échantillon, il est possible de diminuer la saturation de la cartouche en retirant le DabDn libre avant la SPE par extraction liquide-liquide.

I. 3. b. I. Mise en place de l'extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide (ou LLE) est une technique d'extraction où les analytes (ou les interférents) sont extraits d'un échantillon liquide grâce à un solvant non miscible à l'échantillon. Le choix du solvant d'extraction se fait en fonction des propriétés de l'analyte. Ici, je souhaite extraire le DabDn libre, un composé très fortement apolaire, dans un échantillon majoritairement aqueux composé à 66 % d'H₂O et 33 % de DMSO, un solvant organique miscible dans une large variété de solvants aussi bien aqueux qu'organiques. Mon choix s'est porté sur le MTBE (methyl tert-butyl ether), un solvant organique très volatil non miscible à l'eau, disponible au laboratoire. Ce dernier est moins dense que l'eau et le DMSO

et devrait constituer la phase supérieure lors de l'extraction. J'ai donc tenté, grâce au MTBE, d'extraire le DabDn d'un échantillon de plasma dont les Cys-SOH endogènes ont été dérivés ainsi que d'estimer la quantité de consommée lors de la réaction.

Pour cela, un échantillon de plasma dérivé a été préparé selon le protocole suivant : les protéines issues de 10 μL de plasma humain ont été dénaturées grâce à 5,4 μL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM), 40 μL d'urée 8 M durant 40 minutes à 60 °C. L'échantillon a été refroidi à température ambiante, dilué dans 184,6 μL d' H_2O , puis 250 μL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO, 250 μL d' H_2O et 10 μL de trypsine 2 mg/mL ont été rajoutés puis l'échantillon mis à dériver/digérer durant 8h à 37 °C pour des raisons pratiques. 15 μL d'A.F (2 % volumique) ont été ajoutés à l'échantillon, puis le DabDn a été extrait grâce à 9 extractions successives de 700 μL de MTBE : 700 μL de MTBE ont été introduits dans l'échantillon, formant deux phases distinctes sans modification de leur volume respectif. L'échantillon biphasé a été vortexé pendant 1 minute et laissé à décanter pendant 1 minute de sorte que les phases reviennent à l'équilibre. La phase inférieure correspondant à la phase aqueuse contenant les peptides à Cys-SOH dérivés, reconnaissable à sa couleur orange, a été pipetée dans un second eppendorf contenant 700 μL de MTBE tandis que la phase supérieure contenant le DabDn libre qui n'a pas réagit extrait de l'échantillon (couleur jaune vif) a été conservée et notée « Extrait 1 ». Un total de 750 μL de phase aqueuse a été pipeté, indiquant que le DMSO est resté en phase aqueuse, garantissant la solubilité des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés. La manipulation a été réalisée 9 fois au total, permettant de récupérer 9 eppendorfs contenant le MTBE dans lequel le DabDn libre de l'échantillon a été extrait, dont la couleur jaune vif devient de plus en plus claire au fur et à mesure des extractions. Ces eppendorfs ont été notés « Extraits X », X allant de 1 à 9, qui seront désignés comme « les extraits ». Les extraits ont ensuite été séchés à 40 °C sous N_2 et repris dans 150 μL de DMSO. En parallèle, une gamme de concentration de DabDn dans le DMSO comportant 8 points allant de 0 à 0,62 mM et 5 répétitions au centre de 0,24 mM a été réalisée.

Les absorbances à 425 nm (correspondant au maximum d'absorption du groupement dabcyI) de la gamme de concentration et des échantillons ont ensuite été mesurées en triplicat par un lecteur de plaques optiques EnSpire® (PerkinElmer), puis une courbe de calibration a été tracée depuis la

moyenne des absorbances de chaque point de la gamme en fonction de leurs concentrations respectives (Figure 75).

L'équation de la courbe de calibration de la gamme présente un excellent R^2 (0,999 - Figure 75) et permet de calculer les différentes concentrations en DabDn des extraits, disponible dans le Tableau 4.

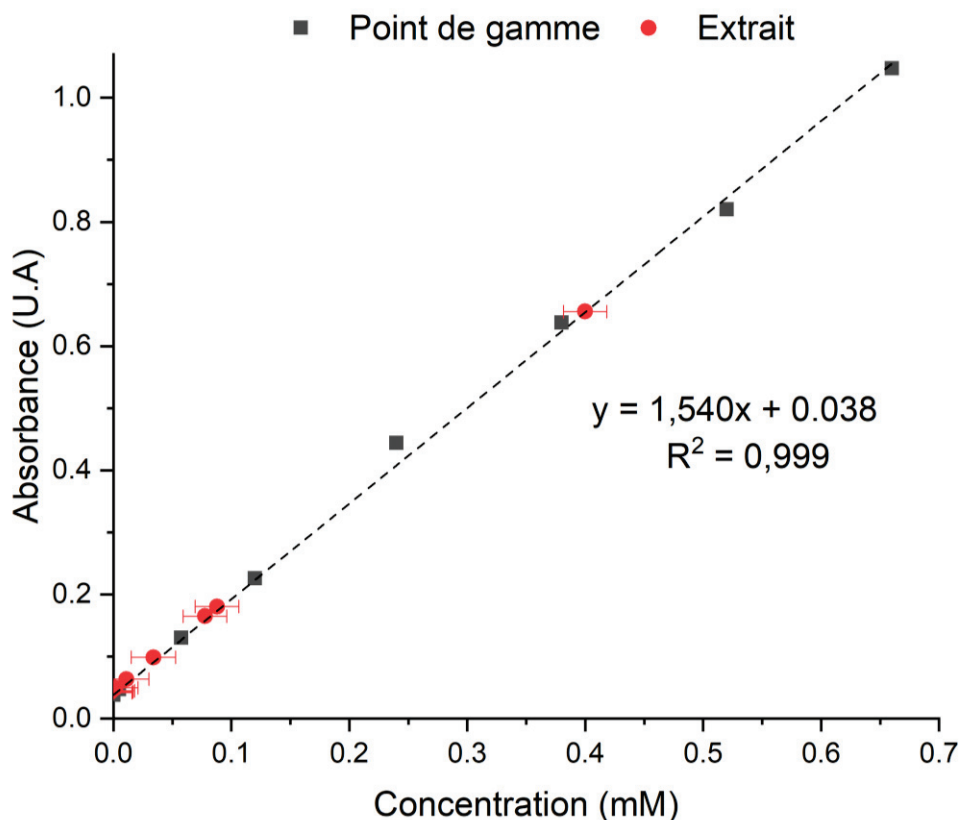


Figure 75: Courbe de calibration issue de la gamme en DabDn comportant 8 points compris entre 0 et 0,62 mM (noirs), réalisés en triplicats avec 5 répétitions au centre (0,24 mM) (non représentés). Les concentrations des différents extraits calculées grâce de l'équation de la droite de calibration sont affichées en rouge.

Extrait n°	Absorbance (U.A)	Concentration en DabDn de l'extrait calculée (mM)	CV (%)	Quantité de DabDn extraite (mol)
1	0,656	0,400	1,8	$2,80 \cdot 10^{-7}$
2	0,165	0,078	9,7	$5,4 \cdot 10^{-8}$
3	0,064	0,011	426	$8 \cdot 10^{-9}$
4	0,05	0,001	-	-
5	0,045	0	-	-
6	0,043	0	-	-
7	0,042	0	-	-
8	0,043	0	-	-
9	0,043	0	-	-

Tableau 4: Récapitulatif de la quantité de DabDn libre qui n'a pas réagi extraite de l'échantillon par le MTBE dans chaque Extrait analysé.

Au total, $3,4 \cdot 10^{-7}$ moles de DabDn libre qui n'a pas réagi ont été extraites de l'échantillon suite aux 9 extractions au MTBE soit 85 % des $4 \cdot 10^{-7}$ moles initialement introduites dans l'échantillon après l'étape de dénaturation. 15 % du DabDn a donc été consommé au cours des 8h de dérivation/digestion.

Si le protocole a permis l'extraction totale du DabDn en trois étapes avec peu de solvant (2,1 mL au total), il est peut-être possible d'optimiser cette étape en minimisant les extractions nécessaires, ou en limitant le volume de solvant utilisé lors des extractions. Le rendement d'extraction ρ_{LLE} est défini par le volume de solvant initial V_A , le volume de solvant extracteur V_B , la constante de distribution du DabDn entre les deux solvants D , et le nombre d'extractions successives n , selon l'équation suivante :²⁴⁷

$$\rho_{LLE} = 1 - \frac{1}{[1 + D \frac{V_B}{V_A}]^n}$$

Un plus grand volume de solvant extracteur V_B ainsi qu'un plus grand nombre d'extractions n permettent d'obtenir un meilleur rendement d'extraction. Le nombre d'extractions suivant une fonction exponentielle et le volume d'extraction suivant une fonction linéaire, le nombre d'extractions aura un impact plus prononcé sur le rendement d'extraction que le volume d'extraction.

Afin d'optimiser l'extraction, il est nécessaire de connaître la constante de distribution D du DabDn (définie selon $D = C_{\text{extrait1}}/C_{\text{DabDn aq}}$) entre le MTBE et l' H_2O . Comme le DabDn est un chromophore à façon, celle-ci est à déterminer expérimentalement :

$$D = \frac{C_{\text{extrait1}}}{C_{\text{DabDn aq1}}} = \frac{0,400}{\frac{n_{\text{initial}} - n_{\text{extrait}}}{V_A}} = \frac{0,400}{\frac{(C_{\text{DabDn}}/V_A) - (C_{\text{extrait1}}/V_B)}{V_A}} = \frac{0,400}{\frac{(0,53/750) - (0,4/700)}{750}} = \frac{0,400}{0,160} = 2,5$$

Le coefficient de distribution D est donc estimé à 2,5. Cette valeur est potentiellement biaisée puisque 15 % du DabDn a été consommée durant la dérivation/digestion, le coefficient a donc été recalculé en conséquence à $2,7 \pm 0,2$.

Connaissant le coefficient de distribution du DabDn, le rendement d'extraction théorique de l'extraction actuelle est estimé à 97,7 % du DabDn extrait de l'échantillon s'il n'avait pas été consommé. Pour conserver ce rendement théorique avec seulement deux extractions, 1550 μL de

MTBE par extraction sont nécessaires, tandis que 12,5 mL de MTBE sont requis pour extraire l'intégralité du DabDn en seule manipulation. À l'inverse, quatre extractions successives permettent d'abaisser le volume de MTBE par extraction à 450 µL et à 300 µL pour cinq extractions successives.

Le MTBE étant un solvant à la fois volatil et peu visqueux, il induit un écoulement intempestif du contenu pipeté, ce qui peut s'avérer problématique lors du transvasement de la fraction aqueuse entre les extractions. J'ai donc préféré définir un optimal à deux extractions avec 1550 µL de MTBE par extraction pour minimiser le risque d'incident manipulateur.

I. 3. b. II. Impact de la LLE sur la SPE et sur l'analyse PRM-LID

Le DabDn libre pouvant être totalement extrait de l'échantillon, j'ai cherché à évaluer l'impact d'une telle extraction sur les éluions intempestives rencontrées durant l'étape de SPE.

Pour cela, j'ai préparé trois échantillons de plasma, contenant chacun 10 µL de plasma dénaturé par 5,4 µL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM), 40 µL d'urée 8 M durant 40 minutes à 60 °C. Les échantillons ont été refroidis à température ambiante, dilués dans 184,6 µL d'H₂O, puis 250 µL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO, 250 µL d'H₂O et 10 µL de trypsine 2 mg/mL ont été rajoutés, puis les échantillons mis à dériver/digérer durant 8h à 37 °C pour des raisons pratiques. 15 µL d'A.F (2 % volumique) ont ensuite été ajoutés à tous les échantillons. Deux échantillons ont été purifiés par SPE (cartouche HLB 60 mg, conditionnée avec 1 mL de MeOH puis 1 mL d'H₂O + 0,5 % A.F, les échantillons chargés, rincés avec 1 mL d'H₂O + 0,5 A.F et élués avec 2 mL de MeOH + 0,5 % A.F) et le DabDn du troisième échantillon a été extrait grâce à deux extractions successives de 3 mL (volume supérieur à celui défini précédemment pour des raisons pratiques) avant SPE. Les 750 µL d'échantillon (phase aqueuse) ont été récupérés et purifiés par SPE à l'instar des deux échantillons non extraits.

Après la SPE, tous les échantillons ont été mis à évaporer à 40 °C sous flux de N₂, et repris dans 200 µL d'un solvant 70/30 H₂O/ACN + 0,1 % A.F. Le DabDn du second échantillon a été extrait grâce à deux extractions de 3 mL de MTBE (après SPE). Cette fois-ci, seuls 140 µL d'échantillon ont pu être récupérés, correspondants au volume d'H₂O du solvant de reprise. Pour compenser, 60 µL d'ACN + 0,1 % A.F ont été rajoutés à l'échantillon. Les trois échantillons ont été mis en vial puis analysés en PRM-LID. Le signal des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés des échantillons a été normalisé par

celui du même peptide de l'échantillon 1 sans extraction du DabDn (contrôle), puis moyenné avec les autres peptides de la même protéine et tracé en [Figure 76](#).

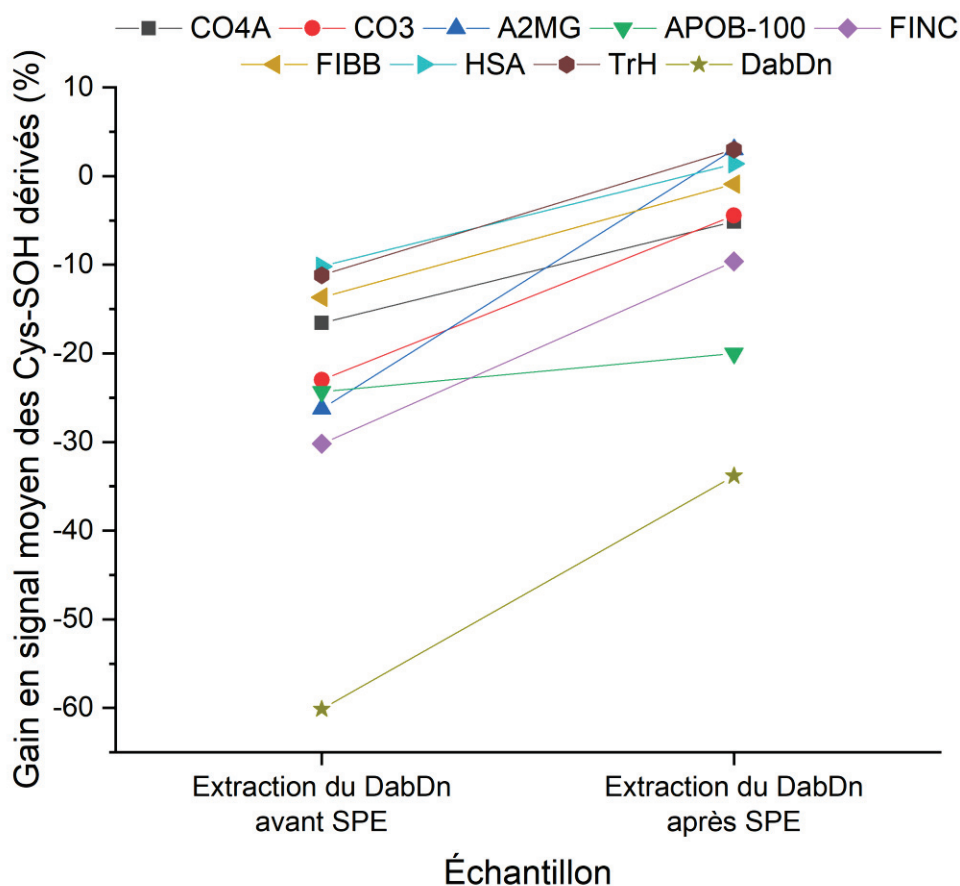


Figure 76: Gain en signal moyen par peptides à Cys-SOH endogènes dérivés d'une même protéine par rapport à l'échantillon contrôle (DabDn non extrait) obtenu avec l'extraction liquide-liquide du DabDn par le MTBE avant ou après l'étape de SPE.

L'extraction du DabDn avant la SPE induit une perte de signal par rapport à l'échantillon contrôle pour l'intégralité des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés, bien qu'aucune élution intempestive de ces peptides n'ait été observée durant la phase de SPE. Suite à l'extraction, le signal du DabDn libre détecté a chuté d'approximativement 60 %. L'extraction du DabDn après la SPE induit également une perte de signal conséquente pour les peptides à Cys-SOH endogènes dérivés des protéines APOB-100, FINC, CO3 et CO4A. Le signal des autres protéines ne semble pas présenter de perte ou de gain significatif. Dans cet échantillon, le signal du DabDn n'a diminué que de 30 %.

La présence d'un signal du DabDn peut être le signe d'une mauvaise extraction de ce dernier, ce qui est fortement improbable au vu des optimisations théoriques établies, ou d'une pollution du système

suite à un phénomène de carryover lors de l'analyse de l'échantillon contrôle, ce qui a été confirmé après la réalisation d'analyses PRM-LID complémentaires. Ce carryover n'a été détecté que pour le DabDn libre, les peptides à Cys-SOH endogènes dérivés en étant exempts.

La perte de signal des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés peut être due soit à l'extraction d'une partie des peptides par le MTBE, soit à la présence de MTBE dans l'échantillon modifiant les propriétés de rétention et d'élution de la cartouche, ce qui constitue un inconvénient majeur pour l'analyse des Cys-SOH endogènes. L'étape de LLE ne sera donc pas intégrée au protocole, mais reste une piste de développement.

I. 3. c. Évaluation de la rétention des Cys-SOH au sein des cartouches Oasis[®] HLB 3 cc 400 mg (Waters)

Devant les éluions partielles indésirées des peptides à SOH endogènes dérivés et l'impossibilité de retirer le DMSO ou réduire la quantité de DabDn dans l'échantillon, j'ai choisi d'employer des cartouches SPE de plus grande capacité. Pour cela, je me suis tourné vers les cartouches Oasis[®] HLB 3 cc 400 mg (Waters), comprenant cinq fois plus de phase solide pour un volume de charge équivalent.

Pour tester les bornes de rétention de la cartouche à l'instar de [I. 3. a](#), un échantillon a été réalisé avec 10 µL de plasma, dénaturé par 5,4 µL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM), 40 µL d'urée 8 M durant 40 minutes à 60 °C. L'échantillon a été refroidi à température ambiante, dilué dans 184,6 µL d'H₂O, puis 250 µL de DabDn 1,06 mM dans DMSO, 250 µL d'H₂O et 10 µL de trypsine 2 mg/mL ont été rajoutés, puis l'échantillon mis à dériver/digérer durant 14h à 37 °C. 15 µL d'A.F (2 % volumique) ont ensuite été ajoutés.

Le conditionnement de la cartouche SPE HLB 400 mg a été fait avec 4 mL de MeOH puis 4 mL H₂O + 0,5 % A.F. L'échantillon a été chargé, puis rincé avec 4 mL d'H₂O + 0,5 % A.F où aucune coulée jaune n'a été observée, puis 2,5 mL de chaque solvant d'élution d'une gamme identique à [I. 3. a](#) ont été introduits et récupérés successivement. La quantité de phase stationnaire étant élevée, j'ai estimé le volume de solvant piégé dans la cartouche de 0,5 mL que je ne récupérerai pas après élution. Chaque

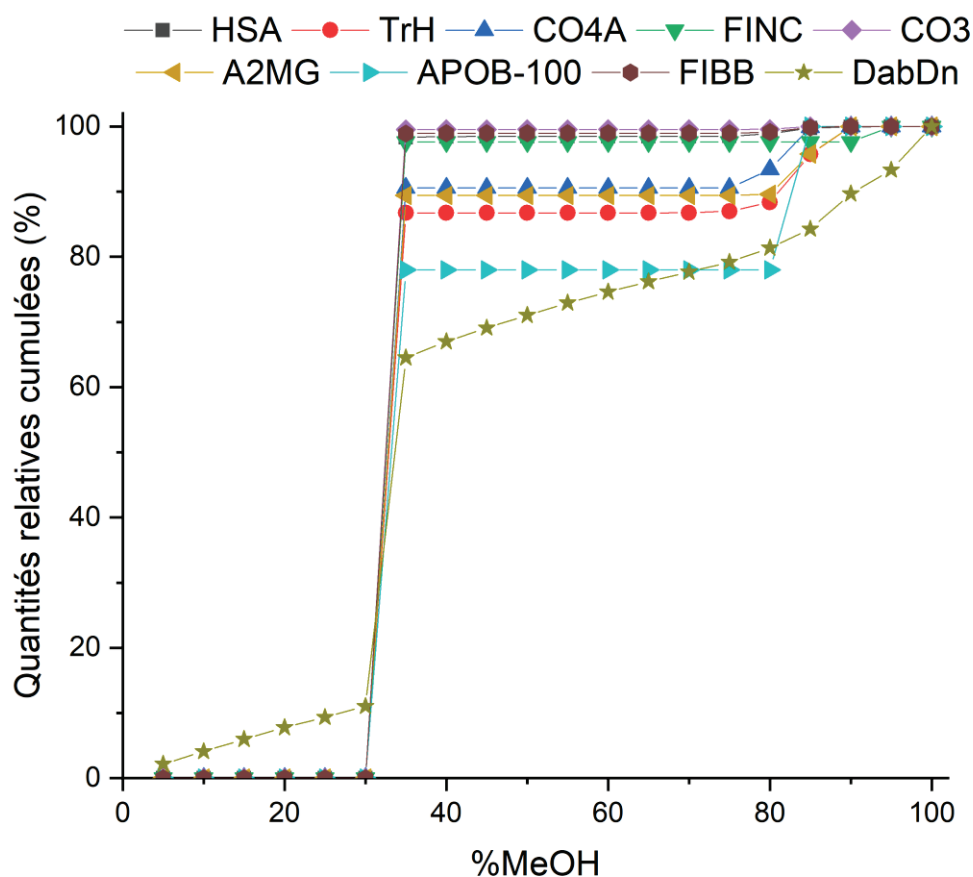


Figure 77: Quantité de peptide à Cys-SOH endogènes dérivés élués par protéine en fonction du pourcentage en MeOH dans le solvant d'élution utilisé avec une cartouche SPE Oasis® HLB 3cc 400 mg.

fraction récupérée a été évaporée à sec sous N_2 à 40 °C, reprise dans le solvant de reprise et analysée en PRM-LID. De même que pour [I. 3. a](#), les quantités de chaque peptide à Cys-SOH endogènes dérivés détectés ont été sommées pour obtenir les quantités cumulées de ces peptides par échantillon, puis chacun des cumuls a été normalisé par le total de peptide à Cys-SOH endogène dérivé extrait, et la moyenne des ratios de tous les peptides d'une même protéine établie ([Figure 77](#)).

Aucune élution partielle de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés n'est détectée lors de l'utilisation de cartouches de 400 mg, excepté pour une part négligeable de la HSA (<0,008 %) représentée par deux peptides sur les neuf suivis. Une élution progressive du DabDn (courbe étoilée) avec l'augmentation du pourcentage en MeOH est toujours constatée, indiquant que le phénomène n'est pas totalement résolu, bien qu'aucune perte visible de DabDn n'ait été observée lors du rinçage avec 4 mL d' H_2O + 0,5 %A. F. Cette élution partielle est observable à l'œil nu, où le solvant se teinte d'une faible couleur jaune juste après son introduction, qui s'éclaircit pour redevenir incolore après à peine 1 mL de solvant écoulé. 35 % de MeOH dans le solvant d'élution suffisent à éluer la majeure partie des

peptides à Cys-SOH endogènes dérivés de chaque protéine, mais ce n'est qu'avec 85 % (CO3, APOB), 90 % (CO4A, A2MG, FIBB), 95 % (TrH, FINC) et 100 % (HSA) de MeOH que l'intégralité des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés des protéines correspondantes sera éluée. Contrairement à la cartouche HLB 60 mg, une grande partie du DabDn reste retenue dans la cartouche HLB 400 mg : après introduction de 2,5 mL de MeOH + 0,5 % A.F, la coulée reste jaune, montrant qu'il reste encore du DabDn libre ou lié dans la cartouche. 17,5 mL de MeOH supplémentaires sont nécessaires pour éluer totalement le DabDn de la cartouche SPE. Les fractions additionnelles de 2,5 mL de MeOH récupérées ne contenant pas de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés, mais uniquement des quantités variables de DabDn, une grande partie de ce dernier reste donc piégé au sein de la cartouche, formant dans celle-ci un anneau orange visible à l'œil nu, très lentement élué par le MeOH. Ainsi, utiliser un solvant d'élution de 100 % MeOH + 0,5 % A.F permet de récupérer l'intégralité des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés sans accumuler de quantité excessive de DabDn dans l'élution, ce qui atténuera le carryover rencontré. Bien que cette nouvelle cartouche permette d'effectuer un rinçage avec 30 % de MeOH, un tel pourcentage entraînerait l'élution complète des peptides sans cystéines et à cystéines libres (SH) (élus à partir de 10% MeOH) dont je souhaite me servir comme référence interne pour m'assurer du bon déroulement de la digestion en cas de perte ou gain de sensibilité inattendu.

Le protocole de SPE optimal est donc établi avec une phase de rinçage réalisée avec de 4 mL 95/5 d'H₂O/MeOH + 0,5 % A.F suivis de 0,5 mL de MeOH + 0,5 % A.F pour retirer le solvant de rinçage de la cartouche, puis d'une élution effectuée avec 1,5 mL de MeOH + 0,5 % A.F

I. 4. Dénaturation des protéines

Étape clef du protocole de dérivation des Cys-SOH endogènes, la dénaturation des protéines comprend l'emploi d'une forte quantité d'urée et l'emploi de DTT comme agent réducteur. J'ai tenu à m'assurer que ces étapes étaient cruciales pour le bon déroulement du protocole.

I. 4. a. Utilisation d'urée

40 μ L d'urée 8 M sont ajoutés pour faciliter l'étape de dénaturation protéique. L'ajout d'une telle quantité de sel peut potentiellement être défavorable à la dérivation des Cys-SOH endogènes ou influencer sur la rétention des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés et du DabDn au sein de la cartouche SPE, ce qui nécessite d'être vérifié.

Pour cela deux échantillons ont été réalisés, l'un avec les 40 μ L d'urée 8 M et l'autre où l'urée a été remplacée par 40 μ L H₂O. Pour chaque échantillon, 10 μ L de plasma ont été dénaturés avec 5,4 μ L de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM). 40 μ L d'urée 8 M ou 40 μ L d'H₂O ont été ajoutés, et les deux échantillons placés à 60 °C durant 40 minutes. Les échantillons ont été refroidis à température ambiante, dilués dans 184,6 μ L d'H₂O, puis 250 μ L de DabDn 1,06 mM dans le DMSO, 250 μ L d'H₂O et 10 μ L de trypsine 2 mg/mL ont été rajoutés et l'échantillon mis à dériver/digérer durant 14h à 37 °C. 15 μ L d'A.F (2 % volumique) ont ensuite été ajoutés, les échantillons ont été purifiés par SPE (cartouche HLB 400 mg), conditionnée avec 4 mL de MeOH, 4 mL d'H₂O + 0,5 % A.F, l'échantillon chargé et rincé avec 4 mL de 95/5 d'H₂O/MeOH (v/v) + 0,5 % A.F puis 0,6 mL de MeOH + 0,5 % A.F, et élué avec 1,5 mL de MeOH + 0,5 % A.F, évaporé à 40 °C sous flux de N₂, repris dans 200 μ L d'un solvant de 75/25 H₂O/ACN + 0,1 % A.F puis mis en vial et analysé en PRM-LID.

Les quantités de chaque peptide à Cys-SOH endogène dérivé détecté ont été rationalisées par la quantité maximale du même peptide parmi les échantillons, puis ce ratio moyenné avec les autres peptides d'une même protéine et tracé en [Figure 78](#). L'étude de l'évolution du ratio d'oxydation en fonction de la présence ou non d'urée permet de prendre en compte l'effet de l'urée sur les étapes de dénaturation, digestion et dérivation.

L'absence d'urée durant l'étape de dénaturation entraîne un gain en signal significatif pour le peptide à Cys-SOH endogène dérivé de la protéine APOB-100, ainsi qu'un gain plus modéré pour les peptides à Cys-SOH endogènes dérivés des protéines HSA et A2MG. En revanche, il en résulte une perte drastique en signal pour ceux issus de la protéine FINC, et modérée pour ceux issus des protéines TrH, CO4A, CO3 et FIBB. Après analyse des ratios individuels de chaque peptide, le nombre de peptides à Cys-SOH dérivés étant impactés négativement par la présence d'urée est faible, induisant la diminution du ratio d'oxydation moyen de la protéine de façon non représentative. J'ai fait le choix de retirer l'urée du protocole de dérivation, ce qui permettra d'alléger le protocole.

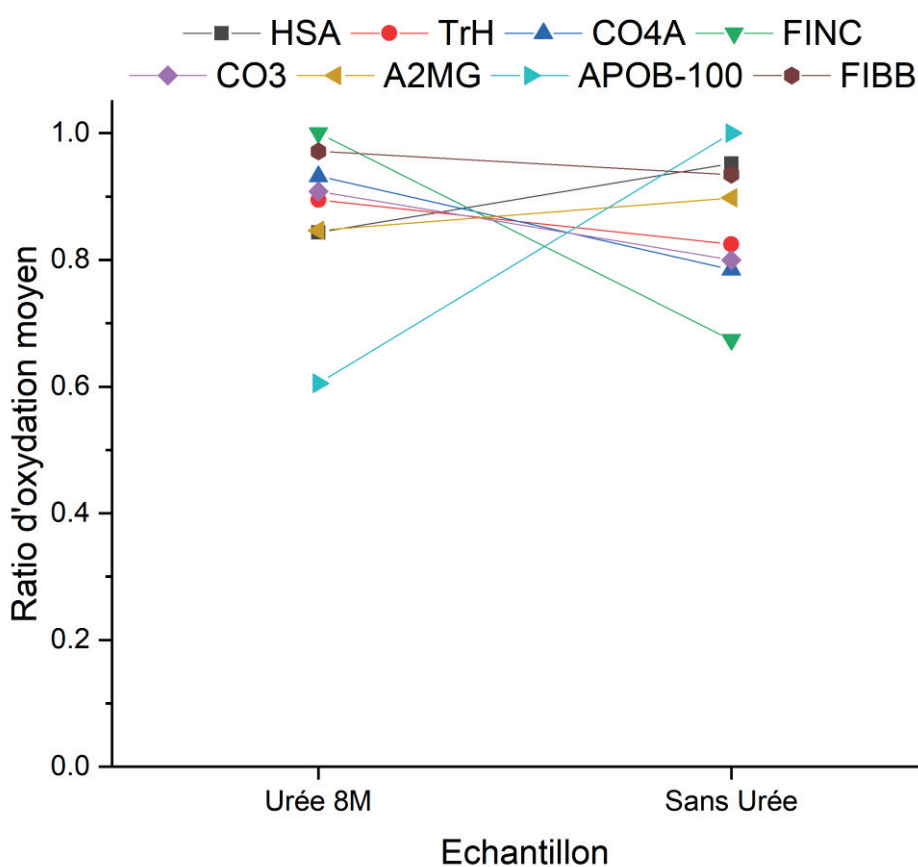


Figure 78: Quantité de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés détectée moyennée par protéine en fonction de la présence ou non d'urée dans l'étape de dénaturation.

I. 4. b. Agent réducteur employé

Au cours de l'optimisation de l'oxydérivation peptidique, j'ai établi que l'utilisation du DTT jusqu'à un ratio cystéine-DTT de 1-15 n'entraînait pas la réduction des Cys-SOH endogènes de l'échantillon. Ces résultats sont issus de conditions particulières dans une matrice artificielle simple, dont la pertinence pour une utilisation dans une matrice biologique complexe doit être vérifiée. Par ailleurs, j'ai voulu déterminer si l'emploi du DTT était réellement obligatoire puisque la dérivation ne porte que sur les cystéines oxydées en SOH, qui ne sont donc pas impliquées dans des ponts S-S. Leur rupture facilite l'accès de la trypsine aux acides aminés arginine (R) et lysine (K), j'ai donc augmenté la quantité de trypsine dans l'échantillon pour tenter de garantir une bonne digestion des protéines malgré l'absence de DTT. J'ai également souhaité confirmer que le TCEP réduisait bien les Cys-SOH, en accord avec la littérature.

Les 10 µL de plasma de chaque échantillon ont été dénaturés selon les conditions suivantes

– 5,4 µL de DTT 150 mM (dans l'AMBIC 50 mM) (ratio 1-3) et 40 µL H₂O ont été ajoutés, puis l'échantillon placé à 60 °C durant 40 minutes (échantillon contrôle)

– 60 µL de TCEP 4 mg/mL (ratio cystéine-TCEP de 1-3) et 40 µL H₂O ont été ajoutés, puis l'échantillon placé à 60 °C durant 40 minutes (échantillon noté « TCEP (1-3) » en [Figure 79](#)).

– 54 µL de DTT 150 mM (dans l'AMBIC 50 mM) (ratio 1-30) et 40 µL H₂O ont été ajoutés, puis l'échantillon placé à 60 °C durant 40 minutes (échantillon « DTT+ (1-30) »)

– 5,4 µL de DTT 15 mM (dans l'AMBIC 50 mM) (ratio 1-0,3) et 40 µL H₂O ont été ajoutés, puis l'échantillon placé à 60 °C durant 40 minutes (échantillon « DTT- (1-0,3) »)

– 45,4 µL d'H₂O ont été ajoutés, puis l'échantillon placé à 60 °C durant 40 minutes (échantillon « ∅DTT Trypsine+ 2,5-1))

Les échantillons ont ensuite été complétés à 240 µL avec de l'H₂O, puis 250 µL de DabDn 1,06 mM dans DMSO a été ajouté avec 250 µL d'H₂O et 10 µL de trypsine 2 mg/mL, excepté pour l'échantillon ∅DTT, pour lequel 10 µL de trypsine 20 mg/mL ont été ajoutés (le ratio massique protéine-trypsine habituel

de 1-0,04, a été augmenté à 1-0,4 pour compenser l'absence de DTT). Les échantillons ont ensuite été mis à dériver/digérer durant 14h (nuit), puis ont été purifiés par SPE HLB 400 mg (conditionnée avec 4 mL de MeOH, 4 mL d'H₂O + 0,5 % A.F, l'échantillon chargé et rincé avec 4 mL de 95/5 d'H₂O/MeOH (v/v) + 0,5 % A.F puis 0,6 mL de MeOH + 0,5 % A.F, et élué avec 1,5 mL de MeOH + 0,5 % A.F), évaporés à 40 °C sous flux de N₂, repris dans 200 µL un solvant de 75/25 H₂O/ACN + 0,1 % A.F puis mis en vial et analysés en PRM-LID.

Les quantités de chaque peptide à SOH endogène dérivé détecté ont été rationalisées par rapport au même peptide de l'échantillon contrôle, moyennées par protéine et tracées en [Figure 79](#).

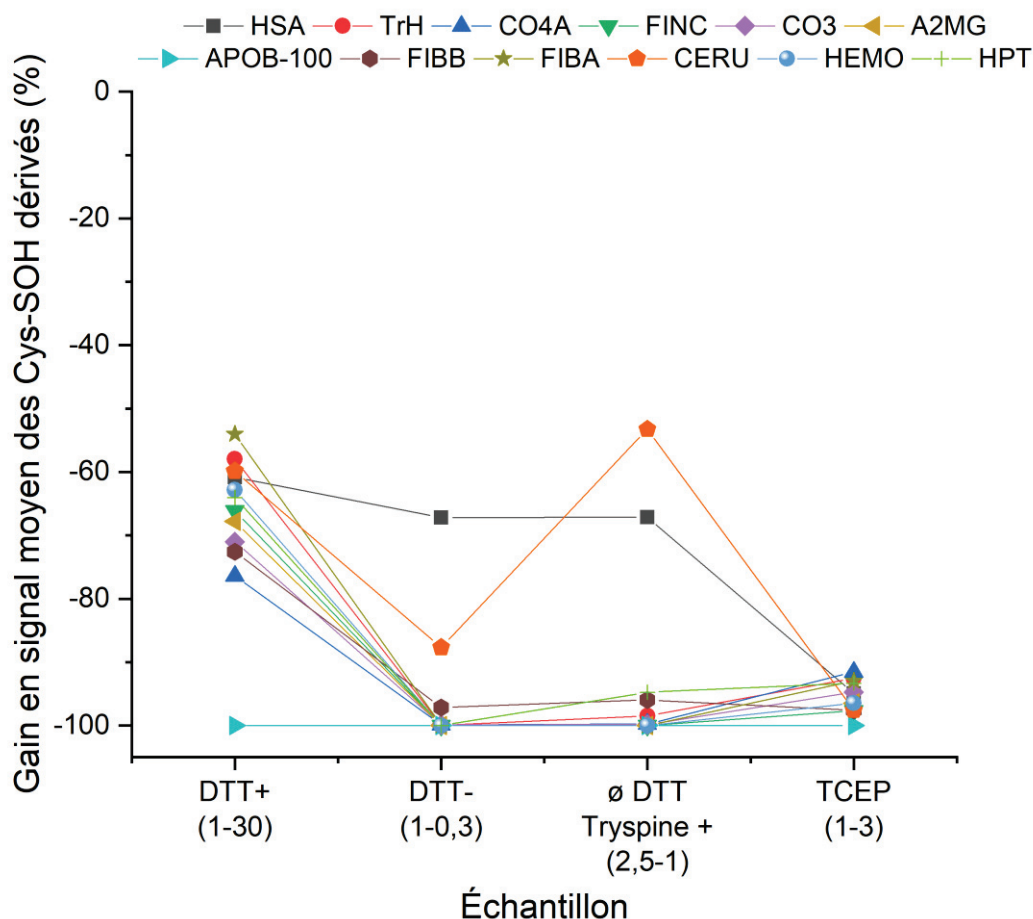


Figure 79: Évolution du gain en signal des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés détecté par protéine obtenue en fonction de la quantité de DTT utilisée lors de l'étape de dénaturation ou de l'utilisation de TCEP par rapport à un échantillon contrôle (dénaturation avec 5,5 µL de DTT 150 mM dans AMBIC 50 mM, ratio cys-DTT 1-3).

L'utilisation d'un ratio de cystéine-DTT dix fois plus ou moins important que celui actuellement utilisé entraîne une violente déplétion du signal des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés. Dans le premier

cas (ratio 1-30), la quantité de DTT présente dans le milieu est bien trop importante, réduisant potentiellement les SOH endogènes, tandis que dans le second cas (ratio 1-0,3) la protéine conserve sa conformation 3D qui empêche sa digestion ainsi que l'accès du chromophore aux cystéines oxydées. L'accroissement de la quantité de trypsine dans l'échantillon ne permet pas d'outrepasser l'absence de DTT, bien qu'une partie des SOH endogènes de la protéine CERU aient pu être dérivés, possiblement localisés dans une région périphérique présentant peu de ponts disulfures, donc accessibles à la trypsine ou au chromophore. L'emploi de TCEP au lieu du DTT induit effectivement la réduction des SOH endogènes puisqu'une très faible quantité de peptides à SOH dérivés a été détectée parmi toutes les protéines suivies.

Ces résultats me permettent de conclure que le ratio cystéine-DTT employé permet la préservation des SOH endogènes de l'échantillon biologique tout en garantissant la bonne rupture des ponts disulfures. Conformément à la littérature ([Chapitre II.I. 1. b](#)), l'emploi de TCEP entraîne la réduction des SOH et n'est donc pas compatible avec leur analyse.

I. 5. Répétabilité de la dérivation des Cys-SOH endogènes dans le temps

Avec l'optimisation du protocole, j'ai souhaité vérifier que ce dernier soit suffisamment répétable à l'injection et dans le temps pour m'assurer que les modifications prises en compte soient pertinentes et non pas dues à la variabilité de l'analyse et du protocole.

Protocole : 10 µL de plasma ont été prélevés puis 5,5 µL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM) et 40 µL d'H₂O ajoutés et l'échantillon dénaturé à 60 °C pendant 40 minutes. 185 µL d'H₂O ont été ajoutés ainsi que 10 µL de trypsine 5 mg/mL, puis 250 µL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO suivis de 250 µL d'H₂O, puis l'échantillon a été mis à digérer/dériver à 37 °C sur la nuit (env. 14h). L'échantillon a été purifié par SPE, évaporé à 40 °C sous N₂ et repris dans 200 µL une solution de 75/25 H₂O/ACN + 0,1 % A.F, et mis en vial.

Ainsi, deux études ont été réalisées :

– Une étude de répétabilité instrumentale pour confirmer la variation due à l'instrument : L'échantillon réalisé selon le protocole précédent a été analysé en PRM-LID 4 fois de suite. 41 des 44 peptides dérivés détectés présentent un CV inférieur à 10 %, dont un tiers inférieur à 5 % ([Tableau 11 en Annexe III](#)). Les peptides restants, SHC*IAEVENDEMPADLPSSLAADFVES de la protéine HSA (45,7 %), DC*HLAQVPSHTVVAR de la protéine TrH et VDGALC*MEK de la protéine HEMO présentent un CV respectif de 45,7, 28,1 et 67,1 %. Le signal détecté de ces peptides étant faible, leur important CV est donc dû à la détection d'une quantité proche de leur limite de détection, mais en dessous de leur limite de quantification.

– Une étude de répétabilité dans le temps, en comparant les résultats de neuf analyses de différents échantillons réalisés sur une période de deux semaines. Les échantillons de référence pour les différents tests de développement du protocole de dérivation séquentielle ont été réalisés à différents jours selon le protocole optimisé décrit plus haut, puis analysés en PRM-LID. Seul un peptide parmi les 45 analysés, EC*EEIIR de la protéine FIBB, présente un CV, inférieur à 10 % (9,4 %, [Tableau 12 en Annexe III](#)). Sur les 44 peptides restants, le CV de 35 d'entre eux est compris entre 10 et 20 %, et celui des neuf restants est supérieur à 20 %. Avec environ 20 % des peptides dont les CV sont hors de la zone de validation (CV <20 %) tout en étant détectés avec suffisamment de signal pour dépasser la limite de quantification, la répétabilité cumulée des biais protocolaires, analytiques et interjour ne permet pas d'établir une seule référence pour plusieurs jours d'analyse consécutive. Ainsi, il est obligatoire d'utiliser systématiquement une nouvelle référence à chaque nouvelle série d'analyse pour garder ces biais en dessous de la limite de 20 % en CV.

Conclusion

Au cours de cette partie j'ai pu optimiser la quantité de peptides à SOH endogènes dérivés détectée grâce l'optimisation du temps de dérivation/digestion, l'ajout d'acide formique, de la SPE par le changement de matériel, et de la dénaturation en retirant l'urée 8 M. Ces optimisations m'ont aidé à simplifier le protocole et confirmer les résultats établis à la fois dans la littérature et lors de

précédentes manipulations (influence du DTT et du TCEP). Bien que de nombreuses autres optimisations puissent être réalisées (variations de pH, de température, agitation...), j'ai estimé que les biais analytiques et les limitations de la comparaison relative freinent l'identification de toute amélioration non majeure, empêchant d'ajuster plus finement les paramètres de dérivation. Pour les compenser, je me suis tourné vers l'utilisation d'une référence interne, c.-à-d. les peptides Cys-SH dérivés avec le chromophore dabcyI maléimide, afin de normaliser chaque peptide à Cys-SOH dérivé par celui de son homologue Cys-SH dérivé, et ce dans la même analyse. Ainsi, les ratios SOH/SH peuvent être comparés entre les différents échantillons, et ce sans effet d'éventuels biais analytiques ou de différents niveaux d'expression des protéines. Pour ces raisons, je n'ai pas souhaité pas complexifier davantage le protocole de dérivation des Cys-SOH dans l'éventualité où ces étapes s'avèreraient délétères pour la dérivation des Cys-SH.

II. Mise en place de la dérivation des Cys-SH avec la dérivation des Cys-SOH

La dérivation des thiols libre est réalisée avec le chromophore dabcyI maléimide (DabMal), constitué d'un groupement dabcyI identique à celui du DabDn (quencher sans autofluorescence minimale, absorbant les photons de longueur d'onde comprise entre 350 et 520 nm avec un maximum d'absorption autour de 425 nm par FRET) conjugué à un groupement maléimide lui permettant de se greffer spécifiquement aux thiols libres ([Figure 80](#)). De même que le DabDn, le DabMal est insoluble dans l'eau, soluble dans le MeOH (<1 mg/mL) et très soluble dans le DMSO (env. 2,5 mg/mL). Ce chromophore ayant beaucoup été utilisé au laboratoire,^{211,213,214} ses mécanismes de fragmentation ainsi que les conditions de dérivation optimales sont connus. Toutefois, à cause d'incompatibilités liées au protocole de dérivation des Cys-SOH, ces conditions doivent à nouveau être définies.

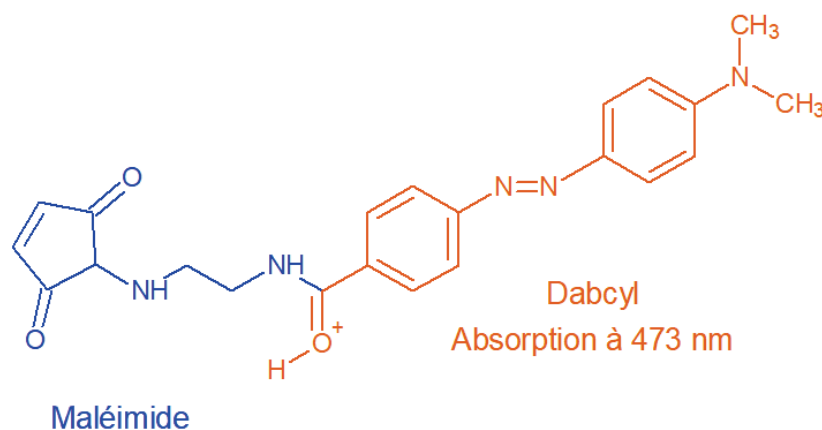


Figure 80: Structure du dabcyI maléimide (DabMal), composé d'un groupement maléimide (bleu) qui lui permet de se greffer spécifiquement aux thiols libres, et d'un groupement dabcyI qui permet au composé de se fragmenter suite à l'absorption de photons à 473 nm

II. 1. Inclusion du DabMal dans le protocole de dérivation des Cys-SOH

Les protocoles de dérivation des Cys-SH par le DabMal précédemment établis au laboratoire emploient le TCEP comme agent réducteur lors de la dénaturation des protéines (ratio cystéine-TCEP 1-3). Ce dernier, à l'inverse du DTT, ne possède pas de groupement SH libre, et ne risque donc pas d'interférer avec la dérivation du DabMal. Malheureusement, comme montré en [I. 4. b](#), le TCEP induit la réduction des cystéines à SOH, le rendant incompatible avec la dérivation des Cys-SOH, ce qui nous contraint à utiliser le DTT. Afin d'éviter une réaction parasite entre les fonctions SH du DTT et le DabMal, j'ai choisi de réaliser en premier lieu la dénaturation des protéines suivie par la dérivation des Cys-SOH avec le DabDn, laissant suffisamment de temps pour consommer un maximum de DTT introduit dans l'échantillon avant de dériver les Cys-SH avec le DabMal.

Le DabMal, insoluble dans l'eau, était précédemment dissous dans le MeOH et introduit dans l'échantillon pour former un ratio cystéine-DabMal de 1-5 avec un %_{org} de 50 %. Sa solubilité dans le MeOH étant limitée, l'introduction d'une telle quantité de chromophore imposait l'emploi d'importants volumes de réaction. À l'instar du DabDn, j'ai fait le choix de dissoudre le DabMal dans le

DMSO, solvant dans lequel il est bien plus soluble, me permettant de limiter le volume de chromophore introduit à 250 μL de DabMal dans DMSO concentré à 5,3 mM.

II. 1. a. Protocole

La première dérivation successive des Cys-SOH endogènes et des Cys-SH a été réalisée selon le protocole suivant :

Dans un tube Eppendorf® Protein LoBind de 2 mL, 10 μL de plasma humain ont été réduits avec 5,5 μL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM), et 185 μL d' H_2O ajoutés avant de placer l'échantillon à 60 °C pendant 40 minutes. Une fois refroidi à T° ambiante, 250 μL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO ainsi que 300 μL d' H_2O ont été ajoutés pour obtenir un %_{org} de 33 %. La dérivation/digestion a été conduite sur 4h à 37 °C avec 10 μL de trypsine à 2 mg/mL, puis 500 μL d'une solution d' H_2O /DMSO 66/33 (v/v) et 250 μL de DabMal 5,3 mM (ratio molaire cystéine-DabMal de 1-5) dans le DMSO ont été ajoutés. La digestion/dérivation a repris à 37 °C sur la nuit (environ 16h), et 30 μL d'A.F (2 % volumique) ont été ajoutés le lendemain matin. La SPE a été conduite sur une cartouche HLB 3cc 400 mg, conditionnée avec 4 mL de MeOH et 4 mL d' H_2O + 0,5 % A.F, l'échantillon chargé et rincé avec 4 mL d'une solution de 95/5 d' H_2O /MeOH + 0,5 % A.F et 600 μL de MeOH + 0,5 % A.F (fraction non récupérée), puis élué avec 2 mL MeOH + 0,5 % A. F. Lors du rinçage, un écoulement jaune est observé, dont l'analyse révèle qu'il ne contient qu'un mélange de DabDn et DabMal. Durant l'élution des peptides dérivés, on distingue nettement deux anneaux orange qui se séparent dans la cartouche : le DabMal et le DabDn. Ainsi, une large partie des deux chromophores n'est pas éluee, limitant l'excès de DabMal dans l'appareillage analytique. L'échantillon récupéré est ensuite évaporé à sec à 40 °C sous N_2 et repris dans 200 μL d'une solution de 95/5 d' H_2O /ACN (v/v) + 0,1 % A.F. L'utilisation une faible quantité de solvant organique dans le solvant de reprise limite la solubilité des chromophores DabDn et DabMal élués, restant sous forme de précipité, allégeant ainsi la quantité de chromophore libre injectée dans le système analytique. Les échantillons repris sont centrifugés à 10 000 tours.min⁻¹ pendant 5 minutes, et un précipité orange se forme suite à la centrifugation, mélange des deux chromophores libres précipités. Le surnageant est ensuite pipeté, mis en insert puis en vial et a été analysé en Top10 (HCD)

dont les paramètres sont les suivants : paramètres MS1 : résolution de 70 000 sur une plage de 200 à 2000 m/z , AGC target de $3e^6$, IT de 100 ms ; paramètres MS2 : résolution de 35 000, AGC Target d' $1e^6$, IT de 50 ms, fenêtre d'isolation de 2 m/z , exclusion dynamique de 10 secondes, Intensity Thresh de $1,6 e^5$; paramètres HCD : 24 eV, 3 ms. Après injection de 10 μL d'échantillon, la séparation chromatographique a été effectuée avec un solvant aqueux $\text{H}_2\text{O} + 0,1 \%$ A.F (A) et un solvant organique ACN + 0,1 % A.F (B) au moyen d'un gradient en solvant organique allant de 5 % à 45 % de B dans la phase mobile en 60 minutes à $300 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, puis d'un rinçage de 10 minutes de 100 % B à $600 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, et d'un rééquilibrage de 10 minutes à 5 % B à $350 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

II. 1. b. Résultats

Après l'acquisition, les données ont été converties au format .txt grâce au logiciel Pavaa, traitées au moyen du logiciel ProteinProspector²⁴⁵ (base de données Swissprot, Taxonomie Homo Sapiens, Digestion par trypsine avec 0 misscleavage, aucun modificateur constant, deux modificateurs variables sur les cystéines, l'un de masse exacte +419,1846 Da correspondant à la masse du DabDn greffé, l'autre « Dabcymlmaleimide (C) » présent dans la liste de modifications prédéfinies correspondant à un ajout de masse de +391,1644 Da).

Le traitement des données révèle la détection en Top10 de 199 peptides à cystéine unique, dont 169 sont dérivés par le DabMal, 26 par le DabDn et 4 non dérivés pour un total de 46 protéines dérivées. À cause de peptides communs entre certaines protéines, le nombre de protéines « uniques » peut être réduit à 20 et la quantité de peptides dérivés au DabMal et au DabDn différents ramenée à respectivement 108 et 22 peptides.

Le [Tableau 5](#) récapitule les 20 protéines détectées, le nombre de peptides à cystéine unique qu'elles contiennent, et le nombre de ces peptides dérivés au DabMal ou au DabDn :

Protéine	Nb Peptides à 1 cystéine	Nb de peptides à cystéine SH dérivée au DabMal	Nb de peptides à cystéine SOH dérivée au DabDn
ALBU (HSA)	13	12	6
TRFE (TrH)	20	14	4
A2MG	18	10	2
CO3	17	7	0
CO4	17	5	0
FIBB	7	5	3
A1AT	1	1	0
IGHM	10	3	1
FIBA	8	2	0
HPT	9	4	2
IGG1	8	5	1
A1BG	7	4	0
CFAH	42	9	1
FIBG	5	2	1
CERU	14	1	0
HEMO	11	6	0
THRB	15	7	0
FETUA	10	6	0
IGKC	2	2	1
IGLC2	3	3	0

Tableau 5: Tableau récapitulatif des protéines uniques détectées lors de l'analyse Top10 de l'échantillon de plasma dérivé séquentiellement avec le DabDn et le DabMal, le nombre de peptides à cystéine unique qu'elles contiennent, ainsi que le nombre de peptides à cystéine unique SH ou SOH dérivés au DabMal ou au DabDn.

Ainsi, seule une partie des peptides à cystéines uniques à SH libres de chaque protéine a été dérivée et détectée par le DabMal, mais il est difficile d'estimer si cela est dû à une dérivation incomplète ou à un défaut de détection, puisque les versions SH libres (non dérivés) des peptides à cystéine uniques n'ont pas été détectées non plus. De même, peu de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés ont été détectés en comparaison d'une analyse PRM (seuls 6 et 4 peptides à Cys-SOH endogènes dérivés détectés pour ALBU et TRFE en Top10 contre respectivement 12 et 12 lors des analyses PRM conduites durant l'optimisation de la dérivation des Cys-SOH, aucun peptide à Cys-SOH endogène dérivé de CO3 et CO4A détecté en Top10 contre respectivement 6 et 4 en PRM...). Ce phénomène ne peut être lié à un défaut de dérivation, puisque les Cys-SOH endogènes ont été dérivés selon le protocole habituel avant la dérivation au DabMal. Comme évoqué dans le [Chapitre II.II. 4. c](#), la méthode d'acquisition TopN n'est pas une méthode répétable et comporte de nombreux biais analytiques qui justifient

l'absence de détection des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés au DabDn habituellement détectés en PRM-LID.

L'analyse PRM-LID des 13 et 20 peptides à cystéine unique de la HSA et la TrH révèle que l'intégralité des peptides à cystéine unique SH de la HSA ont été dérivés avec succès par le DabMal (soit 13 peptides à SH dérivés contre 12 peptides à SH dérivés détectés en Top10), ainsi que 18 des 20 peptides à cystéine unique SH de la TrH (contre seulement 14 peptides à SH dérivés détectés en Top10). Par ailleurs, les versions SH libres (non dérivée) des peptides à cystéine unique de la HSA et de la TrH ne sont pas détectées.

Je me suis servi des résultats du Top10 pour cibler les peptides à Cys-SH et Cys-SOH endogènes des différentes protéines dérivées détectées pour construire une méthode PRM-LID combinant 40 couples Cys-SOH/Cys-SH dérivés au DabDn/DabMal parmi 9 protéines ([Tableau 13 en Annexe III](#)). Le ratio des aires des pics chromatographiques des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés sur celles des peptides

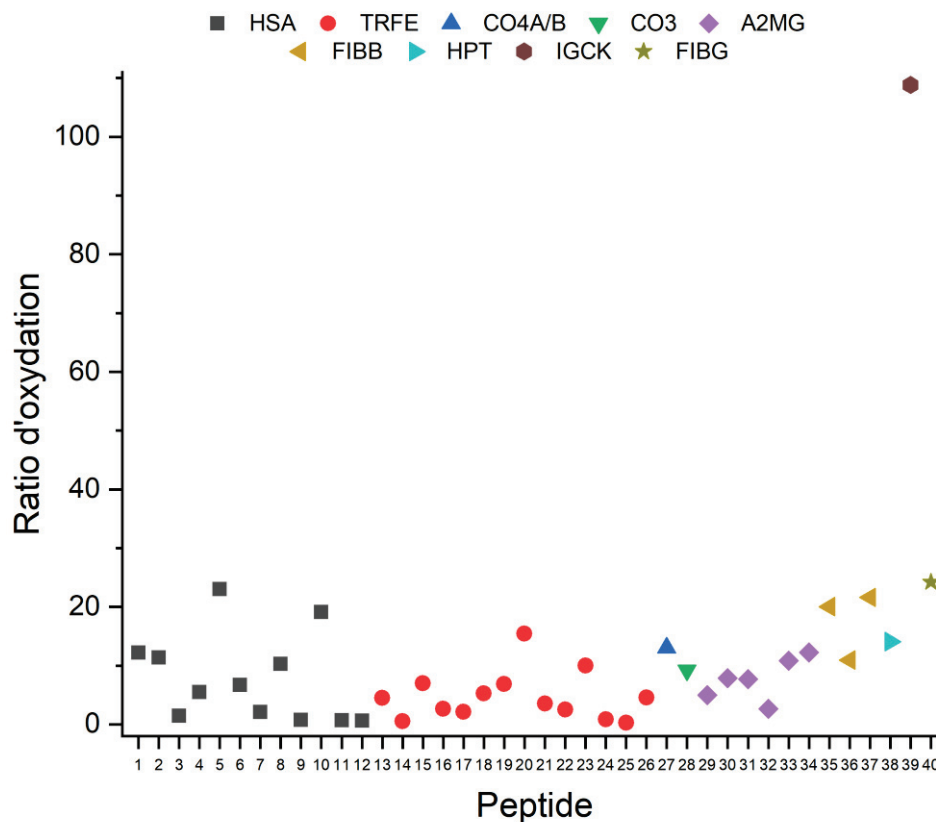


Figure 81: Ratio d'oxydation des 40 couples de peptides Cys-SOH/Cys-SH détectés en PRM-LID. La protéine d'appartenance de chaque peptide est indiquée au travers du code couleur de la légende.

à SH dérivés, qui sera désigné comme le « ratio d'oxydation », a été calculé pour chacun des couples de peptides selon la formule suivante : $\sum \frac{I_{\text{précuseursSOH}} + I_{\text{fragSOH}}}{I_{\text{précuseursSH}} + I_{\text{fragSH}}}$ et tracé en [Figure 81](#).

40 d'entre eux sont contenus dans une plage de ratio d'oxydation allant de 0,3 à 24,3 %, tandis que le ratio d'oxydation du peptide de la protéine IGKC atteint les 108,8 %. Ces valeurs de ratio ne correspondent pas au pourcentage de cystéine SH oxydée en Cys-SOH du peptide correspondant, mais sont une normalisation des signaux détectés. La valeur ainsi obtenue est une valeur arbitraire qui peut être comparée aux autres et qui nécessitera d'être évaluée dans des cohortes de patients sains afin d'établir son écart physiologique (c.-à-d., les valeurs maximales et minimales dans lesquelles le ratio est considéré comme physiologique).

Bien que les chromophores DabDn et DabMal soient tous les deux très fortement apolaires et insolubles dans l'eau, leurs propriétés physico-chimiques sont suffisamment différentes pour

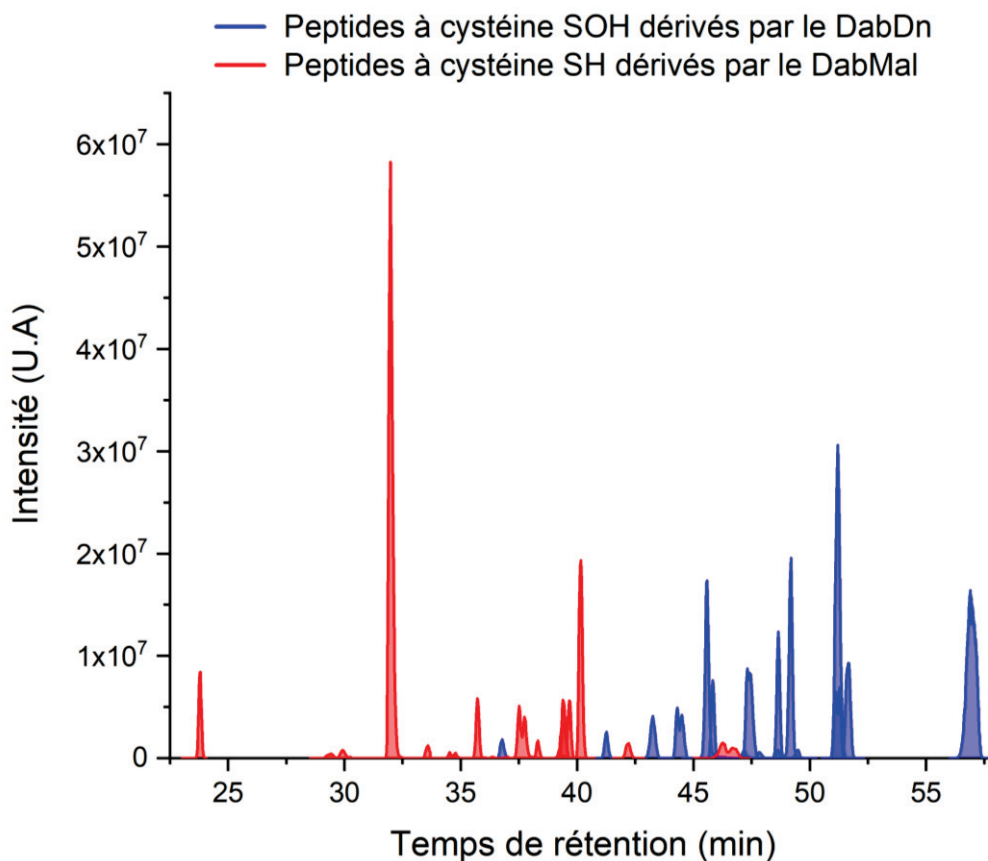


Figure 82: Chromatogramme reconstitué de la séparation des versions Cys-SH dérivées au DabMal (rouge) et Cys-SOH dérivées au DabDn (bleu) de 15 peptides suivis en PRM-LID, obtenu par la somme des intensités de trois transitions relatives à l'ion précurseur et trois à quatre transitions relatives aux fragments pour chaque peptide.

permettre leur séparation par chromatographie de phase inverse ainsi que la séparation des peptides auxquels ils sont greffés. À titre d'exemple, un chromatogramme de la séparation des peptides à Cys-SH et Cys-SOH dérivés est présenté en [Figure 82](#).

Ces différences permettent d'éluer la majorité des peptides à Cys-SH dérivés avant les peptides à Cys-SOH dérivés. Ainsi, les temps de rétention des différents composés sont suffisamment bien répartis le long du chromatogramme pour permettre de suivre la majorité de couples de peptides Cys-SH et Cys-SOH sans allongement significatif du temps de cycle bien que le nombre de précurseurs ciblés soit doublé.

Les fragmentations LID du peptide SVIPSDGSPVACVK à Cys-SH dérivés avec le DabMal et à Cys-SOH dérivés avec le DabDn sont comparées en [Figure 83 a\) et b\)](#). À l'instar du peptide LC*TVATLR, leur fragmentation génère une plus grande proportion d'ions y que d'ions b, bien que la cystéine soit ici plus proche de la position N-terminale. Par ailleurs, les ions y comprennent la cystéine dans leur séquence, ce qui n'avait pas été constaté lors de la fragmentation du peptide LC*TVATLR. Une large majorité d'ions y présente soit la perte du groupement dabacyl au niveau de la liaison ester du chromophore ($[y_{7-251,1}]^+$ à $[y_{12-251,1}]^+$), soit la perte d'H₂O ($[y_{8-H_2O}]^+$ à $[y_{11-H_2O}]^+$), soit la perte du chromophore entier ($[y_4-(SDabMal/Dn)]^+$ à $[y_{11-S(DabMal/Dn)]^+$). Les ions fragments $[y_{8-269,1}]^+$ et $[y_{10-269,1}]^+$ pouvant être induits par une rupture du groupement dabacyl après la liaison ester ou au niveau de la liaison ester conjuguée à une perte d'H₂O au niveau de la chaîne peptidique (cf. [Chapitre III.II. 1. b\)](#)) ne sont observés que pour le peptide SVIPSDGSPVAC*^{Dn}VK ([Figure 83 a\)](#)), car ils sont spécifiques du groupement cyclohexanedione. Les ions issus du chromophore à m/z 148,08 et 252,11 sont également observés. Au final, les fragmentations LID des peptides SVIPSDGSPVAC^{Mal}VK et SVIPSDGSPVAC*^{Dn}VK sont très similaires, même si la quantité de précurseur non photo-fragmenté est plus importante pour les peptides à Cys-SOH dérivés au DabDn que celle des peptides Cys-SH dérivés au DabMal.

Il est donc possible de dériver séquentiellement les Cys-SOH endogènes et Cys-SH d'un échantillon de plasma humain. Cette dérivation doit à présent être optimisée pour garantir la bonne dérivation de l'intégralité des Cys-SOH et Cys-SH endogènes de façon répétable.

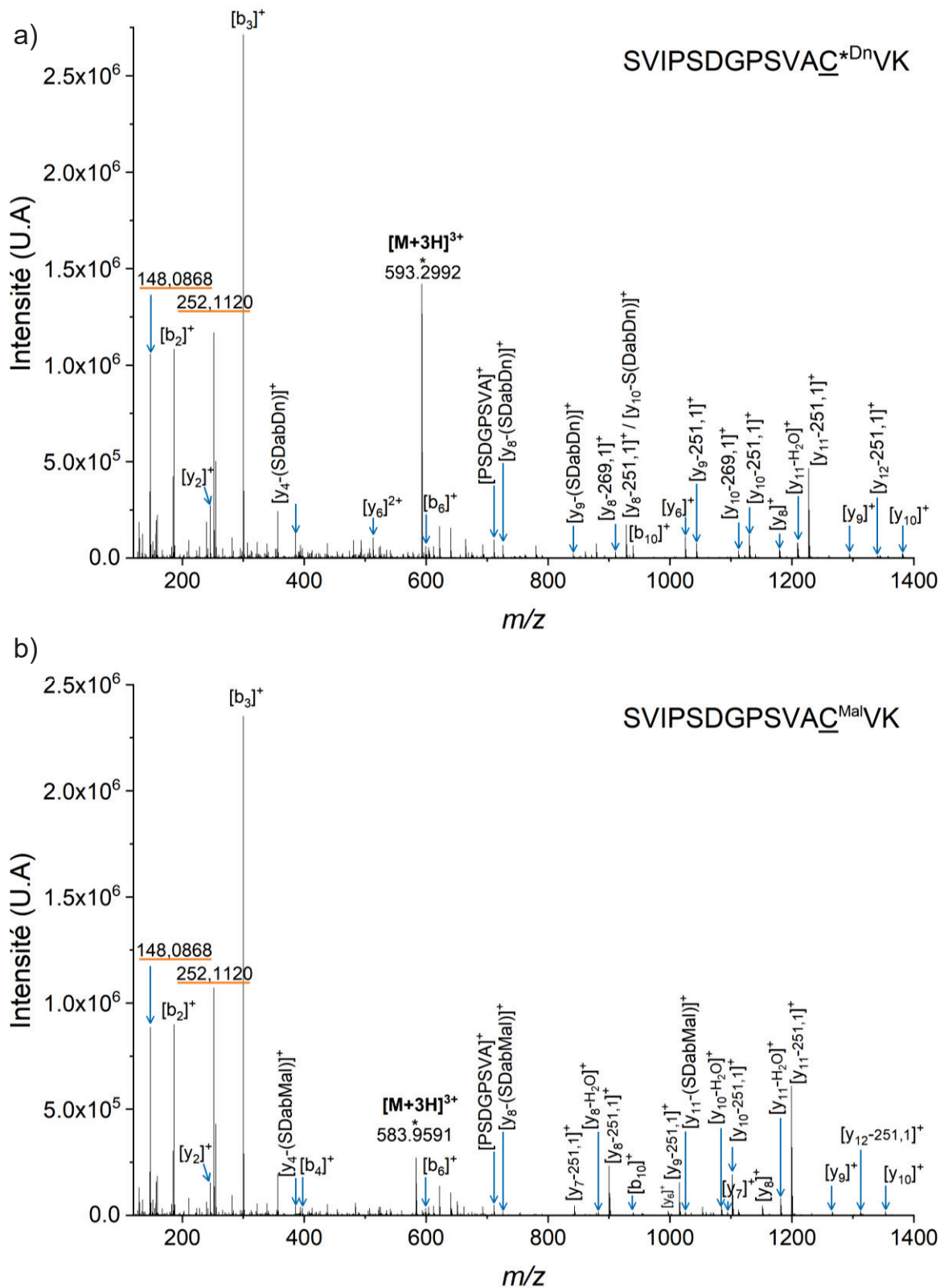


Figure 83: Spectres de fragmentation des précurseurs triplement protonés $[M+3H]^{3+}$ des peptides a) SVIPSDGSPVAC^{Mal}VK dont la Cys-SH est dérivée avec DabMal et b) SVIPSDGSPVAC^{*Dn}VK dont la Cys-SOH est dérivée avec le DabDn, en LID à 473 nm, 800 mW durant 25 ms et 3 eV.

II. 2. Optimisation de la dérivation des Cys-SH et des Cys-SOH endogènes

II. 2. a. Ordre de dérivation

Ayant précédemment choisi de réaliser la dérivation des Cys-SOH avant celle des Cys-SH de façon arbitraire, je me suis demandé comment l'ordre et le temps de dérivation affectaient leurs efficacités respectives. Pour cela, j'ai réalisé sept échantillons :

– Les deux premiers échantillons ne sont dérivés qu'avec un seul chromophore, servant d'échantillons contrôles pour évaluer le rendement de dérivation obtenu sans interaction entre les deux chromophores, et sont réalisés comme suit : 10 µL de plasma auxquels 5,5 µL de DTT 150 mM et 185 µL d'H₂O ont été ajoutés ont été mis à dénaturer 40 min à 60 °C. 10 µL de trypsine 5 mg/mL avec 300 µL d'H₂O ont été ajoutés à l'échantillon, puis 250 µL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO (contrôle DabDn) ou 250 µL de DabMal 5,3 mM dans le DMSO (contrôle DabMal) ont été introduits et l'échantillon correspondant laissé à dériver/digérer à 37 °C pendant 14h (nuit). J'ai privilégié le recours à des échantillons contrôles plutôt qu'au ratio d'oxydation Cys-SOH/Cys-SH puisqu'une variation du ratio peut traduire l'augmentation du signal d'un des deux chromophores comme une diminution du signal de l'autre.

– Les cinq autres échantillons verront leurs Cys-SH et Cys-SOH endogènes dérivés dans un ordre différent : Pour tous les échantillons, 10 µL de plasma auxquels 5,5 µL de DTT 150 mM et 185 µL d'H₂O ont été ajoutés ont été mis à dénaturer 40 min à 60 °C, puis 10 µL de trypsine 5 mg/mL avec 300 µL d'H₂O ont été introduits dans chaque échantillon.

- Les Cys-SOH endogènes des échantillons notés « Dn_4h » et « Dn_8h » en [Figure 84](#) ont été dérivés/digérés en premier lieu avec 250 µL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO pendant respectivement 4 et 8 heures à 37 °C, puis les Cys-SH dérivés avec 250 µL de DabMal 5,3 mM dans le DMSO et 500 µL d'H₂O durant 14 heures (nuit) à 37 °C.

- Pour les échantillons notés « Mal_4h » et « Mal_8h », ce sont les Cys-SH qui ont été dérivés/digérés en premier avec 250 μ L de DabMal 5,3 mM dans le DMSO durant 4 et 8 heures à 37 °C, puis les Cys-SOH endogènes ont été dérivés avec 250 μ L de DabDn 1,06 mM dans le DMSO durant 14 heures (nuit) à 37 °C.

- Finalement, la dérivation des Cys-SH et Cys-SOH endogènes a été conduite en parallèle avec l'ajout simultané des deux chromophores dans l'échantillon noté « 2C_14h », qui a été préalablement digéré sans chromophore pendant 8h à 37 °C, soit 250 μ L de DabDn 1,06 mM dans le DMSO, 250 μ L de DabMal 5,3 mM dans le DMSO et 500 μ L d'H₂O introduits dans l'échantillon mis à réagir durant 14h (nuit) à 37 °C.

Une fois les échantillons dérivés/digérés, 30 μ L d'A.F ont été ajoutés dans chacun d'entre eux, et ils ont été purifiés sur SPE 400 mg ([II. 1](#)), élués avec 100 % de MeOH + 0,5 % A.F, évaporés sous N₂ à T° ambiante, repris dans 200 μ L d'une solution d'H₂O/ACN 70/30 (v/v) + 0,1 % A.F, centrifugés 5 min à 10 000 tours.minute⁻¹, le surnageant pipeté, mis en insert puis en vial et analysé en PRM-LID. Quatre peptides sans cystéines (VFDEKPLVEEPQNLIK, EFQLFSSPHGK, GSVFLR et AVLYNR), pris au hasard parmi les protéines suivies ont été inclus dans la méthode PRM-LID pour contrôler la bonne digestion des protéines lors des optimisations.

Le signal de chaque peptide à Cys-SH dérivé ou Cys-SOH endogène dérivé détecté a été normalisé par le signal de ce même peptide issu respectivement de l'échantillon contrôle DabMal ou contrôle DabDn, puis le gain en signal des peptides d'une même protéine a été moyenné pour obtenir un gain en signal moyen par protéine pour chaque échantillon, disponible en [Figure 84](#). Le panneau a) représente le gain en signal moyen des protéines à Cys-SH dérivées au DabMal et le panneau b) le ratio moyen des protéines à peptides à Cys-SOH endogènes dérivées au DabDn.

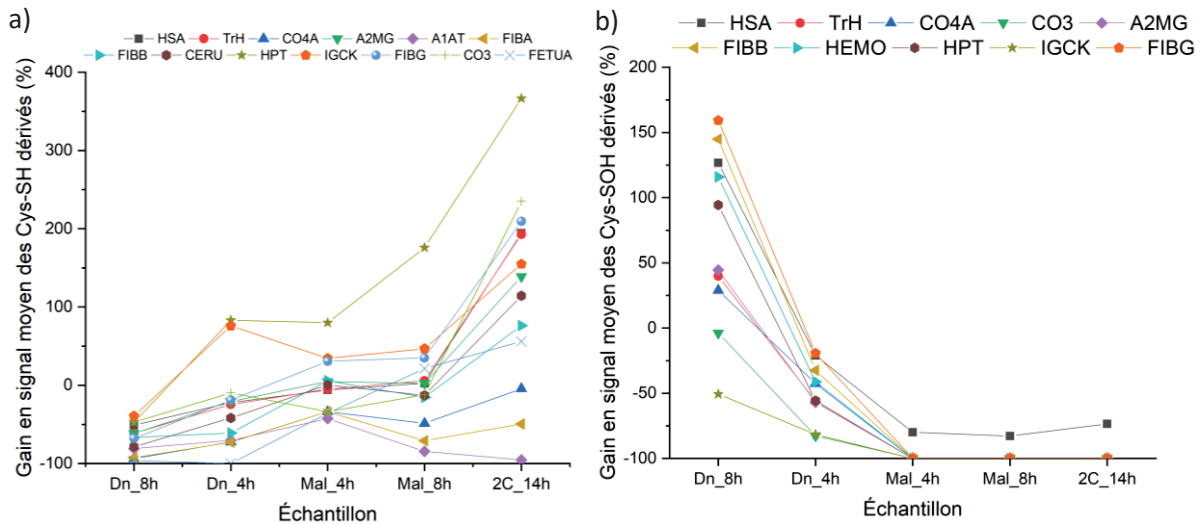


Figure 84: Évolution de la quantité de peptide a) Cys-SH dérivé avec le DabMal b) Cys-SOH dérivé avec le DabDn détectée par rapport à un échantillon contrôle en fonction de différentes conditions de dérivation/digestion : Dérivation des Cys-SOH endogènes en premier lieu pendant 4h ou 8h (Dn_4h, Dn_8h), dérivation des Cys-SH au DabMal en premier lieu pendant 4 h ou 8h (Mal_4h, Mal_8h), digestion de l'échantillon sans chromophore pendant 8h puis dérivation simultanée des Cys-SH et Cys-SOH endogènes avec le DabMal et DabDn pendant la nuit (14h) (2C_14h).

Dériver les Cys-SOH endogènes au DabDn en premier n'est pas favorable à la dérivation des Cys-SH par le DabMal, entraînant une perte de signal comprise entre 40 et 96 % par rapport à la condition contrôle DabMal ([Figure 84 a](#)), mais permet un gain en signal accru en peptides à Cys-SOH endogènes par rapport à la condition contrôle DabDn ([Figure 84 b](#)). Limiter le temps de dérivation/digestion des Cys-SOH endogènes (4h) permet de limiter la perte de signal de peptides à Cys-SH dérivés, mais induit une chute de signal drastique de la quantité de peptides à Cys-SOH endogènes dérivés. En revanche, dériver/digérer les peptides à Cys-SH avant les peptides à Cys-SOH induit une absence totale de dérivation des peptides à Cys-SOH, excepté pour la HSA, qui enregistre une perte de signal d'environ 80 % par rapport à la condition contrôle DabDn. De même, digérer la protéine en amont et introduire simultanément les deux chromophores ne mène qu'à la faible détection de la dérivation d'une poignée de peptides à Cys-SOH endogènes de la HSA, les autres peptides suivis n'étant pas détectés. Il existe donc une interaction pénalisante du DabMal sur la dérivation des Cys-SOH par le DabDn au moment de son introduction : Les échantillons Dn_4h et Dn_8h ayant respectivement été dérivés/digérés pendant 18 et 22h, correspondant à une durée égale ou supérieure à la durée optimale de dérivation, il est possible que le DabMal diminue la vitesse de dérivation des Cys-SOH par le DabDn.

Peu de différences sont observables entre les quantités de peptides SH dérivés détectés après 4h et 8h de dérivation/digestion au DabMal lorsque celui-ci est introduit avant le DabDn, si ce n'est une perte de signal pour les protéines A1AT, CO4A et FIBA plus importante après 8h de digestion, et un gain en signal des protéines IGKC et FIBG par rapport à la condition contrôle DabMal. L'introduction simultanée des deux chromophores mène à une exacerbation du signal des peptides à SH dérivés par rapport à la condition contrôle DabMal pour 8 des 11 protéines suivies, ainsi qu'un meilleur signal par rapport à la dérivation première au DabMal pour 10 des 11 protéines. Ces résultats montrent une interaction entre les deux chromophores, où le DabDn peut avoir un effet délétère, neutre ou catalyseur de la dérivation des Cys-SH par le DabMal en fonction de son moment d'introduction.

Aucun impact de l'ordre d'introduction des chromophores sur la digestion n'a été mis en évidence par le suivi des quatre peptides sans cystéines contrôles de chaque échantillon, celle-ci ne permet donc pas d'expliquer les variations de signal observées.

Ma priorité étant la meilleure détection des Cys-SOH endogènes possible, ces derniers seront les premiers à être dérivés/digérés. Pour des raisons pratiques, les Cys-SOH ne seront dérivés/digérés que pendant 8h à 37 °C, suivi de la dérivation des SH pendant 14h (nuit) à 37 °C également.

II. 2. b. Optimisations de la dérivation séquentielle

À cause des interactions entre les deux chromophores, le rendement de dérivation des Cys-SH par DabMal est dramatiquement affecté. Pour y remédier, j'ai réalisé différentes expérimentations qui seront détaillées au cours de cette partie.

J'ai souhaité vérifier si la faible quantité de peptides SH dérivés lors de la dérivation/digestion des Cys-SOH endogènes en premier lieu était due à une reformation des ponts S-S entre les peptides suite aux 8h de réaction. J'ai également contrôlé si 37 °C était une température favorable à la dérivation au DabMal à l'instar de la dérivation au DabDn, et vérifié si la quantité de trypsine (qui avait été augmentée par précaution), était adaptée à la dérivation séquentielle.

Pour cela, j'ai préparé un échantillon aux Cys-SOH endogènes et Cys-SH séquentiellement dérivés de référence (contrôle) avec 10 µL de plasma mélangés à 5,5 µL de DTT 150 mM (AMBIC) et 185 µL d'H₂O et mis à dénaturer 40 min à 60 °C. 10 µL de trypsine 5 mg/mL ainsi que 300 µL d'H₂O et 250 µL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO ont été ajoutés à l'échantillon qui a été mis à dériver/digérer durant 8h à 37 °C. 500 µL d'H₂O avec 250 µL de DabMal 5,3 mM dans le DMSO ont été introduits et l'échantillon à nouveau laissé à dériver/digérer à 37 °C pendant 14h (nuit).

Quatre échantillons tests ont été préparés en parallèle avec les modifications protocolaires suivantes :

- « 50%org » : Les 500 µL d'H₂O n'ont pas été ajoutés à l'échantillon, permettant d'atteindre un %org de 50 % avec la seule introduction des 250 µL de DabMal dans le DMSO ;
- « DTT+ » : 5,5 µL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM) supplémentaires ont été ajoutés à l'échantillon après les 8h de digestion-dérivation, et l'échantillon a été mis à réagir pendant 15 minutes à 37 °C avant l'introduction du DabMal ;
- « T° ambiante » : La dérivation des SH par le DabMal s'est faite à température ambiante (env. 21 °C) au lieu de 37 °C ;
- « Trypsine 2 mg/mL » : 10 µL de trypsine 2 mg/mL ont été utilisés à la place des 10 µL de trypsine 5 mg/mL habituels.

Une fois les échantillons dérivés/digérés, 30 µL d'A.F ont été ajoutés dans chacun d'entre eux, et ils ont été purifiés sur SPE 400 mg ([II. 1](#)), élués avec 100 % de MeOH + 0,5 % A.F, évaporés sous N₂ à T° ambiante, repris dans 200 µL d'une solution d'H₂O/ACN 70/30 (v/v) + 0,1 % A.F, centrifugés 5 min à 10 000 tours.minute⁻¹, le surnageant pipetté, mis en insert puis en vial et analysé en PRM-LID

Le signal de chaque peptide à Cys-SH dérivé ou Cys-SOH endogène dérivé détecté a été normalisé par le signal de ce même peptide dérivé issu de l'échantillon contrôle, puis le gain en signal des peptides d'une même protéine a été moyenné pour obtenir un gain en signal moyen par protéine pour chaque échantillon, disponible en [Figure 85](#) où le panneau a) représente les ratios moyens des protéines à peptides Cys-SH dérivés au DabMal et le panneau b) ceux des protéines à peptides Cys-SOH dérivés au DabDn.

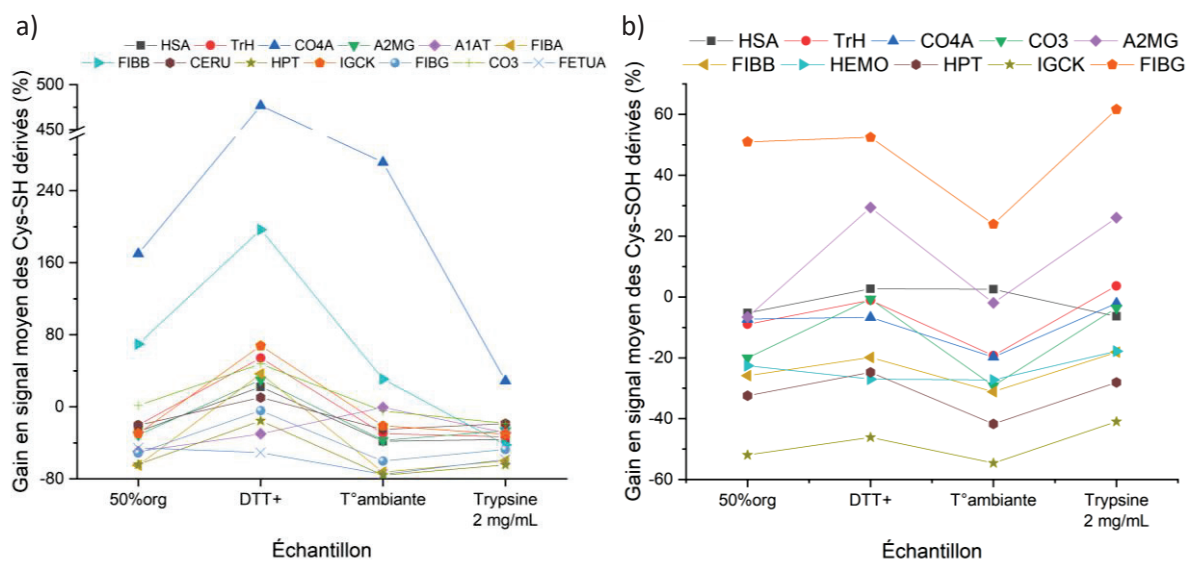


Figure 85: Évolution de la quantité de peptide a) Cys-SH dérivé avec le DabMal b) Cys-SOH dérivé avec le DabDn détectée par rapport à un échantillon de dérivation séquentielle contrôle en fonction de différentes conditions de dérivation/digestion : réaction à 50 % de phase organique (50%org) ; Ajout de 5,5 μ L de DTT 150 mM supplémentaires à l'échantillon après dérivation au DabDn (DTT+) ; Dérivation au DabMal réalisée à T° ambiante (T° ambiante) ; Digestion réalisée avec 2 mg/mL de trypsine (Trypsine 2 mg/mL) ;

Un milieu de réaction contenant 50 % de phase organique n'est pas favorable aux dérivations des Cys-SH et des Cys-SOH endogènes par le DabMal et le DabDn, puisqu'elle entraîne une perte de signal de peptides dérivés par rapport à la condition contrôle dans les deux cas.

Comme établi dans l'optimisation du [Chapitre III.II. 2. c](#), une température de 37 °C favorise la dérivation des Cys-SOH au DabDn, mais également celle des SH au DabMal, puisqu'une perte de signal est enregistrée pour tous les peptides Cys-SH dérivés ainsi que la majorité des peptides Cys-SOH dérivés lorsque la réaction a lieu à T° ambiante (« T° ambiante » a), b)). L'emploi de 2 mg/mL de trypsine semble impacter négativement la quantité de peptides Cys-SH dérivés détectés, bien qu'une majorité de peptides à Cys-SOH dérivés ne semble pas influencée par une modification de la quantité de trypsine. Le gain en signal des peptides dérivés au DabMal détectés apporté par une seconde réduction au DTT avant l'introduction du DabMal (« DTT+ » a)) démontre la présence de ponts S-S résiduels dans l'échantillon impactant la dérivation. Toutefois, l'ajout de DTT induit une perte de signal de certaines protéines à Cys-SOH endogènes dérivés (IGCK, HEMO, HPT, FIBB). L'analyse individuelle du gain en signal respectif de chaque peptide à Cys-SOH endogènes dérivés révèle qu'une majorité des peptides

suivis de ces protéines n'est que très faiblement affectée par la seconde réduction, seuls quelques peptides abaissent drastiquement la moyenne du signal.

Ces résultats corroborent les conclusions établies au [Chapitre III.II. 2. c](#) explicitant qu'une température de 37 °C était bénéfique pour la dérivation ainsi que pour la digestion des protéines. Ils confirment également la présence de ponts S-S dans l'échantillon probablement issus de la reformation d'une partie de ces ponts entre les peptides à cystéines libres. Ainsi, employer une seconde réduction après la dérivation au DabDn permet de réduire ces ponts sans que la réaction parasite entre DTT et DabMal n'affecte le rendement de dérivation des SH, illustré par un gain en signal sensible de peptides Cys-SH dérivés au DabMal. Bien que l'ajout de DTT entraîne une diminution de quelques peptides à Cys-SOH dérivés, ces derniers sont détectés avec un signal suffisant pour les identifier et les quantifier sans ambiguïté. Cela me pousse donc à utiliser une seconde réduction au DTT pour favoriser la dérivation des peptides à Cys-SH. Par ailleurs, la quantité de trypsine actuellement employée (5 mg/mL) est favorable à la dérivation des SH sans nuire à la quantité de peptides à Cys-SOH dérivés détectée.

J'ai également tenu à m'assurer que les quantités de DabMal employées étaient adaptées, ainsi qu'à confirmer qu'un pH acide, entraînant un changement de couleur du chromophore de l'orange vers le rose à l'instar du DabDn, ne permet pas une dérivation suffisante des SH libres. Pour cela, j'ai réalisé un échantillon dérivé séquentiellement (contrôle) avec 10 µL de plasma, 5,5 µL de DTT 150 mM et 185 µL d'H₂O qui ont été mis à dénaturer 40 min à 60 °C, puis 10 µL de trypsine 5 mg/mL ainsi que 300 µL d'H₂O et 250 µL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO ont été ajoutés à l'échantillon qui a été mis à dériver/digérer durant 8h à 37 °C. 5,5 µL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM) ont ensuite été ajoutés et l'échantillon mis à réduire à T° ambiante durant 15 minutes. Une fois l'échantillon à nouveau réduit, 500 µL d'H₂O avec 250 µL de DabMal 5,3 mM dans le DMSO ont été introduits et l'échantillon à nouveau laissé à dériver/digérer à 37 °C pendant 14h (nuit).

J'ai également réalisé un échantillon dans lequel j'ai ajouté 30 µL A.F (2 % v/v) après l'introduction du DabMal (noté « + 2 % A.F » en [Figure 86](#)), ainsi qu'un autre échantillon pour lequel j'ai employé une concentration de DabMal dans le DMSO de 2,35 mM (noté « DabMal 2,35 mM »). Une fois les échantillons dérivés/digérés, 30 µL d'A.F ont été ajoutés dans chacun d'entre eux, et ils ont été purifiés sur SPE 400 mg ([II. 1](#)), élués avec 100 % de MeOH + 0,5 % A.F, évaporés sous N₂ à T° ambiante, repris

dans 200 μL d'une solution d' $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 70/30 (v/v) + 0,1 % A.F, centrifugés 5 min à 10 000 tours.minute⁻¹, le surnageant pipeté, mis en insert puis en vial et analysé en PRM-LID.

Le signal de chaque peptide à Cys-SH dérivé ou Cys-SOH endogène dérivé détecté a été normalisé par le signal de ce même peptide dérivé issu de l'échantillon contrôle, puis le gain en signal des peptides d'une même protéine a été moyenné pour obtenir un gain en signal moyen par protéine pour chaque échantillon, disponible en [Figure 86](#).

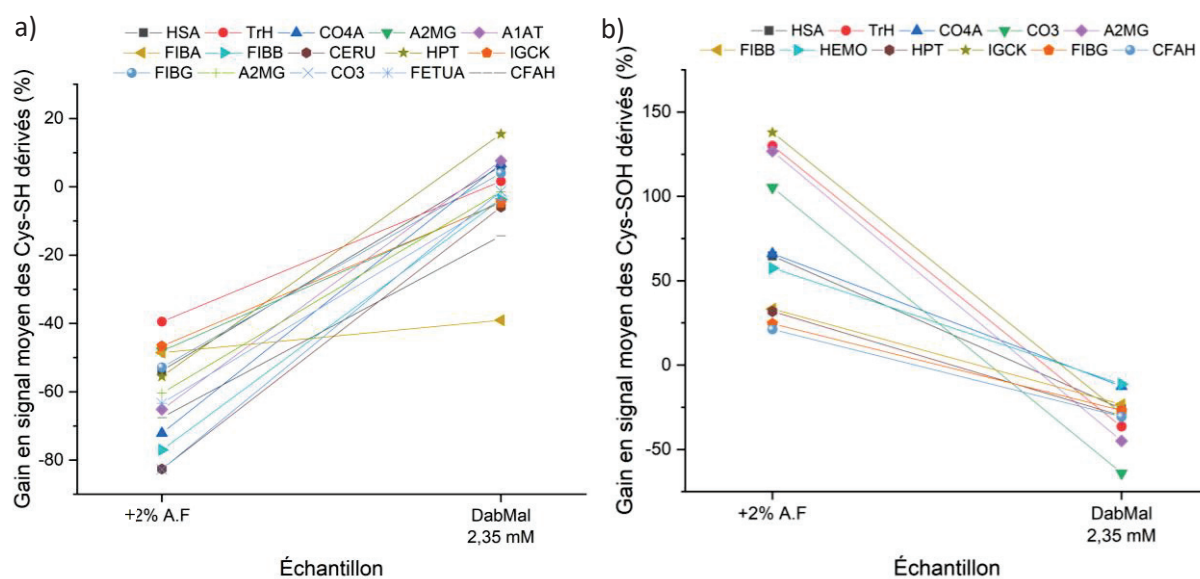


Figure 86: Évolution du gain en signal moyen par protéine des peptides a) Cys-SH dérivés avec le DabMal b) Cys-SOH dérivés avec le DabDn détectés par rapport à un échantillon séquentiellement dérivé contrôle en fonction de différentes conditions de dérivation : ajout de 30 μL d'A.F après l'introduction du DabMal (+2 % A.F), concentration en DabMal de 2,35 mM au lieu de 5,3 mM (DabMal 2,35 mM).

L'acidification du milieu de réaction nuit très fortement à la dérivation des Cys-SH par le DabMal, bien que l'effet inverse soit observé pour la détection des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés. Cette augmentation de signal est peut-être due à une amélioration des conditions de rétention et d'élution SPE, qu'il serait intéressant d'évaluer au travers de la quantité d'A.F ajouté dans l'échantillon après la dérivation séquentielle des Cys-SOH et Cys-SH. Une quantité réduite de DabMal dans le milieu de réaction mène à un signal en peptide à Cys-SH dérivé relativement identique à la dérivation séquentielle contrôle (variation de $\pm 10\%$ du signal) excepté pour ceux issus des protéines FIBA et CFAH qui expriment une baisse de signal importante. Cependant, réduire la quantité de DabMal dans

le milieu mène également à une baisse notable de la quantité de Cys-SOH endogènes dérivés détectée, excepté pour les protéines CO4A et HEMO, ce qui est inattendu.

Au vu des résultats obtenus, le protocole ne sera pas modifié. Étudier plus profondément les interactions DabMal – DabDn pour comprendre leur fonctionnement m'apparaît comme une priorité pour les futures optimisations du protocole, qui ne feront malheureusement pas partie de ce travail de thèse.

Ainsi, le protocole de dérivation séquentiel optimisé est le suivant : 10 µL de plasma auxquels 5,5 µL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM) et 185 µL d'H₂O sont ajoutés et mis à dénaturer 40 min à 60 °C. 10 µL de trypsine 5 mg/mL avec 300 µL d'H₂O sont ajoutés à l'échantillon, puis 250 µL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO sont introduits et l'échantillon laissé à dériver/digérer à 37 °C pendant 8h. 250 µL de DabMal 5,3 mM dans le DMSO ainsi que 500 µL d'H₂O sont ensuite introduits dans l'échantillon, laissé à réagir à 37 °C pendant 14h (nuit). Les échantillons sont purifiés sur une cartouche SPE HLB 400 mg conditionnée avec 4 mL de MeOH, 4 mL d'H₂O + 0,5 % A.F, l'échantillon chargé et rincé avec 4 mL d'un solvant de 95/5 d'H₂O/MeOH + 0,5 % A. F. 600 µL de MeOH + 0,5 % A.F sont ajoutés pour éluer le solvant le rinçage, puis les peptides élués avec 1,5 mL de MeOH + 0,5 % A.F, évaporés sous N₂ à T° ambiante, repris dans 200 µL d'une solution de 75/25 H₂O/ACN (v/v) + 0,1 % A.F, centrifugés 5 min à 10 000 tours.minute⁻¹, le surnageant est pipeté et mis en insert puis en vial et analysé en PRM-LID.

III. Analyse des Cys-SH et Cys-SOH endogènes d'échantillons de plasmas issus de cohortes de patients

La dérivation séquentielle des Cys-SOH endogènes et Cys-SH ayant été réalisée avec succès sur un petit nombre d'échantillons de plasmas issus d'un stock du laboratoire, j'ai souhaité l'utiliser pour l'analyse de cohortes d'échantillons et s'il était possible de mettre en évidence de potentiels biomarqueurs pour

la maladie d'Alzheimer ou le COVID-19 par la quantification des Cys-SOH endogènes des échantillons de patients.

III. 1. Recherche de biomarqueurs

Après avoir optimisé la dérivation séquentielle des Cys-SH et Cys-SOH endogènes, j'ai utilisé cette méthode de quantification relative normalisée pour comparer les niveaux d'oxydation des cystéines dans des échantillons de plasmas issus des cohortes de patients sains et souffrant de la maladie d'Alzheimer ou du COVID-19 et ainsi identifier de potentiels biomarqueurs. Dans un premier temps, il a fallu que je définisse une liste de protéines à analyser qui pourraient être impliquées dans les processus de développement de la maladie d'Alzheimer ou du COVID-19. J'ai donc réalisé une analyse non ciblée Top10 pour identifier certaines des protéines à Cys-SOH présentes dans les échantillons, complétée par une étude de la littérature. Les résultats obtenus grâce à ces deux méthodologies seront détaillés au cours de cette partie.

III. 1. a. Protocole de dérivation séquentielle des échantillons

Ces travaux ont été réalisés grâce à la plateforme CRB-CHUM du CHU de Montpellier et de l'expertise du responsable de collection, le Pr Sylvain LEHMANN (s-lehmann@chu-montpellier.fr) -<http://www.chu-montpellier.fr> (Identifiant BIOBANQUES - **BB-0033-00031**), qui a fourni trente-cinq plasmas issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et quinze plasmas issus de patients sains (aussi appelés « contrôles »). La plateforme CRB-HCL de l'HCL de Croix-Rousse (Lyon) sous la responsabilité du Dr Vinca ICARD (<https://www.chu-lyon.fr/centre-de-ressources-biologiques>) a fourni quatre plasmas de patients positifs au COVID-19 provenant de la cohorte M3.P1.ST3.1 CRB-HCL. Ces plasmas sont stockés à -80 °C, dégelés uniquement le temps du prélèvement. Les échantillons de la cohorte sont listés dans le [Tableau 14](#).

Les 54 échantillons issus des deux cohortes ont été dérivés séquentiellement selon le protocole suivant : 10 µL de plasma auxquels 5,5 µL de DTT 150 mM (dans AMBIC 50 mM) et 185 µL d'H₂O sont

ajoutés et les échantillons sont mis à dénaturer 40 min à 60 °C. 10 µL de trypsine 5 mg/mL avec 300 µL d'H₂O sont ajoutés à l'échantillon, puis 250 µL de DabDn 1,06 mM dans le DMSO sont introduits et les échantillons laissés à dériver/digérer à 37 °C pendant 8h. 250 µL de DabMal 5,3 mM dans le DMSO ainsi que 500 µL d'H₂O sont ensuite introduits dans les échantillons, laissés à réagir à 37 °C pendant 14h (nuit). Les échantillons sont purifiés sur cartouche SPE HLB 400 mg conditionnée avec 4 mL de MeOH, 4 mL d'H₂O + 0,5 % A.F, l'échantillon chargé et rincé avec 4 mL de 95/5 d'H₂O/MeOH + 0,5 % A. F. 600 µL de MeOH + 0,5 % A.F sont ajoutés pour éluer le solvant le rinçage, puis les peptides élués avec 1,5 mL de MeOH + 0,5 % A.F, évaporés sous N₂ à T° ambiante, repris dans 200 µL d'une solution de 75/25 H₂O/ACN (v/v) + 0,1 % A.F, centrifugés 5 min à 10 000 tours.minute⁻¹, le surnageant est pipeté et mis en insert puis en vial, puis les échantillons sont placés au congélateur à -80 °C.

III. 1. b. Analyse Top10 des échantillons de plasma

Les échantillons dérivés séquentiellement ont été décongelés, analysés par Top10 HCD dans les mêmes conditions que précédemment ([II. 1](#)) puis recongelés pour minimiser leur éventuelle dégradation à T° ambiante. Les données issues de l'analyse ont été converties au format .txt grâce au logiciel Pavaa, traitées au moyen du logiciel ProteinProspector²⁴⁵ (base de données Swissprot, Taxonomie Homo Sapiens, Digestion par trypsine avec 0 misscleavage, aucun modificateur constant, deux modificateurs variables sur les cystéines, l'un de masse exacte +419,1846 Da correspondant à la masse du DabDn greffé sur une Cys-SOH, l'autre « Dabcylmaleimide (C) » présent dans la liste de modifications prédéfinies correspondant à un ajout de masse de +391,1644 Da). Pour chaque échantillon, la liste des protéines dont les peptides à Cys-SOH endogènes dérivés ont été détectés a été extraite et comparée entre les différents échantillons de la cohorte.

L'analyse Top10 des 54 échantillons permet de détecter les Cys-SOH endogènes de 21 à 56 protéines différentes au sein d'un même échantillon. Les Cys-SOH endogènes dérivés de deux d'entre elles sont détectées dans une seule catégorie de patients : la protéine α-1-antichymotrypsine (AACT) n'est détectée que parmi les patients positifs au COVID-19, et la protéine CXCL7 (Chemokine C-X-C motif ligand 7 ou Platelet Basic Protein) n'est détectée que parmi les patients contrôles.

La protéine α -1-antichymotrypsine (AACT ou SERPINA3) est une glycoprotéine protéine de phase aigüe (acute-phase protein)²⁴⁸ d'environ 48 kDa appartenant à la classe des inhibiteurs de sérine protéase, dont la cible préférentielle est la cathepsine G. Sa production (localisée dans le foie, mais pouvant être synthétisée directement dans les poumons en cas d'affliction pulmonaire) est hautement stimulée par différentes cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6) durant une inflammation.^{249,250} En plus d'être un marqueur d'une inflammation, l'AACT est également considérée comme responsable de la phosphorylation de la protéine Tau impliquée dans la maladie d'Alzheimer.^{66,251} Des taux d'AACT surélevés, typiques d'une réponse inflammatoire, ont également été observés lors d'une infection par le COVID-19.^{252,253,254}

La protéine CXCL7 (Chemokine C-X-C motif ligand 7 ou Platelet Basic Protein) est une petite protéine (env. 14 kDa) libérée en vaste quantité par les plaquettes sanguines lors de leur activation, servant au recrutement des neutrophiles au niveau des sites d'inflammation, lésions et infections tissulaires.^{255,256} Cette dernière est généralement retrouvée dans le plasma suite à un défaut de centrifugation des plaquettes sanguines.

Ces deux protéines ont donc été incluses dans la méthode PRM-LID, pouvant constituer de potentiels biomarqueurs à la fois pour la maladie d'Alzheimer (AACT) et pour l'infection au COVID-19 (AACT et CXCL7). Toutefois, la faible répétabilité de l'analyse Top10 a été plusieurs fois démontrée dans la littérature (cf. [Chapitre II.II. 4. c](#)), et observée au cours de mes expérimentations ([II. 1](#)). Il est donc possible que la détection de ces protéines dans leur catégorie de patients respectives ne soit que le fruit d'une mauvaise répétabilité.

III. 1. c. Recherche de potentiels biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer dans la littérature

Suite à la faible quantité de possibles biomarqueurs mise en avant par la recherche non ciblée en Top10, j'ai cherché d'autres pistes de biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer au sein de la littérature. Pour cela, j'ai obtenu la liste des 345 protéines impliquées dans le fonctionnement de la maladie d'Alzheimer établie par le site PeptideAtlas²⁵⁷ ([Figure 96](#) en [Annexe III](#)). J'ai ensuite filtré les protéines

en fonction de leur localisation cellulaire grâce au site Uniprot²⁵⁸, et en ai extrait 32 protéines extracellulaires, donc potentiellement observables dans le plasma. La séquence canonique de chacune de ces protéines a été récupérée puis digérée *in-silico* dans le logiciel Skyline, les peptides ne possédant pas ou possédant plus d'une cystéine ont été retirés, et les peptides à cystéine unique ont été dérivés au DabDn et au DabMal au sein du logiciel. Les ratios m/z les plus probables des peptides à cystéines SH et SOH dérivées ont ensuite été compilés dans le [Tableau 15 en Annexe III](#) pour permettre de construire des méthodes PRM pour la recherche de ces peptides. Les peptides à cystéine unique issus des protéines CXCL7 et AACT (détectées en Top10) ont également été inclus, ainsi que différents peptides de la Xanthine Oxydase, protéine responsable de la génération de ROS ([Chapitre I.I. 1. d](#)) pouvant être localisée dans le plasma.

Parmi les 209 peptides suivis lors de l'analyse PRM-LID des différents échantillons de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et contrôles, seuls trois peptides à cystéine dérivée ont été détectés dans leur forme Cys-SH dérivé et Cys-SOH dérivé : le peptide DEELSCTVVELK de la protéine AACT, le peptide LGADMEDVCGR de la protéine APOE ainsi que le peptide ICLDPADPR de la protéine CXCL7. Aucun autre peptide suivi n'a été détecté sous forme Cys-SH dérivé et Cys-SOH dérivé ni dans la population de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ni parmi les patients sains (contrôles). Cela peut être dû au fait que si ces protéines sont localisées dans le milieu extracellulaire des cellules neuronales, elles ne sont pas forcément détectées dans le plasma. La dérivation séquentiellement et l'analyse PRM-LID d'échantillons de liquide céphalo-rachidien plutôt que de plasma conduirait peut-être à la détection d'un plus grand nombre de peptides à Cys-SOH et Cys-SH dérivés ciblés.

Ces trois peptides ont donc été inclus dans une nouvelle méthode PRM-LID, construite sur la base des peptides à cystéine unique des protéines plasmatiques suivies pour l'optimisation du protocole. Cette méthode qui regroupe 179 cibles est constituée des précurseurs des deux chromophores DabDn et DabMal libres, de ceux de 8 peptides à cystéine unique SH libres et 4 peptides sans cystéines, suivis pour s'assurer de la bonne dérivation des SH libres et de la bonne digestion des échantillons ainsi que ceux de 85 peptides à Cys-SH dérivés par le DabMal et 80 peptides à Cys-SOH dérivés avec le DabDn correspondants à 19 protéines différentes (liste disponible en [Annexe III, Tableau 16](#)). Ainsi, 80 ratios

d'oxydation issus de couples de peptides à cystéines SOH/SH éligibles à pourront être estimés en une seule analyse.

III. 2. Quantification des Cys-SH et Cys-SOH endogènes des cohortes de patients

La méthode PRM ayant été complétée, j'ai souhaité établir si la dérivation séquentielle était compatible avec l'analyse de cohortes en comparant les ratios d'oxydation des protéines suivies durant l'optimisation de la méthode et des protéines issues de la recherche de biomarqueurs en mode non ciblé entre les échantillons de plasmas de patients sains et atteints de la maladie d'Alzheimer et positifs au COVID-19.

Les échantillons des cohortes ont donc été randomisés puis dérivés séquentiellement avec le protocole précédent ([III. 1. a](#)) et analysés en LC-MS/MS par PRM-LID (liste des précurseurs en [Annexe III, Tableau 16](#)). Douze QC issus d'un échantillon aléatoire ont également été dérivés séquentiellement et analysés avec la cohorte.

Pour l'analyse des échantillons de la cohorte, le système chromatographique a été remplacé par un système HPLC Ultimate 3000 (ThermoFischer), et la colonne chromatographique remplacée par une colonne Xbridge Premier BEH C18, 130 Å, 4,6*150 mm, $\phi_{\text{particules}}$ 2,5 μM .

La séparation chromatographique a été effectuée avec un solvant aqueux H₂O + 0,1 % A.F (A) et un solvant organique ACN + 0,1 % A.F (B) au moyen d'un gradient en solvant organique allant de 5 % à 45 % de B dans la phase mobile en 60 minutes à 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, puis d'un rinçage de 10 minutes de 100 % B à 600 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, et d'un rééquilibrage de 10 minutes à 5 % B à 350 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pour chaque échantillon, les aires des pics de chaque peptide à Cys-SOH endogènes dérivés avec le DabDn détectés et les aires des pics des mêmes peptides à Cys-SH dérivés au DabMal ont été mesurées. Les ratios d'oxydation ont été calculés en divisant les aires des peptides à Cys-SOH par les aires des peptides à Cys-SH respectifs. 73 ratios d'oxydation à travers 19 protéines ont pu être obtenus suite à l'absence de détection de peptides à Cys-SOH ou Cys-SH dérivés pour certains des couples

suivis. Par ailleurs, suite à un imprévu manipulateur, l'échantillon n°1 a été écarté de la cohorte, dont le nombre final d'échantillons exploitables est donc de 53.

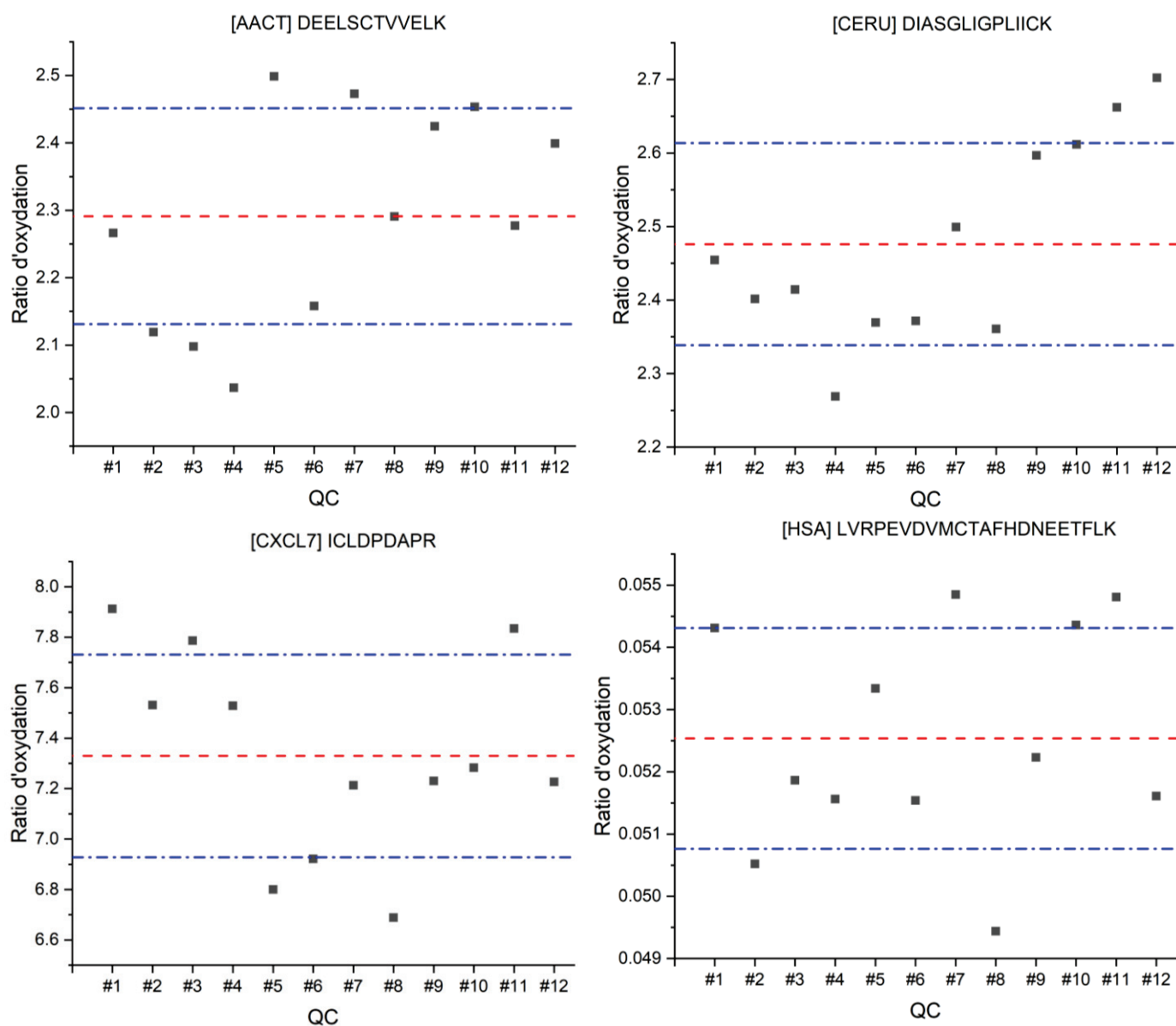


Figure 87: Ratio d'oxydation obtenus lors de l'analyse des douze QC pour les peptides a) DEELSCTVVELK de la protéine AACT b) DIASGLIGLIICK de la protéine CERU c) ICLDPDAPR de la protéine CXCL7 d) LCRPEVDVMCTAFHDNEETFLK. La ligne rouge en pointillé représente la moyenne des douze ratios d'oxydation et les lignes bleues sa valeur à ± 1 écart-type.

La moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation ont été calculés pour chaque ratio d'oxydation grâce à l'analyse des douze échantillons QC. Ces valeurs statistiques sont listées dans le [Tableau 17 en Annexe III](#) et illustrées au travers de quatre peptides représentés en [Figure 87](#). Tous les CV calculés pour les ratios d'oxydation des différents peptides sur les 12 échantillons QC sont inférieurs à 20 %.

Ceci montre que la préparation d'échantillon et l'analyse PRM-LID sont adaptées à l'analyse de cohorte d'échantillons biologiques complexes. 19 ratios sur les 73 (26 %) présentent un CV compris entre 10 et 20 %. 21 % des ratios possèdent un excellent CV (< 5 %), tandis que la majorité (53 %) des ratios d'oxydation présentent un CV compris entre 10 et 5 %.

III. 2. a. Patients atteints de la maladie d'Alzheimer

Les ratios d'oxydation des couples Cys-SOH/Cys-SH des peptides DEELSTVVELK de la protéine AACT et ICLDPDAPR de la protéine CXCL7 de certains des échantillons de la cohorte analysée diffèrent de ceux des échantillons issus des patients contrôles et des autres patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ces deux peptides ont été ajoutés à la liste des peptides suivis en PRM suite à leur détection par acquisition non ciblée en Top10. Leurs ratios d'oxydations en fonction de l'échantillon sont tracés en [Figure 88 a\) et b\)](#).

Le suivi du peptide DEELSTVVELK de la protéine AACT ([Figure 88 a\)](#)) présente 5 échantillons provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (4, 43, 46, 47, 49) dont le ratio d'oxydation est supérieur à ceux des patients contrôles ainsi qu'au reste des échantillons de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les échantillons issus de patients positifs au COVID-19 présentent également un taux de Cys-SOH élevé, et seront traités dans la prochaine partie. Cette augmentation n'est pas observée pour les autres peptides de ces échantillons, mettant en évidence l'absence de biais protocolaire de ces résultats. En raison de la faible incidence de cette augmentation, le suivi de la protéine AACT ne semble pas constituer une piste favorable pour la découverte d'un biomarqueur spécifique à la maladie d'Alzheimer. Conclure sur la pertinence de son suivi dans le cadre d'autres affections dont auraient éventuellement pu souffrir les patients lors du prélèvement du plasma dépasse le champ de mes compétences.

Le suivi du peptide ICLDPDAPR de la protéine CXCL7 ([Figure 88 b\)](#)) indique que seuls trois échantillons (22, 24 et 48) provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent un ratio d'oxydation (donc un taux de Cys-SOH endogènes de ce peptide) plus élevé que ceux des patients contrôles, des patients positifs au COVID-19 ainsi que le reste des échantillons de patients atteints de la maladie

d'Alzheimer. À l'instar d'AACT, l'incidence de ce ratio est trop faible pour permettre de conclure à une potentielle utilisation du suivi du ratio d'oxydation du peptide DEELSCTVVELK en tant que biomarqueur de la maladie d'Alzheimer.

Afin de mettre en évidence une éventuelle différence significative entre les ratios d'oxydation des populations contrôle et positive à la maladie d'Alzheimer, j'ai calculé le ratio d'oxydation moyen par protéine en moyennant les ratios d'oxydation des différents peptides de chaque protéine au sein d'un même échantillon. La dispersion des ratios d'oxydation moyen par échantillon en fonction du type de population de plusieurs protéines sont tracées en [Figure 88 d\), e\) et f\)](#). Une forte dispersion peut être constatée dans la population atteinte de la maladie d'Alzheimer pour les protéines AACT et CXCL7 [Figure 88 d\), e\)](#), ce qui était attendu, tandis que les autres protéines, illustrées au travers de la protéine FIBG, ne semblent pas présenter de différence importante entre les deux populations [Figure 88 f\)](#). Pour confirmer l'absence de différence entre les ratios d'oxydation moyens des deux populations, j'ai réalisé une analyse de variance à un facteur (ANOVA) pour chaque protéine.

Pour cela, un test de Fisher est réalisé entre les variances respectives des deux populations, et la valeur de ce test est comparée à la valeur théorique de la loi de Fisher correspondant au risque α (probabilité de rejeter l'hypothèse nulle, c'est-à-dire qu'il n'existe pas de différence entre les deux populations, alors que cette dernière est vraie) du test. Si la valeur F calculée est supérieure à la valeur F théorique, alors l'hypothèse nulle est rejetée, il existe une différence significative entre les ratios d'oxydation moyens des deux populations pour la protéine concernée. L'ANOVA permet également de calculer la « p-value », la probabilité que la valeur de F calculée soit en réalité inférieure à la valeur de F théorique. Si la p-value est inférieure au risque α , alors l'hypothèse nulle est rejetée.^{259,260}

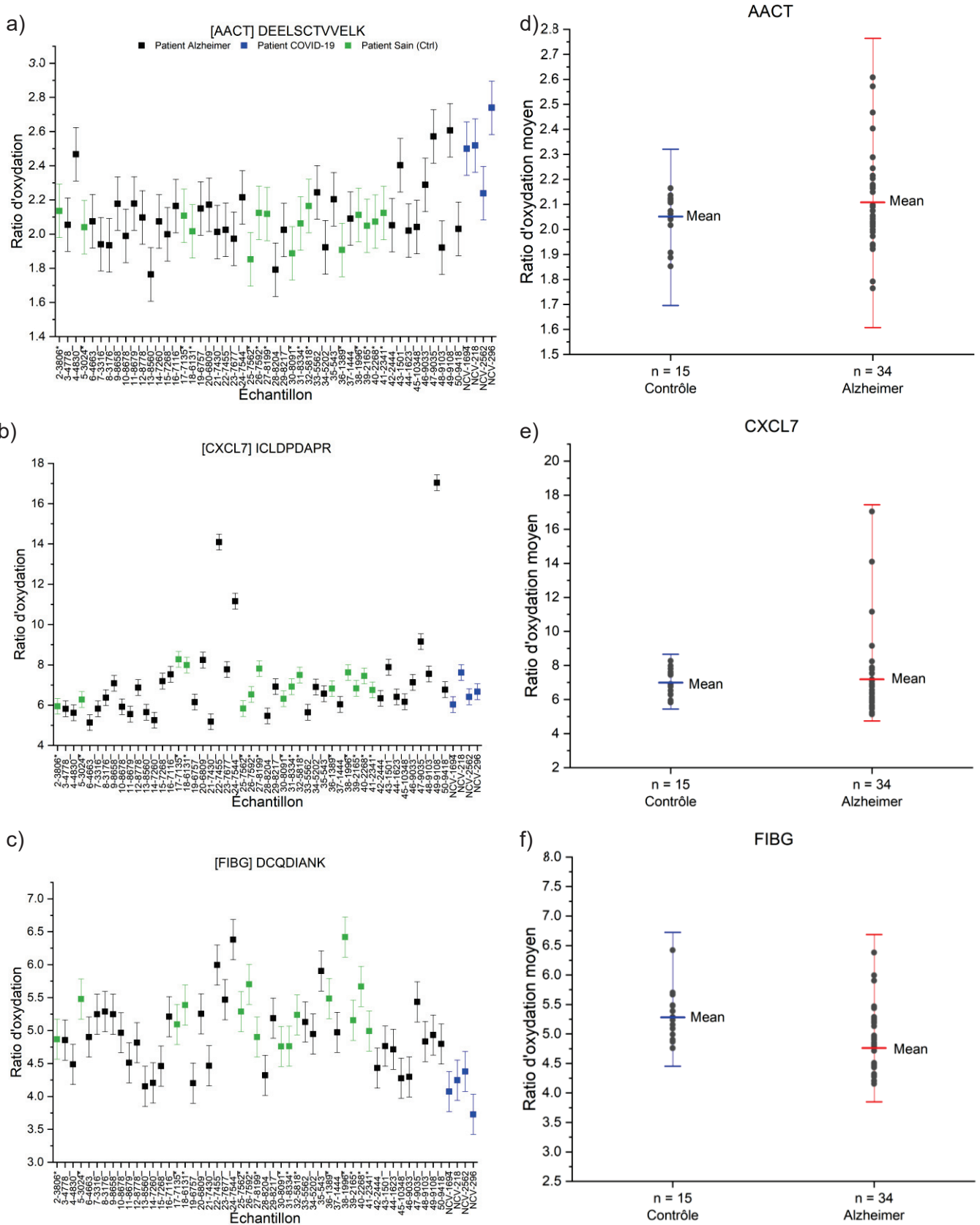


Figure 88: Ratios d'oxydation des peptides a) DEELSCTVVELK [AACT] b) ICLDPDAPR [CXCL7] c) DCQDIANK [FIBG] pour les 53 échantillons de la cohorte composée de patients contrôles (vert), atteints de la maladie d'Alzheimer (noirs) et positifs au COVID-19 (bleu). Dispersion des ratios d'oxydation moyens des protéines d) AACT e) CXCL7 f) FIBG entre les populations atteintes de la maladie d'Alzheimer et contrôles. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type estimé de chaque ratio d'oxydation (a), b), c)) ou moyenné entre les peptides d'une même protéine calculé à partir de l'analyse des QC (d), e), f)).

Protéine	Groupe	Moyenne \pm E.C	pvalue
A2MG	Contrôle n = 15	1,16740 \pm 0,06687	0,165
	A.D n = 34	1,13457 \pm 0,07833	
AACT	Contrôle n = 15	2,05157 \pm 0,09667	0,285
	A.D n = 34	2,10809 \pm 0,19156	
APOB	Contrôle n = 15	0,98417 \pm 0,11031	0,199
	A.D n = 34	0,94665 \pm 0,08449	
APOE	Contrôle n = 15	12,34705 \pm 3,13868	0,615
	A.D n = 34	12,78731 \pm 2,50666	
CERU	Contrôle n = 15	2,82217 \pm 0,16306	0,302
	A.D n = 34	2,75894 \pm 0,20790	
CFAH	Contrôle n = 15	6,8948 \pm 0,51651	0,109
	A.D n = 34	6,56115 \pm 0,71043	
CO3	Contrôle n = 15	2,54204 \pm 0,15394	0,321
	A.D n = 34	2,48669 \pm 0,18738	
CO4	Contrôle n = 15	4,57112 \pm 0,36678	0,488
	A.D n = 34	4,4692 \pm 0,50765	
CXLC7	Contrôle n = 15	6,99137 \pm 0,75116	0,766
	A.D n = 34	7,18811 \pm 2,48061	
FETUA	Contrôle n = 15	0,20041 \pm 0,01291	0,157
	A.D n = 34	0,20253 \pm 0,01878	
FIBA	Contrôle n = 15	0,29302 \pm 0,02409	0,174
	A.D n = 34	0,29854 \pm 0,04850	
FIBB	Contrôle n = 15	8,3334 \pm 0,56446	0,780
	A.D n = 34	8,26907 \pm 0,80092	
FIBG	Contrôle n = 15	5,28001 \pm 0,43964	0,024
	A.D n = 34	4,76163 \pm 0,53330	
FINC	Contrôle n = 15	5,61593 \pm 0,80914	0,233
	A.D n = 34	5,30204 \pm 0,85009	
HEMO	Contrôle n = 15	3,44829 \pm 0,17544	0,328
	A.D n = 34	3,36066 \pm 0,32186	
HPT	Contrôle n = 15	3,09613 \pm 0,25668	0,865
	A.D n = 34	3,07992 \pm 0,32464	
HSA	Contrôle n = 15	2,94202 \pm 0,17422	0,140
	A.D n = 34	2,86172 \pm 0,17167	
TrH	Contrôle n = 15	1,28894 \pm 0,05486	0,498
	A.D n = 34	1,33283 \pm 0,08891	
IGKC	Contrôle n = 15	4,46732 \pm 0,42655	0,786
	A.D n = 34	4,50294 \pm 0,41968	

Tableau 6: Récapitulatif des différences entre les populations de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (A.D) et les patients sains (Contrôle).

Le [Tableau 6](#) récapitule les valeurs moyennes et les coefficients de variation des ratios d'oxydation moyen de chaque échantillon pour chaque population (contrôle ou atteinte de la maladie d'Alzheimer « A.D »), ainsi que la p-value issue de l'analyse ANOVA calculée avec un risque $\alpha = 0,05$. 18 des 19 protéines présentent une p-value $> 0,05$, ce qui signifie qu'il n'y a pas de différence significative entre les ratios d'oxydation moyens des deux populations. En revanche, l'analyse des variances des ratios d'oxydation de la protéine FIBG des deux populations, dont la dispersion des ratios d'oxydation est tracée en [Figure 88 f](#)), présente une p-value de 0,024. Il semble donc que l'hypothèse nulle soit rejetée et qu'il existe une différence significative entre les ratios d'oxydations moyens des échantillons issus de la population contrôle et de la population de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Cette conclusion est peu intuitive au vu de la différence visible entre les dispersions des populations des protéines AACT et CXCL7 et m'a donc poussé à étudier plus profondément les ratios d'oxydation obtenus lors du suivi du peptide DCQDIANK, seul peptide à cystéine suivi pour la protéine FIBG, tracé en [Figure 88 c](#)).

À cause de l'important coefficient de variation dû à la variabilité protocolaire et analytique des échantillons (calculé précédemment) qui n'est pas pris en compte dans le test ANOVA, il est impossible de conclure quant à une réelle distinction entre les ratios d'oxydation des populations de patients sains et atteints de la maladie d'Alzheimer.

Si aucune piste de potentiels biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer ne peut être exploitée suite à l'analyse des plasmas de la cohorte, l'analyse PRM-LID des échantillons à Cys-SOH endogènes et Cys-SH dérivés permet de mettre évidence des variations dans les niveaux d'oxydation de leurs cystéines. Une telle détection directe est possible grâce à la spécificité de fragmentation des Cys-SOH et Cys-SH dérivés en LID qui permet une réduction des interférences. Cette spécificité permet une quantification relative des variations d'oxydation de l'échantillon adaptée à l'analyse de cohortes, également rendue possible grâce à la haute capacité de multiplexage qu'offre la PRM.

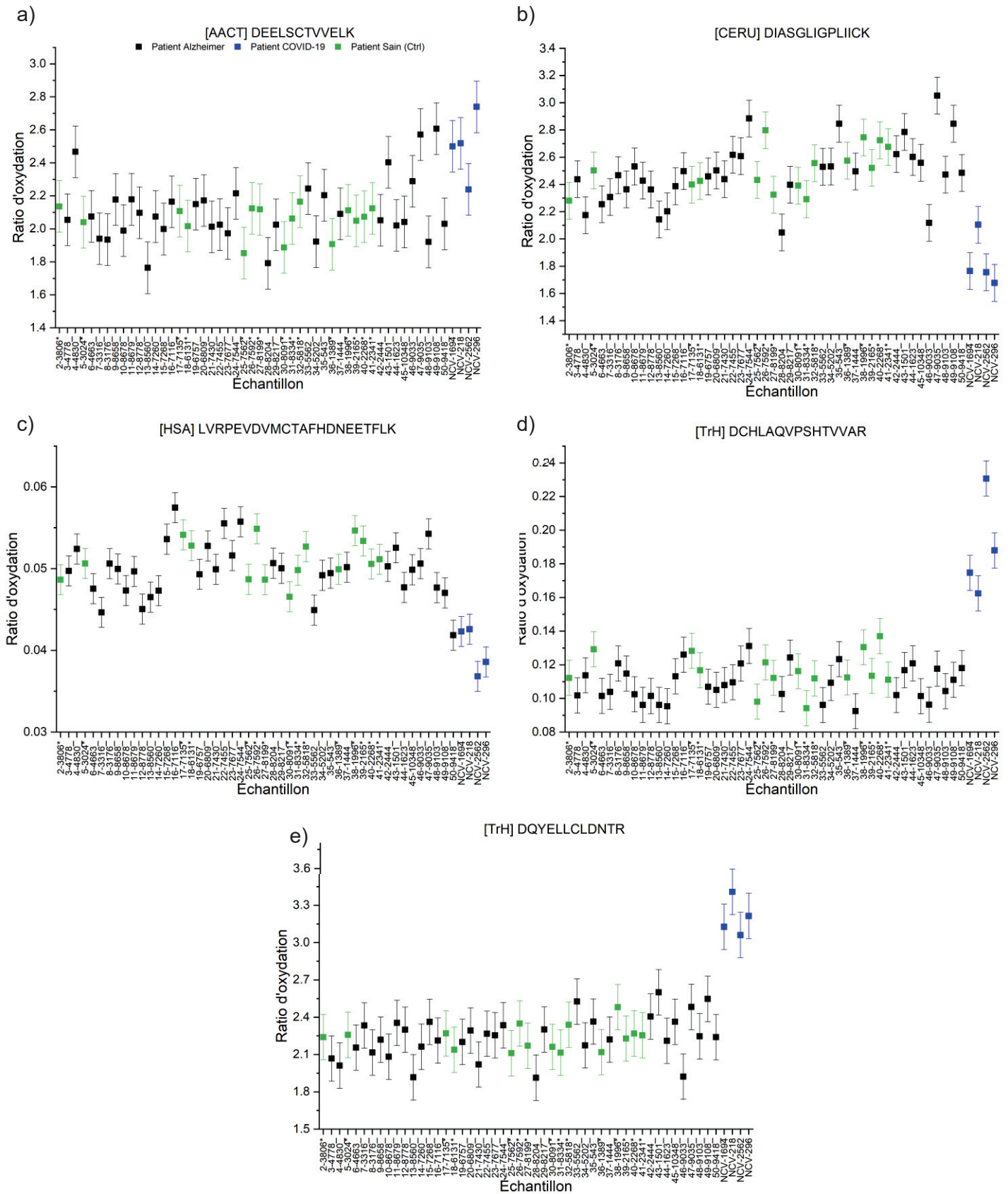


Figure 89: Ratios d'oxydation des peptides a) DEELSCTVVELK de la protéine AACT b) DIASGLIGPLIICK de la protéine CERU c) LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK de la protéine HSA d) DCHLAQVPSHTVVAR de la protéine TrH e) DQYELLCLDNTR de la protéine TrH pour les 53 échantillons de la cohorte composée de patients contrôle (vert), atteints de la maladie d'Alzheimer (noirs) et positifs au COVID-19 (bleu).

III. 2. b. Patients positifs au COVID-19

Cinq couples de peptides sur les soixante-treize suivis présentent des ratios d'oxydations différents parmi les échantillons de patients positifs au COVID-19 par rapport au reste de la cohorte : le peptide DEELSCTVVELK de la protéine AACT, le peptide DIASGLIGLIICK de la protéine CERU, le peptide LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK de la protéine HSA ainsi que les peptides DCHLAQVPSHTVVAR et DQYELLCLDNTR de la protéine TrH.

Le peptide DEELSCTVVELK de la protéine AACT présente un ratio d'oxydation en moyenne 18 % plus élevé chez les patients positifs au COVID-19 et certains patients Alzheimer (échantillons n°4, 43, 46, 47 et 49) que dans la population contrôle ([Figure 89 a](#)). Cela traduit une plus grande proportion de Cys-SOH plasmatiques endogènes de ce peptide chez ces patients.

La forte prévalence de ce peptide chez les patients positifs au COVID-19 avait été précédemment mise en lumière suite à la l'analyse Top10 des plasmas de la cohorte dont les Cys-SH et Cys-SOH endogènes avaient été dérivés séquentiellement (cf. [III. 1. b](#)), mais n'avait pas été observée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

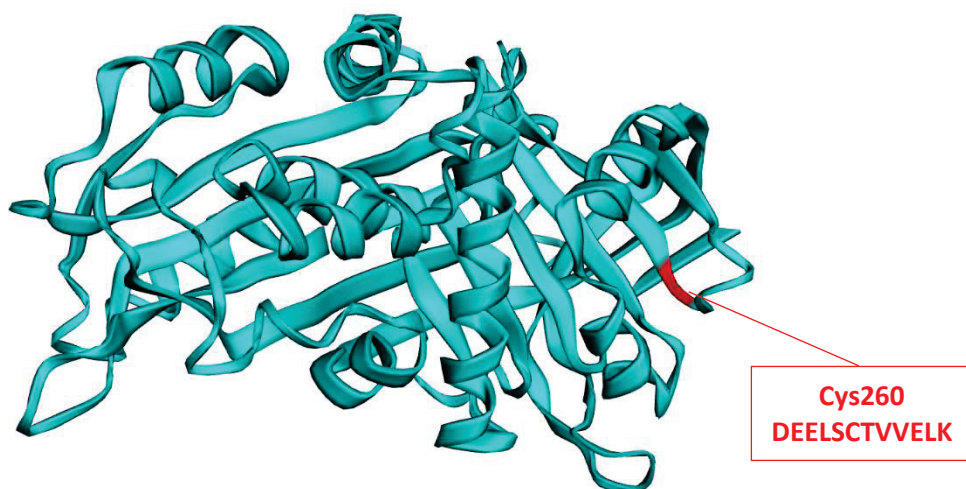


Figure 90: Représentation 3D de la protéine AACT, dont la cystéine 260 (peptide DEELSCTVVELK) présentant un ratio d'oxydation plus élevé parmi les patients positifs au COVID-19 et certains patients atteints de la maladie d'Alzheimer est surlignée en rouge.

Une représentation 3D de la protéine ([Figure 90](#)) permet de voir que la cystéine du peptide impliqué (Cys260) est située en surface de la protéine, à l'extrémité d'un feuillet β .

Les résultats obtenus pour le peptide DIASGLIGPLIICK de la protéine CERU tendent à montrer un abaissement d'en moyenne 27 % de la proportion de peptide oxydé dans le plasma suite à une infection au COVID-19 ([Figure 89 b](#)). La céruloplasmine (CERU) est une autre protéine plasmatique de phase aiguë dont la concentration augmente en réponse à une inflammation.^{248,261} Synthétisée majoritairement dans le foie, mais également dans les poumons, c'est un antioxydant qui cible les ROS, le fer libre et prévient la peroxydation lipidique.^{41,261,262} Julian Hackler et *al.* ont étudié une éventuelle liaison entre la quantité de cuivre plasmatique et le COVID-19 en suivant la concentration en céruloplasmine plasmatique des patients puisqu'avec ses 6 atomes de cuivre internes elle constitue la plus abondante protéine plasmatique contenant du cuivre. S'ils ont établi une corrélation forte entre la quantité de cuivre totale dans le plasma et la concentration en céruloplasmine, ces derniers n'ont pas observé de variation de quantité de cuivre au cours du temps lors d'une infection au COVID-19.²⁶³

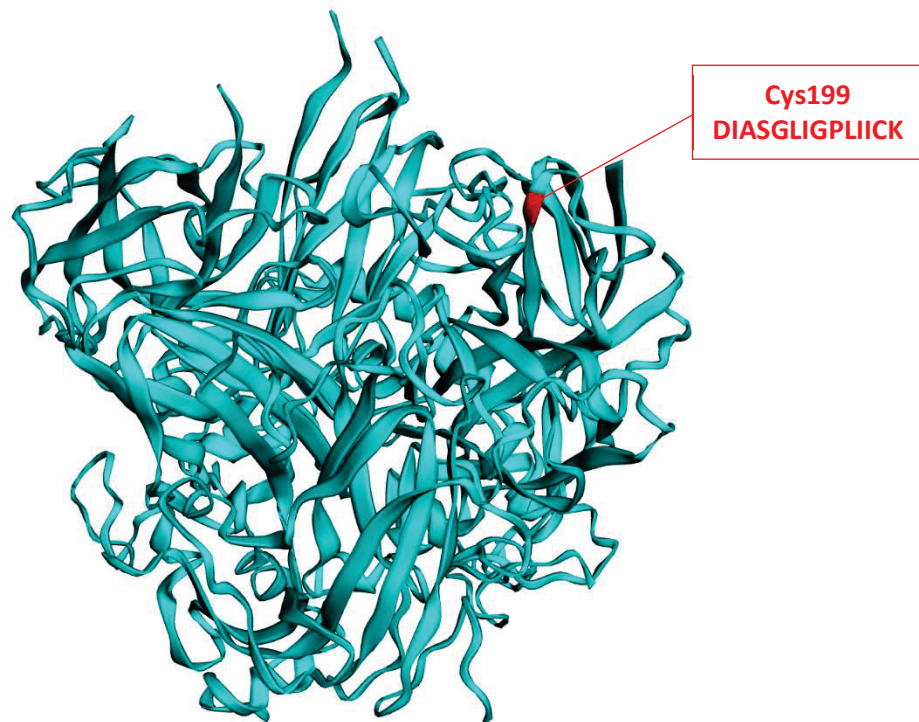


Figure 91: Représentation 3D de la protéine CERU, dont la cystéine 199 (peptide DIASGLIGPLIICK) présentant un ratio d'oxydation plus élevé parmi les patients positifs au COVID-19 est surlignée en rouge.

La cystéine du peptide DIASGLIGPLIICK (Cys199) est située à l'extrémité d'un feuillet β , en surface de la protéine ([Figure 91](#)).

Parmi les treize peptides tryptiques de l'albumine analysés, le ratio d'oxydation du peptide LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK ([Figure 89 c](#)) des patients COVID-19 (bleu) est en moyenne 22 % plus bas que celui des patients contrôles (vert), ce qui traduit un taux de Cys-SOH endogènes du peptide plus faible parmi ces échantillons. L'albumine (HSA) est la protéine majoritaire du plasma humain, représentant plus de la moitié de la quantité totale en protéines plasmatiques,²⁴⁴ synthétisée dans le foie^{42,54} Lors d'une inflammation, sa concentration plasmatique diminue, à l'inverse des protéines AACT et CERU.²⁵¹ Elle régule la pression osmotique et la distribution des fluides (bile, pigments, cholestérol, acides gras, drogues/médicaments) entre les compartiments du corps. Elle permet également de neutraliser les radicaux hydroxyles grâce à la Cys34 qui n'est pas impliquée dans un pont disulfure (peptide tryptique ALVLIAFAQYLQPCFEDHVK).⁵⁴ Son rôle d'antioxydant est particulièrement prononcé dans les cas de diabète, et une diminution de la quantité d'albumine dans le plasma est un marqueur de certaines maladies cardiovasculaires.⁴¹ Une hypoalbuminémie plasmatique compte parmi les signes d'une inflammation sévère et prolongée. Le suivi du taux d'albumine chez les patients pourrait être utilisé comme outil de détection précoce des patients à haut risque de mortalité dans le cas d'une infection au COVID-19.²⁶⁴

La cystéine du peptide LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK (en position 124, « Cys 124 ») est située en périphérie de la protéine sur une structure secondaire de type hélice α ([Figure 92](#)).

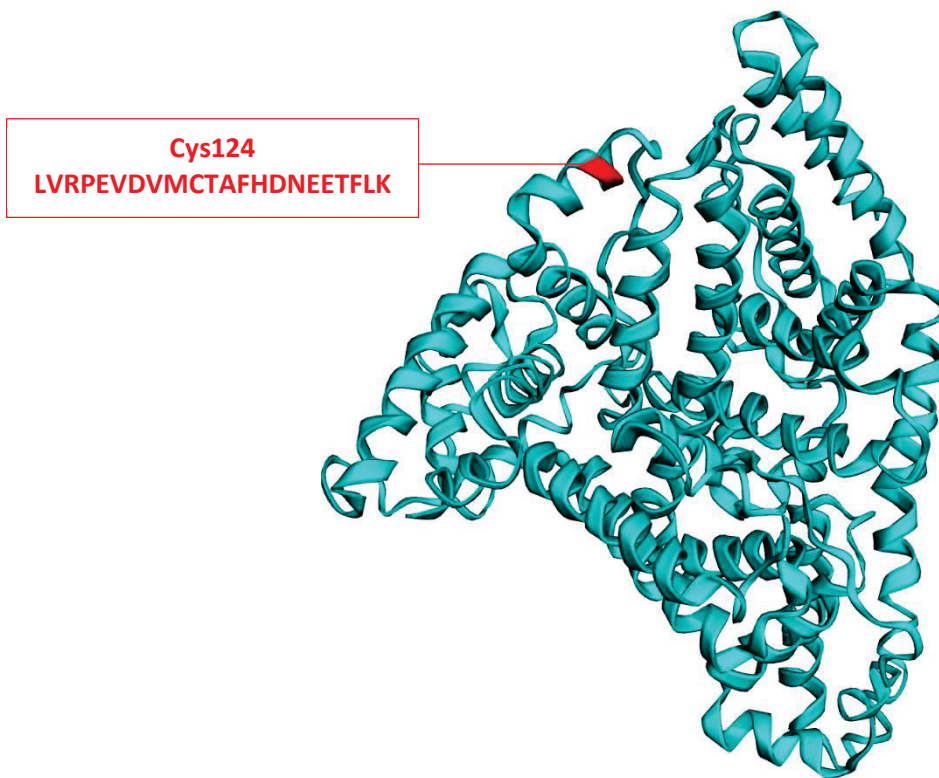


Figure 92: Représentation 3D de la protéine HSA, dont la cystéine 124 (peptide LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK) présentant un ratio d'oxydation plus faible parmi les patients positifs au COVID-19 est surlignée en rouge.

Pour deux des quinze peptides tryptiques de la transferrine analysés (DQYELLCLDNTR-Cys227 et DCHLAQVPSHTVVAR-Cys241) leurs ratios d'oxydation respectifs sont plus élevés d'en moyenne 30 et 38 % chez les patients positifs au COVID-19 que chez les autres patients ([Figure 89 d\) et e\)](#)). La transferrine (TrH) est une protéine plasmatique synthétisée dans le foie,²¹ constituant la principale transporteuse de fer dans le plasma. Elle joue également le rôle d'antioxydant en neutralisant le fer libre pouvant réagir avec H_2O_2 pour produire des radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton.⁴¹ Durant une inflammation la quantité de transferrine plasmatique tend à diminuer²⁴⁴ tandis que dans le cas d'une infection SARS-COV2 la quantité de transferrine cellulaire est accrue.²⁶⁵

Les cystéines des deux peptides (Cys227 et Cys 241) font chacune partie d'un cordon de liaison situé en surface de la sous-unité auquel il appartient ([Figure 93](#)). L'orientation du cordon et donc des cystéines n'implique qu'une faible exposition de ces dernières.

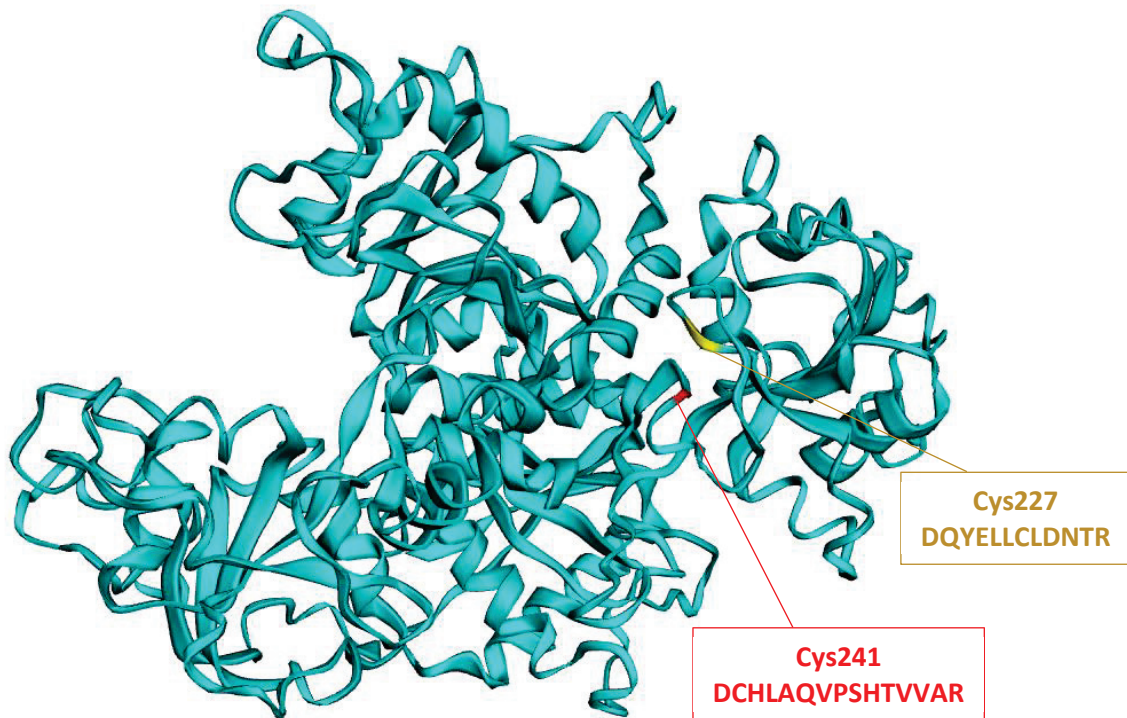


Figure 93: : Représentation 3D de la protéine TrH, dont les cystéines 227 et 241 (peptides DQYELLCLDNTR et DCHLAQVPSHTVVAR) présentant chacun un ratio d'oxydation plus élevé parmi les patients positifs au COVID-19 sont respectivement surlignées en jaune et rouge.

La variation du ratio d'oxydation observée uniquement pour certains peptides au sein d'une même protéine montre qu'il n'y a pas de biais lié au protocole : un biais de l'analyse complète aurait affecté tous les peptides d'une même protéine de la même façon, ce qui n'est pas le cas. De la même façon, un biais protocolaire survenu uniquement sur les échantillons de patients positifs au COVID-19 est à exclure, étant donné que la majorité des peptides analysés présentent un taux de Cys-SOH comparable à ceux des échantillons issus de patients positifs de la maladie d'Alzheimer ou contrôles.

Les échantillons de patients positifs au COVID-19 ont été analysés en dernier. Une instabilité des échantillons aurait impacté la totalité des peptides dérivés, et un biais de mesure aurait mis en évidence une variation du ratio d'oxydation pour tous peptides des échantillons analysés à la fin de la séquence (échantillons de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et échantillons de patients positifs au COVID-19).

En somme, trois peptides appartenant aux protéines AACT (1) et TrH (2) présentent des ratios d'oxydation plus élevés que pour les échantillons contrôles, et deux peptides issus des protéines CERU (1) et HSA (1) dénotent des ratios d'oxydation inférieurs à ceux des échantillons contrôles. Les protéines concernées sont toutes des protéines de phase aigüe : deux sont stimulées lors d'une inflammation (AACT et CERU), deux sont réprimées (TrH et HSA). Lors d'un cas de COVID-19, des quantités plasmatiques accrues en protéines AACT et TrH ont été observées dans la littérature. HSA, TrH et CERU possèdent des propriétés antioxydantes, et les propriétés anti-inflammatoires d'AACT en font un marqueur typique d'inflammation. Il est à noter que les mécanismes antioxydants sont souvent employés pour combattre les inflammations et réprimer les chemins d'activation liés aux cytokines. Les quatre protéines sont toutes synthétisées dans le foie, toutefois les protéines AACT et CERU sont connues pour pouvoir également être synthétisées directement dans les poumons.

Les peptides dont les ratios d'oxydation diffèrent dans le cas des patients positifs au COVID-19 possèdent une cystéine en surface de la protéine qui serait plus prompte à subir des variations redox liées au stress oxydant.

Le protocole de quantification des acides sulféniques endogènes par ratio d'oxydation a été réalisé avec succès puisque je parviens à identifier des variations (augmentation et diminution) des ratios d'oxydation entre les échantillons, et ce sans biais analytique. S'il m'est impossible de tirer des conclusions quant à la pertinence biologique des résultats observés à cause de la trop faible représentativité de la cohorte de patients positifs au COVID-19 (4 échantillons) qui ne permet pas de réaliser d'analyses statistiques et de mon manque d'expertise biologique, ces résultats sont très encourageants et incitent à renouveler l'analyse sur une cohorte de patients positifs au COVID-19 bien plus importante pour confirmer les résultats obtenus. Une demande a d'ailleurs été déposée auprès du CHU de Lyon pour obtenir une plus large cohorte de plasmas de patients sains et positifs au COVID-19.

Conclusion

Au cours de ce chapitre, j'ai présenté différentes optimisations du protocole de dérivation des Cys-SOH endogènes par le DabDn. J'ai raccourci le temps de réaction en réalisant la dérivation des Cys-SOH endogènes en parallèle de la digestion des protéines, puis j'ai réussi à augmenter la quantité de Cys-SOH endogènes détectées par l'ajout de 2 % d'acide formique après digestion/dérivation. J'ai changé les cartouches SPE pour compenser l'élution intempestive des peptides à Cys-SOH endogènes dérivés lors de l'étape SPE après avoir exploré la piste de LLE qui reste prometteuse pour d'autres applications. J'ai finalement me suis concentré sur l'étape de dénaturation protéique, et ai retiré l'ajout d'urée 8 M pour alléger le protocole, puis je me suis assuré du bien-fondé de l'emploi du DTT comme agent réducteur des ponts disulfures.

Pour pallier l'importante variabilité d'expression des protéines totale au sein des échantillons et à d'éventuels biais de dérivation des Cys-SOH, j'ai mis en place une méthode de quantification relative avec une référence interne : les Cys-SH des peptides correspondants. J'ai donc développé la dérivation des Cys-SH de l'échantillon par le DabMal suite à la dérivation des Cys-SOH endogènes par le DabDn. La détection des versions Cys-SH et Cys-SOH endogènes d'un même peptide (respectivement dérivées par le DabMal et le DabDn), puis le calcul d'un ratio d'oxydation permet la normalisation interne des signaux. Suite à cela, j'ai optimisé la réaction de dérivation séquentielle des Cys-SOH endogènes et SH en déterminant l'ordre et le temps de dérivation optimaux, en ajoutant une étape de réduction des ponts disulfures se reformant pour permettre un meilleur rendement de dérivation des Cys-SH par le DabMal, et en m'assurant du bon déroulement de la purification par SPE.

Une fois la dérivation séquentielle optimisée, j'ai appliqué le protocole à pour l'analyse d'une cohorte composée de plasmas de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de patients positifs au COVID-19 et de patients contrôles. Leur analyse a permis de mettre en évidence des variations des taux de Cys-SOH endogènes plasmatiques de cinq peptides issus de quatre protéines parmi les patients positifs au COVID-19 et certains patients atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport aux taux quantifiés chez les patients contrôles. Le faible échantillonnage de patients positifs au COVID-19 ne permettant pas d'interprétations biologiques, une demande de cohorte comprenant une plus grande quantité de

plasmas issus de patients positifs et négatifs (contrôles) au COVID-19 a été déposée auprès du Centre de Ressources Biologique de la Croix-Rousse pour permettre de réaliser une analyse complémentaire et confirmer ces résultats.

La dérivation séquentielle des cystéines à Cys-SOH endogènes et Cys-SH par le DabDn et le DabMal permet donc la détection et la quantification relative des Cys-SOH endogènes d'échantillons biologiques complexes, rationalisée avec une référence interne pour s'affranchir des biais analytiques ainsi que de la variabilité individuelle du niveau total de chaque protéine. Cette quantification est donc non biaisée, suffisamment sensible et robuste pour permettre l'observation directe de variations de la quantité d'oxydation des cystéines entre les individus au sein de larges cohortes d'échantillons.

Conclusion générale

Cette thèse avait pour objectif le développement d'une méthodologie couplant la spectrométrie de masse avec la dissociation induite par laser permettant la détection et la quantification des cystéines oxydées en acides sulféniques.

L'oxydation des fonctions thiol cystéines des protéines en acides sulféniques est un phénomène physiologique minoritaire au sein du corps humain, inscrit dans un système de régulation cellulaire : l'équilibre redox entre oxydants et antioxydants. Les principaux modes de production et d'action de ces divers composés ont été décrits au cours du Chapitre I. Certains des mécanismes de régulation dans lesquels ils sont impliqués, comme l'apoptose ou la réponse immunitaire, ont été décrits afin de souligner l'importance du maintien de l'équilibre redox pour assurer le bon fonctionnement des fonctions vitales. Sa perturbation peut mener à la formation d'un stress oxydant lié à l'apparition de pathologies lourdes telles que les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires, différents types de cancers, le diabète... L'impact du stress oxydant peut être estimé soit par la quantification directe des molécules oxydantes, soit de manière indirecte par les dégâts qu'elles induisent, ou la quantification des protéines et enzymes qu'elles oxydent. Ces composés biologiques caractéristiques, appelés biomarqueurs ne sont souvent pas adaptés à une quantification *in vivo* ou correspondent souvent à des produits finaux de cascades de réactions parfois éloignés de la réalité biologique. Les modifications induites par le stress oxydant ciblent beaucoup de molécules transitoires ou à durée de vie limitée rendant leur détection et leur quantification difficiles. Ceci est le cas pour l'oxydation des fonctions thiols des cystéines en acides sulféniques. Ce phénomène est au cœur d'un système de signalisation cellulaire secondaire largement décrit, et représente une potentielle piste de développement pour la recherche de biomarqueurs liés au stress oxydant. Cependant, de par son état transitoire et sa très faible concentration dans le milieu biologique, sa quantification est un défi analytique à relever.

Différentes méthodes ont été développées pour la détection, la localisation et la quantification des acides sulféniques des cystéines protéiques, qui sont décrites dans le Chapitre II. Ces méthodes se divisent en deux axes : les méthodes globales permettant une quantification des acides sulféniques de

l'échantillon, le plus simplement grâce au suivi de la quantité de thiols libres qui diminue face à une exposition au stress oxydant. D'autres méthodes indirectes consistent à bloquer d'abord les cystéines libres avec un réactif alkylant, puis à réduire les cystéines oxydées de l'échantillon pour les rendre disponibles pour le marquage avec une étiquette spécifique. Différentes sondes peuvent être utilisées pour la dérivation des thiols, permettant leur détection par fluorescence, radiographie, immunochimie... Les méthodes globales ne permettent d'obtenir qu'une quantification du contenu total en cystéines oxydées de l'échantillon, sans information quant à la localisation des oxydations. Les méthodes localisées, quant à elle, utilisent une détection par spectrométrie de masse et permettent d'identifier les résidus oxydés. Ces méthodes diffèrent par la stratégie de préparation d'échantillon adoptée visant à améliorer la spécificité, la sensibilité ou la capacité de multiplexage de l'analyse. De même que pour les méthodes globales, les méthodes localisées fournissent principalement une quantification indirecte des cystéines réversiblement oxydées en employant différentes sondes isotopiques, isobares, biotinylées pour dériver différentiellement les fonctions thiols libres endogènes et les fonctions thiols obtenues après réduction des cystéines oxydées. Il est par ailleurs possible de réduire spécifiquement les acides sulféniques et d'ainsi spécifiquement quantifier les thiols qui en sont issus. D'autres techniques permettent de fournir une quantification directe des Cys-SOH *in vivo* notamment grâce à leur stabilisation par dérivation avec des sondes spécifiques à l'instar du NBD chloride, du DNPH, des norbornènes et des dimédones qui ont fait l'objet de nombreux développements analytiques. Ces méthodes présentent toutefois des défauts de sensibilité et nécessitent un recours à des étapes de purification et d'enrichissement des échantillons. La spectrométrie de masse étant une technique très prisée pour l'analyse protéomique grâce à sa spécificité, sa sensibilité et les informations sur la localisation des modifications post-traductionnelles qu'elle permet d'obtenir, les différentes stratégies analytiques qui lui sont associées ainsi que les différents modes d'acquisition de données et de fragmentation des peptides qui peuvent être employés pour l'analyse des peptides ont été passés en revue dans la seconde partie du Chapitre II. Le couplage de la photodissociation laser à la spectrométrie de masse, remplaçant le mode de fragmentation HCD initialement en place, apparaît comme un moyen d'augmenter la sensibilité analytique par la réduction du bruit généré par la fragmentation non sélective d'analytes isobares

interférents. Ceci permettrait de s'affranchir du recours aux étapes d'enrichissement généralement nécessaires à l'analyse Cys-SOH protéiques.

Le développement d'une telle méthodologie est décrit dans le Chapitre III. Les peptides à acides sulféniques n'absorbant pas dans le visible, leur dérivation par un chromophore quencher permettant l'absorption des photons dans ce domaine est nécessaire pour leur fragmentation spécifique. Ainsi, le chromophore dabcyI cyclohexanedione a été développé et synthétisé par M. Yann Bretonnière et Mme Delphine Pitrat du laboratoire de l'ENS Lyon. Cette molécule comprend une fonction dabcyI, qui absorbe à 473 nm et présente une relaxation par fragmentation, ainsi qu'une fonction cyclohexanedione qui lui permet de dériver spécifiquement les acides sulféniques. Insoluble dans l'eau, il présente un excellent rendement de photodissociation (<99 %) et donne lieu à la génération de différents ions rapporteurs dont certains mécanismes de formation ont été proposés. Suite à l'oxydation *in vitro* des cystéines et méthionines de divers peptides modèles par l'oxydant physiologique H₂O₂, j'ai pu mettre en évidence que la dérivation des cystéines oxydées permet leur fragmentation laser spécifique, donnant lieu à la production d'ions caractéristiques issus de la dissociation de la chaîne peptidique et du chromophore. La spécificité de la dérivation des Cys-SOH par le chromophore a été confirmée, puis les conditions de dérivation les plus propices ont été déterminées et optimisées. La méthodologie a été adaptée pour permettre la dérivation et la quantification spécifiques des acides sulféniques issus de l'oxydation *in vitro* des cystéines de mélanges de peptides et de mélanges de protéines. J'ai pu démontrer le gain en sensibilité apporté par la photodissociation laser par rapport à la technique de fragmentation HCD en comparant les limites de détection et de quantification obtenues lors de l'analyse d'échantillons de plasma humain dopés avec des peptides à Cys-SOH dérivés *in vitro*. J'ai finalement réussi à dériver et quantifier les peptides à acides sulféniques endogènes de divers échantillons de plasma humains. Cette quantification est relative puisqu'il n'existe aucun standard de peptides à Cys-SOH dérivés par le chromophore dabcyI cyclohexanedione qui permettrait de réaliser leur quantification absolue.

Le Chapitre IV présente diverses optimisations du protocole réalisées dans le but d'établir une détection spécifique et une quantification relative multiplexée des Cys-SOH des protéines plasmatiques de plasmas issus d'une cohorte de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, positifs

au COVID-19 et sains. La dérivation des Cys-SOH endogènes a été optimisée de façon à permettre leur détection maximale en réduisant les biais protocolaires, notamment par la dérivation des acides sulféniques en parallèle de la digestion des protéines, le retrait de l'urée lors de l'étape de dénaturation protéique ou l'amélioration des conditions de purification SPE par l'ajout d'acide formique dans les échantillons, sans nécessiter le recours à une étape d'enrichissement ou de fractionnement. Afin de s'affranchir des biais analytiques liés à la variation de la puissance du laser, l'encrassement de l'appareillage ainsi qu'à la variabilité de la quantité de protéines entre les échantillons, les fonctions thiols libres des cystéines protéiques ont été dérivées avec un chromophore dabcyI maléimide, homologue du dabcyI cyclohexanedione permettant une dérivation spécifique des fonctions thiols, pour servir de référence interne. Celle-ci permet d'établir un ratio d'oxydation en normalisant les quantités de chaque peptide Cys-SOH endogène dérivé par celles du même peptide à Cys-SOH dérivé. La mise en place et l'optimisation de cette seconde dérivation font l'objet de la seconde partie du Chapitre IV. Ensuite, les Cys-SOH endogènes et Cys-SH de 54 échantillons de plasma issus de la cohorte de patients sains, atteints de la maladie d'Alzheimer et positifs au COVID-19 ont été séquentiellement dérivées puis analysées de façon ciblée en PRM-LID. Parmi les 73 ratios d'oxydations de couples Cys-SOH/Cys-SH dérivés suivis, des variations de taux d'oxydation de deux peptides au sein des échantillons de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont été observées (protéines AACT et CXCL7). L'analyse statistique par ANOVA des ratios d'oxydation des populations de patients sains et atteints de la maladie d'Alzheimer montre que ces variations sont trop ponctuelles pour être significatives (p value $>0,05$). Des taux d'oxydation de cinq peptides au sein des échantillons de patients positifs au COVID-19 différents de ceux du reste de la cohorte ont également été observés (protéines AACT, CERU, TrH, HSA). La faible représentativité des patients positifs au COVID-19 au sein de la cohorte (4 échantillons sur 54) ne permet pas de conclure quant aux résultats obtenus, mais a motivé la demande d'une cohorte plus importante de patients sains et positifs au COVID-19.

La dissociation laser couplée à la spectrométrie de masse permet donc une détection et une quantification relative sensible, robuste, non biaisée des Cys-SOH endogènes protéiques, adaptée à l'analyse de cohortes d'échantillons biologiques complexes. La méthode développée pourrait être appliquée à la recherche de biomarqueurs de pathologies variées telles que le diabète ou les maladies

neurodégénératives, ou même d'infections virales telles que le COVID-19, au travers d'analyses non ciblées robustes telles que la DIA, ou par l'analyse PRM-LID de potentiels candidats issus d'une étude bibliographique plus approfondie que celle menée au cours de cette thèse. Ce travail de thèse s'est limité à l'analyse de plasmas et peut être adapté à l'analyse d'autres fluides biologiques (urine, liquide céphalo-rachidien ...) ou même de cultures cellulaires. Si ce travail de thèse s'est concentré sur l'analyse des cystéines oxydées en acides sulféniques, la capacité de multiplexage de la méthode développée lui permet d'intégrer d'autres analytes par leur dérivation spécifique avec un chromophore dédié. Il serait par exemple envisageable de compléter la méthode en intégrant d'autres CysROx telles que les cystéines nitrosylées (SNO) avec leur dérivation spécifique grâce à un nouveau chromophore en parallèle de celle des cystéines à acides sulféniques et thiols dans le même échantillon ou dans plusieurs aliquots du même échantillon purifiés et rassemblés à l'instar de la technique IodoTMT. D'ailleurs, le multiplexage pourrait être poussé à l'extrême en s'inspirant de techniques telles que OxiTMT, OxiTRAQ, Oc-SILAC ou ICDID avec l'emploi de chromophores isotopiquement marqués différents pour chaque échantillon à analyser.

Il serait au préalable judicieux de poursuivre l'optimisation et l'amélioration du protocole pour permettre un meilleur contrôle de la dérivation séquentielle. L'optimisation actuelle a été conduite dans le but de garder le protocole de dérivation séquentielle le plus simple possible, mais elle reste imparfaite. Ainsi, une étude plus fine des paramètres tels que la quantité d'acide formique ou la température de réaction serait pertinente, tout comme envisager l'emploi de tampons, de réactifs complémentaires ou de stratégies d'extractions des protéines en amont. La mise au point de techniques de purifications complémentaires comme la LLE au MTBE après l'étape de SPE permettrait d'extraire le DabDn et DabMal libres ainsi que divers composés tels que les lipides et donc limiter l'encrassement de l'appareil pouvant nuire à la qualité de l'analyse. L'optimisation de la séparation chromatographique serait également envisageable au travers de l'évaluation de différentes colonnes chromatographiques ou de la mise en place d'une séparation à plusieurs solvants apolaires (MeOH notamment) ou à solvants plus complexes (tampons, mélanges ACN/MeOH...). Enfin, l'amélioration du matériel optique avec l'appui de ThermoFischer comme la mise en place d'un système automatisé de réglage des miroirs conférerait la possibilité d'automatiquement réaligner le laser à chaque analyse.

L'installation de diodes électroluminescentes (LED) émettant à 473 nm directement dans la cellule HCD permettrait de s'affranchir de la nécessité d'une calibration systématique et de drastiquement diminuer les dangers liés à l'utilisation d'un laser extérieur de classe 4. Les LED pouvant couvrir des longueurs d'ondes entre 350 et 2000 nm, plusieurs méthodes d'activation pourraient être employées en parallèle, ce qui pourrait également être réalisé avec deux lasers différents synchronisés.

Bibliographie

1. Jones, D. P. & Sies, H. The Redox Code. *Antioxidants and Redox Signaling* **23**, 734–746 (2015).
2. Sies, H. Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants* **9**, 1–6 (2020).
3. Ghezzi, P. Environmental risk factors and their footprints in vivo – A proposal for the classification of oxidative stress biomarkers. *Redox Biology* **34**, 101442 (2020).
4. Assi, M. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **313**, R646–R653 (2017).
5. Oluwafemi Omoniyi Oguntibeju. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* **11**, 45–63 (2019).
6. Hansen, J. M., Go, Y. M. & Jones, D. P. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **46**, 215–234 (2006).
7. Sies, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology* **7**, 122–126 (2018).
8. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* **417**, 1–13 (2009).
9. Espinosa-Diez, C. *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology* **6**, 183–197 (2015).
10. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**, 44–84 (2007).
11. Schlagowski, A. I., Isabel, A. & Etude, S. Etude des adaptations mitochondriales dans le muscle squelettique : importance de l' hormone mitochondriale To cite this version : HAL Id : tel-01239372 ETUDE DES ADAPTATIONS MITOCHONDRIALES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE : (2015).
12. Bornhövd, C., Vogel, F., Neupert, W. & Reichert, A. S. Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 13990–13998 (2006).
13. Hamanaka, R. B. & Chandel, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 505–513 (2010).
14. Bedard, K. & Krause, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* **87**, 245–313 (2007).
15. Cross, A. R. & Segal, A. W. The NADPH oxidase of professional phagocytes - Prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* vol. 1657 1–22 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.03.008> (2004).
16. Vignais, P. v. *The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism.* *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* vol. 59 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (2002).

17. Prousek, J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and Applied Chemistry* **79**, 2325–2338 (2007).
18. Kehrer, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**, 43–50 (2000).
19. Nakamura, T., Naguro, I. & Ichijo, H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1863**, 1398–1409 (2019).
20. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).
21. Jiang, X., Stockwell, B. R. & Conrad, M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **22**, 266–282 (2021).
22. Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M. & Bolognesi, A. Xanthine oxidoreductase-derived reactive species: Physiological and pathological effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, (2016).
23. Neurath, H. *et al.* The regulation of rat liver xanthine oxidase: Conversion of type D (dehydrogenase) into type O (oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* **212**, 195–197 (1970).
24. Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B. T., Pai, E. F. & Nishino, T. Mammalian xanthine oxidoreductase - Mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS Journal* **275**, 3278–3289 (2008).
25. Higaki, Y. *et al.* Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **294**, E889–E897 (2008).
26. Cantu-Medellin, N. & Kelley, E. E. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology* **1**, 353–358 (2013).
27. Kelley, E. E. *et al.* Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radical Biology and Medicine* **48**, 493–498 (2010).
28. de Duve, C. & Baudhuin, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* **46**, 323–357 (1966).
29. Schrader, M. & Fahimi, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1763**, 1755–1766 (2006).
30. Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B. & Apanasets, O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1822**, 1363–1373 (2012).
31. Chen, A. C. H., Burr, L. & McGuckin, M. A. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in respiratory disease. *Clinical and Translational Immunology* **7**, 1–13 (2018).
32. Salminen, A., Kauppinen, A., Suuronen, T., Kaarniranta, K. & Ojala, J. ER stress in Alzheimer's disease: A novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. *Journal of Neuroinflammation* **6**, 1–13 (2009).
33. Morris, G. *et al.* The Endoplasmic Reticulum Stress Response in Neurodegenerative Diseases: Emerging Pathophysiological Role and Translational Implications. *Molecular Neurobiology* **55**, 8765–8787 (2018).

34. Antunes, M. A., Lopes-Pacheco, M. & Rocco, P. R. M. Oxidative Stress-Derived Mitochondrial Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Concise Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2021**, (2021).
35. Risom, L., Møller, P. & Loft, S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **592**, 119–137 (2005).
36. Prasad, S., Gupta, S. C. & Tyagi, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters* **387**, 95–105 (2017).
37. Hamid, M. & Khalil-ur-Rehman. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry* **115**, 1177–1186 (2009).
38. Banci, L. Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology* **53**, 253–263 (1997).
39. EMBL-EMI. Peroxidases. <https://www.ebi.ac.uk/intenz/query?cmd=SearchEC&ec=1.11.1>.
40. Glorieux, C. & Calderon, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry* **398**, 1095–1108 (2017).
41. Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M. & Zujko, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences* **63**, 68–78 (2018).
42. Carballal, S. *et al.* Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids* **32**, 543–551 (2007).
43. Jeong, W., Bae, S. H., Toledano, M. B. & Rhee, S. G. Role of sulfiredoxin as a regulator of peroxiredoxin function and regulation of its expression. *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 447–456 (2012).
44. Holmgren, A. *et al.* Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochemical Society Transactions* **33**, 1375–1377 (2005).
45. Dalle-Donne, I. *et al.* Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxidants and Redox Signaling* **10**, 445–473 (2008).
46. Barford, D. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Current Opinion in Structural Biology* **14**, 679–686 (2004).
47. Devarie-Baez, N. O., Lopez, E. I. S. & Furdui, C. M. Biological chemistry and functionality of protein sulfenic acids and related thiol modifications. *Free Radical Research* **50**, 172–194 (2016).
48. Seo, M. Y. & Lee, S. M. Protective effect of low dose of ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Journal of Hepatology* **36**, 72–77 (2002).
49. Rahal, A. *et al.* Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International* **2014**, 1–19 (2014).
50. Halliwell, B. Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radical Research* **25**, 439–454 (1996).
51. Njus, D., Kelley, P. M., Tu, Y.-J. & Schlegel, H. B. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine* **159**, 37–43 (2020).
52. Battelli, M. G., Bolognesi, A. & Polito, L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1842**, 1502–1517 (2014).

53. Rochette, L., Ghibu, S., Muresan, A. & Vergely, C. Alpha-lipoic acid: Molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **93**, 1021–1027 (2015).
54. Theodore Peters, Jr. *All About Albumin : Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. (Academic Press, 1995).
55. Lv, Q. Z. *et al.* Current State of Knowledge on the Antioxidant Effects and Mechanisms of Action of Polyphenolic Compounds. *Natural Product Communications* **16**, (2021).
56. Lawenda, B. D. *et al.* Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? *J Natl Cancer Inst* **100**, 773–783 (2008).
57. Sena, L. A. & Chandel, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell* **48**, 158–167 (2012).
58. Poprac, P. *et al.* Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* **38**, 592–607 (2017).
59. Yun, J. & Finkel, T. Mitohormesis. *Cell Metabolism* **19**, 757–766 (2014).
60. Schulz, T. J. *et al.* Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *Cell Metabolism* **6**, 280–293 (2007).
61. Henríquez-Olguin, C. *et al.* Cytosolic ROS production by NADPH oxidase 2 regulates muscle glucose uptake during exercise. *Nature Communications* **10**, 1–11 (2019).
62. Merry, T. L., Steinberg, G. R., Lynch, G. S. & McConell, G. K. Skeletal muscle glucose uptake during contraction is regulated by nitric oxide and ROS independently of AMPK. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **298**, 577–585 (2010).
63. Herb, M. & Schramm, M. Functions of ros in macrophages and antimicrobial immunity. *Antioxidants* **10**, 1–39 (2021).
64. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology* **11**, 613–619 (2017).
65. Aliev, G. *et al.* The role of oxidative stress in the pathophysiology of cerebrovascular lesions in Alzheimer's disease. *Brain Pathology* **12**, 21–35 (2002).
66. Tyagi, E., Fiorelli, T., Norden, M. & Padmanabhan, J. Alpha 1-antichymotrypsin, an inflammatory protein overexpressed in the brains of patients with Alzheimer's disease, induces Tau hyperphosphorylation through c-Jun N-terminal kinase activation. *International Journal of Alzheimer's Disease* **2013**, 1–12 (2013).
67. Koh, C. H. V. *et al.* Chronic exposure to U18666A is associated with oxidative stress in cultured murine cortical neurons. *Journal of Neurochemistry* **98**, 1278–1289 (2006).
68. Weng, M. *et al.* The Sources of Reactive Oxygen Species and Its Possible Role in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease* **2018**, (2018).
69. Schrag, M. *et al.* Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A meta-analysis. *Neurobiology of Disease* **59**, 100–110 (2013).
70. Mathieu, C. *et al.* An isozyme-specific redox switch in human brain glycogen phosphorylase modulates its allosteric activation by AMP. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 23842–23853 (2016).

71. Farout, L., Mary, J., Vinh, J., Szweda, L. I. & Friguet, B. Inactivation of the proteasome by 4-hydroxy-2-nonenal is site specific and dependant on 20S proteasome subtypes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **453**, 135–142 (2006).
72. Lewis, T. & Trempe, C. *Chapter 7 - Inflammation Friend or Foe? The End of Alzheimer's* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-12-812112-2/00007-0.
73. Oh, S. H. *et al.* The emerging role of xanthine oxidase inhibition for suppression of breast cancer cell migration and metastasis associated with hypercholesterolemia. *FASEB Journal* **33**, 7301–7314 (2019).
74. García-Sánchez, A., Miranda-Díaz, A. G. & Cardona-Muñoz, E. G. The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- And Antioxidant Properties in Chronic Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2020**, (2020).
75. Cho, Y. S. & Moon, H. B. The role of oxidative stress in the pathogenesis of asthma. *Allergy, Asthma and Immunology Research* **2**, 183–187 (2010).
76. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK338448/>.
77. Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Tsikas, D. & Rossi, R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **46**, 241–281 (2009).
78. Leonard, S. E. & Carroll, K. S. Chemical “omics” approaches for understanding protein cysteine oxidation in biology. *Current Opinion in Chemical Biology* **15**, 88–102 (2011).
79. Trost, P., Fermani, S., Calvaresi, M. & Zaffagnini, M. Biochemical basis of sulphenomics: how protein sulphenic acids may be stabilized by the protein microenvironment. *Plant Cell and Environment* **40**, 483–490 (2017).
80. Furdui, C. M. & Poole, L. B. Chemical approaches to detect and analyze protein sulfenic acids. *Mass Spectrometry Reviews* **33**, 126–146 (2014).
81. Freeman, F., Adesina, I. T., La, J. Le, Lee, J. Y. & Poplawski, A. A. Conformers of cysteine and cysteine sulfenic acid and mechanisms of the reaction of cysteine sulfenic acid with 5,5-dimethyl-1,3-cyclohexanedione (dimedone). *Journal of Physical Chemistry B* **117**, 16000–16012 (2013).
82. Delaunay, A. S., Pflieger, D., Né Dicte Barrault, M.-B., Vinh, J. & Toledano, M. B. A Thiol Peroxidase Is an H₂O₂ Receptor and Redox-Transducer in Gene Activation prokaryotic OxyR and SoxR transcription factors that sense and transduce hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion signals, respectively (Kim *et al.*, 2002. *Cell* vol. 111 (2002).
83. Poole, L. B., Karplus, P. A. & Claiborne, A. Protein Sulfenic Acids in Redox Signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **44**, 325–347 (2004).
84. Kiley, P. J. & Storz, G. Exploiting thiol modifications. *PLoS Biology* **2**, (2004).
85. Matthijnssens, J. *et al.* Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radical Biology and Medicine* **153**, 1621–1629 (2009).
86. Poole, L. B. & Ellis, H. R. Identification of cysteine sulfenic acid in AhpC of alkyl hydroperoxide reductase. *Methods in Enzymology* **348**, 122–136 (2002).
87. Poole, L. B., Zeng, B. B., Knaggs, S. A., Yakubu, M. & King, S. B. Synthesis of chemical probes to map sulfenic acid modifications on proteins. *Bioconjugate Chemistry* **16**, 1624–1628 (2005).

88. Maitre, P. *et al.* Applications of Infrared Multiple Photon Dissociation (IRMPD) to the Detection of Posttranslational Modifications. *Chemical Reviews* **120**, 3261–3295 (2020).
89. Reisz, J. A., Bechtold, E., King, S. B., Poole, L. B. & Furdui, C. M. Thiol-blocking electrophiles interfere with labeling and detection of protein sulfenic acids. *FEBS Journal* **280**, 6150–6161 (2013).
90. Eaton, P. Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radical Biology and Medicine* **40**, 1889–1899 (2006).
91. Chiappetta, G. *et al.* Proteome screens for Cys residues oxidation: the redoxome. *Methods in enzymology* vol. 473 (Elsevier Inc., 2010).
92. Diedrich, J. K. & Julian, R. R. Site-Selective Fragmentation of Peptides and Proteins at Quinone-Modified Cysteine Residues Investigated by ESI-MS. *Analytical Chemistry* **82**, 4006–4014 (2010).
93. Leichert, L. I. *et al.* Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8197–8202 (2008).
94. Saurin, A. T., Neubert, H., Brennan, J. P. & Eaton, P. Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17982–17987 (2004).
95. Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Colombo, R., Milzani, A. & Rossi, R. Is ascorbate able to reduce disulfide bridges? A cautionary note. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **19**, 252–258 (2008).
96. Holmes, A. J. & Williams, D. L. H. Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: Clear evidence for two distinct reaction pathways. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 2* 1639–1644 (2000) doi:10.1039/b004028m.
97. Wojdyla, K. & Rogowska-Wrzesinska, A. Differential alkylation-based redox proteomics - Lessons learnt. *Redox Biology* **6**, 240–252 (2015).
98. Qian, J. *et al.* Simple synthesis of 1,3-cyclopentanedione derived probes for labeling sulfenic acid proteins. *Chemical Communications* **47**, 9203–9205 (2011).
99. Alcock, L. J. *et al.* Norbornene Probes for the Detection of Cysteine Sulfenic Acid in Cells. *ACS Chemical Biology* **14**, 594–598 (2019).
100. Wojdyla, K., Williamson, J., Roepstorff, P. & Rogowska-Wrzesinska, A. The SNO/SOH TMT strategy for combinatorial analysis of reversible cysteine oxidations. *Journal of Proteomics* **113**, 415–434 (2015).
101. Bachi, A., Dalle-Donne, I. & Scaloni, A. Redox proteomics: Chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. *Chemical Reviews* **113**, 596–698 (2013).
102. Liu, P., Zhang, H., Wang, H. & Xia, Y. Identification of redox-sensitive cysteines in the arabidopsis proteome using OxiTRAQ, a quantitative redox proteomics method. *Proteomics* **14**, 750–762 (2014).
103. Mahmood, S. & Shakir, S. Développement de nouvelles stratégies analytiques pour la caractérisation moléculaire des états d'oxydation à l'échelle protéomique Shakir Mahmood Shakir Shakir To cite this version : HAL Id : tel-01299792 Université Pierre et Marie Curie Développement. (2016).
104. Lopes De Almeida, J. P. & Saldanha, C. Dithiothreitol revisited in red cells: A new head for an old hat. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **46**, 51–56 (2010).

105. Wang, N. & Li, L. Exploring the precursor ion exclusion feature of liquid chromatography-electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry for improving protein identification in shotgun proteome analysis. *Analytical Chemistry* **80**, 4696–4710 (2008).
106. Ratnayake, S., Dias, I. H. K., Lattman, E. & Griffiths, H. R. Stabilising cysteinyl thiol oxidation and nitrosation for proteomic analysis. *Journal of Proteomics* **92**, 160–170 (2013).
107. Klomsiri, C. *et al.* Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection evaluation of conditions affecting probe incorporation into redox-sensitive proteins. *Methods in enzymology* vol. 473 (Elsevier Inc., 2010).
108. Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Radi, R. & Alvarez, B. Sulfenic acid-A key intermediate in albumin thiol oxidation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **877**, 3384–3392 (2009).
109. Marino, S. M. *et al.* Characterization of surface-exposed reactive cysteine residues in *saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **49**, 7709–7721 (2010).
110. Ratnayake, S. N. Synthesis and application of novel probes for the detection of cysteine sulphenic acids. (2015).
111. Godat, E. *et al.* Regulation of cathepsin K activity by hydrogen peroxide. *Biological Chemistry* **389**, 1123–1126 (2008).
112. Ellis, H. R. & Poole, L. B. Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry* **36**, 15013–15018 (1997).
113. Shakir, S., Vinh, J. & Chiappetta, G. Quantitative analysis of the cysteine redoxome by iodoacetyl tandem mass tags. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **409**, 3821–3830 (2017).
114. Vajrychova, M. *et al.* Quantification of cellular protein and redox imbalance using SILAC-iodoTMT methodology. *Redox Biology* **24**, 101227 (2019).
115. Bednarek, C., Wehl, I., Jung, N., Schepers, U. & Bräse, S. The Staudinger Ligation. *Chemical Reviews* **120**, 4301–4354 (2020).
116. Seo, Y. H. & Carroll, K. S. Quantification of protein sulfenic acid modifications using isotope-coded dimedone and iododimedone. *Angewandte Chemie - International Edition* **50**, 1342–1345 (2011).
117. Pople, J. M. M. & Chalker, J. M. A critical evaluation of probes for cysteine sulfenic acid. *Current Opinion in Chemical Biology* **60**, 55–65 (2021).
118. Cupp-Sutton, K. A. & Wu, S. High-throughput quantitative top-down proteomics. *Molecular Omics* **16**, 91–99 (2020).
119. Shaw, J. B. *et al.* Complete Protein Characterization Using Top-Down Mass Spectrometry and Ultraviolet Photodissociation. *J Am Chem Soc* **135**, 12646–12651 (2013).
120. Chapman, J. D., Goodlett, D. R. & Masselon, C. D. Multiplexed and data-independent tandem mass spectrometry for global proteome profiling. *Mass Spectrometry Reviews* **33**, 452–470 (2014).
121. Dupree, E. J. *et al.* A critical review of bottom-up proteomics: The good, the bad, and the future of this field. *Proteomes* **8**, 1–26 (2020).
122. Wolf-Yadlin, A., Hu, A. & Noble, W. S. Technical advances in proteomics: New developments in data-independent acquisition. *F1000Res* **5**, 1–12 (2016).

123. Giansanti, P., Tsiatsiani, L., Low, T. Y. & Heck, A. J. R. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nature Protocols* **11**, 993–1006 (2016).
124. Hansen, K. *et al.* Glu-C, an alternative digestive enzyme for the quantitative LC-MS/MS analysis of an IgG-based antibody biotherapeutic. *Bioanalysis* **10**, 997–1007 (2018).
125. Ahn, J., Cao, M. J., Yu, Y. Q. & Engen, J. R. Accessing the reproducibility and specificity of pepsin and other aspartic proteases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1834**, 1222–1229 (2013).
126. Brodbelt, J. S., Morrison, L. J. & Santos, I. Ultraviolet Photodissociation Mass Spectrometry for Analysis of Biological Molecules. *Chemical Reviews* **120**, 3328–3380 (2020).
127. Cristobal, A. *et al.* Toward an Optimized Workflow for Middle-Down Proteomics. *Analytical Chemistry* **89**, 3318–3325 (2017).
128. Hoffmann, E. & Stroobant, V. *Mass spectrometry. Journal of Chromatography A* vol. 1040 (2016).
129. Awad, H., Khamis, M. M. & El-Aneed, A. Mass spectrometry, review of the basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews* **50**, 158–175 (2015).
130. Filippo Rusconi. *Manuel de spectrométrie de masse à l'usage des biochimistes*. (2011).
131. Lange, V., Picotti, P., Domon, B. & Aebersold, R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: A tutorial. *Molecular Systems Biology* **4**, (2008).
132. Peterson, A. C., Russell, J. D., Bailey, D. J., Westphall, M. S. & Coon, J. J. Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **11**, 1475–1488 (2012).
133. Ronsein, G. E. *et al.* Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics. *Journal of Proteomics* **113**, 388–399 (2015).
134. Gallien, S., Duriez, E., Demeure, K. & Domon, B. Selectivity of LC-MS/MS analysis: Implication for proteomics experiments. *Journal of Proteomics* **81**, 148–158 (2013).
135. Rauniyar, N. Parallel reaction monitoring: A targeted experiment performed using high resolution and high mass accuracy mass spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 28566–28581 (2015).
136. Morin, L.-P., Mess, J.-N. & Garofolo, F. Large-molecule quantification: sensitivity and selectivity head-to-head comparison of triple quadrupole with Q-TOF. *Bioanalysis* **5**, 1181–1193 (2013).
137. Gallien, S., Bourmaud, A., Kim, S. Y. & Domon, B. Technical considerations for large-scale parallel reaction monitoring analysis. *Journal of Proteomics* **100**, 147–159 (2014).
138. Stahl, D. C., Swiderek, K. M., Davis, M. T. & Lee, T. D. Data-controlled automation of liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of peptide mixtures. *J Am Soc Mass Spectrom* **7**, 532–540 (1996).
139. Brodbelt, J. S. Ion Activation Methods for Peptides and Proteins. *Analytical Chemistry* **88**, 30–51 (2016).
140. Argenzio, E. *et al.* Proteomic snapshot of the EGF-induced ubiquitin network. *Molecular Systems Biology* **7**, 1–15 (2011).

141. Villén, J., Beausoleil, S. A., Gerber, S. A. & Gygi, S. P. Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1488–1493 (2007).
142. Gavin, A. C., Maeda, K. & Kühner, S. Recent advances in charting protein-protein interaction: Mass spectrometry-based approaches. *Current Opinion in Biotechnology* **22**, 42–49 (2011).
143. Davis, Z. H. *et al.* Global mapping of herpesvirus-host protein complexes reveals a transcription strategy for late genes. *Molecular Cell* **57**, 349–360 (2015).
144. Navare, A. T. *et al.* Quantitative proteomic analysis of HIV-1 infected CD4+ T cells reveals an early host response in important biological pathways: Protein synthesis, cell proliferation, and T-cell activation. *Virology* **429**, 37–46 (2012).
145. Borotto, N. B., McClory, P. J., Martin, B. R. & Hakansson, K. Targeted Annotation of S-Sulfonylated Peptides by Selective Infrared Multiphoton Dissociation Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **89**, 8304–8310 (2017).
146. Krasny, L. & Huang, P. H. Data-independent acquisition mass spectrometry (DIA-MS) for proteomic applications in oncology. *Molecular Omics* **17**, 29–42 (2021).
147. Bruderer, R. *et al.* Extending the limits of quantitative proteome profiling with data-independent acquisition and application to acetaminophen-treated three-dimensional liver microtissues. *Molecular and Cellular Proteomics* **14**, 1400–1410 (2015).
148. P. Roepstorff, J. Fohlman. Letter to the Editors. *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).
149. Biemann, K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biological Mass Spectrometry* **16**, 99–111 (1988).
150. Michalski, A., Neuhauser, N., Cox, J. & Mann, M. A systematic investigation into the nature of tryptic HCD spectra. *Journal of Proteome Research* **11**, 5479–5491 (2012).
151. Schlosser, A. & Lehmann, W. D. Five-membered ring formation in unimolecular reactions of peptides: A key structural element controlling low-energy collision-induced dissociation of peptides. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 1382–1390 (2000).
152. Medzihradszky, K. F. & Burlingame, A. L. The advantages and versatility of a high-energy collision-induced dissociation-based strategy for the sequence and structural determination of proteins. *Methods* vol. 6 284–303 Preprint at <https://doi.org/10.1006/meth.1994.1030> (1994).
153. Cui, W., Thompson, M. S. & Reilly, J. P. Pathways of peptide ion fragmentation induced by vacuum ultraviolet light. *J Am Soc Mass Spectrom* **16**, 1384–1398 (2005).
154. McLuckey, S. A. Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **3**, 599–614 (1992).
155. Mitchell Wells, J. & McLuckey, S. A. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods in Enzymology* **402**, 148–185 (2005).
156. Sleno, L. & Volmer, D. A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **39**, 1091–1112 (2004).
157. Dongré, A. R., Jones, J. L., Somogyi, Á. & Wysocki, V. H. Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model. *J Am Chem Soc* **118**, 8365–8374 (1996).
158. Wysocki, V. H., Tsaprailis, G., Smith, L. L. & Breci, L. A. Mobile and localized protons: A framework for understanding peptide dissociation. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 1399–1406 (2000).

159. Olsen, J. V. *et al.* Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nature Methods* **4**, 709–712 (2007).
160. Payne, A. H. & Glish, G. L. Thermally assisted infrared multiphoton photodissociation in a quadrupole ion trap. *Analytical Chemistry* **73**, 3542–3548 (2001).
161. Brodbelt, J. S. & Wilson, J. J. Infrared multiphoton dissociation in quadrupole ion traps. *Mass Spectrometry Reviews* **28**, 390–424 (2009).
162. Vasicek, L. A., Wilson, J. J. & Brodbelt, J. S. Improved Infrared Multiphoton Dissociation of Peptides through N-Terminal Phosphonite Derivatization. *J Am Soc Mass Spectrom* **20**, 377–384 (2009).
163. Brodbelt, J. S. Photodissociation mass spectrometry: new tools for characterization of biological molecules. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 2757–2783 (2014).
164. Gardner, M. W., Vasicek, L. A., Shabbir, S., Anslyn, E. V. & Brodbelt, J. S. Chromogenic cross-linker for the characterization of protein structure by infrared multiphoton dissociation mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **80**, 4807–4819 (2008).
165. Crowe, M. C. & Brodbelt, J. S. Infrared multiphoton dissociation (IRMPD) and collisionally activated dissociation of peptides in a quadrupole ion trap with selective IRMPD of phosphopeptides. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**, 1581–1592 (2004).
166. Wilson, J. J. & Brodbelt, J. S. Infrared multiphoton dissociation for enhanced de novo sequence interpretation of N-terminal sulfonated peptides in a quadrupole ion trap. *Analytical Chemistry* **78**, 6855–6862 (2006).
167. Flora, J. W. & Muddiman, D. C. Determination of the relative energies of activation for the dissociation of aromatic versus aliphatic phosphopeptides by ESI-FTICR-MS and IRMPD. *J Am Soc Mass Spectrom* **15**, 121–127 (2004).
168. Crowe, M. C. & Brodbelt, J. S. Differentiation of phosphorylated and unphosphorylated peptides by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-infrared multiphoton dissociation in a quadrupole ion trap. *Analytical Chemistry* **77**, 5726–5734 (2005).
169. Goeringer, D. E. & McLuckey, S. A. Evolution of ion internal energy during collisional excitation in the Paul ion trap: A stochastic approach. *Journal of Chemical Physics* **104**, 2214–2221 (1996).
170. Stedwell, C. N., Patrick, A. L., Gulyuz, K. & Polfer, N. C. Screening for phosphorylated and nonphosphorylated peptides by infrared photodissociation spectroscopy. *Analytical Chemistry* **84**, 9907–9912 (2012).
171. Flora, J. W. & Muddiman, D. C. Selective, sensitive, and rapid phosphopeptide identification in enzymatic digests using ESI-FTICR-MS with infrared multiphoton dissociation. *Analytical Chemistry* **73**, 3305–3311 (2001).
172. Pikulski, M., Wilson, J. J., Aguilar, A. & Brodbelt, J. S. Amplification of infrared multiphoton dissociation efficiency in a quadrupole ion trap using IR-active ligands. *Analytical Chemistry* **78**, 8512–8517 (2006).
173. Shaw, J. B., Robinson, E. W. & Paša-Tolić, L. Vacuum Ultraviolet Photodissociation and Fourier Transform–Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) Mass Spectrometry: Revisited. *Analytical Chemistry* **88**, 3019–3023 (2016).
174. Thompson, M. S., Cui, W. & Reilly, J. P. Fragmentation of singly charged peptide ions by photodissociation at $\lambda = 157$ nm. *Angewandte Chemie - International Edition* **43**, 4791–4794 (2004).

175. Morgan, J. W. & Russell, D. H. Comparative Studies of 193-nm Photodissociation and TOF-TOFMS Analysis of Bradykinin Analogues: The Effects of Charge Site(s) and Fragmentation Timescales. *J Am Soc Mass Spectrom* **17**, 721–729 (2006).
176. Robotham, S. A., Kluwe, C., Cannon, J. R., Ellington, A. & Brodbelt, J. S. De novo sequencing of peptides using selective 351 nm ultraviolet photodissociation mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **85**, 9832–9838 (2013).
177. Mistarz, U. H. *et al.* Photodissociation Mass Spectrometry Accurately Localizes Sites of Backbone Deuteration in Peptides. *ChemRxiv* (2017) doi:10.26434/chemrxiv.5594314.
178. Bellina, B. *et al.* UV photodissociation of trapped ions following ion mobility separation in a Q-ToF mass spectrometer. *Analyst* **139**, 6348–6351 (2014).
179. Wilson, J. J. & Brodbelt, J. S. MS/MS simplification by 355 nm ultraviolet photodissociation of chromophore-derivatized peptides in a quadrupole ion trap. *Analytical Chemistry* **79**, 7883–7892 (2007).
180. Rizzo, T. R., Stearns, J. A. & Boyarkin, O. V. Spectroscopic studies of cold, gas-phase biomolecular ions. *International Reviews in Physical Chemistry* **28**, 481–515 (2009).
181. Baer, T. & Dunbar, R. C. Ion Spectroscopy: Where Did It Come From; Where Is It Now; and Where Is It Going? *J Am Soc Mass Spectrom* **21**, 681–693 (2010).
182. Antoine, R. & Dugourd, P. Visible and ultraviolet spectroscopy of gas phase protein ions. *Physical Chemistry Chemical Physics* **13**, 16494–16509 (2011).
183. Doll, S. & Burlingame, A. L. Mass spectrometry-based detection and assignment of protein posttranslational modifications. *ACS Chemical Biology* **10**, 63–71 (2015).
184. Thompson, M. S., Cui, W. & Reilly, J. P. Factors That Impact the Vacuum Ultraviolet Photofragmentation of Peptide Ions. *J Am Soc Mass Spectrom* **18**, 1439–1452 (2007).
185. Parthasarathi, R., He, Y., Reilly, J. P. & Raghavachari, K. New insights into the vacuum UV photodissociation of peptides. *J Am Chem Soc* **132**, 1606–1610 (2010).
186. Quick, M. M., Crittenden, C. M., Rosenberg, J. A. & Brodbelt, J. S. Characterization of Disulfide Linkages in Proteins by 193 nm Ultraviolet Photodissociation (UVPD) Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **90**, 8523–8530 (2018).
187. Shin, Y. S., Moon, J. H. & Kim, M. S. Selective screening of tyrosine-nitrated peptides in tryptic mixtures by in-source photodissociation at 355 nm in matrix-assisted laser desorption ionization. *Analytical Chemistry* **83**, 1704–1708 (2011).
188. Vasicek, L. & Brodbelt, J. S. Enhancement of ultraviolet photodissociation efficiencies through attachment of aromatic chromophores. *Analytical Chemistry* **82**, 9441–9446 (2010).
189. Girod, M. Increasing specificity of tandem mass spectrometry by laser-induced dissociation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **33**, 64–71 (2019).
190. Gardner, M. W. & Brodbelt, J. S. Ultraviolet Photodissociation Mass Spectrometry of Bis-aryl Hydrazone Conjugated Peptides. *Analytical Chemistry* **81**, 4864–4872 (2009).
191. Aponte, J. R. *et al.* Streamlining bottom-up protein identification based on selective ultraviolet photodissociation (UVPD) of chromophore-tagged histidine- and tyrosine-containing peptides. *Analytical Chemistry* **86**, 6237–6244 (2014).
192. O'Brien, J. P., Pruet, J. M. & Brodbelt, J. S. Erratum: Chromogenic chemical probe for protein structural characterization via ultraviolet photodissociation mass spectrometry (*Analytical*

- Chemistry (2013) 85:15 (7391-7397) DOI: 10.1021/ac401305f). *Analytical Chemistry* **85**, 11160 (2013).
193. O'Brien, J. P., Mayberry, L. K., Murphy, P. A., Browning, K. S. & Brodbelt, J. S. Evaluating the conformation and binding interface of cap-binding proteins and complexes via ultraviolet photodissociation mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **12**, 5867–5877 (2013).
194. Cotham, V. C., Wine, Y. & Brodbelt, J. S. Selective 351 nm photodissociation of cysteine-containing peptides for discrimination of antigen-binding regions of IgG fragments in bottom-Up liquid chromatography-tandem mass spectrometry workflows. *Analytical Chemistry* **85**, 5577–5585 (2013).
195. Parker, W. R. & Brodbelt, J. S. Characterization of the Cysteine Content in Proteins Utilizing Cysteine Selenylation with 266 nm Ultraviolet Photodissociation (UVPD). *J Am Soc Mass Spectrom* **27**, 1344–1350 (2016).
196. Parker, W. R., Holden, D. D., Cotham, V. C., Xu, H. & Brodbelt, J. S. Cysteine-Selective Peptide Identification: Selenium-Based Chromophore for Selective S-Se Bond Cleavage with 266 nm Ultraviolet Photodissociation. *Analytical Chemistry* **88**, 7222–7229 (2016).
197. Greer, S. M., Cannon, J. R. & Brodbelt, J. S. Improvement of shotgun proteomics in the negative mode by carbamylation of peptides and ultraviolet photodissociation mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **86**, 12285–12290 (2014).
198. Joo, Y. O. *et al.* Photodissociation tandem mass spectrometry at 266 nm of an aliphatic peptide derivatized with phenyl isothiocyanate and 4-sulfophenyl isothiocyanate. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**, 1283–1288 (2005).
199. Ly, T. & Julian, R. R. Residue-specific radical-directed dissociation of whole proteins in the gas phase. *J Am Chem Soc* **130**, 351–358 (2008).
200. Diedrich, J. K. & Julian, R. R. Facile identification of phosphorylation sites in peptides by radical directed dissociation. *Analytical Chemistry* **83**, 6818–6826 (2011).
201. Diedrich, J. K. & Julian, R. R. Site-specific radical directed dissociation of peptides at phosphorylated residues. *J Am Chem Soc* **130**, 12212–12213 (2008).
202. Sun, Q. & Julian, R. R. Probing sites of histidine phosphorylation with iodination and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **25**, 2240–2246 (2011).
203. Tao, Y., Quebbemann, N. R. & Julian, R. R. Discriminating d-amino acid-containing peptide epimers by radical-directed dissociation mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **84**, 6814–6820 (2012).
204. Madsen, J. A. *et al.* High-throughput database search and large-scale negative polarity liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ultraviolet photodissociation for complex proteomic samples. *Molecular and Cellular Proteomics* **12**, 2604–2614 (2013).
205. Madsen, J. A., Kaoud, T. S., Dalby, K. N. & Brodbelt, J. S. 193-nm photodissociation of singly and multiply charged peptide anions for acidic proteome characterization. *PROTEOMICS* **11**, 1329–1334 (2011).
206. Greer, S. M., Bern, M., Becker, C. & Brodbelt, J. S. Extending Proteome Coverage by Combining MS/MS Methods and a Modified Bioinformatics Platform Adapted for Database Searching of Positive and Negative Polarity 193 nm Ultraviolet Photodissociation Mass Spectra. *Journal of Proteome Research* **17**, 1340–1347 (2018).

207. Zhang, L. & Reilly, J. P. De novo sequencing of tryptic peptides derived from deinococcus radiodurans ribosomal proteins using 157 nm photodissociation MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* **9**, 3025–3034 (2010).
208. Zhang, L. & Reilly, J. P. Peptide de novo sequencing using 157 nm photodissociation in a tandem time-of-flight mass spectrometer. *Analytical Chemistry* **82**, 898–908 (2010).
209. Kreuzer, K. A. *et al.* Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(4'-dimethylaminophenylazo)bezoic acid as a dark quencher dye. *Clinical Chemistry* **47**, 486–490 (2001).
210. Garcia Leny. Développement d'une méthodologie couplant la photodissociation laser et la spectrométrie de masse haute résolution pour l'identification de nouveaux biomarqueurs. (2018).
211. Garcia, L., Lemoine, J., Dugourd, P. & Girod, M. Fragmentation patterns of chromophore-tagged peptides in visible laser induced dissociation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **31**, 1985–1992 (2017).
212. Garcia, L. *et al.* Data-Independent Acquisition Coupled to Visible Laser-Induced Dissociation at 473 nm (DIA-LID) for Peptide-Centric Specific Analysis of Cysteine-Containing Peptide Subset. *Analytical Chemistry* **90**, 3928–3935 (2018).
213. Enjalbert, Q. *et al.* Combined collision-induced dissociation and photo-selected reaction monitoring mass spectrometry modes for simultaneous analysis of coagulation factors and estrogens. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **4**, 183–189 (2014).
214. Daly, S. *et al.* Action-FRET of a Gaseous Protein. *J Am Soc Mass Spectrom* **28**, 38–49 (2017).
215. Daly, S. *et al.* Action-FRET: Probing the molecular conformation of mass-selected gas-phase peptides with förster resonance energy transfer detected by acceptor-specific fragmentation. *Analytical Chemistry* **86**, 8798–8804 (2014).
216. Zubarev, R. A. *et al.* Electron Capture Dissociation for Structural Characterization of Multiply Charged Protein Cations than the conventional MS / MS methods (e . g . , collisionally. *Anal Chem* **72**, 563–573 (2000).
217. Syka, J. E. P., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J. & Hunt, D. F. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9528–9533 (2004).
218. Zubarev, R. A., Haselmann, K. F., Budnik, B., Kjeldsen, F. & Jensen, F. Towards an understanding of the mechanism of electron-capture dissociation: A historical perspective and modern ideas. *European Journal of Mass Spectrometry* **8**, 337–349 (2002).
219. Zubarev, R. A. Reactions of polypeptide ions with electrons in the gas phase. *Mass Spectrometry Reviews* **22**, 57–77 (2003).
220. Kim, M.-S. & Pandey, A. Electron transfer dissociation mass spectrometry in proteomics. *PROTEOMICS* **12**, 530–542 (2012).
221. Budnik, B. A., Haselmann, K. F. & Zubarev, R. A. Electron detachment dissociation of peptide dianions: An electron-hole recombination phenomenon. *Chemical Physics Letters* **342**, 299–302 (2001).
222. Rumachik, N. G. *et al.* Characterizing peptide neutral losses induced by negative electron-transfer dissociation (NETD). *J Am Soc Mass Spectrom* **23**, 718–727 (2012).

223. Coon, J. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Syka, J. E. P. Electron transfer dissociation of peptide anions. *J Am Soc Mass Spectrom* **16**, 880–882 (2005).
224. Huzarska, M. *et al.* Negative electron transfer dissociation of deprotonated phosphopeptide anions: choice of radical cation reagent and competition between electron and proton transfer. *Analytical Chemistry* **82**, 2873–2878 (2010).
225. Hersberger, K. E. & Håkansson, K. Characterization of O-sulfopeptides by negative ion mode tandem mass spectrometry: Superior performance of negative ion electron capture dissociation. *Analytical Chemistry* **84**, 6370–6377 (2012).
226. Yoo, H. J., Wang, N., Zhuang, S., Song, H. & Håkansson, K. Negative-ion electron capture dissociation: Radical-driven fragmentation of charge-increased gaseous peptide anions. *J Am Chem Soc* **133**, 16790–16793 (2011).
227. Hashimoto, Y., Hasegawa, H., Yoshinari, K. & Waki, I. Collision-activated infrared multiphoton dissociation in a quadrupole ion trap mass spectrometer. *Analytical Chemistry* **75**, 420–425 (2003).
228. Antoine, R., Lemoine, J. & Dugourd, P. Electron photodetachment dissociation for structural characterization of synthetic and bio-polymer anions. *Mass Spectrometry Reviews* **33**, 501–522 (2014).
229. Halim, M. A. *et al.* 213 nm Ultraviolet Photodissociation on Peptide Anions: Radical-Directed Fragmentation Patterns. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* vol. 27 (2016).
230. Håkansson, K. *et al.* Combined electron capture and infrared multiphoton dissociation for multistage MS/MS in a Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer. *Analytical Chemistry* **75**, 3256–3262 (2003).
231. Tsybin, Y. O., Witt, M., Baykut, G., Kjeldsen, F. & Håkansson, P. Combined infrared multiphoton dissociation and electron capture dissociation with a hollow electron beam in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**, 1759–1768 (2003).
232. Shaw, J. B. *et al.* Sequencing Grade Tandem Mass Spectrometry for Top-Down Proteomics Using Hybrid Electron Capture Dissociation Methods in a Benchtop Orbitrap Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **90**, 10819–10827 (2018).
233. Madsen, J. A. *et al.* Charge-Site-Dependent Dissociation of Hydrogen-Rich Radical Peptide Cations upon Vacuum UV Photoexcitation. *Chemistry - A European Journal* **18**, 5374–5383 (2012).
234. Cannon, J. R., Holden, D. D. & Brodbelt, J. S. Hybridizing ultraviolet photodissociation with electron transfer dissociation for intact protein characterization. *Analytical Chemistry* **86**, 10970–10977 (2014).
235. Bonner, J., Lyon, Y. A., Nellesen, C. & Julian, R. R. Photoelectron Transfer Dissociation Reveals Surprising Favorability of Zwitterionic States in Large Gaseous Peptides and Proteins. *J Am Chem Soc* **139**, 10286–10293 (2017).
236. Shliaha, P. V. *et al.* Maximizing Sequence Coverage in Top-Down Proteomics by Automated Multimodal Gas-Phase Protein Fragmentation. *Analytical Chemistry* **90**, 12519–12526 (2018).
237. Chirio-Lebrun, M. C. & Prats, M. Fluorescence resonance energy transfer (FRET): Theory and experiments. *Biochemical Education* **26**, 320–323 (1998).

238. Clegg, R. M. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods in Enzymology* **211**, 353–388 (1992).
239. Guillaubez, J. V., Pitrat, D., Bretonnière, Y., Lemoine, J. & Girod, M. Unbiased Detection of Cysteine Sulfenic Acid by 473 nm Photodissociation Mass Spectrometry: Toward Facile in Vivo Oxidative Status of Plasma Proteins. *Analytical Chemistry* **93**, 2907–2915 (2021).
240. Prell, J. S., O'Brien, J. T. & Williams, E. R. IRPD Spectroscopy and Ensemble Measurements: Effects of Different Data Acquisition and Analysis Methods. *J Am Soc Mass Spectrom* **21**, 800–809 (2010).
241. PubChem. Methanol. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/methanol#section=Vapor-Pressure>.
242. PubChem. Acetonitrile.
243. PubChem. Dimethyl Sulfoxide. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dimethyl-sulfoxide#section=Vapor-Pressure>.
244. Hortin, G. L., Sviridov, D. & Anderson, N. L. High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the top 4 logs of polypeptide abundance. *Clinical Chemistry* **54**, 1608–1616 (2008).
245. Baker, P.R. Clauser, K. R. Protein Prospector. <http://prospector.ucsf.edu>.
246. Sirotkin, V. A. & Kuchierskaya, A. A. α -chymotrypsin in water–acetone and water–dimethyl sulfoxide mixtures: Effect of preferential solvation and hydration. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **85**, 1808–1819 (2017).
247. Abe, E., Delyle, S. G. & Alvarez, J. C. Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés. *Annales de Toxicologie Analytique* **22**, 51–59 (2010).
248. Gabay, C. & Kushner, I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *New England Journal of Medicine* **340**, 448–454 (1999).
249. Sandford, A. J., Chagani, T., Weir, T. D. & Paré, P. D. A1-Antichymotrypsin Mutations in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Disease Markers* **13**, 257–260 (1998).
250. Kalsheker, N., Morgan, K. & Chappell, S. Proteinase Inhibitors: Antichymotrypsin. *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Four-Volume Set* 507–511 (2006) doi:10.1016/B0-12-370879-6/00327-6.
251. Padmanabhan, J., Levy, M., Dickson, D. W. & Potter, H. Alpha1-antichymotrypsin, an inflammatory protein overexpressed in Alzheimer's disease brain, induces tau phosphorylation in neurons. *Brain* **129**, 3020–3034 (2006).
252. Shu, T. *et al.* Plasma Proteomics Identify Biomarkers and Pathogenesis of COVID-19. *Immunity* **53**, 1108-1122.e5 (2020).
253. Shen, B. *et al.* Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell* **182**, 59-72.e15 (2020).
254. Di, B. *et al.* Identification and validation of predictive factors for progression to severe COVID-19 pneumonia by proteomics. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **5**, (2020).
255. Murphy, P. M. Chemokines and chemokine receptors. in *Clinical Immunology* 173–196 (Elsevier Ltd, 2008). doi:10.1016/B978-0-323-04404-2.10011-9.
256. Yoshie, O. [Chemokines and chemokine receptors]. *Nihon Rinsho* **70 Suppl 8**, 212–217 (2012).

257. Peptide Atlas - Alzheimer's Disease. [https://db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/showPathways?apply_action=pathway_details;path_id=path:hsa05010;path_def=Alzheimer%20disease%20-%20Homo%20sapiens%20\(human\);searchdb=pa](https://db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/showPathways?apply_action=pathway_details;path_id=path:hsa05010;path_def=Alzheimer%20disease%20-%20Homo%20sapiens%20(human);searchdb=pa).
258. Bateman, A. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research* **47**, D506–D515 (2019).
259. Henson, R. N. Analysis of Variance (ANOVA). *Brain Mapping: An Encyclopedic Reference* **1**, 477–481 (2015).
260. Sthle, L. & Wold, S. Analysis of variance (ANOVA). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **6**, 259–272 (1989).
261. Landi, C. *et al.* Ceruloplasmin and oxidative stress in severe eosinophilic asthma patients treated with Mepolizumab and Benralizumab. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1869**, 140563 (2021).
262. Healy, J. & Tipton, K. Ceruloplasmin and what it might do. *Journal of Neural Transmission* **114**, 777–781 (2007).
263. Hackler, J. *et al.* Relation of serum copper status to survival in covid-19. *Nutrients* **13**, (2021).
264. Violi, F. *et al.* Is Albumin Predictor of Mortality in COVID-19? *Antioxidants and Redox Signaling* **35**, 139–142 (2021).
265. Bojkova, D. *et al.* Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets. *Nature* **583**, 469–472 (2020).
266. Kebarle, P. & Verkerk, U. H. Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrometry Reviews* **28**, 898–917 (2009).
267. Cohen, A. Erratum: Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI and commonly used mass analyzers (Applied Spectroscopy Reviews vol. 44 (3) (210)). *Applied Spectroscopy Reviews* **44**, 362 (2009).
268. Wilm, M. & Mann, M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Analytical Chemistry* **68**, 1–8 (1996).
269. Wilm, M. *et al.* Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nanoelectrospray mass spectrometry. *Nature* vol. 379 466–469 Preprint at <https://doi.org/10.1038/379466a0> (1996).
270. Emmett, M. R. & Caprioli, R. M. Ultra-High-Sensitivity Analysis of Peptides and Proteins. 0–8 (1994).
271. Sage, E. New concept of mass spectrometer based on arrays of resonating nanostructures. (2013).
272. SRMATlas. SRM/MRM assays for targeted proteomic analysis.
273. Lund University. Mass spectrometry-based multiplex protein quantification platforms. <https://bme.lth.se/research-pages/clinical-protein-science-and-imaging/research/mass-spectrometry-based-multiplex-protein-quantification-platforms/>.
274. Sandoval, M. A. R. Extraction of Phorbol Esters (PEs) from Pinion cake using computationally-designed polymers as adsorbents for Solid Phase Extraction. *ResearchGate* 1–50 (2017).

275. Snow Thomas. The environmental, elemental and proteomic plasticity of *Trichodesmium* in the (sub) tropical atlantic. (2014).

Annexe I

Techniques d'ionisation

Cette désolvatation est réalisée en générant un fort champ électrique obtenu en appliquant une différence de potentiel de 3 à 6 kV (dépendant de la surface de tension du solvant utilisé)²⁶³ entre le capillaire et une contre électrode, séparés par 0,3 à 2 cm. Un tel champ induit une accumulation de charges à la surface du liquide à l'extrémité du capillaire, entraînant la formation d'un cône de Taylor duquel est expulsé en un nuage de gouttelettes. Le solvant restant dans les gouttelettes est évaporé en les faisant traverser un gaz chauffé (N₂) ou par chauffage du capillaire, générant des gouttelettes de plus en plus petites mais de plus en plus chargées, jusqu'à ce qu'il ne reste plus de solvant (ionisation des protéines) ou que le champ électrique de surface induise la désorption des ions (ionisation des peptides). Les ions ainsi formés sont entraînés jusqu'au spectromètre de masse.^{128,129,266,267}

L'ESI génère des ions multichargés depuis des molécules larges intactes, ce qui permet leur détection dans une gamme de masse plus restreinte (le ratio m/z diminuant avec l'augmentation de la charge), améliorant la sensibilité de l'analyse. Cependant, la charge détectée en MS n'est pas équivalente à celle de l'analyte en solution. Ainsi les ions négatifs et positifs peuvent être observés même si le pH de la solution analysée ne semble pas adapté, pouvant parfois améliorer le ratio S/B de l'analyse en favorisant les réactions d'oxydation (peptides positifs) et de réduction (peptides négatifs) ayant lieu à la pointe du capillaire.

L'ionisation par électrospray est compatible avec des débits de solution allant de 1 à 1000 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, mais une perte de sensibilité est généralement observée au-delà de 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Un débit réduit permet de limiter le nombre d'interférents matriciels ionisés simultanément à l'échantillon (autres analytes plus facilement ionisables, tampons ...). Des sources micro-ESI et nano-ESI ont ainsi été mises au point, employant des débits descendant jusqu'à la dizaine de nanolitres par minute.^{128,129,268,269,270}

Pour garantir une ionisation optimale, le spray généré doit être stable : le solvant doit contenir un minimum d'électrolytes (que contiennent les solvants classiques), préférentiellement volatiles pour

éviter une suppression d'ions (mauvaise évaporation) et une contamination de la source. L'emploi d'un gaz injecté coaxialement au capillaire à un faible débit permet de limiter la dispersion du spray et donc d'améliorer sa stabilité.¹²⁹

L'échantillon doit également être relativement pur pour éviter la compétition à l'ionisation entre les interférents matriciels et les analytes d'intérêt, en particulier les sels qui rendent impossible l'ionisation des analytes les moins concentrés. L'utilisation de techniques SPE/LLE ou d'une séparation chromatographique préalable permettant une purification et une concentration de l'analyte peuvent être envisagées.

La matrice MALDI est formée par le dépôt, sur une plaque, de gouttes d'un mélange analytes/matrice qui seront ensuite séchées. Les ions formés après désorption et ionisation sont acheminés vers le spectromètre de masse pour y être analysés.¹²⁹

Analyseurs

Quadrupôles

L'analyseur quadripolaire est constitué de quatre barreaux métalliques parallèles reliés à un générateur de radiofréquence ($V \cos \omega t$; avec V l'amplitude de la tension alternative (V), ω la fréquence angulaire ($\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) correspondant à $2\pi\nu$, ν la fréquence du champ RF (Hz)) et un générateur de courant continu (de tension U (V)), de telle manière que les barreaux opposés soient à un potentiel de même signe électrique : $\pm \Phi_0 = \pm (U - V \cos \omega t)$ ([Figure 94](#)).

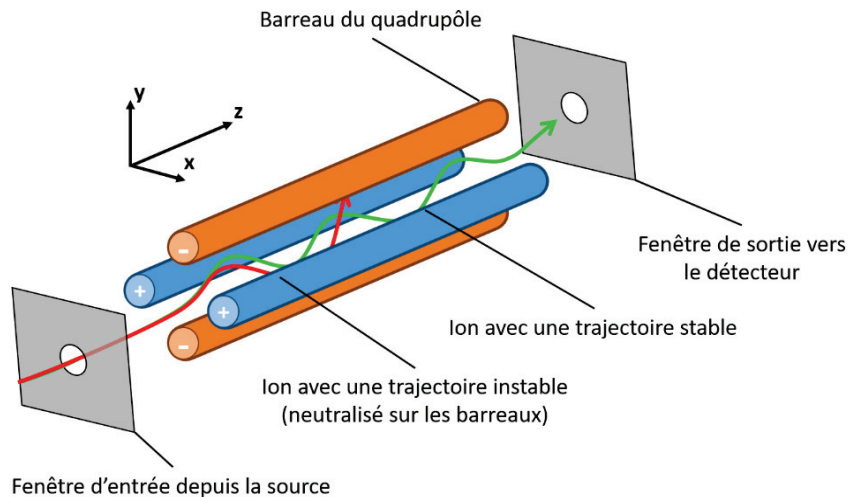


Figure 94: Illustration des trajectoires des ions (stable en vert, instable en rouge) au sein d'un quadripôle

Les ions sont extraits de la source d'ionisation et propulsés dans l'analyseur par application d'une tension d'accélération (selon l'axe z), mais sont soumis, suivant les axes x et y, aux accélérations résultant des forces dues aux champs électriques suivants :

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \frac{2ze}{mr_0^2} (U - V \cos \omega t) x = 0$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} + \frac{2ze}{mr_0^2} (U - V \cos \omega t) y = 0$$

Où les axes x et y représentent la position de l'ion entre les barreaux, ze sa charge, m sa masse et $2r_0$ la distance entre les barreaux opposés.

L'intégration de ces équations permet de corréler la position x,y de l'ion en fonction du temps t pour une radiofréquence ω donnée (la position selon l'axe z étant uniquement déterminée par l'accélération des ions dans l'analyseur). On obtient ainsi, pour un rapport m/z donné, des aires de stabilité de sa trajectoire oscillante dans le quadripôle sans qu'il n'heurte l'un des barreaux et ne se décharge.¹³⁰

Un spectre de masse peut être acquis en maintenant U et V constants et en faisant varier ω pour que tous les ions puissent être détectés, ou en maintenant la radiofréquence ω constante et en faisant varier le rapport U/V (méthode la plus implantée dans les logiciels pilotant le quadripôle). Ainsi, il est possible de « filtrer » les ions en appliquant aux barreaux les rapports U/V correspondant aux rapports m/z des ions que l'on souhaite observer, ou d'effectuer un balayage en variant graduellement le

rapport U/V , laissant passer un à un tous les ions d'une plage de m/z définie. L'analyseur étant court (une vingtaine de centimètres) et la production de radiofréquences stable, le balayage effectué est suffisamment rapide pour que le quadripôle soit compatible avec des sources de production continue d'ions.¹³⁰

Cas spécial, le LIT (Linear Ion Trap) est un quadripôle auquel deux portails électrostatiques ont été ajoutés aux extrémités, y confinant les ions. Cette fois-ci, le mouvement des ions selon l'axe z n'est plus uniquement soumis à la tension d'entrée depuis la source (V_s), mais dépend des portails dont le potentiel est le même que celui des ions, la répulsion de charge leur imprimant une oscillation en « aller-retour » le long de la trappe. De même, un gaz inerte (He ou N_2) est injecté dans la cellule LIT pour refroidir les ions. Ces derniers peuvent être éjectés de manière axiale et radiale, permettant de combiner différents détecteurs. Les pièges à ion ouvrent à la MS/MS (ou MS^2), analyse où le précurseur est filtré, fragmenté et ses fragments analysés.

Piège à ion orbital

L'Orbitrap est constitué de deux électrodes coaxiales, une interne (en fuseau), l'autre externe ([Figure 95](#)). Le volume interne formant un cylindre est réparti en deux axes, l'axe r qui caractérise la position radiale entre les électrodes interne et externe, et l'axe z qui caractérise la position longitudinale selon l'axe du cylindre.

Les ions sont introduits avec une forte accélération par une fente excentrée (position $z > 0$), selon une direction normale au plan r, z . L'électrode centrale est placée à un fort potentiel (de signe opposé à la charge des ions) pour dévier les ions et les forcer à adopter une trajectoire orbitale circulaire autour de l'électrode. Grâce à la fente excentrée, les ions oscillent sur l'axe z autour de leur position d'équilibre de façon pendulaire, donc la fréquence d'oscillation est proportionnelle à l'inverse de leur rapport m/z . De même que pour le FTICR, l'oscillation sur l'axe z des ions induit un courant dans l'électrode externe, qui est enregistré, traité par transformée de Fourier puis transformé en spectre de masse.

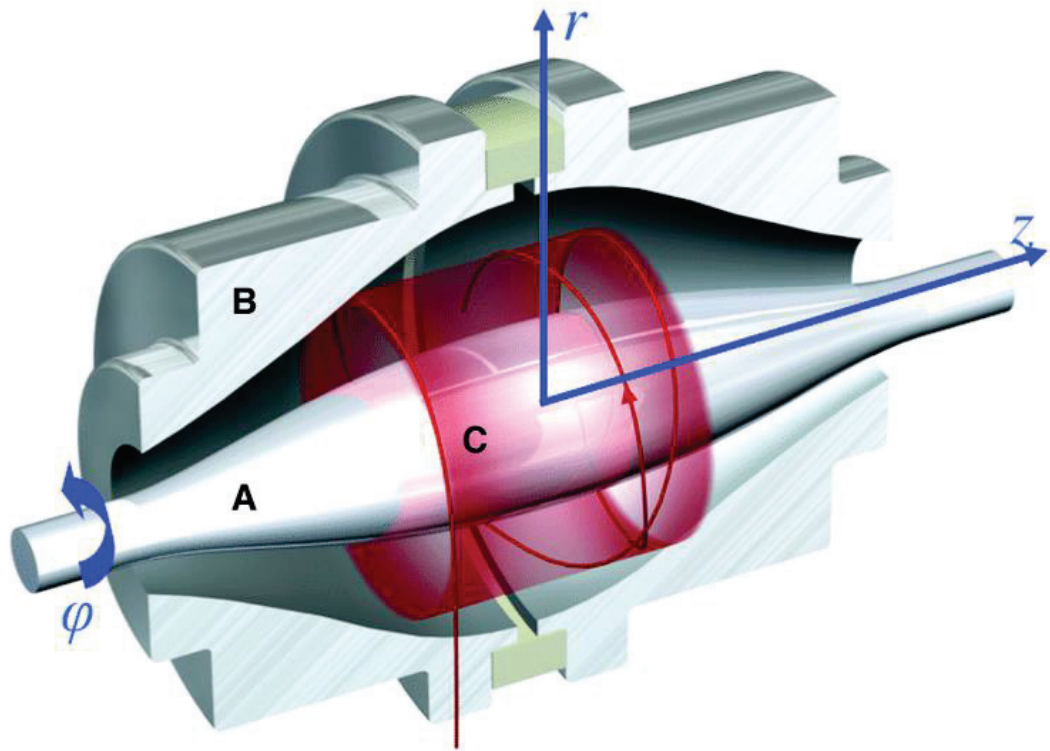


Figure 95: Fonctionnement d'un analyseur Orbitrap : A - électrode interne, B - électrode externe, C - trajectoire orbitale de l'ion.²⁷⁵

Pour maintenir les ions dans une trajectoire stabilisée, les deux électrodes sont ramenées à un potentiel constant de même signe que les ions.

L'analyseur Orbitrap est souvent conjugué à une trappe à ion en amont (à l'instar de la C-trap du Qexactive), permettant d'accumuler et d'injecter des ions de façon groupée, ce qui réduit les perturbations liées à une population hétérogène désordonnée et améliore le signal du courant d'ion enregistré, les ions groupés délimitant clairement le signal dans le temps tout en l'intensifiant.

L'Orbitrap possède un haut pouvoir résolutif (140 000 à 200 m/z), inversement proportionnel à $\sqrt{m/z}$, toutefois, plus la résolution du spectre est haute, plus son acquisition est longue (i.e 64 ms pour un spectre de $R=17500$ contre 512 ms pour un spectre de $R=140000$).

Annexe II

Nom	m/z	z	Début (min)	Fin (min)
Dabcyyl cyclohexanedione	422.2074	1	40	50
[HSA] ALVLIAFAQYLQQC ³⁴ PFEDHVK	713.8675	4	37.5	41.5
[HSA] LC ⁷⁵ TVATLR	432.5654	3	26	29
[HSA] NEC ¹⁰¹ FLQHK	479.8922	3	23	27
[HSA] LVRPEVDVMC ¹²⁴ TAFHDNEETFLK	753.8622	4	24.5	27.5
[HSA] AAC ¹⁷⁷ LLPK	378.8721	3	30	33
* [HSA] C ²⁰⁰ ASLQK	333.1680	2	5	50
[HSA] YIC ²⁶⁵ ENQDSISSK	602.6065	3	20	23
* [HSA] SHC ²⁸⁹ IAEVENDEMPADLPSLAADFVGSK	653.7031	5	5	50
* [HSA] DVC ³¹⁶ K	442.2046	2	5	50
[HSA] QNC ³⁹² ELFEQLGEYK	673.9767	3	28.5	31.5
[HSA] RPC ⁴⁸⁷ FSALEVDETYVPK	618.6416	3	14.5	18.5
[HSA] EFNAETFTFHADIC ⁵¹⁴ TLSEK	656.3019	4	25.5	28.5
[HSA] ETC ⁵⁶⁷ FAEEGK	478.2078	3	22.5	25.5
[TrH] WC ⁹ AVSEHEATK	420.6935	4	21	24
[TrH] C ¹⁹ QSFR	530.2395	2	20	24
[TrH] SVIPSDGSPVAC ³⁹ VK	593.2992	3	22.5	25.5
[TrH] ASYLDC ⁴⁸ IR	453.8849	3	26.85	29.5
[TrH] SC ¹¹⁸ HTGLGR / SC ⁴⁵⁰ HTAVGR	417.1976	3	14	18.5
[TrH] SAGWNIPIGLLYC ¹³⁷ DLPEPR	634.0701	4	35	37.5
[TrH] DQYELLC ²²⁷ LDNTR	634.6295	3	28.5	31.5
[TrH] DC ²⁴¹ HLAQVPSHTVVAR	513.7585	4	16	18.8
[TrH] WC ³⁴⁵ ALSHHER	390.1819	4	17.5	21.5
* [TrH] C ³⁵⁵ DEWSVNSVGK	548.2451	3	5	50
* [TrH] C ⁴⁰² GLVPVLAENYK	613.6430	3	5	50
* [TrH] SDNC ⁴¹⁸ EDTPGAGYFAVAVVK	591.2729	4	5	50
[TrH] INHC ⁴⁷⁴ R	354.5044	3	13	16
[TrH] FDEFFSAGC ⁴⁸⁴ APGSK	647.2784	3	26	29
[TrH] DSSLC ⁴⁹⁵ K	536.2444	2	23	25
* [TrH] C ⁵²³ LVEK	337.5054	3	5	50
[TrH] DYELLC ⁵⁶³ LDGTR	572.9361	3	31	34
[TrH] KPVEEYANC ⁵⁷⁷ HLAR	487.9898	4	13	16
[TrH] EAC ⁵⁹⁶ VHK	369.1760	3	14.3	17
[TrH] DDTVC ⁶³⁷ LAK	428.5374	3	25	28.5

Tableau 7: Liste des transitions PRM des 33 peptides à cystéine SOH dérivée de la HSA et la TrH suivis. Pour chaque peptide, le numéro correspondant à la position de la cystéine dans la séquence peptidique est indiqué en exposant.

Nom	m/z	z	Début (min)	Fin (min)
[HSA] ALVLIAFAQYLQQC ⁺ FEDHVK	713.8675	4	37.5	41.5
[HSA] L ⁺ CTVATLR	432.5654	3	26	29
[HSA] NE ⁺ CFLQHK	479.8922	3	23	27
[HSA] LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK	753.8622	4	24.5	27.5
[HSA] AA ⁺ CLLPK	378.8721	3	30	33
[HSA] YI ⁺ CENQDSISSK	602.6065	3	20	23
[HSA] QN ⁺ C ⁺ ELFEQLGEYK	673.9767	3	28.5	31.5
[HSA] RPCFSALEVEDETYVPK	618.6416	3	14.5	18.5
[HSA] EFNAETFTFHADI ⁺ CTLSEK	656.3019	4	25.5	28.5
[HSA] ETC ⁺ FAEEGK	478.2078	3	22.5	25.5
[TrH] WC ⁺ AVSEHEATK	420.6935	4	21	24
[TrH] C ⁺ QSFR	530.2395	2	20	24
[TrH] SVIPSDGSPVAC ⁺ VK	593.2992	3	22.5	25.5
[TrH] ASYLD ⁺ CIR	453.8849	3	26.85	29.5
[TrH] S ⁺ CHTGLGR / S ⁺ CHTAVGR	417.1976	3	14	18.5
[TrH] SAGWNIPIGLLY ⁺ CDLPEPR	634.0701	4	35	37.5
[TrH] DQYELL ⁺ CLDNTR	634.6295	3	28.5	31.5
[TrH] D ⁺ CHLAQVPSHTVVAR	513.7585	4	16	18.8
[TrH] WC ⁺ ALSHHER	390.1819	4	17.5	21.5
[TrH] INH ⁺ CR	354.5044	3	13	16
[TrH] FDEFFSAG ⁺ CAPGSK	647.2784	3	26	29
[TrH] DSSL ⁺ CK	536.2444	2	23	25
[TrH] DYELL ⁺ CLDGTR	572.9361	3	31	34
[TrH] KPVEEYAN ⁺ CHLAR	487.9898	4	13	16
[TrH] EAC ⁺ VHK	369.1760	3	14.3	17
[TrH] DDTV ⁺ CLAK	428.5374	3	25	28.5
* [A2MG] GC ⁺ VLLSYLNETVTVSASLESVR	920.47020	3	0	50
* [A2MG] SLFTDLEAENDVLH ⁺ C ⁺ VAFVAVPK	946.46670	3	0	50
* [A2MG] IITILEEEMNVSVC ⁺ GLYTYGKPVPGHVTVSIC ⁺ R	892.65010	5	0	50
* [A2MG] YSDASD ⁺ CHGEDSQAF ⁺ CEK	708.28230	4	0	50
* [A2MG] FSGQLNSHG ⁺ CFYQQVK	754.68610	3	0	50
* [A2MG] SPC ⁺ YGYQWVSEEHEEAHHTAYLVFSPSK	925.91740	4	0	50
* [A2MG] SFVHLEPMSHELPC ⁺ GHTQTVQAHYILNGGTLGLK	850.22990	5	0	50
[A2MG] YDVEN ⁺ CLANK	529.90980	3	21	27
[A2MG] VTAAPQSV ⁺ CALR	545.61680	3	22	28
* [A2MG] DLTGFPGPLNDQDNED ⁺ CINR	663.79720	4	0	50
[A2MG] M ⁺ CPQLQQYEMHGPEGLR	812.70260	3	17	23
[A2MG] AGAF ⁺ CLSEDAGLISSTASLR	815.73	3	28	34
* [A2MG] SLGNVNFTVSAEALESQEL ⁺ CGTEVPSVPEHGR	755.96400	5	0	50
[A2MG] ETTFNSLL ⁺ CPSGGEVSEELSLK	920.44220	3	29	35
* [A2MG] DNG ⁺ CFR	377.49560	3	0	50
* [A2MG] NALF ⁺ CLSAWK	567.60960	3	0	50

[A2MG] VTGEGCVYLQTSLK	639.65360	3	23	29
* [A2MG] EEFPFALGVQTLPQTCDDEPK	667.82140	4	0	50
[A2MG] VYDYYETDEFAIAEYNAPCSK	728.31770	4	24	30
[CO3] DSCVGSLLVVK	475.90760	3	24	30
[CO3] ADIGCTPGSGK	475.55530	3	17	24
* [CO3] AELQCPQPAAR	534.92930	3	0	50
* [CO3] FSCQR	530.23950	3	0	50
* [CO3] FISLGEACK	462.89690	3	0	50
* [CO3] GICVADPFVETVMQDFFIDLR	709.34470	4	0	50
* [CO3] VELLHNPAFCSLATTK	721.70300	3	0	50
* [CO3] HLIVTPSGCGEQNMIGMTPTVIAVHYLDETEQWEK	870.01800	5	0	50
* [CO3] VFSLAVNLIAIDSQVLCGAVK	860.46960	3	0	50
[CO3] DICEEQVNSLPGSITK	718.01370	3	20	27
* [CO3] DQLTCNK	414.19370	3	0	50
[CO3] NTMILEICTR	538.26690	3	27	33
* [CO3] VSHSEDDCLAFK	590.59950	3	0	50
[CO3] VYAYYNLEESCTR	677.30490	3	22	28
* [CO3] DELCR	527.73680	3	0	50
* [CO3] CAEENCFIQK	506.47460	4	0	50
[CO3] ACEPGVDVYVK	554.92180	3	19	25
* [CO3] DTWVEHWPEEDECCQDEENQK	742.05280	4	0	50
* [CO3] QCQDLGAFTESMVFVGCPCN	617.02070	4	0	50
* [FIBB] HLLLLLVCVFLVK	648.39120	3	0	50
* [FIBB] APDAGGCLHADPDLGLVLCPTGCVLQEQEALLQQERPIR	1009.28790	5	0	50
[FIBB] LESDVSAQMEYCR	650.61850	3	20	26
* [FIBB] TPCTVSCNIPVVSGK	586.53520	4	0	50
[FIBB] ECEIIR	655.80790	2	19	25
[FIBB] VYCDMNTENGGWTVIQNR	840.37550	3	22	28
[FIBB] NYCGLPGEYWLGNDK	716.65590	3	26	32
* [FIBB] CHAANPNGR	453.54010	3	0	50
* [CO4A] NNVP CSPK	426.53760	3	0	50
* [CO4A] SCGLHQLLR	482.58350	3	0	50
* [CO4A] VDVQAGACEGK	499.23440	3	0	50
* [CO4A] VFEAMNSYDLGCGPGGGDSALQVFQAAGLAFSDGDQWTLR	932.22730	5	0	50
* [CO4A] LSCPK	322.83000	3	0	50
[CO4A] SCEQR	347.82010	3	14	20
* [CO4A] VQQPDCR	422.19750	3	0	50
* [CO4A] GLCVATPVQLR	525.94990	3	0	50
* [CO4A] GCGEQTMIIYLAPTLAASR	767.70630	3	0	50
* [CO4A] LQETSNWLLSQQADGSFQDPCPVLDLDR	874.41350	4	0	50
* [CO4A] NTTCDLQIEVTVK	670.99960	3	0	50
* [CO4A] VHYTEVCIWR	532.59910	3	0	50
* [CO4A] ECVGFQAVQEVVGLVQVPASATLYDYNNPER	773.37200	5	0	50
* [CO4A] CSVFYGAPSK	493.23220	3	0	50
* [CO4A] LLATLCSAEVCQCAEGK	645.05200	4	0	50

[CO4A] FACYYPR	446.87070	3	24	30
* [CO4A] ASCR	428.19450	2	0	50
* [CO4A] AACQLNDFLQEYGTQGCQV	749.58210	4	0	50
* [FINC] GPGPGLLLLAVQCLGTAVPSTGASK	682.37010	4	0	50
* [FINC] QAQQMVQPQSPVAVSQSKPGCYDNGK	799.38130	4	0	50
* [FINC] GFNCESKPEAEETCFDK	693.79630	4	0	50
[FINC] ISCTIANR	432.88500	3	20	27
* [FINC] CHEGGQSYK	476.53980	3	0	50
* [FINC] GEWTCKPIAEK	560.94120	3	0	50
* [FINC] CFDHAAGTSYVVGETWEKPYQGWMMVDCTCLGEGSGR	982.62510	5	0	50
* [FINC] ITCTSR	550.26570	2	0	50
* [FINC] CNDQDTR	424.17680	3	0	50
* [FINC] AAVYQPQPHQPQPPYGHCVTDSGVVYVSGMQWLK	832.00350	5	0	50
* [FINC] QMLCTCLNGVSCQETAVTQTYGGNSNGEPCVLPFTYNGR	1094.88760	5	0	50
[FINC] TFYSCTEGR	528.56600	3	32	36
* [FINC] QDGHLCSTTSNYEQDQK	640.52750	4	0	50
* [FINC] YSFCTDHTVLVQTR	696.99980	3	0	50
* [FINC] GGNSNGALCHFPFLYNNHNYTDCTSEGR	786.14080	5	0	50
* [FINC] WCGTTQNYDADQK	650.27720	3	0	50
* [FINC] FGFCPMAAHEEICTTNEGVMYR	669.69280	5	0	50
[FINC] GEWTCAYSQLR	615.95910	3	35	39
* [FINC] DQCIVDDITYNVNDTFHK	640.54290	4	0	50
* [FINC] CDPVDQCQDSETGTFYQIGDSWEK	718.70330	5	0	50
* [FINC] GIGEWHCQPLQTYPSSSGPVEVFITETPSQPNSHPIQWNAPQPSHISK	1143.35140	5	0	50
* [FINC] ITTPTNGQQGNSLEEVVHADQSSCTFDNLSPGLEYNVSVYTVK	1033.29010	5	0	50

Tableau 8: Transitions PRM des 117 peptides à cystéines SOH dérivées issues des protéines HSA, TrH, CO4a, CO3, A2MG, FIBB et FINC suivies lors de l'analyse des échantillons de plasma. L'astérisque représente les peptides qui n'ont pas été détectés ni en HCD ni en LID.

m/z	z	Nom	Protéine	Quantification relative entre les échantillons*					
				0154	0832	S428	0127	0185	0584
713.8675	4	ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK	Human Serum	1.00	0.06	0.67	0.46	0.80	0.48
432.5654	3	LCTVATLR	Albumin [HSA]	0.93	0.46	1.00	0.29	0.47	0.27
479.8922	3	NECFLQHK		0.92	0.56	1.00	0.49	0.60	0.50
753.8622	4	LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK		1.00	0.42	0.88	0.35	0.63	0.44
378.8721	3	AACLLPK		1.00	0.53	0.82	0.39	0.57	0.46
602.6065	3	YICENQDSISSK		1.00	0.59	0.80	0.46	0.58	0.54
673.9767	3	QNCELFEQLGEYK		1.00	0.53	0.95	0.42	0.70	0.40
656.3019	4	EFNAETTFHADICTLSEK		0.80	0.63	0.77	0.73	1.00	0.84
478.2078	3	ETCFAEEGK		1.00	0.49	0.69	0.41	0.50	0.41
420.6935	4	WCAVSEHEATK		1.00	0.41	0.85	0.23	0.72	0.13

593.2992	3	SVIPSDGSPVACVK	Human Serotransferrin [TrH]	1.00	0.58	0.77	0.62	0.92	0.57
453.8849	3	ASYLDCR		1.00	0.54	0.68	0.36	0.65	0.25
417.1976	3	SCHTGLGR / SHTAVGR		0.79	0.40	0.82	0.47	1.00	0.41
634.0701	4	SAGWNIPIGLLYCDLPEPR		1.00	0.46	0.60	0.25	0.54	0.21
634.6295	3	DQYELLCLDNTR		1.00	0.57	0.83	0.40	0.72	0.33
513.7585	4	DCHLAQVPSHTVVAR		0.71	0.50	0.69	0.39	1.00	0.16
390.1819	4	WCALSHHER		1.00	0.44	0.60	0.65	0.87	0.53
354.5044	3	INHCR		0.92	0.38	1.00	0.26	0.76	ND
647.2784	3	FDEFFSAGCAPGSK		1.00	0.47	0.90	0.21	0.39	0.15
536.2444	2	DSSLCK		0.93	ND	1.00	ND	0.61	ND
572.9361	3	DYELLCLDGTR		0.89	0.65	1.00	0.63	0.98	0.47
487.9898	4	KPVEEYANCHLAR		0.49	0.62	0.47	0.65	1.00	0.53
369.1760	3	EACVHK		0.82	0.41	0.89	0.57	1.00	0.36
428.5374	3	DDTVCLAK		0.98	0.68	0.77	0.64	1.00	0.54
529.9098	3	YDVENCANK	α -2 Macroglobulin [A2MG]	0.49	1.00	0.09	0.19	0.61	0.17
812.7026	3	MCPQLQQYEMHGPEGLR		ND	0.45	0.02	ND	1.00	ND
567.6096	3	NALFCLESAWK		0.60	1.00	0.06	0.21	0.63	0.17
639.6536	3	VTGEGCVYLQTSLK		0.50	1.00	0.12	0.22	0.57	0.22
728.3177	4	VYDYYETDEFAIAEYNAPCSK		0.08	0.32	ND	0.24	1.00	0.39
920.4422	3	ETTFNSLLCPSGGVESELSLK		0.45	1.00	0.15	0.35	0.86	0.39
475.9076	3	DSCVGSLVVK	Complement C3 [CO3]	0.50	1.00	0.18	0.42	0.70	0.46
475.5553	3	ADIGCTPGSGK		0.50	1.00	0.27	0.41	0.63	0.51
718.0137	3	DICEEQVNSLPGSITK		0.53	1.00	0.16	0.14	0.34	0.16
538.2669	3	NTMILEICTR		0.52	1.00	0.11	0.32	0.60	0.34
677.3049	3	VYAYYNLEESCTR		0.42	1.00	0.14	0.21	0.49	0.25
554.9218	3	ACEPGVDYVYK		0.39	1.00	0.11	0.33	0.56	0.38
650.6185	3	LESDVSAQMEYCR	Fibrogen β chain [FIBB]	0.35	1.00	0.13	0.17	0.33	0.26
655.8079	2	ECEIIR		0.19	1.00	0.02	0.16	0.08	0.20
840.3755	3	VYCDMNTENGGWTVIQNR		0.32	1.00	0.03	0.17	0.41	0.30
716.6559	3	NYCGLPGEYWLGNDK		0.33	1.00	0.06	0.11	0.25	0.16
347.8201	3	SCEQR	Complement C4a [CO4A]	0.46	0.95	0.17	0.56	1.00	0.56
446.8707	3	FACYPR		0.71	1.00	0.07	0.10	0.30	0.04
482.5835	3	SCGLHQLLR		0.67	1.00	0.75	ND	0.25	ND
432.885	3	ISCTIANR	Fibronectin [FINC]	0.64	1.00	0.17	0.59	0.50	0.70
528.566	3	TFYSCTTEGR		0.26	1.00	0.23	0.35	ND	ND
615.9591	3	GEWTCIAYSQLR		0.30	1.00	ND	0.10	ND	ND

Tableau 9: Quantification relative des peptides à Cys-SOH dérivés détectés en PRM-LID entre les six échantillons de plasma (0154, 0832, S428, 0127, 0185, 0584)

m/z	z	Name	Protein	Relative quantification between samples*					
				0154	0832	S428	0127	0185	0584
713.8675	4	ALVLIAFAQYLQ ^Q CPFEDHVK	Human Serum Albumin [HSA]	1.00	0.57	0.67	0.69	0.97	0.31
432.5654	3	L ^C TVATLR		0.93	0.60	1.00	0.32	0.52	0.29
479.8922	3	NE ^C FLQHK		0.92	0.72	1.00	0.48	0.70	0.50
753.8622	4	LVRPEVDVM ^C TAFHDNEETFLK		1.00	0.57	0.88	0.43	0.73	0.46
378.8721	3	AA ^C LLPK		1.00	0.68	0.82	0.45	0.63	0.50
602.6065	3	YI ^C ENQDSISSK		1.00	0.69	0.80	0.47	0.63	0.51
673.9767	3	QN ^C ELFEQLGEYK		1.00	0.68	0.95	0.41	0.70	0.41
656.3019	4	EFNAETFTFHADI ^C TLSEK		0.75	0.71	0.72	0.72	1.00	0.78
478.2078	3	ET ^C FAEEGK		1.00	0.59	0.69	0.44	0.53	0.40
420.6935	4	W ^C AVSEHEATK	Human Serotransferrin [TrH]	1.00	0.62	0.85	0.36	0.82	0.24
593.2992	3	SVIPSDG ^S SVAC ^V VK		1.00	0.71	0.77	0.66	0.94	0.55
453.8849	3	ASYLD ^C R		1.00	0.73	0.68	0.41	0.71	0.35
417.1976	3	S ^C HTGLGR / S ^C HTAVGR		0.78	0.47	0.81	0.54	1.00	0.40
634.0701	4	SAGWNIPIGLLY ^C DLPEPR		1.00	0.66	0.60	0.30	0.71	0.24
634.6295	3	DQYELL ^C LDNTR		1.00	0.72	0.83	0.38	0.64	0.31
513.7585	4	D ^C HLAQVPSHTVVAR		ND	ND	ND	ND	1.00	ND
390.1819	4	W ^C CALSHHER		ND	ND	ND	ND	ND	ND
354.5044	3	INH ^C R		0.92	ND	1.00	ND	ND	ND
647.2784	3	FDEFFSAG ^C APGSK		1.00	0.66	0.90	0.20	0.38	0.15
536.2444	2	DSSL ^C K		ND	ND	ND	ND	ND	ND
572.9361	3	DYELL ^C LDGTR		0.89	0.71	1.00	0.54	0.95	0.32
487.9898	4	KPVEEYANCH ^L AR		0.48	0.69	0.46	0.58	1.00	0.43
369.1760	3	EAC ^V HK		ND	ND	ND	ND	ND	ND
428.5374	3	DDTV ^C LAK		0.86	0.72	0.68	0.59	1.00	0.50
529.9098	3	YDVEN ^C LANK		α-2 Macroglobulin [A2MG]	0.56	0.13	0.12	0.35	1.00
812.7026	3	M ^C PQLQQYEMHGPEGLR	ND		ND	ND	ND	ND	ND
567.6096	3	NALF ^C LES ^A WK	0.68		0.18	0.15	0.56	1.00	ND
639.6536	3	VTGEGC ^V YLQ ^T SLK	0.54		0.23	0.19	0.45	1.00	ND
728.3177	4	VYDYYETDEFAIAEYNAP ^C SK	ND		ND	ND	ND	ND	ND
920.4422	3	ETTFNSLL ^C PSGGEVSEELSLK	0.89		0.34	0.35	0.39	1.00	ND
475.9076	3	DSC ^V GLSVVK	Complement C3 [CO3]	0.64	0.36	0.41	0.47	1.00	ND
475.5553	3	ADIGCTPGSGK		0.55	0.34	0.44	0.44	1.00	ND
718.0137	3	DICEEQVNSLPGSITK		0.32	0.15	0.14	0.46	1.00	ND
538.2669	3	NTMILEI ^C TR		0.55	0.24	0.26	0.47	1.00	ND
677.3049	3	VYAYYNLEES ^C TR		0.37	0.17	0.14	0.31	1.00	ND
554.9218	3	ACEPGVDYVYK		0.52	0.25	0.32	0.30	1.00	ND
650.6185	3	LES ^D VSAQMEY ^C R	Fibrogen β chain [FIBB]	0.33	0.16	0.22	0.33	1.00	ND
655.8079	2	E ^C EIIIR		0.08	0.19	0.16	0.12	1.00	ND
840.3755	3	VY ^C DMNTENGGWTVIQNR		0.45	0.17	0.27	0.28	1.00	ND
716.6559	3	NY ^C GLPGEYWLGN ^D K		0.28	0.10	0.16	0.27	1.00	ND
347.8201	3	S ^C EQR	Complement C4a	0.90	0.55	0.51	0.44	1.00	ND
446.8707	3	FA ^C YYPR		0.36	0.07	0.02	0.64	1.00	ND

482.5835	3	SCGLHQLLR	[CO4A]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
432.885	3	ISCTIANR	Fibronectin [FINC]	0.16	0.38	0.49	0.52	1.00	ND
528.566	3	TFYSCTTEGR		ND	ND	ND	1.00	0.93	ND
615.9591	3	GEWTCIAYSQLR		ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau 10: Quantification relative des peptides dérivés détectés en PRM-HCD entre les six échantillons de plasma (0154, 0832, S428, 0127, 0185, 0584)

Annexe III

Peptide	Protéine	C.V (%)	Peptide	Protéine	C.V (%)
ALVLIAFAQYLQQC*PFEDHVK	Human Serum Albumin (HSA)	4,9	LESDVSAQMEYC*R	Fibrogen β chain [FIBB]	8,7
C*ASQLK		3,6	EC*EEIIR		5,4
DVC*K		3,5	VYC*DMNTENGGWTVIQNR		3,9
EFNAETTFHADIC*TLSEK		5,9	NYC*GLPGEYWLGN DK		6,2
ETC*FAEEGK		6,4	SC*EQR	Complement C4a [CO4A]	5,5
LC*TVATLR		4,9	FAC*YYPR		4,8
LVRPEVDVMC*TAFHDNEETFLK		7,9	NNVPC*SPK		5,1
NEC*FLQHK		5,8	GC*GEQTMIIYLAPTLAASR		7,0
QNC*ELFEQLGEYK		6,0	NTMILEIC*TR	Complement C3 [CO3]	7,5
SHC*IAEVENDEMPADLPSSLAADFVES		45,7	DYFMPC*PGR	Hémopexine [HEMO]	8,7
RPC*FSALEVDETYVVK		4,7	VDGALC*MEK		10,9
YIC*ENQDSISSK		5,0	YYC*FQGNQFLR		2,9
WC*AVSEHEATK		Human Sero-transferrin (TrH)	4,0	SC*AVAEGVYVK	Haptoglobine [HPT]
SVIPSDGPSVAC*VK	5,8		VMPIC*LPSK	5,1	
ASYLDC*R	6,2		YVMLPVADQDQC*IR	8,2	
SC*HTAVGR	2,5		STGASVVC*LLNNFYPR	Immuno-globulin κ Constant [IGKC]	3,8
SC*HTGLGR	3,7		AGAFC*LSEDAGLGISSTASLR	α -2 Macro-globulin [A2MG]	8,6
SAGWNIPIGLLYC*DLPEPR	6,2		MC*PQLQQYEMHGPEGLR		6,5
DQYLLEC*LDNTR	5,9		VTGEGC*VYLQTSLK		6,9
DC*HLAQVPSHTVVAR	13,2		VTAAPQSV C*ALR		7,2
FDEFFSAGC*APGSK	5,0				
DSSL C*K	5,6				
DYLLEC*LDGTR	6,6				
DDTV C*LAK	6,3				

Tableau 11: Tableau récapitulatif des coefficients de variation de l'analyse des peptides à Cys-SOH endogènes lié à la répétabilité instrumentale.

Protéine	Peptide	C.V (%)	Protéine	Peptide	C.V (%)
Human Serum Albumin (HSA)	ALVLIAFAQYLQQC*PFEDHVK	18,7	Fibrogen β chain [FIBB]	LESDVSAQMEYC*R	24,7
	C*ASQLK	12,2		EC*EEIIR	9,4
	DVC*K	11,8		VYC*DMNTENGGWTVIQNR	19,3
	EFNAETFTFHADIC*TLSEK	18,8		NYC*GLPGEYWLGN DK	17,0
	ETC*FAEEGK	13,9	Complement C4a [CO4A]	SC*EQR	13,0
	LC*TVATLR	11,8		FAC*YYPR	16,7
	LVRPEVDVMC*TAFHDNEETFLK	16,3		NNVPC*SPK	14,6
	NEC*FLQHK	18,8		GC*GEQTMIIYLAPTLAASR	19,2
	QNC*ELFEQLGEYK	16,3	Complement C3 [CO3]	NTMILEIC*TR	21,7
	SHC*IAEVENDEMPADLPSSLAADFVES	14,4	Hémopexine [HEMO]	DYF MPC*PGR	17,9
	RPC*FSALEVDETYV PK	57,1		VDGALC*MEK	67,2
	YIC*ENQDSISSK	13,1		YYC*FQGNQFLR	19,6
	Human Sero-transferrin (TrH)	WC*AVSEHEATK	13,0	Haptoglobine [HPT]	SC*AVA EYGVYVK
SVIPSDGPSVAC*VK		17,5	VMPIC*LPSK		12,6
ASYLDC*R		18,2	YVMLPVADQDQC*IR		19,7
SC*HTAVGR		18,6	Fibrinogen γ Chain [FIBG]	DC*QDIANK	13,2
SC*HTGLGR		20,3	Immuno-globulin κ Constant [IGKC]	STGASVVC*LLNNFYPR	13,5
SAGWNIPIGLLYC*DLPEPR		13,7	α -2 Macroglobulin [A2MG]	AGAFC*LSEDAGLGISSTASLR	24,4
DQYLLEC*LDNTR		16,3		MC*PQLQQYEMHGPEGLR	7,8
DC*HLAQVPSHTVVAR		28,1		VTGEGC*VYLQTSLK	16,1
FDEFFSAGC*APGSK		17,8		VTAAPQSV C*ALR	21,1
DSSL C*K		23,8			
DYLLEC*LDGTR		13,9			
DDTV C*LAK		11,6			

Tableau 12: Tableau récapitulatif des coefficients de variation de l'analyse des peptides à Cys-SOH endogènes lié à la répétabilité du protocole prenant en compte la variabilité inter-jour parmi la variabilité instrumentale

Protéine	Peptide	m/z C ^{Mal}	z	m/z C ^{Dn}	z
Human Serum Albumin (HSA)	[HSA] LCTVATLR	423,2254	3	432,5628	3
	[HSA] AACLLPK	369,532	3	378,8721	3
	[HSA] EFNAETFTFHADICTLSEK	649,2969	4	656,2982	4
	[HSA] YICENQDSISSK	593,2665	3	602,6061	3
	[HSA] QNCELFEQLGEYK	664,6367	3	673,9767	3
	[HSA] ETCFAEEGK	468,8678	3	478,2046	3
	[HSA] LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK	597,6872	5	753,8622	4
	[HSA] RPCFSALEVDETYVPK	562,0241	4	569,0260	4
	[HSA] NECFLQHKL	470,5522	3	479,8922	3
	[HSA] DVCK	285,7988	3	295,1388	3
	[HSA] CASLQK	347,5012	3	356,8443	3
	[HSA] SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK	827,8759	4	834,8823	4
Human Sero-transferrin (TrH)	[TrH] SVIPSDGPSVACK	583,9591	3	593,2992	3
	[TrH] DCHLAQVPSHTVVAR	506,7534	4	513,7585	4
	[TrH] DQYELLCLDNTR	625,2857	3	634,6295	3
	[TrH] SHTGLGR / SHTAVGR	306,1450	4	417,1976	3
	[TrH] WCAVSEHEATK	413,6885	4	420,6935	4
	[TrH] DDTVCLAK	419,1974	3	428,5376	3
	[TrH] DYELLCLDGTR	563,5961	3	572,9361	3
	[TrH] FDEFFSAGCAPGSK	637,9363	3	647,2784	3
	[TrH] ASYLDCIR	444,5417	3	453,8849	3
	[TrH] KPVEEYANCHLAR	640,9719	3	487,9898	4
	[TrH] DSSLCK	348,4892	3	536,2444	2
	[TrH] WCALSHHER	383,1768	4	390,1819	4
	[TrH] SAGWNIPIGLLYCDLPEPR	835,7470	3	634,0701	4
α-2 Macroglobulin [A2MG]	[A2MG] VTAAPQSVCALR	536,2768	3	545,6118	3
	[A2MG] MCPQLQQYEMHGPEGLR	602,7738	4	609,7753	4
	[A2MG] AGAFCLSEDAGLGISSTASLR	806,3847	3	815,7300	3
	[A2MG] ETTFNSLLCPSGGEVSEELSLK	911,1022	3	920,4422	3
	[A2MG] VTGEGCVYLQTSLK	630,3136	3	639,6536	3
	[A2MG] VYDYYETDEFAIAEYNAPCSK	961,4145	3	728,3177	3
Fibrogen β chain [FIBB]	[FIBB] LESDVSAQMEYCR	641,2784	3	650,6163	3
	[FIBB] ECEEIIR	428,2010	3	437,5399	3
	[FIBB] NYCGLPGEYWLGNDK	707,3159	3	716,6559	3
Haptoglobine [HPT]	[HPT] SCAVAEYGVYVK	560,6011		569,937	3
Immuno-globulin κ Constant [IGKC]	[IGKC] SGTASVVCLLNNFYPR	1066,5227	2	720,6909	3
Fibrinogen γ Chain [FIBG]	[FIBG] DCQDIANK	433,1925	3	442,5307	3
Complement C4a [CO4A]	[CO4A] NNVPCSPK	417,1976	3	426,5376	3
Complement C3 [CO3]	[CO3] NTMILEICTR	528,9269	3	538,2669	3

Tableau 13: Liste des transitions PRM des 40 couples Cys-SOH/Cys-SH établies suite à l'analyse Top10 d'un échantillon de plasma dont les Cys-SOH endogènes et Cys-SH ont été dérivées séquentiellement.

Patient	Référence	Numéro attribué	Patient	Référence	Numéro attribué
Alzheimer	4654	1	Alzheimer	1501	43
Alzheimer	4778	3	Alzheimer	1623	44
Alzheimer	4830	4	Alzheimer	10348	45
Alzheimer	4663	6	Alzheimer	9033	46
Alzheimer	3316	7	Alzheimer	9035	47
Alzheimer	3176	8	Alzheimer	9103	48
Alzheimer	8658	9	Alzheimer	9108	49
Alzheimer	8678	10	Alzheimer	9418	50
Alzheimer	8679	11	Sain (contrôle)	3806	2
Alzheimer	8778	12	Sain (contrôle)	3024	5
Alzheimer	8560	13	Sain (contrôle)	7135	17
Alzheimer	7250	14	Sain (contrôle)	6131	18
Alzheimer	7268	15	Sain (contrôle)	7562	25
Alzheimer	7116	16	Sain (contrôle)	7592	26
Alzheimer	6757	19	Sain (contrôle)	8199	27
Alzheimer	6809	20	Sain (contrôle)	8091	30
Alzheimer	7430	21	Sain (contrôle)	8334	31
Alzheimer	7455	22	Sain (contrôle)	5818	32
Alzheimer	7677	23	Sain (contrôle)	1389	36
Alzheimer	7544	24	Sain (contrôle)	1996	38
Alzheimer	8204	28	Sain (contrôle)	2165	39
Alzheimer	8217	29	Sain (contrôle)	2268	40
Alzheimer	5562	33	Sain (contrôle)	2341	41
Alzheimer	5202	34	COVID-19	NCV-1694	51
Alzheimer	543	35	COVID-19	NCV-218	52
Alzheimer	1444	37	COVID-19	NCV-2562	53
Alzheimer	2444	42	COVID-19	NCV-296	54

Tableau 14: Liste des échantillons de la cohorte

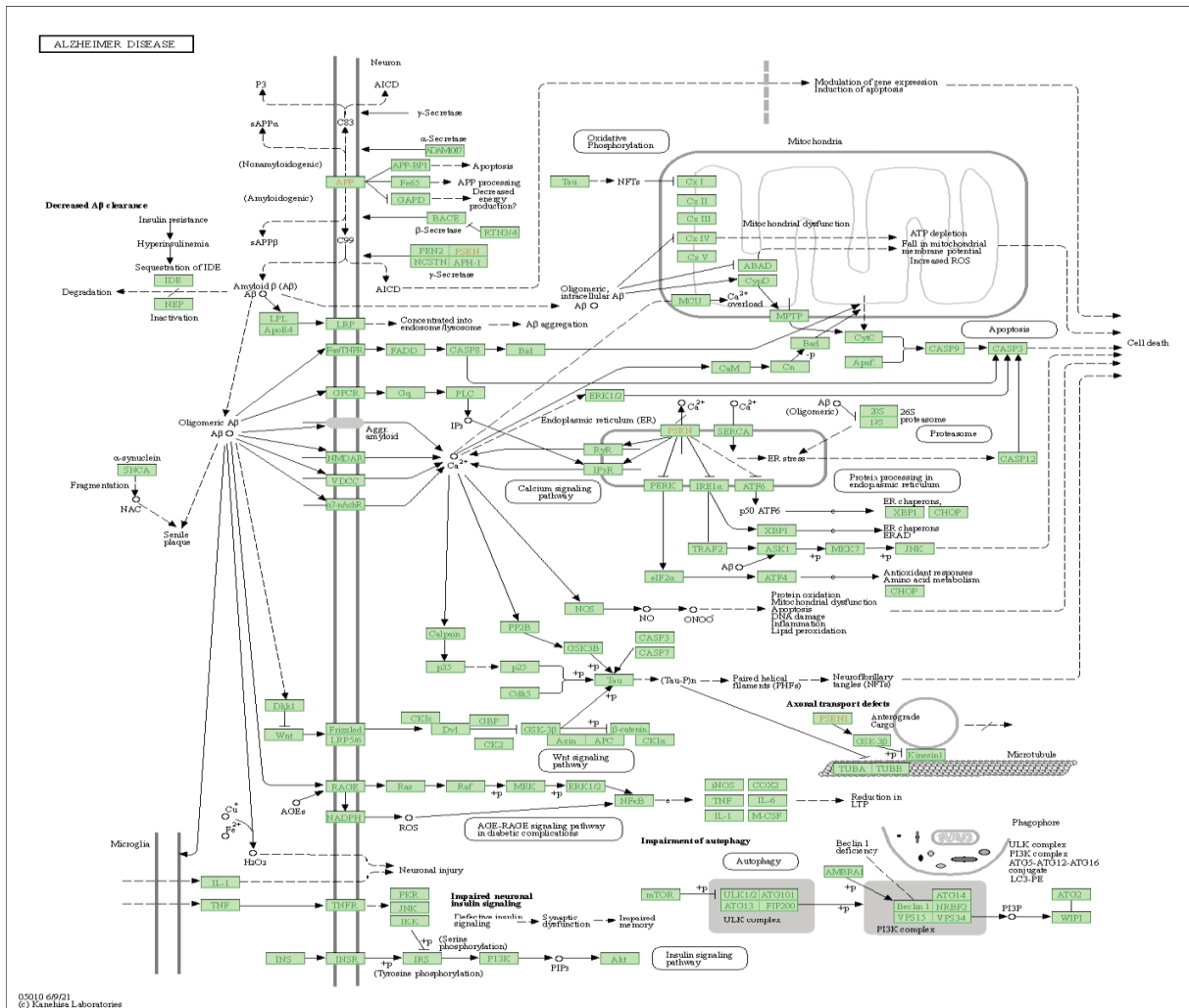


Figure 96: Schéma récapitulant le développement de la maladie d'Alzheimer au travers des interactions de 345 protéines différentes, établi par le site PeptideAtlas.

Protéine	Peptide	m/z	C ^{Mal}	z	m/z	C ^{*Dn}	z
Interleukin-6 (IL6)	ETC _{NK}	329,144726	3	338,484748	3		
	SNM _{CESSK}	426,174357	3	435,514379	3		
Protein Wnt-10b (WNT10B)	MLEEPRPRPPPSGLAGLLFLAL _{CSR}	623,133481	5	628,737494	5		
	LPGEPLTANTV _{CLT} LSGLSK	626,331984	4	633,337001	4		
	QLGL _{CLR}	398,546454	3	407,886476	3		
	NPDVTASALQGLHIAVHEC _{QHQLR}	606,504994	5	612,109008	5		
	WN _{CSALEGGGR}	514,229853	3	523,569875	3		
	ESAFSFSMLAAGVMHAVATAC _{SLGK}	576,276239	5	581,880252	5		
	SFPHSLPSPGPGSSPSGPQDTWEWGG _C NHDMDFGEK	863,971772	5	869,575785	5		
	TC _{WR}	319,47804	3	328,818062	3		
	SPDF _{CER}	415,509957	3	424,849979	3		
	AC _{NK}	276,127007	3	285,467029	3		
	VTEWVNV _{CK}	490,239578	3	499,5796	3		
Advanced glycosylation end	C _{QAMNR}	371,828744	3	381,168766	3		
	VGTC _V SEGSYPAGTLSWHLDGKPLVPNEK	858,922492	4	865,927508	4		

product-specific receptor (RAGE)	GGDRPTFSCSFSPGLPR	757,025095	3	766,365117	3
	VWEPVPLEEVQLVVEPEGGAVAPGGTVTLTCEVPAQPSPQIHWMK	1039,926	5	1045,53002	5
	DGVPLPLPPSPVLILPEIGPQDQGTYSVATHSSHGPQESR	1167,58014	4	1174,58516	4
Protein Wnt-7a (WNT7A)	CLGHLFSLGMVYLR	705,033986	3	714,374008	3
	IGGFSSVVALGASII \underline{C} NK	709,706703	3	719,046725	3
	WNCSALGER	476,215544	3	485,555566	3
	WGGCSADIR	452,536506	3	461,876528	3
	LECK	295,1425	3	304,482568	3
	TCWTTLPQFR	548,597765	3	557,937787	3
	SPNYCEEDPVTG \underline{S} VGTQGR	597,514382	4	604,519398	4
	ACNK	276,127007	3	285,467029	3
	TEMYTCK	422,847581	3	432,187603	3
Protein Wnt-9a (WNT9A)	ACDR	285,790395	2	295,130417	2
	DPGVAETLVEAVSMSALECQFQFR	1006,809	3	1016,14902	3
	WNCTLEGR	457,208389	3	466,548411	3
	ACSAGR	319,144949	3	328,484971	3
	EAWQWGGCGDNLK	618,938739	3	628,278761	3
	AGVETTCK	400,521974	3	409,861996	3
	TCWR	319,47804	3	328,818062	3
	TPELVHLD \underline{D} SPSFCLAGR	783,375793	3	792,715815	3
	QCTQR	342,823987	3	352,164009	3
	EEVYTCK	421,521863	3	430,861885	3
Dickkopf-related protein 1 (DKK1)	NGICVSSDQNHFR	623,281276	3	632,621298	3
	GQEGSVCLR	447,211911	3	456,551933	3
	ICKPVLK	397,895083	3	407,235105	3
	EGQVCTK	385,846569	3	395,186591	3
	LHTCQR	383,518787	3	392,858809	3
Tumor Necrosis Factor (TNFA)	GQGC \underline{P} STHVLLTHTISR	733,368973	3	742,708995	3
	SPCQR	327,816833	3	337,156855	3
Interleukin-1 α (IL1A)	NCYSENEEDSSSIDHLSLNQK	701,552964	4	708,557981	4
	SFYHVSYGPLHEGCMDQSVLSISETSK	870,647233	4	877,652249	4
	QDYWVCLAGGPPSITDFQILENQA	764,861637	4	771,866653	4
Interleukin-1 β (IL1B)	MLVPCPQTFQENDLSTFFPFIFEEPIFFDTWDNEAYVHDAPVR	1135,3242	5	1140,92821	5
	SLNCTLR	399,865964	3	409,205986	3
	NLYLSCVLK	481,919957	3	491,259979	3
Apolipoprotéine E (APOE)	VLWAALLVTFLAGCQAK	732,399322	3	741,739344	3
	LGADMEDVCGR	519,55887	3	528,898892	3
Lipoprotein Lipase (LIPL)	SIGIQKPVGHVDIYPNGGTFQPGCNIGEAIR	907,958403	4	914,963419	4
	CNNLGYEINK	520,241759	3	529,581781	3
	VIFCSR	372,520016	3	381,860038	3
Amyloid- β precursor protein (A4)	ALEVPTDGNAGLLAEPQIAMFCGR	955,466795	3	723,856931	3
	TCIDTK	357,835781	3	367,175803	3
	ETCSEK	363,155291	3	372,495313	3
	STNLHDYGMLLPCGIDK	756,690724	3	766,030746	3
Insulin-degrading enzyme (IDE)	LCGFQK	362,8445	3	372,1845	3
	SSAALDVHIGLSLSDPPNIAGLSHFCEHMLFLGTK	989,736914	4	996,7419	4
	FHSAYSSNLMAVCVLGR	803,713752	3	813,053774	3
	AEGPQEWVFQECK	647,957799	3	657,297821	3

	LSAECAK	371,511298	3	380,85132	3
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A (TNR1A)	DSVCPQ GK	408,853724	3	418,193746	3
	ECESGSFTASENHLR	686,630522	3	695,970544	3
	EMGQVEISSCTVDR	648,95747	3	658,297492	3
	SLECTK	357,835781	3	367,175803	3
	LCLPQIENVK	516,606149	3	525,946171	3
	GTEDSGTTVLLPLVIFVGLCLLSLLFIGLMYR	974,02506	4	981,030076	4
	LYSIVCGK	425,218114	3	434,558136	3
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 (TNR6)	CEHGIK	397,530692	3	406,870714	3
	ECTLTSNTK	463,21521	3	472,555232	3
	SNLGWLCLLLLIPLIVVVK	894,518319	3	903,858341	3
	ANLCTLAEK	451,892178	3	461,2322	3
Dickkopf-related protein 4 (DKK4)	MVAAVLLGLSWLCSPLGALVLDNFNIR	819,941064	4	826,946081	4
	FCLQPR	385,523649	3	394,863671	3
	GQEGESCLR	457,203304	3	466,543326	3
Dickkopf-related protein 2 (DKK2)	NLGQAYPCSSDK	558,584073	3	567,924095	3
	ECEVGR	361,827397	3	371,167419	3
	GHEGDPCLR	458,871777	3	468,211799	3
	LHVCQK	373,523649	3	382,863671	3
Protein Wnt-16 (WNT16)	L _C ALWAALLVLFYGAQGNWMWLGIASFVPEK	1004,0163	4	809,018507	5
	LGCANLPLNSR	516,929515	3	526,269537	3
	LGIQECGSQFR	543,592791	3	552,932813	3
	WNCMITAAATTAPMGASPLFGYELSSGTK	842,64507	4	849,650087	4
	LMSVDCR	405,519687	3	414,859709	3
	SPNYCVEDK	482,543326	3	491,883348	3
Protein Wnt-5b (WNT5B)	LCQLYQEHMAYIGEGAK	782,366241	3	791,706263	3
	ECQHQR	446,864734	3	456,204756	3
	WNCSTADNASVFGR	640,281165	3	649,621187	3
	DWLWGGCGDNVEYGYR	760,99005	3	770,330072	3
	MADVACK	376,837017	3	386,177039	3
	TCWLQLAEFR	553,269649	3	562,609671	3
	FTQTPEDLVYVDPSPDYCLR	949,442532	3	719,338735	4
Protein Wnt-9b (WNT9B)	MRPPPALALAGLCLLALPAAAASYFGLTGR	844,207064	4	851,21208	4
	QCDLLK	370,851543	3	380,191565	3
	DAAHLGLLECCQFQFR	713,679148	3	723,01917	3
	WNC _S LEGR	452,536506	3	461,876528	3
	ACSAGR	319,144949	3	328,484971	3
	QAWQWGVCGDNLK	632,626384	3	641,966406	3
	SGDLVYMEDSPSFCRPSK	803,692794	3	813,032816	3
Protein Wnt-1 (WNT1)	WNCPTAPGPHLFGK	639,306874	3	648,646896	3
	GPGGPDWHWGGCS _D NIDFGR	631,018629	4	638,023645	4
	TCW _M R	363,158201	3	372,498223	3
	SPNFCTYSGR	508,222587	3	517,562609	3
	NCTHTR	374,834775	3	384,174797	3
	VLHECL	368,848021	3	378,188043	3
Protein Wnt-5A (WNT5A)	LCHLYQDHMQYIGEGAK	600,028037	4	607,033053	4
	ECQYQFR	455,532873	3	464,872895	3

	WNCSTVDNTSVFGR	659,628453	3	668,968475	3
	DWLWGGCGDNIDYGYR	760,99005	3	770,330072	3
	TVYNLADVACK	529,925659	3	539,265681	3
	TCWLQLADFR	548,597765	3	557,937787	3
	FNSPTTQDLVYIDSPDYCVR	706,078618	4	713,083634	4
Protein Wnt-2 (WNT2)	VMCDNVPGLVSSQR	502,246404	3	641,974572	3
	QLCHR	349,836227	3	359,176249	3
	AISQGVAEWTAECQHQR	818,046559	3	827,386581	3
	WNCNTLDR	471,543661	3	480,883683	3
	ACSQGEVK	404,853724	3	414,193746	3
	GIFDWGGCSDNIDYGK	751,001956	3	760,341978	3
	TCWLAMADFR	535,576084	3	544,916106	3
	NDLVYFENSPDYCIR	747,001956	3	756,341978	3
VCNLTSR	395,19408	3	404,534102	3	
Protein Wnt-3 (WNT3)	VLGYPIWWSLALGQQYTSLSGSQLLCGSIPGLVPK	1051,80777	4	847,251682	4
	LGIQECQHQR	583,947457	3	593,287479	3
	WNCTTIDDSLAIFGPVLDK	833,73862	3	843,078642	3
	WGGCSEDADFGVLVSR	696,979263	3	706,319285	3
	TCWWAQPDFR	567,585748	3	576,92577	3
	DLVYYENSPNFCEPNPETGSFGTR	782,593626	4	789,598643	4
	IYDVHTCK	457,216773	3	466,556795	3
Protein Wnt-3A (WNT3A)	MAPLGYFLLCSLK	654,012299	3	663,352321	3
	QALGSYPIWWSLAVGPQYSSLSGSQLCASIPGLVPK	855,847815	5	861,451828	5
	IGIQECQHQR	583,947457	3	593,287479	3
	WNCTTVHDSLAIFGPVLDK	836,410726	3	845,750748	3
	WGGCSEDIEFGGMVSR	707,63662	3	716,976642	3
	TCWWSQPDFR	572,917387	3	582,257409	3
	DLVYYEASPNFCEPNPETGSFGTR	771,842173	4	778,847189	4
VYDVHTCK	452,54489	3	461,884912	3	
Protein Wnt-4 (WNT4)	LSSVGSISEEETCEK	663,63505	3	672,975072	3
	QVQMCK	376,509011	3	385,849033	3
	GAQLAIEECQYQFR	682,98787	3	692,327892	3
	WNCSTLDSLVPFGK	653,313694	3	662,653716	3
	ACSSGELEK	438,864288	3	448,20431	3
	TVHGVSPQGFQWSGCSDNIAYGVAFSQSFDVDR	984,960137	4	991,965153	4
	NAQFKPHTDEDLVYLEPSPDFCEQDMR	904,654052	4	911,6591	4
	LVELHTCR	454,564285	3	463,9043	3
Protein Wnt-7 (WNTB)	WIFYVFLCFGVLYVK	763,39703	3	772,737052	3
	LGALSSVVALGANIICNK	712,054103	3	712,054103	3
	WNCALGEK	466,880161	3	466,880161	3
	WGGCSADVR	447,864623	3	457,204645	3
	MQLCEK	381,5089	3	390,848922	3
	TCWTLPK	447,553386	3	456,893408	3
	SPNYCEEDAATGSVGTQGR	778,334434	3	787,674456	3
	TEVFTCK	406,858586	3	416,198608	3
Protein Wnt-2b (WNT2B)	LGLACLILLLLTLPAR	733,114634	3	742,454656	3
	VICIPGLVSR	559,624092	3	568,964114	3

	QLCQR	346,836116	3	356,176138	3
	ECQHQR	446,864734	3	456,204756	3
	WNCTTLDLDR	467,211911	3	476,551933	3
	GDFDWGGCSIHYGVR	763,657071	3	772,997093	3
	TDLVYFSPDYCVLDK	800,028059	3	809,368081	3
	NTVDVHTCK	469,887316	3	479,227338	3
Protein Wnt-10a (WNT10a)	LPPEPVLNANTVCLTLPGLSR	865,796581	3	875,136603	3
	QMEVCVR	419,195204	3	428,535226	3
	HPDVAASAIQGIQIAIHECQHQR	765,880695	4	772,885712	4
	WNCSSLETR	496,222587	3	505,562609	3
	ESAFAYAIAAAGVVHAVSNACALGK	696,349702	4	703,354719	4
	GLSHGVPEHPALPTASPLQDSWEWGGCSPDMGFGER	851,386393	5	856,990406	5
	TCWQVTPEFR	553,25752	3	562,597542	3
	SPDFCER	415,509957	3	424,849979	3
	ITEWVSVCK	485,907828	3	495,24785	3
Platelet Basic Protein (CXCL7)	LDTPSCNSARPLHALQVLLLSLLLTALASSTK	791,2404	5	796,8444	5
	GTHCNQVEVIATLK	632,321	3	644,661	3
	ICLDPDAPR	464,2239	3	473,5639	3
α -1-antichymotrypsine (AACT)	DEELSCTVVELK	585,9468	3	595,2868	3
Sortilin-related Receptor (SORL)	LPFLFTLVALLPPGALCEVWTQR	744,655567	4	751,660583	4
	YIFADAYAQYLWITFDFCNTLQGFSSIPFR	781,176058	5	786,780072	5
	HPINEYIADASEDQVFVCVSHSNR	850,387545	4	857,392561	4
	ENVHSWLILQVNATDALGVPCTENDYK	684,932171	5	690,536185	5
	GNECLLGHK	454,552156	3	463,892178	3
	EDYECDFGFK	548,553891	3	557,893913	3
	MSEDLSLEVCPDPEFSGK	619,031713	4	626,03673	4
	SYSPPVPCPVGSTYR	667,648965	3	676,988987	3
	ISGDTCSGGDVEAR	586,589775	3	595,929797	3
	LEGELVPCPLAEENEFILYAVR	724,615102	4	731,620118	4
	AAVALDFDYEHNCLYWSDLALDVIQR	1144,54331	3	692,732909	3
	LCLNGSTGQVEIINSGLTVEALAFELSQLLYWVDAGFK	944,07971	5	949,683723	5
	WPNGISVDDQWIYWTDAYLECIER	841,63556	4	848,640576	4
	NNTCVK	357,167643	3	366,507665	3
	QENTCLR	418,86099	3	428,201012	3
	NGHCIPQR	439,208612	3	448,548634	3
	CNGFR	329,813311	3	339,153333	3
	HCDGLR	364,499504	3	373,839526	3
	DGSEDAAFAGCSQDPEFHK	839,673115	3	849,013137	3
	ENDCGDWSDEK	563,547576	3	572,887598	3
	FEFECHQPK	519,231083	3	528,571105	3
	TCIPNWK	418,202576	3	427,542598	3
	ACSDELTVYK	507,234381	3	516,574403	3
	MPSASCYVNVYYR	648,623763	3	657,963785	3
	VQVQCLSK	432,557019	3	441,897041	3
	AINQTAVECTWTGPR	679,991503	3	689,331525	3
	Xanthine Oxydase (XO)	ENCWK	535,72930	2	549,7393
ENCWK		357,48860	3	366,82860	3

	GLCIPTK	412,5584	3	421,89840	3
	ALFHMDNCYK	544,9077	3	554,24770	3
	CTLTLSFFFK	533,26720	3	542,60730	3
	CTGYRPILQGFR	601,30340	3	610,64340	3
	NACVDK	347,49210	3	356,83210	3

Tableau 15 : Récapitulatif des ratios m/z et charges des 209 peptides à Cys-SOH et Cys-SH dérivés par le DabDn et le DabMal suivis issus des 32 protéines extracellulaires impliquées dans la maladie d'Alzheimer ainsi que des protéines CXCL7, AACT et Xanthine Oxydase.

Protéine	Précurseur	m/z	z	Début (min)	Fin (min)
Peptides sans cystéine					
	[HSA] VFDEFKPLVEEPQNLIK	682,37	3	25,5	33
	[Trh] EFQLFSSPHGK	426,21550	3	18	24
	[CO4A] GSVFLR	339,70030	2	10	18
	[CO3] AVLYNYR	449,74270	2	10	15
Peptides à cystéine SH non dérivée					
	[Trh] SVIPSDGPSVACVK	679,85290	2	1	29
	[Trh] KPVEEYANCHLAR	383,19370	4	1	29
	[CO4A] GCGEQTMIIYLAPTLAASR	627,97810	3	1	25
	[CO3] DSCVGSLLVVK	503,76550	2	1	25
	[CO3] NTMILEICTR	597,30450	2	1	25
	[CO3] FISLGEACK	484,24950	2	1	25
	[CERU] DLYSGLIGPLIVCR	759,9211	2	1	25
	[HPT] SCAVAEYGVVVK	644,8157	2	1	25
Chromophores libres					
	Dabcyl cyclohexadione	422,20800	1	52,00	69,00
	Dabcyl Maleimide	392,17220	1	42,00	48,00
Peptides à cystéine SOH dérivée par le DabDn					
Human Serum Albumin (HSA)	[HSA] (Dn) LCTVATLR	432,5628	3	47,5	48,99
	[HSA] (Dn) AACLLPK	378,8721	3	50,5	51,99
	[HSA] (Dn) EFNAETFTFHADICTLSEK	656,2982	4	47	48,49
	[HSA] (Dn) YICENQDSISSK	602,6061	3	42,5	43,79
	[HSA] (Dn) QNCELFEQLGEYK	673,9767	3	50	50,99
	[HSA] (Dn) ETCFAEEGK	478,2046	3	44,5	45,99
	[HSA] (Dn) LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK	753,8622	4	46,5	47,49
	[HSA] (Dn) ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK	713,8675	4	57,5	58,99
	[HSA] (Dn) NECFLQHK	479,8922	3	45,7	46,99
	[HSA] (Dn) RPCFSALEVDETYVVK	569,026	4	45	46,49
	[HSA] (Dn) SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK	834,8823	4	48,5	50,49
	[HSA] (Dn) CASLQK	356,8443	3	45	46,49

	[HSA] (Dn) DVCK	295,1388	3	43,5	44,49
Human Sero- transferrin (Trh)	[Trh] (Dn) SVIPSDGPSVACVK	593,2992	3	44,5	45,99
	[Trh] (Dn) DCHLAQVPSHTVVAR	513,7585	4	38,5	39,99
	[Trh] (Dn) DQYELLCLDNTR	634,6295	3	49,5	51,49
	[Trh] (Dn) SHTGLGR / SHTAVGR	417,1976	3	36,5	39,49
	[TrH] (Dn) WCAVSEHEATK	420,6935	4	43	44,49
	[TrH] (Dn) DDTVCLAK	428,5376	3	46,5	48,49
	[TrH] (Dn) DYELLCLDGTR	572,9361	3	51,5	53,49
	[TrH] (Dn) FDEFFSAGCAPGSK	647,2784	3	47,5	48,49
	[TrH] (Dn) ASYLDCIR	453,8849	3	48	49,49
	[TrH] (Dn) KPVEEYANCHLAR	487,98980	4	36,5	37,99
	[TrH] (Dn) DSSLCK	536,2444	2	45,2	45,99
	[TrH] (Dn) INHCR	354,50440	3	36	37,49
	[TrH] (Dn) CQSFR	530,23950	2	46,5	47,99
	[TrH] (Dn) WCALSHHER	390,18190	4	41	42,99
	[TrH] (Dn) SAGWNIPIGLLYCDLPEPR 4+	634,0701	4	54,5	56,99
	[TrH] (Dn) CDEWSVNSVGK	548,24510	3	48	49,49
Complement C4a/b (CO4)	[CO4] (Dn) SCGLHQLLR	482,58350	3	44,5	45,49
	[CO4] (Dn) SCEQR	347,82010	3	39	39,99
	[CO4] (Dn) FACYYPR	446,87070	3	47,2	48,49
	[CO4] (Dn) NNVPCSPK	426,53760	3	41,8	43,19
	[CO4] (Dn) GLCVATPVQLR	525,94990	3	49,5	50,99
	[CO4] (Dn) GCGEQTMIIYLAPTLAASR	767,70630	3	47,5	49,49
	[CO4] (Dn) CSVFYGAPSK	493,23220	3	20	60
Complement C3 (CO3)	[CO3] (Dn) NTMILEICTR	538,26690	3	50	51,49
	{CO3} (Dn) DSCGSLVVK	475,90760	3	48	48,99
	[CO3] (Dn) ADIGCTPGSGK	475,55530	3	42	43,49
	[CO3] (Dn) VYAYYNLEESCTR	677,30490	3	46	46,99
	[CO3] (Dn) DICEEQVNSLPGSITK	718,01370	3	44,5	45,99
	[CO3] (Dn) ACEPGVDYVYK	554,92180	3	43	44,99
	[CO3] (Dn) VELLHNPAFCSLATTK	541,52900	4	45,5	46,99
Fibrogen β chain (FIBB)	[FIBB] (Dn) LESDVSAQMEYCR	650,6163	3	44,5	45,99
	[FIBB] (Dn) ECEEIIR	437,53990	3	43,5	45,49
	[FIBB] (Dn) VYCDMNTENGGWTVIQNR	840,37060	3	45,5	47,49
	[FIBB] (Dn) NYCGLPGEYWLGNDK	716,65590	3	49,5	50,49
α -2 Macro-globulin (A2MG)	[A2MG] (Dn) VTAAPQSVCALR	545,6118	3	46	47,49
	[A2MG] (Dn) MCPQLQQYEMHGPGLR	609,7753	4	42	43,49
	[A2MG] (Dn) NALFCLESARK	567,6096	3	53,5	55,99
	[A2MG] (Dn) VTGEGCVYLQTSLK	639,65360	3	46	47,49
	[A2MG] (Dn) AGAFCLSEDAGLISSTASLR	815,73000	3	51	52,49
	[A2MG] (Dn) ETTFNSLLCPSGGEVSEELSLK	920,44220	3	51,5	52,99
	[A2MG] (Dn) YDVENCLANK	529,9098	3	45	46,49
	[A2MG] (Dn) VYDYYETDEFAIAEYNAPCSK	970,7546	3	47,5	48,99

	[A2MG] (Dn) FSGQLNSHGCFYQQVK	566,2664	4	42,5	43,99
	[A2MG] (Dn) DNGCFR	377,4956	3	46	47,49
	[A2MG] (Dn) EEPFALGVQTLPTCDEPK	667,8214	4	49	50,99
	[A2MG] (Dn) SLFTDLEAENDVLHCVAFAVPK	710,1018	4	54	55,99
Céruoplasmine (CERU)	[CERU] (Dn) DIASGLIGPLIICK	611,3391	3	56,5	58,49
	[CERU] (Dn) TYCSEPEK	459,2007	3	39,5	41,49
	[CERU] (Dn) DLYSGLIPLIVCR	646,678	3	57,5	58,99
Hémopexine (HEMO)	[HEMO] (Dn) VDGAALCEK	462,214	3	46	47,49
	[HEMO] (Dn) DYFMPCPGR	502,2178	3	49,5	51,49
	[HEMO] (Dn) YYCFQGNQFLR	619,9521	3	49	50,49
Haptoglobine (HPT)	[HPT] (Dn) VMPICLPSK	469,5758	3	49	52,99
	[HPT] (Dn) SCAVAEYGVYVK	569,937	3	45	48,99
	[HPT] (Dn) YVMLPVADQDQCIR	690,6656	3	47	49,99
	[HPT] (Dn) SPVGQPILNEHTFCAGMSK	634,3106	4	44	47,99
Apolipoprotein B-100 (APOB)	[APOB-100] (Dn) VELEVPQLCSFILK	679,6970	3	56,5	57,99
Fibronectin (FINC)	[FINC] (Dn) ISCTIANR	432,8850	3	44,5	45,99
Fibrinogen α Chain (FIBA)	[FIBA] (Dn) HQSACK	364,8359	3	35,5	36,99
α -2-HS-glycoprotein (FETUA)	[FETUA] (Dn) EHAVEGDCDFQLLK	506,4871	4	46	46,99
Immuno-globulin κ Constant (IGKC)	[IGK] (Dn) SGTASVVCLLNNFYPR	720,6909	3	55	57,49
	[IGK] (Dn) VYACEVTHQGLSSPVTK	560,2779	4	41,2	42,49
Fibrinogen γ Chain (FIBG)	[FIBG] (Dn) DCQDIANK	442,5307	3	41	42,99
Complement Factor H (CFAH)	[CFAH] (Dn) SCDIPVFMNAR	557,9237	3	50	51,49
α -1- antichymotrypsine (AACT)	[AACT] DEELSCTVVELK (Dn)	595,2868	3	48,5	49,49
Apolipoprotéine E (APOE)	[APOE] LGADMEDVCGR (Dn)	528,898892	3	45,5	47,49
Chemokine C-X-C motif ligand 7 (CXCL7)	[CXCL7] ICLDPDAPR (Dn)	473,5639	3	46,5	48,49
Peptides à cystéine SH dérivée par le DabMal					
Human Serum Albumin (HSA)	[HSA] (Mal) LCTVATLR	423,2254	3	36	37,49
	[HSA] (Mal) AACLLPK	369,532	3	36	37,99
	[HSA] (Mal) EFNAETFTFHADICTLSEK	649,2969	4	40	41,49
	[HSA] (Mal) YICENQDSISSK	593,2665	3	31	32,49
	[HSA] (Mal) QNCELFEQLGEYK	664,6367	3	40,5	41,99
	[HSA] (Mal) ETCFAEEGK	468,8678	3	32,5	33,99
	[HSA] (Mal) LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK	597,6872	5	38,5	40,49
	[HSA] (Mal) ALVLIAFAQYLQPCFEDHVK	942,1475	3	50	51,5
	[HSA] (Mal) NECFLQHK	470,5522	3	32,5	33,99

	[HSA] (Mal) RPCFSALEVDETYVVK	562,0241	4	36,5	37,99
	[HSA] (Mal) SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK	827,8759	4	41,5	44,49
	[HSA] (Mal) CASLQK	347,5012	3	29,5	30,99
	[HSA] (Mal) DVCK	285,7988	3	29,5	30,99
Human Sero- transferrin (TrH)	[TrH] (Mal) SVIPSDGPSVACVK	583,95910	3	34	35,49
	[TrH] (Mal) DCHLAQVPSHTVVAR	506,75340	4	25	31,99
	[TrH] (Mal) DQYELLCLDNTR	625,28570	3	40	41,49
	[TrH] (Mal) SHTGLGR / SHTAVGR	306,14500	4	20	29,99
	[TrH] (Mal) WCAVSEHEATK	413,68850	4	31	32,49
	[TrH] (Mal) DDTVCLAK	419,19740	3	33,5	34,49
	[TrH] (Mal) DYELLCLDGTR	563,59610	3	41,5	42,99
	[TrH] (Mal) FDEFFSAGCAPGSK	637,93630	3	38	39,49
	[TrH] (Mal) EACVHK	359,83600	3	24	25,49
	[TrH] (Mal) ASYLDCIR	444,54170	3	37,5	38,99
	[TrH] (Mal) KPVEEYANCHLAR	640,97190	3	27	28,49
	[TrH] (Mal) DSSLCK	348,48920	3	32	33,99
	[TrH] (Mal) INHCR	259,12260	4	23,5	24,99
	[TrH] (Mal) CQSFR	344,48560	3	31	32,99
	[TrH] (Mal) WCALSHHER	383,17680	4	25	30,99
	[TrH] (Mal) SAGWNIPIGLLYCDLPEPR	835,74700	3	48	49,49
	[TrH] (Mal) CDEWSVNSVGK	538,90090	3	34,5	35,49
[TrH] (Mal) CLVEK	328,16540	3	32	33,99	
Complement C4a/b (CO4)	[CO4] (Mal) SCEQR	338,48010	3	20	29,99
	[CO4] (Mal) FACYYPR	437,53070	3	36	37,49
	[CO4] (Mal) SCGLHQLLR	473,24034	3	34	35,49
	[CO4] (Mal) NNVPCSPK	417,19760	3	20	29,99
	[CO4] (Mal) GLCVATPVQLR	516,60990	3	38,5	39,49
	[CO4] (Mal) GCGEQTMIIYLAPTLAASR	758,36620	3	40	41,99
	[CO4] (Mal) CSVFGAPSK	483,89220	3	35,5	36,99
Complement C3 (CO3)	[CO3] (Mal) DSCVGSLLVVK	466,56760	3	36,5	37,99
	[CO3] (Mal) ADIGCTPGSGK	466,21530	3	30	31,49
	[CO3] (Mal) DICEEQVNSLPGSITK	708,67370	3	35,5	36,99
	[CO3] (Mal) NTMILEICTR	528,92690	3	40,5	41,99
	[CO3] (Mal) VYAYYNLEESCTR	667,96480	3	20	44,99
	[CO3] (Mal) ACEPGVDYVYK	545,5818	3	33,5	34,99
	[CO3] (Mal) DTWVEHWPEEDEQCDEENQK	735,04780	4	20	45
	[CO3] (Mal) VELLHNPAFCSLATTK	534,52400	4	37	38,99
Fibrogen β chain (FIBB)	[FIBB] (Mal) LESDVSAQMEYCR	641,27840	3	33,5	34,99
	[FIBB] (Mal) ECEEIIR	428,20100	3	34	35,49
	[FIBB] (Mal) VYCDMNTENGGWTVIQNR	831,03540	3	37,5	38,49
	[FIBB] (Mal) NYCGLPGEYWLGNDK	707,31590	3	41	42,99
	[FIBB] (Mal) CHAANPNGR	444,20010	3	20	30
α -2 Macro-globulin	[A2MG] (Mal) YDVENC_LANK	520,5698	3	34,5	35,99

(A2MG)	[A2MG] (Mal) VTAAPQSV <u>C</u> ALR 3+	536,2768	3	34,5	35,99
	[A2MG] (Mal) M <u>C</u> PQLQQYEMHGPEGLR	602,77380	4	34	35,99
	[A2MG] (Mal) NALF <u>C</u> LESARK	558,2695	3	44,5	45,99
	[A2MG] (Mal) VTGEG <u>C</u> VYLQTSLK	630,31360	3	36,5	38,49
	[A2MG] (Mal) VYDYYETDEFAIAEYNAP <u>C</u> SK	961,4145	3	39	40,5
	[A2MG] (Mal) AGAF <u>C</u> LEDAGLGISSTASLR	806,3847	3	40,5	42,99
	[A2MG] (Mal) ETTFN <u>S</u> LL <u>C</u> PSGGVESELSLK	911,10220	3	43	44,49
	[A2MG] (Mal) SPCYGYQWVSEEEHAAHTAYLVFSPSK	612,944	6	34	35,49
	[A2MG] (Mal) FSGQLNSHGCFYQQVK	559,2614	4	32,5	33,99
	[A2MG] (Mal) DNGCFR	368,1556	3	33,5	34,99
	[A2MG] (Mal) EEFPFALGVQTLPTCDEPK	660,8164	4	42	44,99
	[A2MG] (Mal) SLFTDLEAENDVLHCVAFAVPK	703,0968	4	46,5	47,99
Céruoplasmine (CERU)	[CERU] (Mal) DLYSGLIGPLIVCR	637,3369	3	48	49,99
	[CERU] (Mal) TYCSEPEK	449,8607	3	20	32
	[CERU] (Mal) DIASGLIGPLIICK	601,99900	3	47	48,49
Hémopexine (HEMO)	[HEMO] (Mal) VDGALCMEK	452,87400	3	34	35,99
	[HEMO] (Mal) DYFMPCPGR	492,87780	3	39	40,49
	[HEMO] (Mal) YYCFQGNQFLR	610,61210	3	39,5	40,99
Haptoglobine (HPT)	[HPT] (Mal) VMPICLPSK	460,2385	3	37	40,99
	[HPT] (Mal) SCAVAEYGVYVK	560,6011	3	35	38,99
	[HPT] (Mal) YVMLPVADQDQCIR	681,32560	3	37	39,99
	[HPT] (Mal) SPVGQPILNEHTFCAGMSK	627,30560	4	36	39,99
Apolipoprotein B-100 (APOB)	[APOB-100] (Mal) VELEVPQLCSFILK	670,35700	3	47,5	48,99
Fibronectin (FINC)	[FINC] (Mal) ISCTIANR	423,5450	3	32,5	34,99
Fibrinogen α Chain (FIBA)	[FIBA] (Mal) HQSACK	355,4959	3	20	30
α -2-HS-glycoprotein (FETUA)	[FETUA] (Mal) EHAVEGDCDFQLLK	499,4821	4	37	38,49
Immuno-globulin κ Constant (IGKC)	[IGK] (Mal) SGTASVVCLLNIFYPR	1066,5227	2	44,5	46,99
	[IGK] (Mal) VYACEVTHQGLSSPVTK	553,2729	4	30,5	31,99
Fibrinogen γ Chain (FIBG)	[FIBG] (Mal) DCQDIANK	433,1925	3	29	30,5
Complement Factor H (CFAH)	[CFAH] (Mal) SCDIPVFMNAR	548,5842	3	41	42,49
α -1- antichymotrypsine (AACT)	[AACT] DEELSCTVVELK (Mal)	585,9468	3	38	39,49
Apolipoprotéine E (APOE)	[APOE] LGADMEDVCGR (Mal)	519,5589	3	34,5	36,49
Chemokine C-X-C motif ligand 7 (CXCL7)	[CXCL7] ICLDPDAPR (Mal)	464,2239	3	35	36,99

Tableau 16 : Liste des transitions PRM de la méthode PRM-LID employée lors de l'analyse des cohortes de patients atteints de la d'Alzheimer, positifs au COVID-19 et de patients sains (contrôles).

Protéine	Peptide	Moyenne	E.C	C.V (%)
α-2 Macro-globulin (A2MG)	AGAFCLSEDAGLGISSTASLR	0,5584	0,0443	7,93
	DNGCFR	0,4347	0,0163	3,74
	EEFPFALGVQTLPQTCDEPK	1,6429	0,1930	11,75
	ETTFNSLLCPSGGEVSEELSLK	1,0808	0,0586	5,42
	MCPQLQQYEMHGPEGLR	0,8730	0,0653	7,48
	NALFCLESAWK	1,4304	0,0763	5,33
	SLFTDLEAENDVLHCVAFAVPK	0,1350	0,0070	5,16
	VTAAPQSVCALR	3,6170	0,2483	6,86
	VTGEGCVYLQTSLK	0,8256	0,0904	10,95
	VYDYETDEFAIAEYNAPCSK	3,0228	0,4144	13,71
YDVENCLANK	0,2421	0,0171	7,05	
α-1-antichymotrypsine (AACT)	DEELSCTVVELK	2,2814	0,1565	6,86
Apolipoprotein B-100 (APOB)	VELEVPQLCSFILK	1,0700	0,0799	7,47
Apolipoprotéine E (APOE)	LGADMEDVCGR	12,7513	1,7114	13,42
Céruoplasmine (CERU)	DIASGLIGPLIICK	2,4555	0,1351	5,50
	DLYSGLIGPLIVCR	2,0058	0,1099	5,48
	TYCSEPEK	4,0193	0,2598	6,46
Complement Factor H (CFAH)	SCDIPVFMNAR	7,7256	0,2723	3,52
Complement C3 (CO3)	ACEPGVDYVYK	2,4141	0,0946	3,92
	ADIGCTPGSGK	1,9149	0,0787	4,11
	DICEEQVNSLPGSITK	4,8525	0,3231	6,66
	DSCVGSVLVK	3,7082	0,2391	6,45
	NTMILEICTR	3,8665	0,3457	8,94
	VELLHNPAFCSLATTR	0,2288	0,0194	8,48
Complement C4a/b (CO4)	FACYYPR	5,9077	0,7171	12,14
	NNVPCSPK	5,9041	0,3159	5,35
	SCEQR	10,9926	0,4111	3,74
	SCGLHQLLR	0,4920	0,0591	12,02
Chemokine C-X-C motif ligand 7 (CXCL7)	ICLDPDAPR	7,3390	0,3908	5,32
α-2-HS-glycoprotein (FETUA)	EHAVEGDCDFQLLK	0,1884	0,0227	12,06
Fibrinogen α Chain (FIBA)	HQSACK	0,3063	0,0233	7,61
Fibrogen β chain (FIBB)	ECEEIIR	3,3678	0,2490	7,39
	LESDVSAQMEYCR	19,6554	2,2969	11,69
	NYCGLPGEYWLGNCK	2,9633	0,0800	2,70
	VYCDMNTENGGWTVIQNR	7,8448	0,4680	5,97

Fibrinogen γ Chain (FIBG)	DCQDIANK	5,4036	0,3049	5,64
Fibronectin (FINC)	ISCTIANR	6,2786	0,9443	15,04
Hémopexine (HEMO)	DYFMPCPGR	0,8861	0,1626	18,35
	VDGALCMEK	7,3532	0,1672	2,27
	YYCFQGNQFLR	2,8114	0,3168	11,27
Haptoglobine (HPT)	SCAVAEYGVYVK	3,8550	0,3100	8,04
	SPVGQPILNEHTFCAGMSK	0,2974	0,0273	9,19
	VMPICLPSK	4,0260	0,2062	5,12
	YVMLPVADQDQCIR	4,9505	0,6597	13,33
Human Serum Albumin (HSA)	AACLLPK	1,8278	0,1583	8,66
	ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK	3,9889	0,4434	11,12
	CASLQK	0,0486	0,0042	8,71
	DVCK	14,3457	0,5285	3,68
	EFNAETFTFHADICTLSEK	0,5035	0,0277	5,49
	ETCFAEEGK	4,9597	0,2642	5,33
	LCTVATLR	2,4154	0,2339	9,68
	LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK	0,0526	0,0018	3,50
	NECFLQHKL	0,2243	0,0159	7,09
	QNCLEFEQLGEYK	3,0305	0,0897	2,96
	RPCFSALEVDETYVPK	5,9225	0,2800	4,73
	SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESK	0,1699	0,0046	2,73
	YICENQDSISSK	2,1541	0,0863	4,01
Immuno-globulin κ Constant (IGKC)	SGTASVVCLLNIFYPR	9,6040	1,2671	13,19
	VYACEVTHQGLSSPVTK	0,1220	0,0074	6,09
Human Sero-transferrin (TrH)	ASYLDCIR	1,0234	0,0380	3,72
	DCHLAQVPSHTVVAR	0,1192	0,0104	8,76
	DDTVCLAK	1,4491	0,2189	15,11
	DQYELLCLDNTR	2,3201	0,1826	7,87
	DSSLCK	0,0663	0,0053	8,04
	DYELLCLDGTR	3,9279	0,2719	6,92
	FDEFFSAGCAPGSK	1,9739	0,1579	8,00
	INHCR	2,0940	0,3273	15,63
	KPVEEYANCHLAR	3,0774	0,3395	11,03
	SAGWNIPIGLLYCDLPEPR	2,1177	0,2235	10,56
	SCHTAVGR	0,2272	0,0213	9,38
	SCHTGLGR	0,1330	0,0126	9,50
	SVIPSDGSPVACK	1,6695	0,0445	2,66
	WCALSHHER	0,0235	0,0025	10,73
	WCAVSEHEATK	0,1636	0,0056	3,44

Tableau 17: Moyenne, écart-type et coefficient de variation des ratios d'oxydation des 73 couples de peptides Cys-SOH/Cys-SH calculés grâce à l'analyse PRM-LID de douze QC avec la cohorte d'échantillons de plasma.