

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODE D'ANALYSE D'UN BIOMARQUEUR
DE TOXICITÉ À PARTIR DE LA SÉRUM ALBUMINE MODIFIÉE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
SOUADE BEN HADDOU

FÉVRIER 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement et avec beaucoup de sincérité la Professeure Lekha Sleno de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis d'effectuer mes études. Je la remercie pour sa patience et sa pédagogie mais également pour son écoute, ses bons conseils, et toutes les corrections qu'elle a apporté à ce mémoire. Merci !

Cette maîtrise en chimie a été pour moi une expérience professionnelle et personnelle très enrichissante.

Je remercie Tze Chieh Shiao et le Professeur René Roy pour leur collaboration dans la synthèse de plusieurs produits synthétiques au cours de nos travaux.

Je remercie les organismes tels que le CRSNG et le GRASP qui ont financé le projet.

Je remercie également les membres de mon équipe pour tous les bons moments qu'on a pu passer ensemble : Lam, Leanne, Yasmin, et André, mais aussi aux nouveaux arrivants Makan, Julie-Anne et Michel.

Enfin, je remercie mes parents ainsi que toute ma famille pour leur soutien, leurs motivations et tous leurs encouragements.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

*À mes parents,
pour vos encouragements et votre soutien*

AVANT-PROPOS

L'arrivée chaque année de nouvelles molécules chimiques sur le marché du médicament montre un essor de l'industrie pharmaceutique. Néanmoins, certains médicaments sont responsables d'effets secondaires graves, induisant de la toxicité dans le corps. De nos jours, les techniques d'analyses de ces médicaments sont de plus en plus sophistiquées, les biomarqueurs de toxicité utilisés sont souvent issus de matrices biologiques ou mimant une structure biologique comme des peptides. La mise en place d'une méthode d'analyse applicable à la protéine la plus abondante du sang permettrait de l'utiliser comme biomarqueur de toxicité avant la mise sur le marché du médicament. Le but étant de mesurer le risque du médicament en utilisant un biomarqueur commun à tous les individus afin de prévenir les effets secondaires issus des réactions indésirables induites par le médicament. Notre projet d'étude est la mise en place d'une méthode d'analyse en LC-MS de la formation d'adduits à partir de métabolite réactif (MR) issus de médicament sur la sérum albumine humaine (HSA) qui pourrait être utilisée durant les essais cliniques et précliniques comme biomarqueur de toxicité.

Ce travail présenté a été un long cheminement. Tout d'abord, la validation de l'adduit formé à partir de MR issus de médicament déjà sur le marché, en utilisant un peptide synthétique mimant le site actif de la sérum albumine. Un problème de quantification de cet adduit s'est posé durant l'étape de digestion. Puis, la validation de cette méthode de quantification par optimisation du protocole de digestion et l'ajustement de différents paramètres qui ont rendu possible la quantification. La méthode a été optimisée pour l'albumine non modifiée, il reste à expérimenter la formation de l'adduit et voir si la méthode est applicable comme méthode standard à tous types de médicaments capables de former des adduits sur la sérum albumine humaine. Pour au final, identifier et classer ces différents médicaments en fonction de leurs propriétés et de leurs impacts sur la sérum albumine humaine.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
NOMENCLATURE DES ACIDES AMINÉS	xi
RÉSUMÉ	xii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1. La sérum albumine : une protéine plasmatique	1
1.1.1. Le plasma composant majeur du sang.....	2
1.1.2. La sérum albumine	4
1.2. De la biotransformation du médicament à la formation d'adduit d'albumine.....	10
1.2.1. Définition et principe du métabolite réactif.....	10
1.2.2. Le glutathion : outil de validation de la formation d'adduits	15
1.3. Techniques d'analyses appliquées à l'étude des peptides et des protéines	18
1.3.1. Incubations en présence d'enzymes de digestions.	19
1.3.2. Purification des protéines	24
1.3.3. La chromatographie liquide à haute performance.	26
1.3.4. La spectrométrie de masse.....	30
1.4. La spectrométrie de masse en tandem	43
1.4.1. La fragmentation par dissociation induite par collision (CID).....	44
1.4.2. Exemple d'application sur un spectre MS/MS obtenus sur un instrument de type QqLIT	47
1.4.3. Les différents modes de balayages d'un instrument classique type QqQ en comparaison aux instruments hybrides QqLIT et QqTOF	49
CHAPITRE II	
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	53
2.1. Matériels.....	53
2.2. Méthodologie.....	53
2.2.1. Synthèse du QCCPF.....	54

2.2.2. Validation du trappage du métabolite réactif de médicament par l'utilisation de deux agents de trappage : le glutathion et le QCCPF.....	55
2.2.3. Préparation à l'analyse des peptides d'albumines.	57
CHAPITRE III	
RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	62
3.1. Validation du QCCPF comme agent de trappage.....	62
3.2. Mise en place de la méthode de digestion de l'albumine à l'analyse du peptide constitué de la cystéine 34.....	75
3.2.1. Optimisation du protocole de digestion de l'albumine.....	75
3.2.2. Description des logiciels du Triple TOF 5600 dans le traitement des données.....	78
3.3. Méthode de quantification de l'étalon interne à partir d'un mélange d'albumine humaine et de rat	86
CHAPITRE IV	
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	97
BIBLIOGRAPHIE.....	100
RÉFÉRENCES DES FIGURES	103

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Maintien de la pression oncotique par la concentration d'albumine à l'intérieur du capillaire.	3
1.2 Séquence peptidique des 50 premiers acides aminés de la « pré-pro-albumine » chez l'homme, le bovin et le rat.	5
1.3 Structure 3D de la HSA avec les 3 domaines et les 3 sites de liaisons.....	6
1.4 Sites de liaisons des molécules endogènes sur la HSA par cristallographie.....	8
1.5 Types de liaisons du groupement thiol de la cystéine.....	9
1.6 Métabolisme du médicament et les risques de formation de MR.....	12
1.7 Formation et détection d'un métabolite stable.....	14
1.8 Formation d'un adduit à partir d'un MR sur une protéine ou un agent de trappage.....	14
1.9 Formation du métabolite réactif NAPQI.....	15
1.10 Structure de 2 agents de trappages : le glutathion et le QQCPF.....	17
1.11 Sites de liaison de l'albumine humaine.	18
1.12 Groupements réactifs des acides aminés que constitue une protéine.....	19
1.13 Mécanisme d'action de l'IAM sur une cystéine de l'albumine.....	20
1.14 Mécanisme d'action de la pepsine.	22
1.15 Les différentes polarités des phases stationnaires utilisées en SPE.....	24
1.16 Groupement fixé sur l'adsorbant SCX (Strata-XC) et HLB (Oasis).	25
1.17 Appareillage classique d'une HPLC.....	27
1.18 Séparation de 5 peptides standards sur la colonne Kinetex C18-RP HPLC.....	28
1.19 Corrélations entre résolution et structure des particules.....	29
1.20 Principe du LC-MS.....	31
1.21 Spectre MS obtenu en (HR) par un ESI-TOF de l'ion $(M+5H)^{5+}$ de l'insuline.....	33
1.22 Principe de l'ionisation de la source MALDI.....	34
1.23 Principe de l'ionisation de la source ESI.....	35
1.24 Représentation théorique des ions multichargés d'une protéine de 10 000 Da.....	36
1.25 Spectre MS en ESI(+) et ESI(-) de la myoglobine.....	37
1.26 Structure du quadripôle simple.....	40
1.27 Représentation des équations du principe du temps de vol.....	41
1.28 Expression de la résolution d'un TOF.....	41
1.29 Le TOF en mode linéaire et en mode réflectron.....	42
1.30 Les différents types de fragmentation d'un peptide obtenus par CID.....	45
1.31 Représentation de la cellule de collision q2 dans un QqLIT.....	46
1.32 Spectre MS/MS du peptide QQCPFDEHVK à une énergie de collision de 28 eV.....	48
1.33 Représentation du QqLIT et du QqTOF.....	50
1.34 Les différents types de balayages réalisables dans une cellule de collision q2 sur un instrument de type QqQ classique.....	51
2.1 Synthèse du pentapeptide synthétique : le QQCPF.....	54
2.2 Gradient d'éluion de la colonne RP-HPLC Thermo beta-basic.....	56
2.3 Principe de la purification SPE et l'éluion des peptides d'intérêts.....	59
2.4 Gradient utilisé pour la colonne RP-HPLC Kinetex C18.....	60

Figure	Page
3.1 Voies de formation des métabolites réactifs et des adduits de GSH pour l'APAP, le fipexide et l'atrazine	63
3.2 Voies de formation des métabolites réactifs et des adduits de QQCPF pour l'acétaminophène, le fipexide et l'atrazine.	64
3.3 Chromatogramme de l'extraction des ions (EIC) des adduits QQCPF à ± 10 ppm	66
3.4 Chromatogrammes (EIC) des adduits GSH à ± 10 ppm	67
3.5 Spectre MS/MS de l'adduit QQCPF+APAP (-2H) en mode EPI.	69
3.6 Spectre MS/MS de l'adduit GSH+APAP (-2H) en mode EPI.	70
3.7 Spectre MS/MS de l'adduit QQCPF-FIP-(CH ₂) en mode EPI	71
3.8 Spectre MS/MS de l'adduit GSH-FIP-(CH ₂) en mode EPI.	72
3.9 Spectre MS/MS de l'adduit QQCPF+ATZ (-HCl) en mode EPI	73
3.10 Spectre MS/MS de l'adduit QQCPF+ATZ (-2H) en mode EPI	73
3.11 Spectre MS/MS de l'adduit GSH+ATZ (-HCl) en mode EPI.	74
3.12 Spectre MS/MS de l'adduit GSH+ATZ (-2H) en mode EPI.	74
3.13 Résumé des conditions d'incubations de chaque enzyme en présence d'albumine humaine ou de rat.	76
3.14 Illustration de la page obtenue après l'exécution de la recherche sur Protein Pilot d'un échantillon d'albumine humaine digéré à la trypsine.	78
3.15 Illustration des données d'un peptide digéré par la pepsine avec l'identification des fragments issus de la fragmentation par Protein Pilot.	80
3.16 Superposition des EIC des peptides issus de la digestion à la pronase.	82
3.17 Superposition des EIC des peptides issus de la digestion à la trypsine	83
3.18 Superposition des EIC des peptides issus de la digestion à la pepsine	84
3.19 Résumé des étapes impliquant l'analyse d'un mélange d'albumines constitué de ratios différents entre l'albumine de rat et humaine.	87
3.20 EIC des peptides du site actif des deux albumines (rat et humain) avec un ratio de 1/5 (A) et 5/1 (B) à des temps de digestions de 2h et 8h.	88
3.21 Liste des peptides les plus abondants chez l'homme à gauche et chez le rat à droite	90
3.22 EIC des ions multichargés chez l'homme et le rat ainsi que leurs spectres MS respectifs obtenus en mode ESI(+) sur le triple TOF 5600	92
3.23 EIC des peptides du HSA et RSA utilisés pour le calcul du ratio des protéines, le tableau montrant la somme des aires de tous les peptides pour chaque protéine et la quantification résultante	94
3.24 Droite de quantification en utilisant les données du tableau 3.3.	96
4.1 Objectif de l'utilisation de la sérum albumine comme biomarqueur sanguin.	99

Remarque : Les références des figures tirées de sites internet et de publications se situent dans la partie référence des figures.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Peptides théoriques issus de la digestion à la trypsine.....	23
1.2 Peptides théoriques issus de la digestion à la pepsine.	23
1.3 Peptides théoriques issus de la digestion à la pronase.	23
1.4 Application de calcul des masses du bromure de méthyle CH ₃ Br.....	32
1.5 Masses théoriques des fragments du peptide QQCPFDEHVK.....	48
3.1 Récapitulatif des adduits identifiés du QQCPF par LC-ESI-TOF.....	66
3.2 Récapitulatif des adduits identifiés du GSH par LC-ESI-TOF.....	67
3.3 Résumé des aires des peptides sélectionnés de la HSA et la RSA.	95

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADR	Réaction médicamenteuse idiosyncratique
APAP	Acétaminophène
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
BSA	Sérum albumine bovine
Da	Dalton
ESI	électrospray ionisation
GSH	Glutathion
HSA	Sérum albumine humaine
HRMS	High resolution mass spectrometry ou spectrométrie de masse à haute résolution
IAA	2-iodoacetic acid
IAM	2-iodoacétamide
LC-MS	Liquid chromatography coupled to mass spectrometry ou chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry ou chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization la désorption/ionisation laser assistée d'une matrice
mg/ml	milligramme / millilitre
mM	milli-Molaire
MR	Métabolite réactif
MRM	Multiple reaction monitoring ou Analyse des réactions multiples
MS	Mass spectrometry ou spectrométrie de masse
NADPH	Nicotinamide adénine di nucléotide 2'-phosphate réduit
NAPQI	N-acetyl-p-benzoquinone imine
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonate d'ammonium
RP	Reverse phase ou phase inversée
RSA	Sérum albumine de rat
SPE	Solid phase extraction ou extraction sur phase solide
SIM	Single ion monitoring ou Détection d'un ion sélectionné
SRM	Selected reaction monitoring ou Détection de réaction sélectionnée
UV	Ultra Violet

NOMENCLATURE DES ACIDES AMINÉS

<u>Nom</u>	<u>Code à lettre</u>	<u>Code à 3 lettres</u>
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Acide Aspartique	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Acide glutamique	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
tryptophane	W	trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

RÉSUMÉ

Certains médicaments en se métabolisant dans le corps forment des métabolites dits « réactifs » (MR) qui peuvent entraîner une toxicité en se liant de manière covalente à des protéines pour former des adduits. Notre étude se concentre sur l'analyse d'adduits formés à partir d'une protéine sanguine : la sérum albumine humaine. En particulier, les adduits formés au niveau du site actif de l'albumine situé sur la cystéine en position 34. L'objectif principal de ce travail était de mettre en place une méthode d'analyse en chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) permettant la détection et la caractérisation des adduits peptidiques issus de la sérum albumine modifiée.

Le travail a consisté tout d'abord à valider par des réactions *in vitro* la formation d'adduit issus de médicaments connus pour former des MR avec un antioxydant naturel : le glutathion (GSH). En parallèle, en mimant le site actif de la sérum albumine humaine avec un peptide synthétique, le QQCPF, le profil de fragmentation en LC-MS/MS des adduits formés avec le QQCPF ont été comparé avec ceux obtenus par le GSH et ont permis de le valider comme agent de trappage.

Pour de futures réactions *in vivo*, l'identification des adduits d'albumines en LC-MS implique une étape de digestion de l'albumine en peptides, le protocole de digestion de l'albumine en comparant plusieurs enzymes a été optimisé pour l'analyse en LC-MS des peptides digérés comportant la cystéine 34. Par ailleurs, une méthode de quantification de ce peptide modifié à été mise en place par l'introduction d'un étalon interne provenant d'une autre espèce d'albumine, l'albumine de rat.

Le but ultime est que la sérum albumine soit utilisée comme biomarqueur sanguin de toxicité en utilisant cette méthodologie qui permettra avec un prélèvement sanguin d'identifier à partir de la sérum albumine humaine modifiée, la toxicité du médicament ingéré et ainsi améliorer la prévention de risque du médicament.

Mots clés : Sérum albumine, métabolite réactif, adduits, liaison covalente, spectrométrie de masse, fragmentation, séquençage, chromatographie liquide.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 La sérum albumine : une protéine plasmatique

La protéomique par définition consiste à étudier des protéines qui sont le résultat de l'expression des gènes en fonction de leurs régulations, leurs modifications et leurs interactions au cours du développement d'une cellule. La cible de notre projet concerne une des protéines plasmatiques : la sérum albumine humaine (HSA). Pour comprendre son implication dans le plasma et son rôle indispensable dans le sang en termes d'équilibre d'un individu, une première partie va décrire les différents éléments du système circulatoire ainsi que les fonctions qui lui sont appropriées dans ce système. Alors pourquoi s'intéresser à cette protéine ?

L'albumine est l'une des protéines les plus étudiées. Elle est souvent étudiée pour sa fonction de transporteur dans l'étude d'interaction avec d'autres molécules ou avec d'autres protéines [1, 2]. La sérum albumine représente 55% des protéines totales du plasma sanguin. Par son abondance, et son transit entre les différents organes, elle est le reflet de l'activité protéique d'un individu à un moment donné, elle a un rôle majeur de transporteur de molécules endogènes et exogènes comme les médicaments [3]. Ces molécules exogènes qui interagissent avec cette protéine sont un support d'information concernant les types de liaison formés entre ces deux entités et les conséquences de ces liens formés temporairement ou de manière irréversible du point de vue de la toxicité que cela peut impliquer.

Notre cible concerne les molécules exogènes qui vont se lier de manière covalente à l'albumine, pour former un adduit protéine-petite molécule. Notre intérêt se concentre sur les adduits formés à partir des métabolites réactifs issus de médicaments. L'albumine est constituée d'une cystéine au niveau de son site actif en position 34, comportant un groupement thiol libre connu pour être le lieu de réaction [4]. La formation d'adduits entre le

métabolite réactif (MR) et l'albumine entraîne une modification de l'albumine de manière irréversible, ce qui peut induire de la toxicité dû au médicament si cette albumine modifiée n'est pas éliminée par le corps. En mesurant la fixation du MR sur l'albumine, il est possible de quantifier la toxicité du médicament en fonction de sa fixation sur l'albumine. Le but étant de mettre en place une méthode d'analyse qui permettrait la détection et la quantification de ces adduits formés, et ainsi attribuer à la sérum albumine le rôle de biomarqueur de toxicité sanguin.

Après avoir défini le rôle de l'albumine au sein du plasma, une deuxième partie sera consacré à définir ce qu'est un métabolite réactif (MR) formé à partir d'un médicament, et la troisième partie comprendra, dans un premier temps, la méthodologie et les techniques d'analyses les plus communément utilisées dans l'analyse des protéines et des peptides qui sont la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) et ensuite une familiarisation à l'outil de mesure utilisé durant nos travaux en laboratoire.

1.1.1 Le plasma composant majeur du sang

Dans la plupart des organismes eucaryotes, les cellules sont ancrées, elles ne peuvent pas se déplacer pour aller chercher les nutriments nécessaires pour leur fonctionnement. Pour combler ses besoins énergétiques et éliminer les déchets métaboliques tels que le dioxyde de carbone généré lors de la production d'ATP, c'est l'oxygène qui vient à elles [5]. Les deux liquides qui assurent cette fonction sont le sang et le liquide interstitiel où des échanges permanent ont lieu entre ces deux compartiments.

Le liquide interstitiel est le liquide qui enveloppe toutes les cellules d'un organisme. Par concomitance, les nutriments provenant du tube digestif et l'oxygène des poumons sont acheminés par diffusion à travers le sang jusqu'à la cellule. Et inversement pour l'élimination des déchets métaboliques et du CO_2 , la circulation se fait des cellules au sang par diffusion à travers le liquide interstitiel jusqu'à l'expulsion au niveau des poumons, des reins et de la peau.

Le sang, de par sa composition, est constitué d'une matrice extracellulaire liquide qui est le plasma sanguin, et d'une partie solide traditionnellement appelée les éléments figurés [5]. Chez un individu normal, le sang représente, à lui seul, 8% du poids total de l'individu. Étant l'élément important dans la régulation du système circulatoire d'un organisme, il permet le maintien de la pression osmotique. Il permet également la régulation de la température corporelle constante à 37°C ainsi que le maintien à un pH constant des cellules de l'ensemble de l'organisme à 7,35-7,45. La centrifugation d'un prélèvement sanguin sépare le tube de telle sorte que la partie soluble, le plasma soit en suspension, et la partie solide : les éléments figurés, soit précipitée vers le fond du tube centrifugé. Le plasma est de couleur jaunâtre constitué de 91.5% d'eau et de 8.5% de solutés. La partie soluté contient des protéines solubles (plasmiques) et un ensemble d'électrolytes, de nutriments, de substances régulatrices (enzymes, hormones), de gaz et de déchets cellulaires [5, 6]. Par l'intermédiaire des protéines plasmiques, le plasma joue le rôle de transporteur de ces substances d'un point à un autre, permettant ainsi la communication entre les organes, et les échanges par diffusion entre le sang et le milieu interstitiel. Les protéines plasmiques sont composées de 55% d'albumine, de 38% de globulines, et de 7% de fibrinogènes et d'une petite quantité d'hormones. Par leur présence dans le plasma, elles jouent un rôle indispensable dans le maintien du volume constant des vaisseaux sanguins. En particulier la sérum albumine, par son abondance et son poids moléculaire 66 500 Da permet le maintien de la pression osmotique par l'intermédiaire de la pression oncotique décrite dans la figure 1.1.

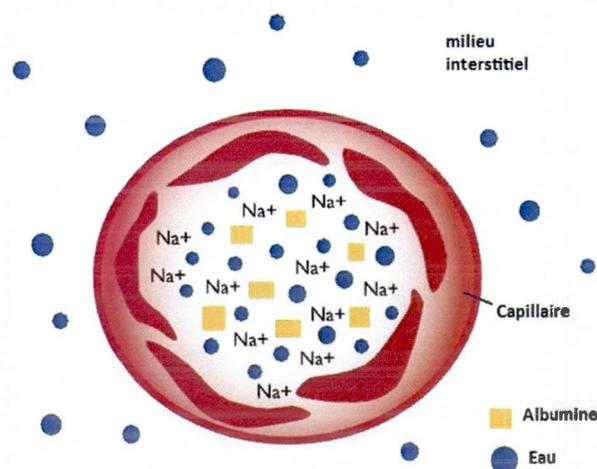


Figure 1.1 : Maintien de la pression oncotique par la concentration d'albumine à l'intérieur du capillaire.

Le maintien de cette pression dans le plasma, est essentiellement dû à la sérum albumine représentant la plus grande concentration en protéines dans le sang. En effet, elle est de l'ordre de 50 mg/ml dans le plasma contre 30 mg/ml dans le liquide interstitiel. Pour une membrane semi-perméable, la pression oncotique exercée par une substance est directement proportionnelle à sa concentration et inversement proportionnel à son poids moléculaire [6].

Dans la figure 1.1, l'albumine attire les ions sodiums (Na^+), l'eau se déplace du milieu le moins concentré au plus concentré, grâce à ce déséquilibre de concentration, l'albumine oblige le liquide à rester dans le milieu où elle se trouve. Ces protéines plasmatiques sont le reflet de l'activité protéique d'un individu. En effet, l'albumine permet, entre autre, le transport de molécules non solubles comme les hormones et les acides gras libres qui formeraient des agrégats en temps normales. Les globulines, quand à elles, sont divisées en trois groupes : les alphas et les betas qui sont impliquées dans le transport des substances liposolubles (fer, vitamine, lipides) et les gammas globulines dans le processus de protection dans le système immunitaire.

1.1.2 La sérum albumine

1.1.2.1 La synthèse de la sérum albumine et ses propriétés

L'albumine à l'origine est un terme utilisé pour désigner une protéine ou un groupe de protéine qui sont soluble dans l'eau. Au cours de nos travaux, l'albumine (de rat, bovine et humaine) a été étudiée et utilisée afin de mettre en évidence les similitudes et les différences entre ces différentes espèces. L'albumine est exclusivement synthétisée par le foie, à raison de 12 à 20 g par jour. Elle a un temps de demi-vie de 18 jours. Dès sa formation, elle est directement libérée dans la circulation sanguine. Les cellules hépatiques (hépatocytes) synthétisent l'albumine sous forme de « pro-pré-albumine ». Pour obtenir l'albumine mature, cette chaîne peptidique est précédée d'un pro-peptide de 6 acides aminés à l'extrémité N-terminale de la chaîne peptidique, qui est lui-même précédé du peptide signal comportant 18 résidus qui sont ensuite éliminés au cours du processus cytoplasmique de l'hépatocyte. Comme l'illustre la figure 1.2, elle représente la séquence de la pré-pro-albumine et les

différents peptides qui vont être clivés au cours de la maturation de l'albumine. Le peptide signal (en vert figure 1.2) et le pro-peptide (en bleu figure 1.2) sont identique d'une espèce à l'autre, entre celui de l'homme, du bovin et du rat. Le site actif de plusieurs espèces est également représenté en rouge, la cystéine 34, qui est très similaire entre l'albumine bovine et humaine.

	1	34	50
	MKWVTFISLLFLSSAYS	RGVFRDDAHKSEVAHRFKDLG	EENFKALVLI
	HOMME	FAQYL	LQQCPFED
	MKWVTFISLLLLFSSAYS	RGVFRDDTHKSEIAHRFKDLG	EEHFKGLVLI
	BOVIN	AFSQYL	LQQCPFDE
	MKWVTFLLLLFISGS	AFSRGVFRREAHKSEIAHRFKDLG	EQHFKGLVLI
	RAT	AFSQYL	LQKCPYEE
			HIKLVQEVT
			DFA

Figure 1.2 : Séquence peptidique des 50 premiers acides aminés de la « pré-pro-albumine » chez l'homme, le bovin et le rat. Peptide signal (vert). Pro-peptide (bleu). Peptides entourant la cystéine 34 (rouge).

Pour les mammifères, la « pré-pro-albumine » est transformé en « pro-albumine » dans la lumière du réticulum endoplasmique. Elle transite vers l'appareil trans-golgien où la protéine mature est formée par la coupure du pro-peptide. Chez l'homme, l'albumine contient 585 acides aminés, traduit de son ARN messenger, un résidu de tryptophane en position 214, un faible taux de résidus de méthionine, et une plus grande abondance d'acides aminés chargés, tels que des acides aminés basiques, lysine et arginine mais aussi des acides aminés acides tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique [7, 8]. Tous ces résidus s'ionisent et participent à la solubilité de l'albumine dans le plasma. La molécule finale a une forme ellipsoïde qui la rend peu visqueuse et très flexible. Sa dégradation implique des organes d'élimination, elle se fait à 50% dans le muscle et la peau, à 15% dans le foie et 10% à travers le tractus intestinal [2].

1.1.2.2 Structure et fonction de l'albumine

La structure primaire d'une protéine correspond à sa séquence en acides aminés, traduite à partir de l'ARN messenger. Les acides aminés sont composés d'une base fondamentale

constituée d'une amine et d'un acide carboxylique. La liaison peptidique est la réaction entre l'amine en N-terminale d'un acide aminé et l'acide en C-terminale d'un autre acide aminé. Pour chaque acide aminé, la région latérale est variable, ce qui confère des propriétés physico-chimiques définis à petite échelle. Alors à grande échelle, lors de la formation de la structure mature d'une protéine, en fonction des acides aminés que la protéine constitue, cela va avoir un impact direct sur ses propriétés physico-chimiques et structurales, et ainsi sur la fonction et l'activité de cette protéine. La structure secondaire se manifeste par le repliement de la chaîne peptidique, ce maintien se fait par l'apparition des ponts hydrogènes entre les groupements amines NH et carbonyle CO de la chaîne peptidique, pour organiser la chaîne sous forme de feuillets et d'hélices. La structure tertiaire correspond au repliement de la chaîne dans l'espace, des interactions ioniques, des ponts hydrogènes, des interactions dipôle-dipôle, des interactions hydrophobes et des liaisons covalentes sous forme de ponts disulfures apparaissent. La sérum albumine est constituée de 68% d'hélices α , la figure 1.3 illustre les 3 domaines cylindriques de la sérum albumine humaine (HSA).

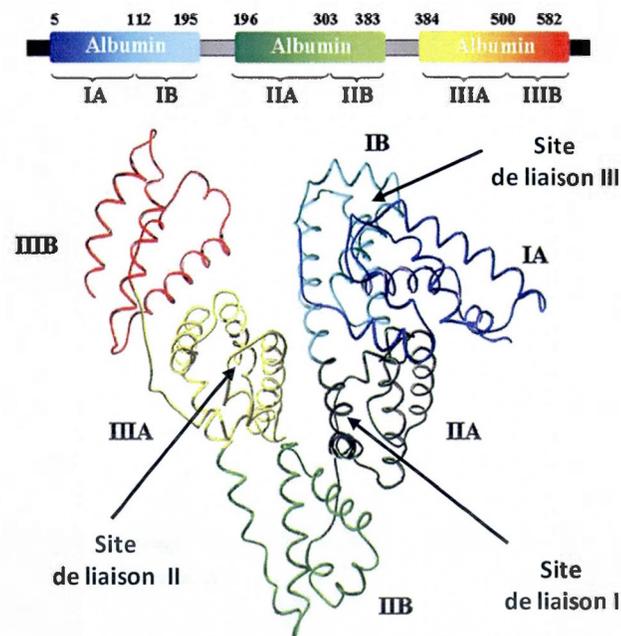


Figure 1.3 : Structure tridimensionnelle de la HSA avec les 3 domaines et les 3 sites de liaisons. Couleurs (domaine : IA (bleu), IB (bleu ciel), IIA (vert foncé), IIB (vert clair), IIIA (jaune), IIIB (rouge)).

Chaque domaine est constitué de 10 hélices qui forment des sous domaines A et B [7]. Le sous domaine A contient 6 hélices et le sous domaine B en contient 4. Le domaine I allant de l'acide aminé 5 à 195, le domaine II de l'acide aminé 196 à 383 et le domaine III de l'acide aminé 384 à 582.

Une dénaturation de la protéine, entraîne une incapacité à effectuer le travail auquel elle est destinée. Comme le décrit la figure 1.3, la sérum albumine est un monomère. Des études ont montré que chez l'homme, l'albumine avait 3 grands sites de liaisons, le site I, II et III. Ils sont constitués d'une poche hydrophobe qui a des capacités de flexibilités et d'adaptation, si bien que le médicament est compatible, et peut se retrouver enfermer à l'intérieur de cette poche par la structure des acides aminés qui la maintiennent [1, 7].

La figure 1.3 identifie la localisation de ces 3 sites de liaisons (sites de liaisons I à III) sur l'albumine humaine, deux d'entre eux sont des sites potentiels d'association à un grand nombre de substances naturelles ou étrangères tels que les médicaments [1]. Les sites de liaisons I et II de l'albumine sont situés au niveau des sous domaines IIA et IIIA [8]. En effet, le site I contient le résidu de tryptophane 214, il participe au maintien d'une poche hydrophobe. Pour le site II, une série d'acides aminés participe à des interactions hydrophobes par leur structure. Le site III correspond au site actif de la sérum albumine humaine (HSA), il est entouré de l'aspartate 38, de l'histidine 39 et de la tyrosine 84 qui ont une influence sur l'état de charge de cette cystéine. Il se situe au niveau du domaine I et du sous domaine IA. Ce site est constitué de la cystéine 34, qui joue un grand rôle dans le transport de molécules endogènes et exogènes [7].

L'albumine peut se lier à des molécules endogènes, des acides gras, des vitamines et des hormones [2]. Ses liaisons qui se forment sont des liaisons de types ioniques avec des interactions électrostatiques dû à l'albumine chargée négativement et aux molécules transportées chargées positivement ou sous forme de complexe positif. La figure 1.4 illustre toutes les interactions qui peuvent avoir lieu avec des molécules endogènes mais aussi avec des médicaments comme le diazépam et l'ibuprofène, ces travaux ont été effectués par cristallographie.

Ghuman et *al* ont étudié les interactions de 17 complexes sur l'albumine humaine par une technique d'analyse en cristallographie pour mettre en évidence les sites de liaisons entre les médicaments et la HSA [1]. Elle est également connue pour avoir des interactions avec les

métaux chargés positivement, en particulier, le nickel, le cadmium, le zinc, le magnésium et le cuivre [8, 9].

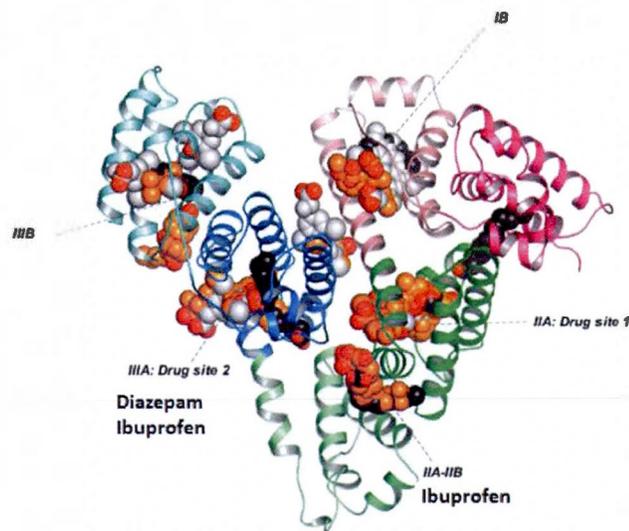


Figure 1.4 : Sites de liaisons des molécules endogènes sur la HSA par cristallographie. Ligands : O₂ (rouge), acides gras (noir), thyroxine hème (gris clair), médicament (orange).

Certains facteurs dans l'interaction albumine-médicament comme la température, le pH et la force ionique peuvent avoir une influence sur le nombre de sites de fixations de l'albumine en générant une compétition entre les médicaments et les molécules endogènes, étant donné que la fixation des acides gras par exemple et d'un médicament utilisent les mêmes poches du domaine de l'albumine compatible.

1.1.2.3 Implication de la cystéine 34 dans la formation d'adduit d'albumine

La HSA est un monomère retenue par 17 ponts disulfures [2]. Un pont disulfure est une liaison covalente entre deux cystéines, les deux atomes de soufre de chaque cystéine se lient pour former, par un lien covalent, un pont disulfure. La figure 1.5 illustre les types de liaisons covalentes entre la cystéine de l'albumine et des molécules endogènes [4]. Il a été montré que la HSA inhibe la production de radicaux libres oxygénés [10]. En effet, la cystéine 34 peut

réagir avec d'autres espèces électrophiles et ainsi donné à l'albumine des propriétés anti-oxydantes [7].

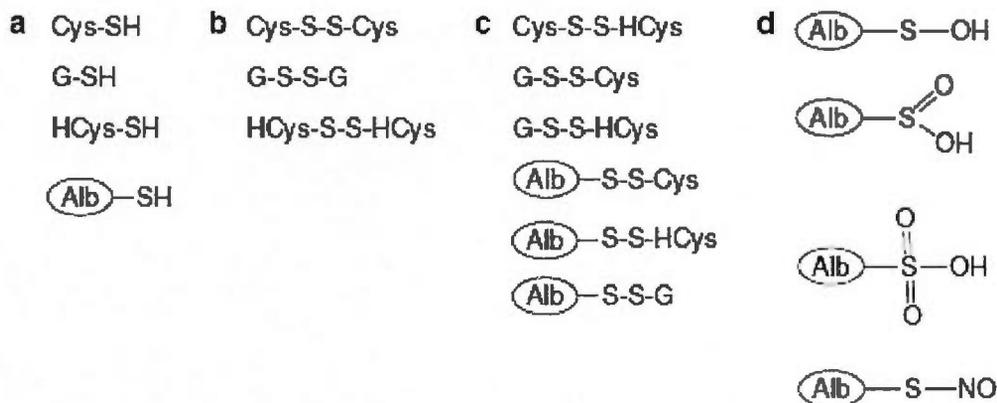


Figure 1.5 : Types de liaisons du groupement thiol de la cystéine. (a) la forme réduite. (b) pont disulfures. (c) disulfure d'albumine. (d) oxydation maximale de l'albumine [4]. Acide Sulphenique (SOH), acide sulphinique (SO₂H), acide sulphonique (SO₃H), oxyde d'amine (NO), alb : albumine, Cys : cysteine; G : glutathion; HCys:homocysteine.

La cystéine est un acide aminé soufré avec une chaîne latérale portant un groupement thiol CH₂-SH. C'est un site nucléophile réactif et ionisable avec un point isoélectrique de 5. Avec un pH à 7,4 dans le plasma, elle est sous la forme ionisée et peut réagir avec des molécules exogènes soufrées ou avec des espèces électrophiles pour former des adduits, qui peuvent oxyder l'albumine par leurs groupements thiols.

1.1.2.4 Intérêt de l'étude de la cystéine 34 de la sérum albumine

Cette nouvelle liaison formée entre la cystéine libre de l'albumine et la molécule forme un adduit d'albumine et ceci va perturber l'albumine dans ses différents rôles qui lui sont attribués. Cela peut induire de la toxicité car elle ne peut plus être reconnue par les molécules endogènes avec lesquelles elle interagit naturellement dans l'organisme. La formation de cet adduit est une étape indispensable dans la détermination d'un biomarqueur de toxicité [11].

Un biomarqueur de toxicité est défini comme un changement mesurable ou/et observable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire ou physiologique qui va révéler une exposition

passée ou présente à la substance chimique, ou/et à ses sous produits dégradés qui sont dits toxiques pour le corps humain [12]. Des études ont montrées qu'il était possible de mesurer la glycosylation de l'albumine, par mesure de ligand glycosylé formé. C'est une réaction réversible par la réaction du groupement carbonyle du glycane et un groupement amine de l'albumine. La fraction d'albumine glycosylée, chez les individus sains varie de 1% et dans le cas du diabète, ce taux augmente de 2 à 3 fois sa valeur. La quantification d'albumine glycosylée est devenue un biomarqueur pour le contrôle du glucose dans le diabète [10].

Etudier le site actif contenant la cystéine 34 de l'albumine permettrait d'évaluer les adduits qui pourraient se former entre l'albumine et les métabolites réactifs issus de médicament. L'objectif est de trouver un moyen de mesurer cet adduit formé entre cette cystéine 34 de l'albumine et le métabolite réactif afin de mettre en place une méthode analytique standard applicable à l'identification de toutes les molécules exogènes capables de se fixer sur l'albumine et également à la quantification de cet adduit formé.

1.2 De la biotransformation du médicament à la formation d'adduit d'albumine

1.2.1 Définition et principe du métabolite réactif

Le médicament est une substance qui va avoir des propriétés thérapeutiques ou préventives vis-à-vis des maladies humaines et animales. Lors de sa mise sur le marché, et lors de son développement en phase clinique, le médicament administré à des doses standards peut induire des effets secondaires du médicament relié à son métabolisme. Si elles provoquent des effets toxiques, ces réactions sont un problème réel de santé qui contribue à l'augmentation du taux de mortalité et de morbidité des patients.

C'est pourquoi, il est important d'identifier à un stade précoce, ce type de réaction dans le développement d'un médicament. Il existe plusieurs types d'ADRs (réactions médicamenteuses idiosyncratiques) qui affecte différents organes du corps mais souvent le foie est l'organe le plus touché [13, 14]. En effet, lors de son administration, le médicament est souvent liposoluble et subit plusieurs transformation afin de pouvoir agir à l'endroit qui

lui est destiné. Pour améliorer sa solubilité et faciliter son évacuation, des réactions de biotransformations ont lieu. La figure 1.6 illustre le métabolisme du médicament et les conséquences de la formation de métabolite réactif. Un médicament qui minimise le risque de toxicité est un médicament qui agit dans l'organe cible et qui entre dans le processus de biotransformation d'un métabolite « stable » (figure 1.6 : phase I et II) avec une élimination normale aux travers des poumons, des reins et de la peau. Un médicament, à l'opposé, instable va former des métabolites réactifs, et ces conséquences, représentés en rouge dans la figure 1.6, peuvent être multiples, étant donné qu'il n'est pas éliminé, il reste dans l'organisme. Dans un organisme, le parcours d'un médicament comprend plusieurs étapes, tout d'abord l'absorption par l'organisme, suivi de son transport à l'organe cible par le biais de transporteurs, puis il se retrouve métabolisé, puis éliminé. Le métabolisme du médicament est un processus développé par le corps pour rendre le médicament facilement éliminable.

Le foie est un organe qui à un rôle majeur de détoxification dans le métabolisme du médicament. Il contient les enzymes nécessaires pour métaboliser le médicament, en particulier la famille des cytochromes P450 [15]. Les cytochromes sont une famille de protéines membranaires situées dans la membrane du réticulum endoplasmique. La réaction d'oxydation effectuée par le cytochrome en présence de NADPH et d' O_2 est présentée dans la figure 1.6. Les voies métaboliques du médicament comprennent deux phases (I et II) [16]. Dans la phase I, le médicament est métabolisé par une réaction de biotransformation d'oxydation. Ce métabolite étant polaire, son devenir sera soit d'être éliminé directement par les processus appropriés, soit d'être le substrat dans le processus de métabolisme phase II, cette étape implique des transférases (figure 1.6), ce sont des enzymes qui vont transférer un groupement fonctionnel en réagissant avec un groupement/ atome du métabolite, ce qui va améliorer la solubilité du métabolite en le rendant plus hydrosoluble. Ces transférases peuvent être des sulfurtransférases avec le transfert d'un groupement sulfuré, des sulfotransférases avec le transfert de groupement sulfonique, des méthyltransférases avec le transfert de groupement carboné.

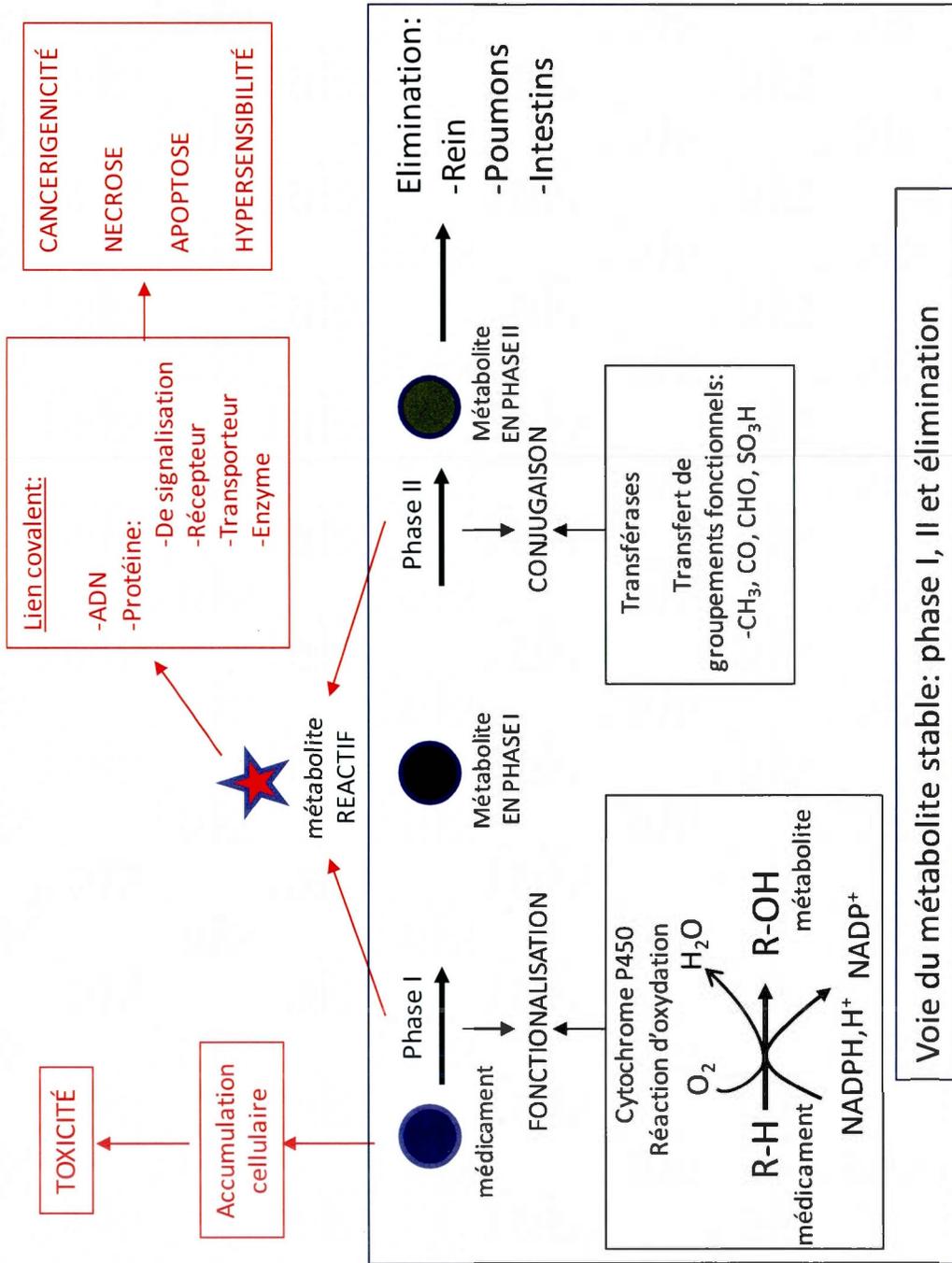


Figure 1.6 : Métabolisme du médicament et les risques de formation de métabolites réactifs.

Les réactions de phase I et II peuvent former ce type de métabolite réactif, nos travaux concernent l'étude de la formation d'adduits entre le métabolite réactif et la sérum albumine humaine (HSA). Cependant, la durée de vie du métabolite réactif est très rapide, ce qui le rend souvent non détectable directement en LC-MS. Plusieurs types de métabolites réactifs ont été répertoriés dans la littérature. En 2009, Stephan et *al*, ont exposé le top 200 médicaments réunissant 200 molécules mis sur le marché aux États Unis susceptibles de former des métabolites réactifs et de générer des ADRs [17].

L'étude des métabolites réactifs aide à déterminer la limite critique entre les protéines modifiées potentiellement capable de générer de la toxicité issues du médicament des protéines dont le lien covalent formé n'aura pas de conséquence notable. Dans les hépatocytes, les métabolites réactifs issus d'une réaction par le cytochrome P450, sont souvent des espèces électrophiles ou des radicaux libres. Ils peuvent former une liaison covalente, souvent irréversible avec des protéines.

De multiples publications ont montrés le lien entre la formation d'adduits, et l'apparition d'effets toxiques engendrés par l'ingestion de certain médicaments. Un lien évident a été montré par la prise de carbamazepine et nevirapine et la réaction immunitaire de type allergique, les molécules entraînent un profond désordre physiologique aux niveaux des cellules hépatiques [13, 18]. Ces deux molécules forment des adduits avec des protéines. Il s'en suit une réaction en chaîne qui va aboutir à la synthèse d'anticorps par les lymphocytes T et B. C'est aussi le cas du diclofenac qui peut induire une réaction immunitaire [13, 16]. C'est pourquoi, il est nécessaire avec les avancées technologiques d'identifier et de quantifier la présence d'adduits afin de pouvoir à long terme réussir à identifier toutes les cibles perturber par la formation de cet adduit et l'influence que cela peut avoir sur la fonction de ces molécules endogènes du point de vue fonctionnelle et structurales.

Nos travaux consiste à développer une méthode d'analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse LC-MS/MS capable de détecter des adduits d'albumine. La figure 1.7 illustre les étapes classiques de la détection en LC-MS/MS d'un métabolite stable.



Figure 1.7 : Formation et détection d'un métabolite stable.

La formation du métabolite réactif est dépendante de la structure du médicament et des groupes fonctionnels qu'il contient. En générale, les espèces électrophiles dur vont réagir avec les nucléophiles durs comme les groupements d'ADN et les résidus de lysines de protéines [13, 19]. La cystéine est un nucléophile « mou », c'est le cas du glutathion qui va réagir avec des électrophiles « mou ». L'extraction et la purification d'une protéine dans un mélange complexe reste une étape limitante. Et même si l'extraction était possible, l'identification de l'acide aminé qui a réagit avec la protéine ne serait pas reconnu parmi l'ensemble de la protéine totale. À ce jour, Il n'y a pas de techniques développées permettant d'isoler directement cet acide miné de la protéine native.

La figure 1.8 décrit les limitations dans l'identification directe de l'adduit d'une protéine en LC-MS/MS, et l'utilisation d'un agent de trappage. En effet, il est possible d'identifier de manière indirecte des métabolites réactifs par l'utilisation d'un agent de trappage, le glutathion, car la quantification directe des MR, chez un individu, reste non résolu à ce jour.

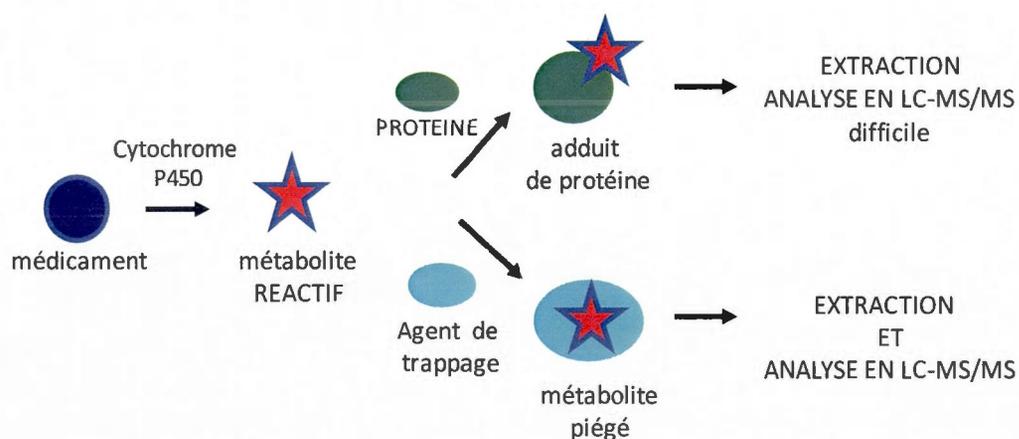


Figure 1.8 : Formation d'un adduit à partir d'un MR sur une protéine ou un agent de trappage.

1.2.2 Le glutathion : outil de validation de la formation d'adduits

Le glutathion ou le γ -L-glutamyl-L-cystéinyglycine (GSH) est un agent de trappage naturel, il est présent à des hautes concentrations à l'état physiologique dans le corps, en particulier dans le foie. C'est un tripeptide constitué d'un acide glutamique, d'une cystéine et d'une glycine, son poids moléculaire est de 307 Da.

Son rôle principal est de piéger les espèces oxydatives réactives présentes dans le corps, en formant des adduits avec elles pour faciliter leur élimination. La concentration physiologique du glutathion est de l'ordre de 10 mM dans le foie [13]. Le corps utilise le GSH comme une molécule anti-oxydante pour éliminer ces MR. Ses propriétés physiologiques *in vivo* sont utilisées *in vitro* pour identifier la formation d'un MR.

L'acétaminophène (APAP) est connu dans la littérature pour former des métabolites réactifs, lors de son administration. Il va subir une première transformation au niveau des cellules hépatiques [13, 15]. Après une série de réaction de transferts d'électrons, l'acétaminophène est métabolisé en N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI). La figure 1.9 décrit la réaction de formation du métabolite réactif à partir de l'APAP.

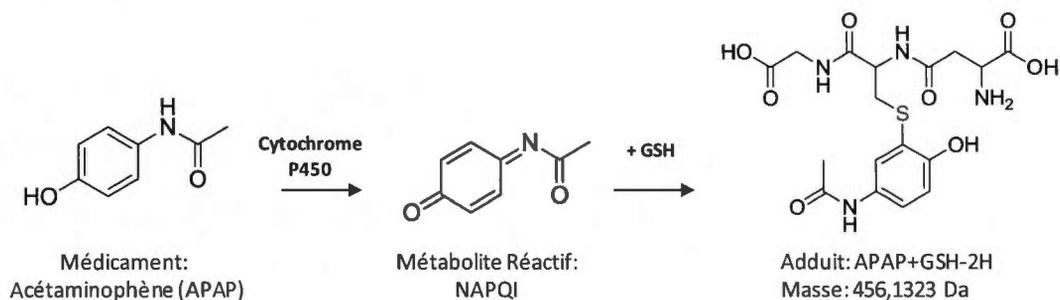


Figure 1.9 : Formation du métabolite réactif NAPQI.

Sa structure le rend réactif car l'ajout d'un oxygène forme une espèce électrophile, pouvant réagir avec des groupements nucléophiles. Cette molécule est très toxique car elle peut former un lien covalent avec des protéines [13]. Le NAPQI est tout de suite piégé par le glutathion. Il a été montré que même à des doses thérapeutiques, une quantité non négligeable d'APAP forme le NAPQI. Le traitement par intoxication par l'APAP est la N-

acétylcystéine qui va agir comme agent de trappage quand le glutathion endogène est insuffisant [13].

Pour l'APAP qui va suivre une voie de métabolite stable, des transférases se chargent de le fonctionnaliser par glucuronidation et sulfonation pour faciliter son élimination [13].

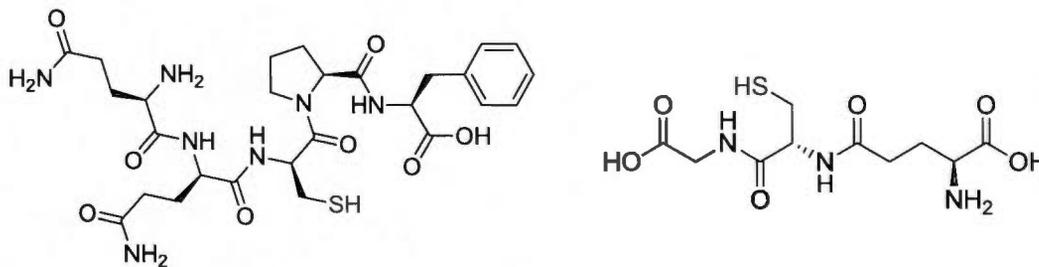
La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est une technique analytique permettant de détecter les adduits de GSH. La détection de l'adduit se fait par le biais d'une technique de transition SRM pour (*selected reaction monitoring*), elle permet d'enregistrer spécifiquement un processus de fragmentation et ainsi de valider la formation de l'adduit à partir de la GSH. Cette technique consiste à sélectionner la réaction de fragmentation qui se focalise sur la perte du fragment de GSH [18].

Partant de ce principe un métabolite réactif peut se lier à toutes molécules endogènes qui sera réceptive, ce peut être de l'ADN, des protéines et des métabolites [20]. Néanmoins, il est sûr que des adduits sont formés constamment, et la limitation reste la manière de les détecter.

La formation de liens covalents entre l'APAP et les protéines hépatiques qui induisent une hépatotoxicité, reste une voie d'étude pour l'identification de ces protéines cibles. Une surdose de l'APAP dans le foie entraîne une accumulation du NAPQI. L'adduit APAP-GSH (figure 1.9) a été mis en évidence, le $m/z = 457,2$ qui correspond à l'adduit protoné (figure 1.9) en MS, dans différentes espèces tels que le rat, la souris, le porc et l'homme avec des doses thérapeutiques [13]. Cela nous informe sur la formation de cet adduit sur d'autres espèces proches de l'homme dans les essais cliniques. C'est pourquoi, cette méthode pourrait être un moyen de détection *in vivo* des métabolites réactifs de médicament et de mettre en évidence des médicaments potentiellement toxiques.

Au cours de nos travaux nous avons effectué des expériences sous forme d'incubations *in vitro*, sur des microsomes de foies de rats en utilisant le fipexide, l'atrazine, et l'acétaminophène en présence de GSH [15, 21-24]. En parallèle, la même expérience a été réalisée en remplaçant la GSH par un peptide modèle synthétique qui mime le site actif de la sérum albumine humaine et bovine : le QQCPF. En effet, pour évaluer la réactivité du site actif de l'albumine, l'étude d'un agent de trappage synthétique avec des molécules déjà connue dans la littérature pour former des adduits de GSH est un moyen d'anticiper les réactions futures sur la protéine d'albumine complète. Le QQCPF est un pentapeptide

constitué de deux glutamines, d'une cystéine, d'une proline et d'une phénylalanine. La figure 1.10 illustre la structure du QQCPF et du GSH.



QQCPF

Formule brute: $C_{27}H_{39}N_7O_8S$

Masse : 621,7057 Da

Glutathion (GSH)

Formule brute: $C_{10}H_{17}N_3O_6S$

Masse : 307,0838 Da

Figure 1.10 : Structure de 2 agents de trappages utilisés dans nos travaux : le glutathion et le QQCPF.

Les analyses sont effectuées en LC-MS/MS sur un instrument hybride type quadripôle-trappe linéaire (QqLIT). Cette méthode permet d'effectuer des études structurales des adduits formés entre le fipexide, l'atrazine, l'APAP et les deux agents de trappage (GSH et QQCPF). La perte de neutre de 307 Da ou de 621 Da indique une perte du fragment neutre de GSH ou de QQCPF dans les spectres MS/MS.

En ce qui concerne l'albumine, de multiples publications ont montré des adduits formés qui sont souvent utilisés comme biomarqueurs de toxicité [10]. Dans le cas du naphthalène, le benzène, la différence de formation des métabolites réactifs dans différentes espèces peut nous éclaircir sur les mécanismes qui exercent une toxicité qui ne sont pas des médicaments mais des composés retrouvés dans la nature, inhalés par les individus [25, 26].

Cependant comme nous l'avons vu précédemment, la sérum albumine contient plusieurs sites de fixation, susceptible de se lier de manière covalente à un MR. D'autres études ont montré que la tyrosine 411 de l'albumine pouvait être modifiée en présence d'espèce organophosphorés comme le dichlorvos, un pesticide [27]. La figure 1.11 illustre les sites I et II qui sont des poches hydrophobes, ils peuvent interagir avec les médicaments [7], la cystéine du site actif en position 34 [10] et un autre site de liaison, la lysine 525.

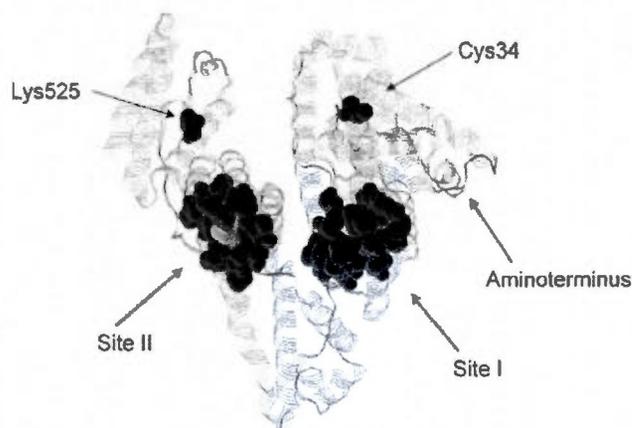


Figure 1.11 : Sites de liaison de l'albumine humaine.

Avec les avancées en protéomique, l'identification simultanée de plusieurs adduits de protéines, du peptide spécifique modifié est possible [27], ces informations ont aussi permis la localisation de la protéine dans la cellule hépatique : réticulum endoplasmique, cytosol, mitochondrie ou encore la membrane plasmique. Cette localisation nous renseigne indirectement sur la mobilité du métabolite réactif dans la cellule.

L'étape incontournable, en protéomique pour pouvoir identifier un acide aminé de la protéine portant la modification est l'étape de digestion. Cette digestion va permettre l'analyse des peptides digérés issus de la protéine, avec la masse de chaque peptide, ils seront séparables, identifiables et détectables en LC-MS et LC-MS/MS.

1.3 Techniques d'analyses appliquées à l'étude des peptides et des protéines

Une protéine est une macromolécule constituée d'un assemblage de résidus d'acides aminés. Ces acides aminés ont des propriétés physico-chimiques qui définissent leurs interactions. Sur l'ensemble, seule une petite portion contient des groupes fonctionnels réactifs susceptibles de réagir et interagir avec d'autres molécules. La structure de la chaîne principale est identique d'un acide aminé à l'autre constitué d'un groupement carboxyle COOH et d'une amine primaire NH₂, exception faite pour la proline, où la chaîne principale constitue une amine secondaire dans un cycle. Ces groupements peuvent s'ioniser sous la

forme COO^- et NH_3^+ . L'ionisation dépend du pH et au pH physiologique, les 2 groupements sont ionisés, conférant à la molécule la forme zwitterion qui est la forme neutre avec l'annulation de la charge. La chaîne latérale est la partie variable de l'acide aminé. La structure d'une protéine, est faite à partir de réaction en chaîne de liaisons peptidiques. Tous ces acides aminés vont définir les propriétés de la protéine, son comportement dans un milieu va dépendre de l'ensemble de leurs pKa. Le pH du milieu est directement relié à la valeur du pKa. Le pKa dépend de la température, de la force ionique mais aussi de l'environnement de ces groupements ionisables [28]. La préparation d'un échantillon nécessite de connaître ces paramètres pour utiliser les bons tampons et les bons pH adaptés à la protéine. La figure 1.12 illustre certains des acides aminés qui ont un groupement réactif [28].

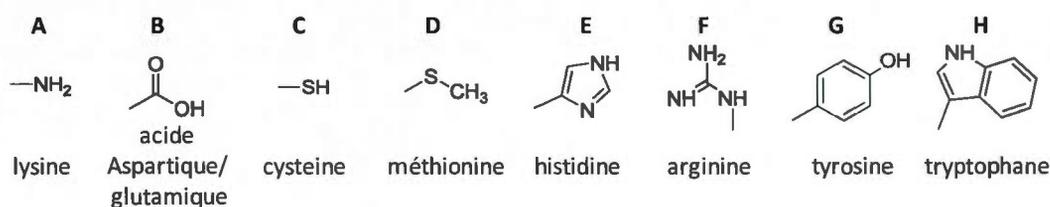


Figure 1.12 : Groupements réactifs des acides aminés que constitue une protéine. A.amine ; B.carboxyle ; C.sulfidryl; D.thioéther; E.imidazole; F.guanidyle; G.phénol; H.indole.

Leurs propriétés vont servir également lors de l'ionisation dans la source du spectromètre de masse que ce soit en mode positif, certains sites tels les amines vont être protonés, c'est le cas de la lysine et de l'arginine. Par contre en mode négatif ce seront les sites acides qui vont perdre un proton, comme l'acide aspartique et l'acide glutamique.

1.3.1 Incubations en présence d'enzymes de digestions.

L'utilisation de la digestion est une étape fondamentale en protéomique. La digestion peut être chimique ou enzymatique. L'objectif premier est de digérer la (ou les) protéine(s) par l'utilisation d'un agent chimique pour la digestion chimique ou d'endopeptidases et d'exopeptidases dans la digestion enzymatique, cette digestion agit sur ces liaisons

peptidiques. Cette méthode permet de dissocier la protéine en peptides qui eux sont plus facilement séparables et détectables en LC-MS.

Pour rendre la protéine plus accessible à l'enzyme de digestion, une étape en présence d'un agent dénaturant comme le DTT (dithiotréitol) permet de réduire les ponts disulfures mais aussi de retirer les interactions électrostatiques dus aux liaisons de types Vander Wall et aux ponts hydrogènes entre les acides aminés. Pour éviter la reformation des ponts disulfures, un agent d'alkylation peut être appliqué, nous avons testé au cours de nos travaux plusieurs agents alkylants comme le 2-iodoacétamide (IAM), l'acide 2-iodoacétique (IAA), le N-éthylmaleimide (NEM). Celui que nous avons sélectionné au final est l'IAM. La figure 1.13 illustre le mode d'action de l'IAM, c'est une expérience qui se fait dans l'obscurité car la molécule contient un atome d'iode, photosensible et volatile à la lumière.

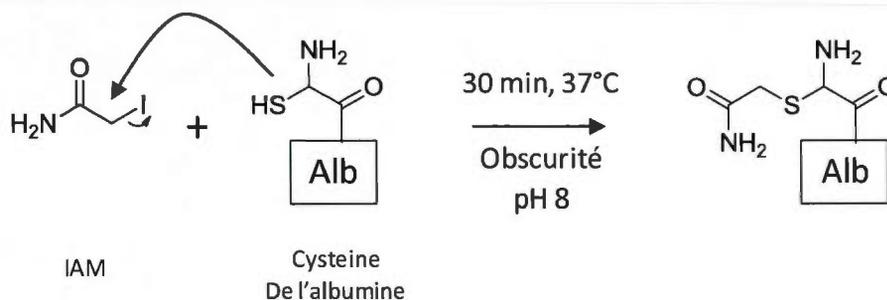


Figure 1.13 : Mécanisme d'action de l'IAM sur une cystéine de l'albumine. Alb : albumine.

De plus, cette alkylation, évite également la formation de cystéines oxydées qui peuvent nuire à l'intensité du signal d'un peptide donné. Elle a un effet positif sur la séparation en LC et améliore le signal en MS.

La digestion chimique fait intervenir des agents de clivage tels que : le bromure de cyanogène (Br-CN), le N-Bromosuccinimide (NBS) ou le HO-Br, le 2 nitro-5thiocyanobenzoate (NTCB) et l'hydrolyse acide en présence de HCl 6N très concentré. Br-CN a la particularité de couper à l'extrémité C-terminale des méthionines [28-30]. Le NBS et le HO-Br clivent aussi à l'extrémité C-terminale des tyrosines et des tryptophanes et le NTCB agit aux niveaux de l'extrémité N-terminale des cystéines réduites. Pour nos travaux sur l'albumine, nous n'avons pas effectué de digestion chimique, mais plutôt des digestions enzymatiques. Les enzymes sont des catalyseurs naturels, elles catalysent une réaction biochimique, en augmentant le processus de réaction.

La trypsine est l'une des premières enzymes utilisées en protéomique. C'est une protéase à serine avec un site actif constitué de la sérine, l'histidine et l'acide aspartique [31, 32]. Elle a un mode d'action spécifique en hydrolysant à l'extrémité C-terminale des acides aminés basiques comme la lysine et l'arginine. Les peptides formés par la trypsine ont des extrémités contenant un groupement amines, chargé sous la forme NH_3^+ , elle agit à un pH optimal de coupure situé entre 8-9 correspondant au pH utilisé au cours des incubations *in vitro* [11]. Pour ce faire, plusieurs méthodes de digestion impliquant différentes enzymes sont testées où chaque enzyme clive à des sites différents, pour donner des peptides avec des caractères physico-chimiques particuliers (taille, charge, hydrophobicité). Notre peptide d'intérêt est celui du site actif de l'albumine qui contient une cystéine libre. L'endoprotéinase Lys-C et Arg-C sont aussi des enzymes, qui coupent respectivement à l'extrémité C-terminale de la lysine et de l'arginine. Ce qui peut faciliter la purification des peptides par l'utilisation de colonnes échangeuses de cations, ce qui peut être utilisées dans les étapes ultérieures de purification. La chymotrypsine est une enzyme également très utilisée en protéomique, elle appartient également à la famille des serines protéases [29]. Elle coupe au niveau des acides aminés hydrophobes tels que la tyrosine, le tryptophane, la leucine, l'isoleucine, la valine, la méthionine et la phénylalanine. La réaction implique le site actif formant une triade constituée de serine, histidine et aspartate. À l'inverse l'endoprotéinase Glu-C (V8DE) clive à l'extrémité C-terminale des résidus acides, l'acide aspartique et l'acide glutamique et son pH optimal d'action est entre 4-8 [33].

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé la pronase qui est une enzyme non spécifique pour la coupure de l'albumine, c'est un mélange de protéases [21]. Ce mélange d'enzyme est connu pour avoir des vitesses de réaction rapide et pour fournir des peptides très courts. Le temps d'incubation pour la pronase va être par conséquent un facteur limitant. Les conditions optimales d'action de la pronase se trouvent à des gammes de pH de 7,3-8,5. La pepsine est une enzyme non spécifique mais plus sélective que la pronase. Elle appartient à la famille des aspartate protéases [34, 35]. Elle intervient en position C-terminale de tripeptide aux extrémités hydrophobes. Li *et al* ont utilisé cette enzyme lors de leurs expériences [34]. C'est une enzyme qui est active à des pH très acides. Elle clive à l'extrémité C-terminale de la phénylalanine, de la leucine et de l'acide aspartique. La figure 1.14 illustre le transfert de proton entre les deux aspartates du site actif.

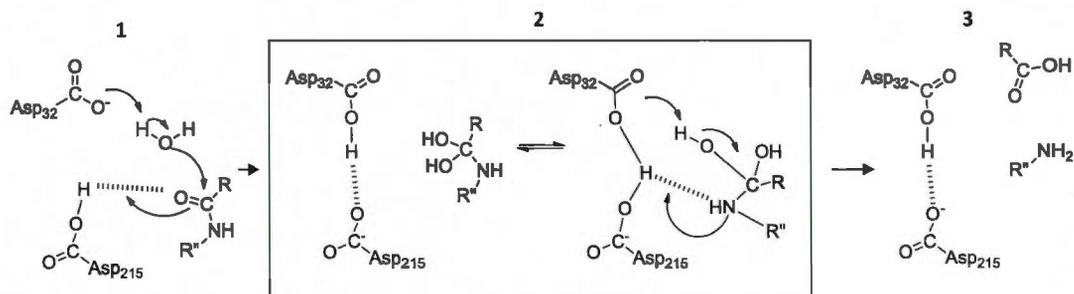


Figure 1.14 : Mécanisme d'action de la pepsine.

La pepsine fait intervenir 2 acides aspartiques sous forme de poche. Le mécanisme nécessite la protonation de l'un des deux acides aspartiques. Pour l'étape finale, l'arrêt de la réaction en présence d'enzymes digestives comme la trypsine et la pepsine se fait en modifiant le pH où pour la pepsine le pH acide passe à un pH basique et inversement pour la trypsine. Cette modification entraîne une dénaturation de l'enzyme de manière irréversible.

Pour nos incubations, plusieurs enzymes digestives ont été utilisées afin de sélectionner l'enzyme qui nous fournira le peptide d'intérêt. La trypsine, la pepsine et la pronase sont les enzymes que nous avons expérimentés au cours de nos travaux en présence de sérum albumine de rat, bovine et humaine. Plusieurs articles ont publié des protocoles de digestion à la sérum albumine [21, 34-37]. Notre étude cible le peptide du site actif de la sérum albumine, il est indispensable et nécessaire qu'après la digestion enzymatique, ce peptide soit détectable en MS avec un bon signal, qu'il n'est pas de redondance avec d'autres masses, pour ne pas avoir de faux positifs et qu'il ne soit pas dégradé au cours de l'incubation et de la digestion.

Pour l'identification de peptides issus de protéine digérée par une enzyme ou un agent chimique, il existe des sites internet spécialisés dans la digestion enzymatique virtuelle (<http://expasy.org/> et <http://www.uniprot.org/>). Ce site internet Uniprot est une base de données qui répertorie la plupart des protéines et des enzymes étudiées en protéomique, il peut prédire la masse théorique des peptides mais aussi celles des ions mono et multichargés issus de ces peptides obtenus après digestion enzymatique et chimique, avec ou sans utilisation d'un agent alkylant comme l'IAM ou l'IAA. Les tableaux 1.1, 1.2 et 1.3 résument les séquences des peptides obtenus via Uniprot de la sérum albumine, si aucun site de clivage

n'a été oublié par l'enzyme, on retrouve le peptide synthétique QQCPF. Ces peptides obtenus seront comparés aux peptides obtenus *in vitro* lors de nos expériences.

Tableau 1.1 : Peptides théoriques issus de la digestion à la trypsine.

Peptides	Albumine	Masses
ALVLIAFAQYLQ QCPFEDHVK	Humaine	2432,2562
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	Bovine	2434,2355
CPYEEHIK	Rat	1019,474

Tableau 1.2 : Peptides théoriques issus de la digestion à la pepsine.

Peptides	Albumine	Masses
QQCPF	Humaine	621,2581
QQCPF	Bovine	621,2581
QKCPYEEHIKL	Rat	1386,6965

Tableau 1.3 : Peptides théoriques issus de la digestion à la pronase.

Peptides	Albumine	Masses
CPF	Humaine	365,1409
CPF	Bovine	365,1409
CPY	Rat	381,1358

Tableaux tirés du site expasy (http://web.expasy.org/cgi-bin/peptide_mass/peptide-mass.pl).

Les peptides obtenus par la trypsine sont plus long dû à la localisation des lysines et des arginines. La pepsine et la pronase nous donne le même peptide chez l'albumine humaine et bovine. Damsteen et *al* ont utilisé une digestion à la pronase sur la sérum albumine humaine (HSA) [21]. Leurs travaux impliquent un tripeptide synthétique, le CPF : cystéine-proline-phénylalanine, pour former des adduits avec l'APAP [21]. Pour avoir une valeur comparative à la HSA digérée. Cet article décrit la stratégie utilisée pour générer et analyser des adduits formés à partir de la sérum albumine humaine. La méthode consiste à isoler la HSA du sang humain, sa digestion par la pronase E, et la détection ultra sensible de ces adduits formés à

partir du tripeptide CPF, détectés en LC-MS/MS. Après la digestion, une étape de purification utilisant des cartouches d'extraction sur phase solide (SPE) permet un retrait des sels contenus dans les échantillons provenant des tampons et une pré-concentration de l'échantillon avant l'analyse LC-MS/MS.

1.3.2 Purification des protéines

L'extraction sur phase solide (SPE) est devenue une étape indispensable dans la purification des peptides digérés, non seulement elle permet une élimination des molécules interférentes, mais en plus elle augmente le rendement final des peptides récupérés. La SPE se définit comme une méthode chromatographique de partage, la séparation implique une phase solide fixe et une phase mobile qui va permettre la fixation des molécules d'intérêt et leurs éluions. Ils existent plusieurs types de colonnes SPE, permettant ainsi une extraction ciblée des molécules d'intérêts. La figure 1.15 représente le type de polarité que l'on retrouve sur les cartouches SPE.

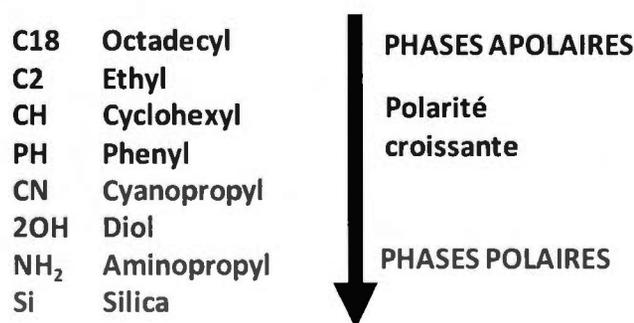


Figure 1.15 : Les différentes polarités des phases stationnaires utilisées en SPE

Les adsorbants représentent le revêtement de la phase solide, ils peuvent être sous forme de polymères ou de silice, c'est la partie qui va interagir avec l'analyte. Le polystyrène-divinylbenzène à une gamme de pH allant de 1 à 14, c'est un composé stable du point de vue chimique, qui est moins sélectif que la silice. La silice œuvre à des gammes de pH allant de 2 à 7,5, elle est plus sélective que les polymères. Il existe plusieurs types d'adsorbants à base de

silice, en phase inverse qui est représentée par les phases apolaires avec des ramifications de chaînes carbonées, la séparation se fait sur les interactions hydrophobes que peut avoir l'analyte à séparer et la phase stationnaire. Les phases normales contiennent un groupement hydrophile et ce sont les interactions polaires qui vont permettre la séparation. Plus le composé sera polaire, plus il va être retenu par la colonne. Le principe est très identique à celui appliqué aux molécules ionisées ; ce sont des cartouches SPE, échangeuses de cations ou d'anions qui sont utilisées.

Au cours de nos travaux, les échantillons digérés à la trypsine, ont été extraits par des cartouches SPE, échangeuse forte de cations (SCX). Les peptides issus de la digestion tryptique sont des peptides chargés positivement par la lysine et l'arginine situés à l'extrémité du peptide. Ces acides aminés basiques contiennent un groupement amines, chargés sous la forme NH_3^+ . La figure 1.16 illustre le groupement fixé sur les cartouches SCX et HLB utilisées au cours de notre étude.

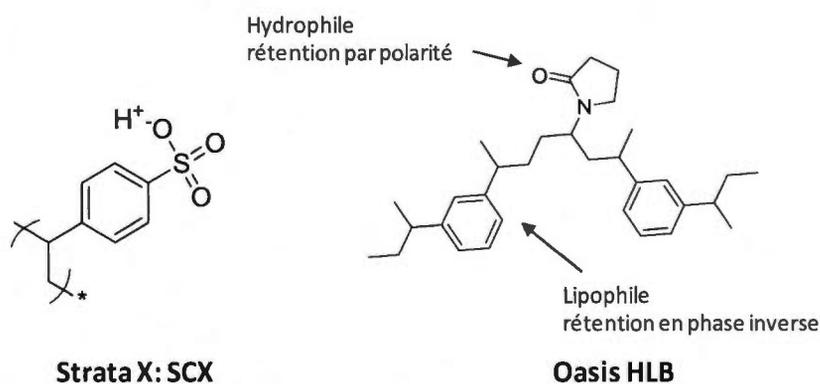


Figure 1.16 : Groupement fixé sur l'adsorbant SCX (Strata-XC) et HLB (Oasis).

Les peptides chargés positivement vont être retenus par ce groupement sulfoxyde de l'adsorbant SCX, c'est un contre ion qui va retenir les ions chargés positivement. Les peptides issus de la trypsine sont chargés à cause de leurs extrémités, le cycle benzénique permet d'augmenter l'hydrophobicité de l'adsorbant et ainsi d'avoir des interactions hydrophobes avec l'analyte et en même temps ionique avec les 2 groupements chargés SO_3^- NH_3^+ . Pour la digestion à la pronase et à la pepsine, les cartouches utilisées sont de types HLB, ce sont des cartouches *hydrophobic lipophilic balance*. Ces cartouches sont utilisées pour éluer les peptides hydrophobes obtenus après la digestion à la pronase et à la pepsine.

L'élution pour les cartouches HLB se fait avec un solvant organique tel que l'acétonitrile et le méthanol, pour décrocher les peptides. Par contre dans le cas de SCX, c'est un mélange de solvants basiques qui va libérer les peptides retenus sur l'adsorbant.

1.3.3 La chromatographie liquide à haute performance.

La chromatographie est une méthode de séparation de différentes molécules que constitue un mélange. Cette séparation se fait par l'intermédiaire d'une phase stationnaire, qui est solide ou un gel fixé et une phase mobile qui peut être un gaz ou un liquide. Cette séparation se fait au travers d'une colonne, enfermée dans un cylindre en métal ou en plastique. Les deux constituants de cette colonne sont l'éluant qui représente la phase mobile et l'adsorbant qui est la surface de la phase stationnaire. La phase stationnaire doit être non miscible à la phase mobile, sa surface peut être solide composée de silice auxquelles sont greffés par liaisons covalentes des molécules comme des chaînes poly-carbonés (C18), des groupements fonctionnels représenté à la figure 1.15. La chromatographie liquide implique plusieurs types de chromatographie, la chromatographie échangeuse d'ions, d'exclusion stérique, de partage et d'adsorption. Le choix de la chromatographie se fait en fonction du mélange à séparer. Certaines propriétés donneront des affinités avec certains types de chromatographie. Il y a une balance entre les interactions dispersives en solution de la phase mobile et celle de la phase stationnaire.

La chromatographie liquide est majoritairement utilisée pour des composés non volatiles, à la différence de la chromatographie en phase gazeuse (CPG), où le critère principal est la volatilité du composé. À cause de ce critère, la CPG n'est pas une technique adaptée à l'étude des protéines et à la séparation des peptides.

La phase inverse contient une phase stationnaire apolaire et une phase normale polaire, c'est une colonne utilisée pour la séparation de la plupart des composés. En effet, ces colonnes sont très similaires à celles utilisées pour les cartouches SPE. La figure 1.17 décrit l'appareillage utilisé dans une HPLC. La phase mobile choisie à des propriétés opposées à la phase stationnaire, si elle est apolaire, la phase mobile sera polaire, cette polarité est réglée

par ajout de solvant, miscible comme des mélanges eau/méthanol ou eau/acétonitrile. La séparation de 2 composés se fait en fonction de leur affinité pour la phase mobile. Elle entraîne les constituants du mélange à travers la colonne. Plus le composé a une grande affinité avec la phase mobile et moins il va être retenu par la phase stationnaire.

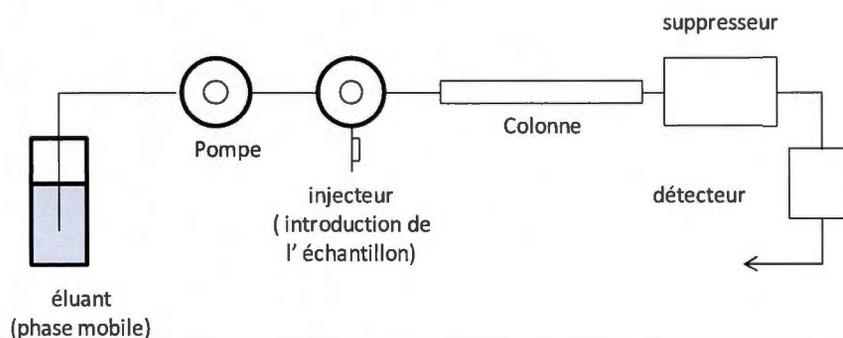


Figure 1.17 : Appareillage classique d'une HPLC.

Le système de pompe permet le transfert du solvant à un débit précis du réservoir où il se trouve jusqu'à la colonne contenant la phase stationnaire, il traverse la colonne, contenant l'échantillon à analyser. En fonction des affinités de l'échantillon pour la phase mobile et la phase stationnaire, un transfert de masse de l'échantillon a lieu entre ces deux phases. Il existe 2 modes, le mode isocratique où la composition de la phase mobile qui peut être un mélange de solvant est identique tout au long de la séparation, et le mode gradient où le mélange de solvant qui constitue la phase mobile varie en fonction du temps de la séparation. Ce deuxième mode permet d'augmenter la vitesse d'élution des échantillons, de diminuer le temps de séparation et d'améliorer la résolution entre les pics chromatographiques.

La détection des constituants de l'échantillon séparés peut se faire avec un détecteur UV, un détecteur à indice de réfraction, un détecteur à fluorescence et un spectromètre de masse. Les échantillons à analyser contiennent des groupements fonctionnels qui peuvent affecter la rétention de la colonne en phase inverse. Cette rétention est affectée par une protonation ou une déprotonation de la fonction durant son transport par la phase mobile. On constate ce phénomène en mode gradient où la variation de la concentration des solvants du mélange induit un changement de polarité de la phase mobile au cours du temps.

Nous allons expliquer les paramètres essentiels pour une chromatographie liquide qui révèle la qualité de la séparation [38]. Le chromatogramme a été obtenu en laboratoire, sur un

détecteur UV à une absorbance de 280 nm, représenté par la figure 1.18. L'appareil utilise les capacités d'absorbance des molécules à analyser, en mesurant les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$, si la molécule est constituée de chromophore, comme dans le cas des acides aminés aromatiques, l'absorbance va augmenter. Aussi, les peptides absorbent à une longueur d'onde située entre 220 et 250 nm par la fonction amide que constitue la liaison peptidique.

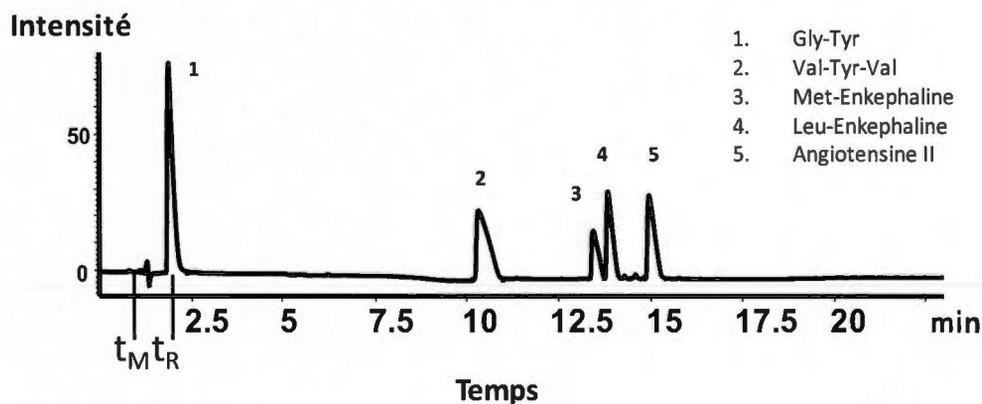


Figure 1.18 : Séparation de 5 peptides standards sur la colonne Kinetex C18-RP HPLC. t_M (temps mort), t_R (temps de rétention). Légende : enképhaline (Phe-Gly-Gly-Tyr), angiotensine II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe).

Le chromatogramme représente la mesure de la détection en fonction du temps. La séparation de ces cinq peptides s'est effectuée en HPLC avec un gradient linéaire de phase mobile constituée d' H_2O à 0.1% d'acide formique (FA) et d'acétonitrile (ACN) à 0.1% FA.

La qualité d'une séparation en chromatographie va dépendre de la colonne qui la constitue, sa longueur, son diamètre interne et la taille des particules. Plus les particules vont être de petit diamètre et plus il va falloir utiliser des pressions élevées. La colonne Kinetex utilisée plus tard dans la séparation des peptides issus de la digestion des albumines de rat, bovine et humaine est une colonne hydrophobe en phase inverse, d'une longueur de 15 cm, avec un diamètre de 2,1 mm et un diamètre de particule de 2,6 μm .

Les particules ont un corps solide de 1.9 μm , l'épaisseur de la phase stationnaire est réduite et cela a une influence sur la qualité de séparation. Ses propriétés permettent de travailler dans des conditions de micro-HPLC avec des pressions raisonnables (< 400 bars). En effet, l'utilisation de ce type de particules réduit l'adsorption sur la phase stationnaire du soluté par les particules, ce corps solide permet de diminuer la distance de diffusion de l'analyte sur la

phase stationnaire, c'est un gain en résolution et un gain en temps d'analyse. La figure 1.19 illustre l'amélioration du pic par les particules à corps solide, le pic est symétrique et plus fin.

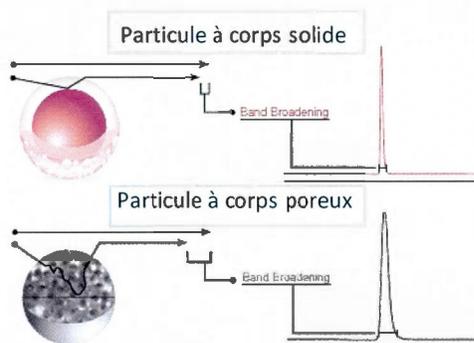


Figure 1.19 : Corrélation entre résolution et structure des particules.

Le facteur de capacité k' est la mesure de la rétention de l'analyte sur la phase stationnaire par la mesure du temps (t_S) que le composé met à traverser la colonne [38]. Il se mesure à partir du temps de rétention (t_R) du soluté et du temps mort (t_M) qui correspond au temps que la phase mobile met pour traverser la colonne. Ce temps est soustrait au temps de rétention du soluté. Il est représenté sur la figure 1.16 par t_M et t_R .

$$k' = \frac{t_S}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Une mesure de la capacité permet de bien séparer deux pics adjacents. Ce facteur k' est dépendant du facteur de sélectivité α qui mesure la séparation entre 2 pics. Pour séparer deux analytes, ce facteur α va définir l'affinité qu'a un composé par rapport à la phase mobile et la phase stationnaire. Ce qui correspond au temps que met un composé pour passer de la phase mobile à la phase stationnaire et inversement pour l'autre composé. Il s'exprime sous l'équation suivante :

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Le troisième critère est l'efficacité d'une colonne qui est représentée par le nombre de plateaux théoriques N , W la largeur du pic à sa base, et $W_{1/2}$, la largeur à sa mi-hauteur [38].

Elle dépend du temps de rétention et de la longueur (L) de la colonne et du diamètre des particules (d_p), alors plus la longueur de la colonne sera grande et le d_p petit et plus le nombre de plateaux théoriques sera élevé.

$$N = 16 \times \left[\frac{t_R}{W} \right]^2 = 5,54 \times \left[\frac{t_R}{W_{1/2}} \right]^2 = \frac{16R^2}{(1-\alpha)^2} = \frac{L}{d_p}$$

La résolution R de la séparation du composé B, si elle est inférieure à 1,5, elle reflète une haute sélectivité. Elle est dépendante de la sélectivité, de la capacité et du nombre de plateaux théoriques.

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{k'_B}{1+k'_B} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha}$$

1.3.4 La spectrométrie de masse

1.3.4.1 Principe du spectromètre de masse

Le spectromètre de masse (MS) est un instrument analytique qui mesure la masse d'une molécule par la séparation de ses ions moléculaires en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Le principe du spectromètre de masse réside dans l'utilisation d'un faisceau d'ions dont la trajectoire est régit par un champ électrique ou magnétique ; cette trajectoire étant directement proportionnelle au m/z . Il est conçu avec un système de pompes permettant la formation de ces ions, de plusieurs compartiments, allant du système d'introduction de l'échantillon à analyser jusqu'au système d'acquisition des données. La figure 1.20 est la représentation des éléments indispensables d'un spectromètre couplé à la chromatographie liquide.

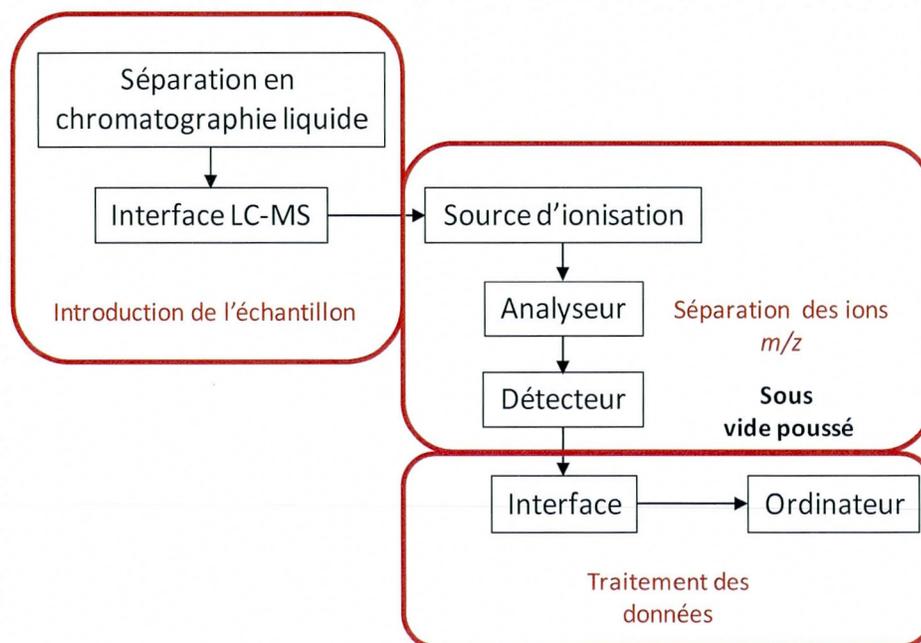


Figure 1.20 : Principe du LC-MS.

Le système d'introduction est souvent un tuyau situé à l'interface entre l'échantillon et le spectromètre de masse, cette étape se déroule à pression atmosphérique. L'échantillon est introduit dans l'instrument qui est mis sous vide poussé. Le passage de la pression atmosphérique à un vide poussé dans l'instrument se fait par l'intermédiaire de pompes. En effet, des pompes de type mécanique et turbo-moléculaire permettent d'atteindre le vide et son maintien, avec des niveaux de pression de l'ordre de 10^{-3} - 10^{-10} Torr, selon l'instrument. L'injection peut se faire de deux manières, soit en infusion directe avec l'utilisation d'une seringue d'injection ou indirecte en présence d'un appareil couplé à un instrument de séparation analytique type chromatographie liquide ou gazeuse, où l'échantillon traverse la colonne avant d'arriver au spectromètre de masse. À l'étape d'ionisation, l'échantillon est chauffé puis les molécules se retrouvent chargées, ce qui leur permet de voyager tout au long du spectromètre de masse vers le détecteur. Le triage et la détection de ces ions chargés se fait à l'aide d'un analyseur et d'un détecteur. Certains détecteurs émettent un signal électrique proportionnel à la quantité des ions détectés. Le système informatique convertit ce signal sous forme de spectre, appelé spectre de masse où chaque ion est représenté en fonction de son abondance isotopique.

Le spectromètre de masse sépare les ions en fonction de leurs m/z . Il est important de définir la notion d'abondance isotopique et de mesure de la masse. La masse monoisotopique est la masse calculée à partir de la masse exacte de l'isotope principal de chaque élément en tenant compte des défauts de masse. Aussi, chaque atome que constitue la molécule, possède un profil isotopique défini par les isotopes naturels qu'il constitue [39].

La masse moyenne est la masse calculée à partir de la masse atomique d'un élément donné, regroupant l'abondance relative des isotopes naturels [39].

La masse nominale est la masse calculée à partir de la masse entière de l'isotope principal de chaque élément [39].

Ces masses sont décrites pour la molécule de bromure de méthyle dans le tableau 1.4.

Tableau 1.4 : Application de calcul des masses du bromure de méthyle CH_3Br .

	Abondance relative (%)	Masse Monoisotopique	Masse moyenne	Masse nominale
Carbone	^{12}C : 98,90	^{12}C : 12,0000	12,011	12
	^{13}C : 1,10	^{13}C : 13,003355		
Hydrogène	^1H : 99,985	^1H : 1,007825	1,00794	1
	^2H : 0,015	^2H : 2,014		
Brome	^{79}Br : 50,69	^{79}Br : 8,918336	79,904	79
	^{81}Br : 49,31	^{81}Br : 80,916698		
CH_3Br		93,941011	94,93906	93

Adapté du livre Edmond de Hoffman, V. S., *Spectrométrie de masse, cours et exercices corrigés*. Paris, 2005; p 425.

Le brome est en abondance environ à 50/50 sous forme de deux isotopes naturels. Sur un spectre MS, ce sont deux pics qui vont apparaître, et ils seront représentatifs de ces proportions.

D'après le tableau, le carbone a deux isotopes stables, ^{12}C à 98,90 % et le ^{13}C à 1,10 % d'abondance. Comme le montre la figure 1.21, le massif isotopique de l'insuline représente

un m/z de 1161,7353 pour l'ion $(M+5H)^{5+}$ ce qui correspond à une masse moléculaire de 5803,64 g/mol, comparée à la masse moyenne qui prend la valeur de l'isotope le plus abondant, soit au $m/z = 1162,5364$, avec une masse moyenne de 5807,66 g/mol. Ce spectre montre la contribution du carbone dans l'écart de masse entre la masse moyenne et la masse monoisotopique.

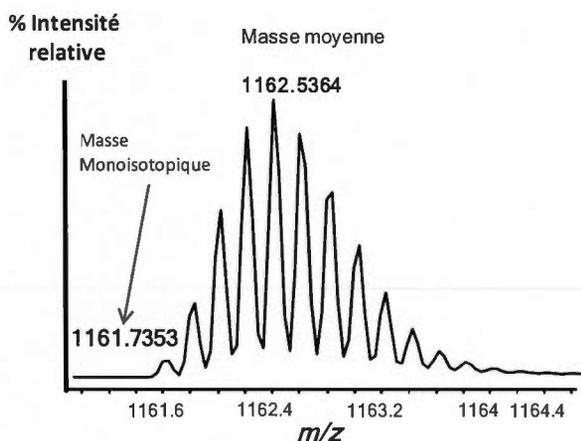


Figure 1.21 : Spectre MS obtenu en haute résolution par un instrument ESI-TOF de l'ion $(M+5H)^{5+}$ de l'insuline à ± 10 ppm obtenu en laboratoire.

1.3.4.2 Les sources d'ionisations adaptées à l'étude des peptides et des protéines

La source d'ionisation est une source qui permet le passage de l'échantillon sous forme neutre liquide ou solide, à la forme ionisée gazeuse. Il existe plusieurs manières de former ces ions. Le choix de la source est adapté à la nature de l'échantillon. En effet, il existe plusieurs types de sources d'ionisations, elles sont dites fortes et douces adaptées aux composés à analyser. Des conditions dures pour l'ionisation par impact électronique, l'ion généré est de forme radicalaire $M^{\bullet+}$, ce type d'ion est réservé à l'analyse de composés volatiles, thermorésistants, alors que la plupart des analyses de peptides et de protéines se font à l'état liquide ou solide avec des sources d'ionisations plus douces. Les ions générés sont sous formes $(M+H)^+$ et $(M-H)^-$ car souvent ce sont des échantillons issus de matrices biologiques et thermosensibles.

Les deux sources d'ionisations douces les plus utilisées pour l'étude des peptides et des protéines sont l'ionisation par désorption laser assistée d'une matrice (MALDI) et l'électrospray (ESI). Elles sont décrites ci-dessous ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients dans l'analyse des protéines.

La source MALDI est une technique qui utilise un laser pour la désorption de l'échantillon solide [40]. La matrice est constituée de molécules organiques qui absorbent dans l'UV à 337 ou 355 nm qui correspond à la longueur d'onde du laser [39]. L'analyte est déposé dans la matrice, pour former un mélange. Après la désorption de l'échantillon, l'ionisation de l'analyte se fait par transfert de charge de la matrice ionisée, souvent par transfert de protons comme l'illustre la figure 1.22 [41].

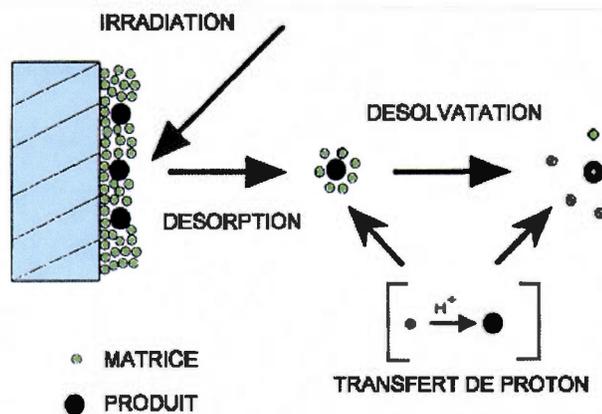


Figure 1.22 : Principe de l'ionisation de la source MALDI.

Le laser irradie la matrice qui absorbe l'excès d'énergie et entraîne en même temps la désorption de l'analyte et de la matrice. La deuxième étape est l'étape d'ionisation avec les ions qui se forment par transfert de proton entre la matrice photoexcitée et l'analyte [41]. La troisième étape de désolvatation et les ions formés sont ensuite accélérés vers l'analyseur. Les matrices les plus utilisées sont l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique, l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (2,5 DHB) et l'acide sinapique [42]. Ce type de matrice favorise l'ionisation par transfert de protons. Cette technique rend possible l'étude d'échantillons biologiques complexes, de par sa tolérance vis-à-vis des sels, des détergents et des tampons [32]. Elle sépare les molécules à analyser en limitant la formation d'agrégats et de clusters. Cette technique est le plus souvent couplée à des analyseurs à temps de vol (MALDI-TOF). Il

peut également exister un effet de matrice sur les composés dont la masse est inférieure à 1000 Da qui sont confondus avec le bruit de fond générés par la matrice, alors le MALDI est souvent appliqué à l'analyse des macromolécules. Cette technique est adaptée à la désorption des protéines pouvant avoir des tailles supérieures à 300 000 Da [43].

L'ionisation par électro-nébulisation ou électrospray (ESI) se fait à pression atmosphérique et est réservée aux molécules non volatiles et thermosensibles [32]. Le défi est de relier une source à pression atmosphérique à un analyseur sous vide poussé. La figure 1.23 décrit le principe de l'ESI. La contre électrode sert d'interface entre la source à pression atmosphérique et l'analyseur sous vide poussé.

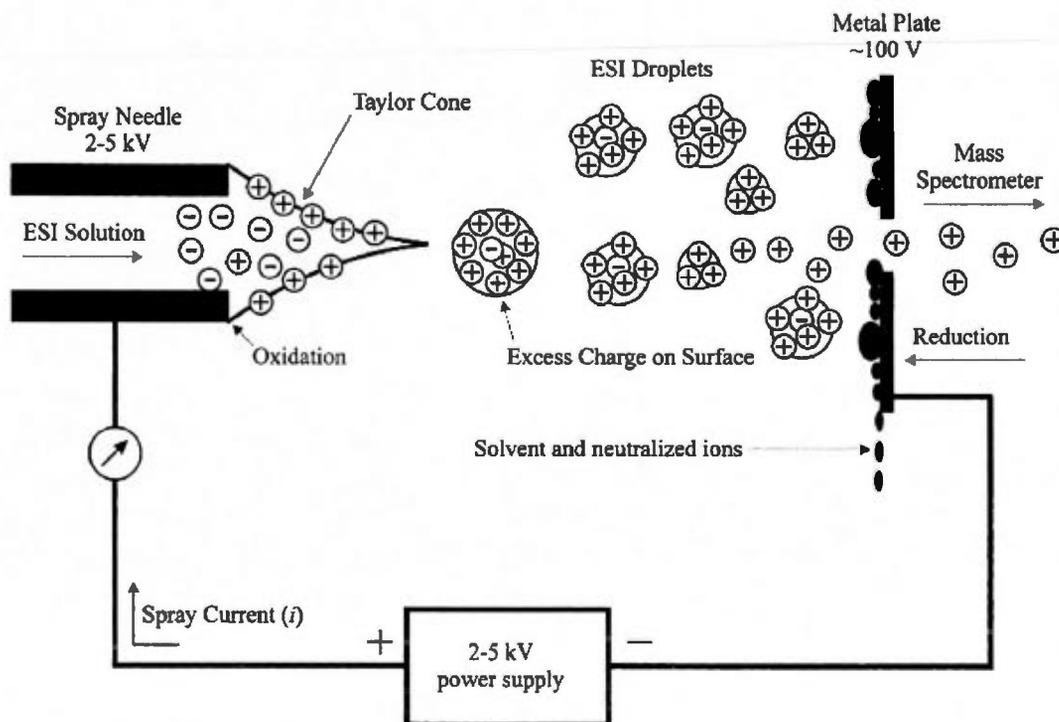


Figure 1.23 : Principe de l'ionisation de la source ESI.

L'utilisation d'un orifice minuscule de l'ordre de 5^{-10} μM et de pompes performantes permettent le maintien des niveaux de pression de l'ordre de 10^{-5} Torr entre ces différents compartiments de l'instrument. On utilise un capillaire à haute température pour le transfert des ions dans l'analyseur ainsi qu'un gaz de nébulisation qui est nécessaire pour améliorer

l'évaporation du solvant résiduel dans la source. L'ESI s'effectue en présence d'un champ électrique de 10^6 V.m^{-1} sur un liquide à faible débit contenu dans un tube capillaire [40]. Le champ électrique est appliqué par l'intermédiaire d'une différence de potentiel de 2 à 5 kV, entre le capillaire et la contre électrode.

Le cône de Taylor est un processus par lequel la formation d'une pointe va entraîner la déformation du liquide sous forme de gouttelettes chargées. Le gaz de nébulisation aide à la transformation du liquide en fines gouttelettes chargées, sous forme de spray. L'évaporation du solvant *in situ*, forme des gouttelettes de plus en plus petites qui induisent une densité de charge de plus en plus grande à leurs surfaces. Leur densité de charges augmentent jusqu'à atteindre une saturation de la densité de surface, provoquant des explosions coulombiennes. Ces explosions entraînent la libération des ions multichargés en phase gazeuse. La figure 1.24 illustre une protéine ayant 5 m/z [44]. L'interprétation des pics de cette figure montre les formes multiples de la protéine. La masse de la molécule est déterminée par l'intermédiaire du rapport m/z .

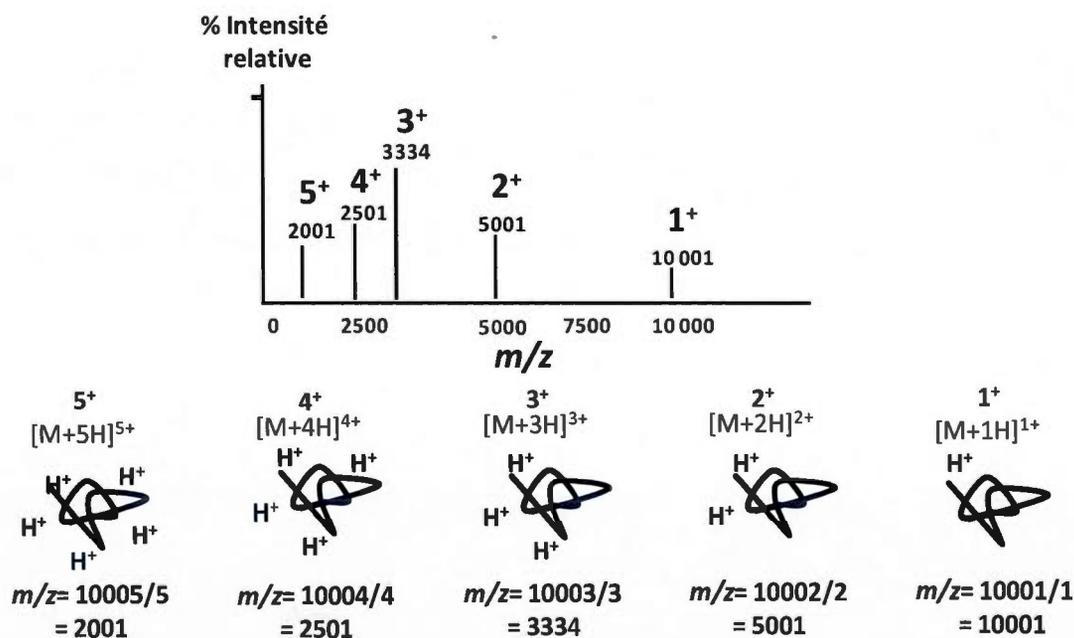


Figure 1.24 : Représentation théorique des ions multichargés de 1 à 5 protons d'une protéine de masse moléculaire de 10 000 Da.

Le spectre mesure l'intensité des pics en fonction de leurs états de charge pour chaque molécule. Pour chaque pic dans un spectre de masse ayant un rapport m/z représente l'état de charge de la molécule. Pour une molécule ionisée mono-chargée ou $[M+H]^{1+}$, on aura une valeur de 1, et pour une molécule di-chargée ou $[M+2H]^{2+}$, on aura une valeur de 2.

La formation de l'ion pseudo moléculaire est l'ion $[M+1H]^{1+}$ qui correspond à la molécule d'intérêt intacte qui a été protonée une seule fois. D'autres types d'ions peuvent être formés selon le même principe, sans ionisations, seulement par l'intermédiaire de la formation d'adduits. Des adduits de type sodique, potassique, ammonium se liant à l'ion Na^+ , K^+ , NH_3^+ . Si la molécule contient plusieurs sites ionisables, cela peut produire des ions multichargés. La myoglobine, par exemple peut contenir jusqu'à 20 charges (Figure 1.25). En analyse des peptides et des protéines, le mode positif de l'ionisation est privilégié. D'après la structure amphotère des acides aminés, l'analyse en mode négatif peut être envisagée.

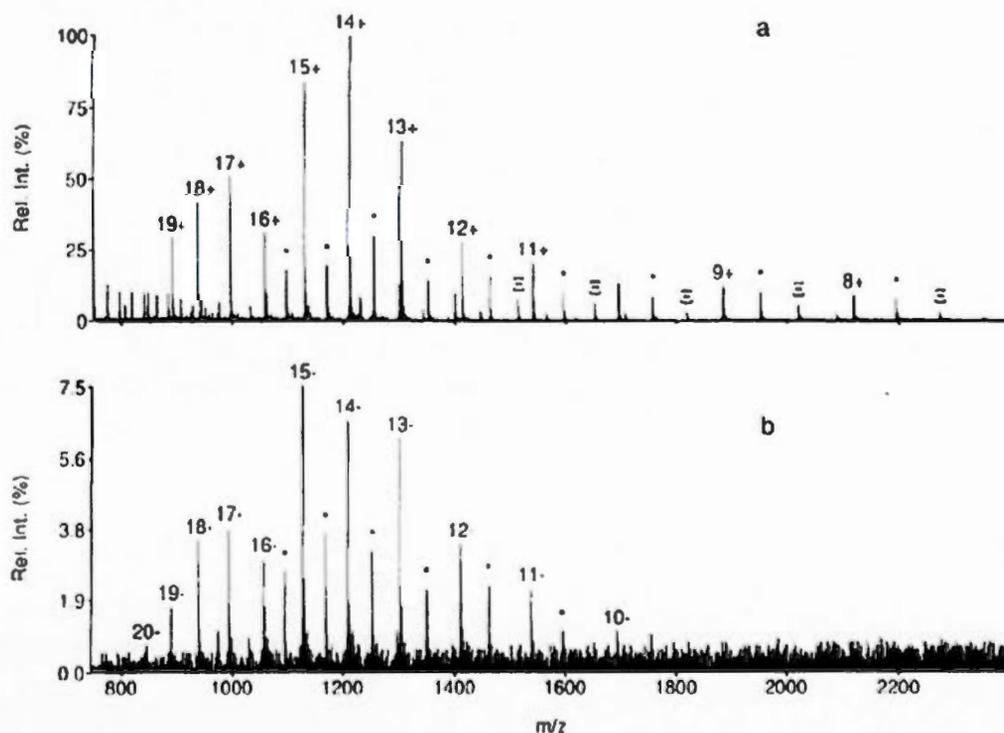


Figure 1.25 : Spectre MS en ESI(+) en a et ESI(-) en b de la myoglobine.

Cette mesure est plus ou moins précise selon la résolution de l'appareil. C'est pourquoi l'étalonnage de l'instrument est nécessaire, afin d'avoir une précision au niveau de ces masses. Des calibrants sont introduits durant l'analyse de l'échantillon, ou entre les analyses. Ces calibrants ont des masses précises, qui permettent par la mesure de leur m/z de modifier les paramètres de l'instrument. L'ESI est une technique qui permet une ionisation rapide, à haute sensibilité de l'ordre du femtomole (10^{-15} mole). Elle est facilement adaptée à l'HPLC. Cependant elle demeure moins tolérante que la source MALDI aux contaminations par les sels et les tampons utilisés durant l'expérience, elle demande une purification de type SPE des échantillons avant l'injection.

1.3.4.3 Les analyseurs

L'analyseur permet la séparation des ions. Les analyseurs reliés à une source d'ionisation ESI peuvent se ranger en deux catégories : basse ou haute. Les paramètres qui distinguent un instrument d'un autre sont : la gamme de masse d'ions détectables par l'appareil, la vitesse d'analyse, et la transmission qui correspond au rapport entre les ions détectés et les ions entrant dans l'analyseur. L'exactitude de masse est le rapport d'erreur entre la masse mesurée par le spectromètre, et la masse théorique de la molécule fournie par son calcul. C'est une valeur qui détermine la précision de la masse, elle se mesure en partie par million (ppm).

$$\text{Exactitude de la masse} = \frac{(\text{Masse théorique} - \text{Masse Mesurée})}{\text{Masse théorique}} \times 10^6$$

Si on prend l'exemple du GSH qui a une masse théorique de 307,0838 et une masse mesurée par l'instrument à 307,083, la valeur de ppm est de 2,6 ppm. Pour chaque peptide détecté, cette exactitude de masse est calculée. Cela apporte une précision dans la validation de la masse du peptide. Cette précision dépend également de la résolution de l'analyseur. La résolution (R) peut se déterminer à partir d'un spectre de masse en prenant en compte un pic isolé. Elle se calcule sur le pic en faisant le rapport de la masse m sur la largeur à mi-hauteur du maximum δm (FWHM : *Full Width Half-height Maximum*) du pic [44]:

$$R = m / \delta m$$

La vitesse d'analyse d'un analyseur est directement reliée au domaine de masse mesurable par l'instrument.

La précision de masse et la résolution permettent de classifier les différents instruments. En effet, au cours de nos travaux, nous avons utilisé le quadripôle (Q) et la trappe ionique linéaire (LIT) qui sont des analyseurs à basse résolution et l'analyseur à temps de vol (TOF) qui est à haute résolution. Le principe de ces analyseurs est décrit ci-dessous.

1.3.4.3.1 Les analyseurs quadripolaires à basse résolution

Le simple quadripôle est un analyseur qui agit comme un filtre de masse. Il est constitué de 4 tiges cylindriques parallèles, les tiges en oppositions portent la même charge, elles sont connectées aux pôles positif et négatif d'une source de courant directe. La figure 1.26 illustre la structure d'un quadripôle simple. Entre ces tiges parallèles, la trajectoire des ions suivant l'axe z est contrôlée par un champ électrique constitué d'une tension continue U et d'un potentiel alternatif de radiofréquence RF. Elle est constituée de l'amplitude de la tension alternative (V), de la pulsation de la radiofréquence (ω s'exprimant en rad.s⁻¹) et ω est égale à $2\pi f$ avec f représentant la fréquence du potentiel alternatif RF.

$$RF = V \cos \omega t$$

Le potentiel U (ou DC) est un courant constant dit de filtrage, il correspond à la différence de potentiel entre les pôles positif et négatif [45]. La tension appliquée au niveau des électrodes s'exprime par Φ_0 :

Pour les électrodes positives :

$$\Phi_0 = (U - V \cos \omega t)$$

Pour les électrodes négatives :

$$-\Phi_0 = -(U - V \cos \omega t)$$

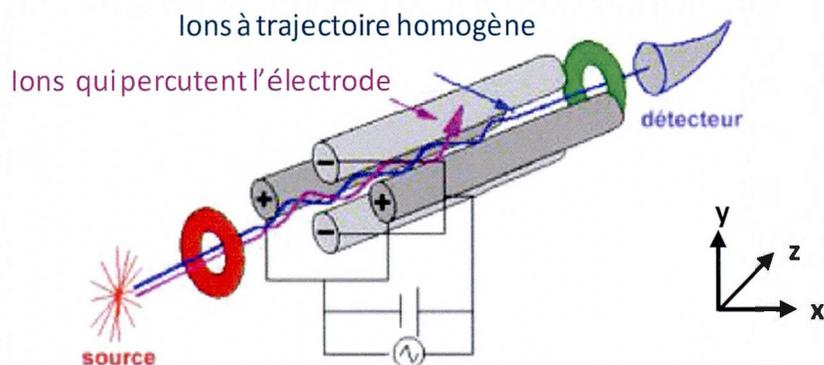


Figure 1.26 : Structure du quadripôle simple.

Ces 4 tiges sont associés électriquement 2 par 2 créant un champ électrique d'oscillation laissant passer certaines masses tandis que d'autres sont sur une trajectoire instables ne leur permettant pas d'atteindre le détecteur. La focalisation des ions par RF se fait par un déphasage de 180° . Les ions chargés positivement sont attirés par l'électrode négative, la RF en courant inversé induit l'attraction des ions vers l'électrode négative, et ainsi de suite [45]. Ce changement de tension est responsable de la trajectoire oscillante des ions. Ainsi pour chaque potentiel RF/DC imposé, seul les ions ayant un rapport m/z particulier auront une trajectoire stable, les autres percuteront l'électrode opposée à leur charge (figure 1.26). Quand seul le potentiel RF traverse le quadripôle, il n'y a pas de filtre U entre les pôles, le quadripôle sert simplement à la transmission des ions. Un simple quadripôle peut également servir de trappe ionique linéaire (LIT) par l'application d'un courant à l'entrée et à la sortie des électrodes. Cette trappe permet un confinement des ions par l'intermédiaire du courant appliqué, un gaz est présent pour le maintien de la pression de la trappe à $5 \cdot 10^{-3}$ mbar. L'ajustement du potentiel trappe les ions dans la cavité centrale des électrodes.

1.3.4.3.2 L'analyseur à temps de vol à haute résolution (HR)

L'analyseur *time of flight* (TOF) ou à temps de vol linéaire (TOF linéaire) ne contient pas de champ électrique. Tous les ions contenus dans l'analyseur parcourent la même distance pour atteindre le détecteur et sont soumis à la même tension accélératrice imposée. Le principe du

TOF est de mesurer le temps que met l'ion à effectuer une trajectoire déterminée, l'élément séparateur d'une molécule à l'autre sera la vitesse acquise au cours de cette trajectoire qui est directement fonction de la masse de la molécule. D'après la définition de l'énergie cinétique à la figure 1.27 :

$$Ec = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = \frac{1}{2} \cdot m \cdot \frac{l^2}{t^2} \quad (a) \quad \text{et} \quad Ec = z \cdot e \cdot V \quad (b)$$

Avec m : masse, v : vitesse, l : longueur de la trajectoire, t : temps, z : charge, e : charge élémentaire, V : tension accélératrice.

$$\frac{m}{z} = \left(\frac{2eV}{L^2} \right) t^2 \quad (c)$$

Figure 1.27 : Représentation des équations du principe du temps de vol.

Cette énergie est inversement proportionnelle à la masse des molécules. L'énergie cinétique de la charge s'exprime à partir de la tension accélératrice et de la charge z . Tous les ions produits sont accélérés par un champ électrique puis traversent un tube où il n'y a pas de champ. La masse est directement proportionnelle au temps mis par l'ion à effectuer la trajectoire. La variation de l'énergie cinétique a une influence sur la résolution de l'instrument. En effet, la résolution d'un spectromètre de masse TOF est dérivée de l'équation mathématique qui relie m/z à la durée du temps de vol (équation c : figure 1.27) [39]. La figure 1.28 décrit l'expression de la résolution:

$$(1) \frac{m}{z} = \left(\frac{2eV}{L^2} \right) t^2 \quad \text{et} \quad (2) \frac{1}{z} dm = \left(\frac{2eV}{L^2} \right) 2t dt$$

$$\left(\frac{1}{2} \right) \frac{m}{dm} = \frac{t}{2dt}$$

Ainsi, la résolution R correspond :

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \approx \frac{L}{2\Delta z}$$

Figure 1.28 : Expression de la résolution d'un TOF. (m : masse de l'ion, t : son temps de vol, Δm : largeur du pic à mi-hauteur mesurée sur l'échelle de masse, Δt : largeur du pic à mi-hauteur sur l'échelle de temps, L : la distance de vol, Δz : épaisseur du paquet d'ions approchant le détecteur.

La résolution est directement proportionnelle à la durée t et à la distance L parcourus par l'ion. Le TOF est dit à haute résolution capable de fournir un pic précis définissant une masse calculée avec 4 chiffres après la virgule. Pour optimiser ce paramètre, souvent la taille L est augmentée en utilisant un tube de vol plus long, cela permet de conserver une bonne sensibilité de détection et une plus grande précision. Le TOF recouvre une gamme de masse très grande supérieure à 350 000 Da, une haute transmission. La figure 1.28 montre les différences structurales d'un instrument TOF linéaire d'un instrument TOF réflectron.

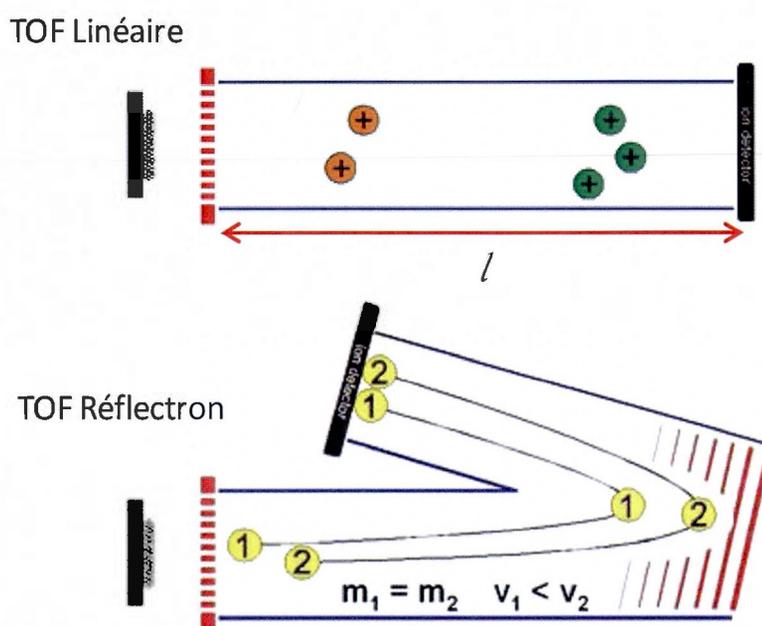


Figure 1.29 : Le TOF en mode linéaire et en mode réflectron.

Le TOF en mode réflectron est constitué d'un miroir électrostatique. Il permet de diminuer les variations de l'énergie cinétique des ions de même masse, donc cela entraîne un gain en résolution. Après la formation des ions dans la source et leur focalisation à l'entrée de l'analyseur, une tension accélératrice orthogonale est appliquée aux ions. Ainsi durant l'analyse des ions, la gamme de masse du TOF réflectron est inférieure à 5000 Da.

Les instruments à haute résolution (HR) sont des instruments assez dispendieux, c'est pourquoi sur le marché, les instruments à basse résolution ($R < 5000$) de type triple quadripôles et trappe à ions restent des instruments abordables avec un bon rapport qualité/prix.

1.4 La spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS est une technique qui comprend l'acquisition et l'analyse de spectres issus d'ions précurseurs ou d'ions produits chargés ayant un m/z sélectionné, ou de spectres issus d'une perte de masse neutre sélectionnée. Cette technique a pour objectif d'apporter des informations structurales de composé par le biais de leurs masses et de leurs charges qu'ils auront au cours de l'acquisition. Cette technique nécessite la combinaison de 2 analyseurs dans un même instrument. Le premier analyseur permet la séparation des ions précurseurs et le deuxième sert à séparer les ions fragmentés. Après sélection d'une masse de façon précise sur le premier analyseur, cet ion précurseur est fragmenté dans la cellule de collision et les ions fragments sont séparés dans le deuxième analyseur. L'assemblage de trois quadripôles ou QqQ permet d'effectuer la MS/MS. En effet, le premier quadripôle Q_1 va séparer les ions précurseurs et dans le troisième quadripôle Q_3 la séparation des ions fragments.

Dans le cas d'une trappe linéaire, la trappe sert à la fois de cellule de collision et de séparateur d'ions, les expériences sont réalisées de manière successive en fonction du temps. En effet, un simple quadripôle agit comme un filtre de masse alors que dans la trappe, les ions sont confinés. Si l'énergie induite entre l'ion et le gaz neutre est suffisante pour permettre une fragmentation des ions, cette trappe devient une cellule de collision.

Les instruments hybrides que nous avons utilisés au cours de notre étude sont un quadripôle-trappe linéaire (QqLIT), à basse résolution, et un quadripôle-temps de vol (QqTOF), à haute résolution. Le QqLIT fonctionne comme un triple quadripôle, avec le troisième quadripôle étant une trappe linéaire (LIT). Le QqTOF contient deux analyseurs distincts, un quadripôle et un analyseur à temps de vol (TOF), il permet de mesurer des spectres MS et MS/MS à haute résolution.

Ils existent plusieurs méthodes d'activation à basse ou haute énergie pour permettre la fragmentation des ions. La méthode utilisée dans les instruments types QqQ, QqLIT et QqTOF est le procédé de dissociation induite par collision (CID). Après avoir décrit le principe de CID et les différents types de fragments réalisables sous ce mode, un exemple d'application sera expliqué avec un spectre MS/MS de peptide, pour terminer par une partie

consacrée aux différents types d'expériences réalisables dans les instruments hybrides utilisés au cours de nos travaux.

1.4.1 La fragmentation par dissociation induite par collision (CID)

Le mode CID est un processus qui induit une dissociation de l'ion précurseur par l'intervention de collision entre l'ion précurseur et les molécules inertes du gaz neutre sous un vide poussé. Ce processus de collision se divise en deux phases, la première phase est la phase d'activation impliquant la collision entre l'ion et le gaz cible, cette collision entraîne une augmentation de l'énergie cinétique de l'ion. En augmentant son énergie cinétique, l'ion augmente son énergie interne jusqu'à atteindre un état excité. La deuxième phase est la décomposition unimoléculaire de l'ion activé. Cette dissociation implique également une énergie de collision (EC), appliquée à l'ion pour augmenter son énergie interne, cette augmentation d'énergie entraîne la fragmentation de l'ion, plus la molécule aura une masse haute et plus une énergie de collision élevée sera nécessaire pour sa fragmentation. C'est une étape importante dans l'élucidation structurale de composés et dans l'amélioration des rendements des fragments des ions produits. Ce procédé d'activation CID permet par conséquent la formation d'ions fragments. Ils existent plusieurs types de fragmentation de l'ion précurseur régit par sa structure. En effet, en fonction de sa composition et de l'énergie interne, l'ion contient des liaisons plus fragiles que d'autres. La figure 1.30 illustre les types de fragments obtenus en mode CID après la fragmentation d'une seule liaison du peptide d'intérêt.

Lors de la fragmentation d'un peptide, plusieurs ruptures de liaison peuvent survenir dans la chaîne peptidique. La rupture peut avoir lieu au niveau de la liaison C α -C (figure 1.30), sur la liaison C-N ou la liaison N-C α . Les fragments obtenus sont répertoriés selon l'extrémité N-terminale ou C-terminale. Après la fragmentation, la charge du peptide peut se situer soit à l'extrémité N-terminale pour donner les fragments de la série a_n , b_n et c_n ou à l'extrémité C-terminale pour donner les fragments de types x_n , y_n et z_n . L'indice n représente le nombre d'acides aminés que contient le fragment.

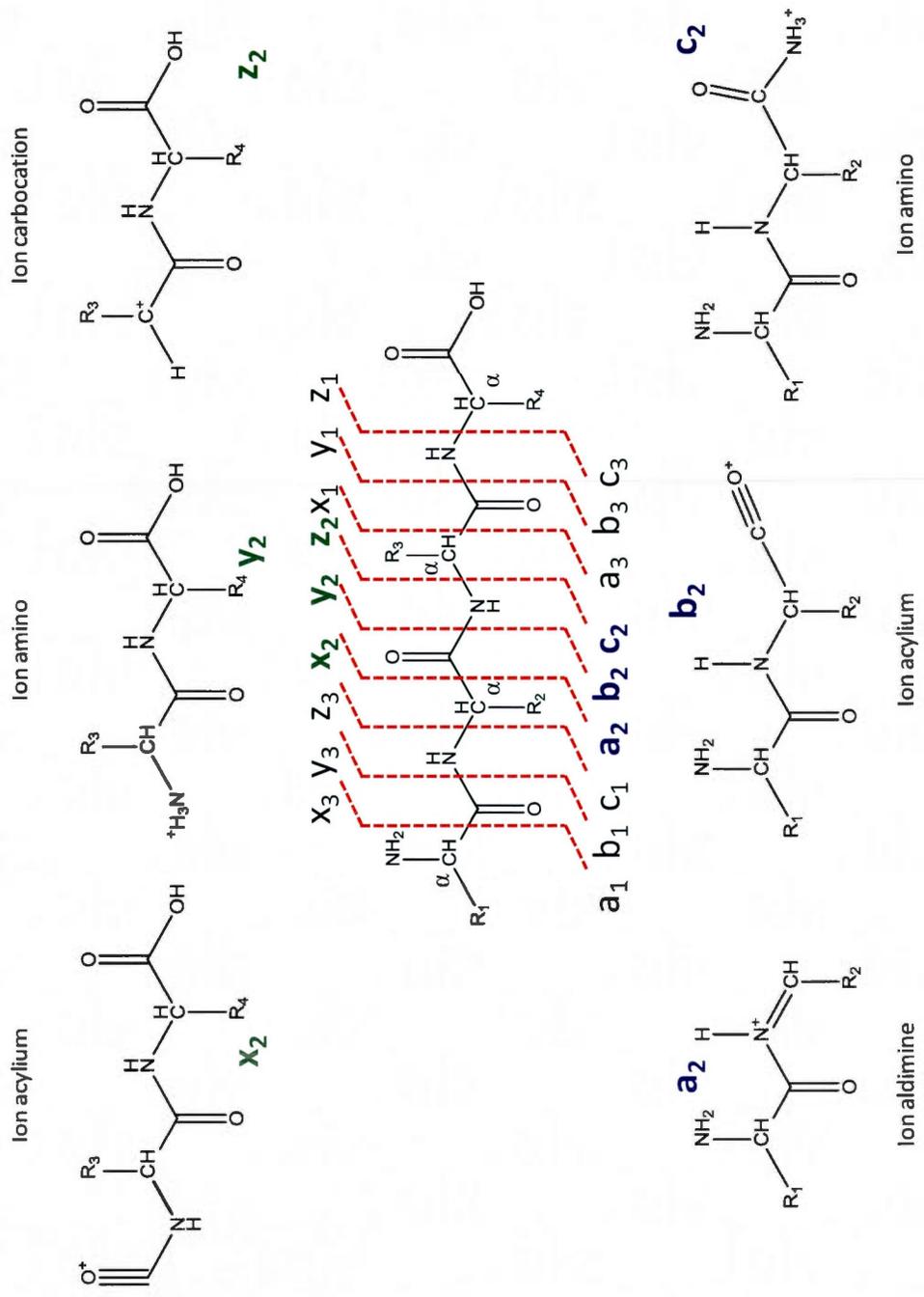


Figure 1.30 : Les différents types de fragmentation d'un peptide obtenu par CID. (R_n correspond à la chaîne latérale de l'acide aminé).

Lorsque le peptide ionisé subit une fragmentation, la charge de l'ion peut se retrouver sur plusieurs atomes en fonction du lieu de la liaison rompue. Le spectre obtenu va identifier les masses des différents ions fragments obtenus. Comme le montre la figure 1.30, l'ion acylium x_2 et c_2 porte la charge sur le groupement CO-NH_3^+ . L'ion z_2 porte la charge sur le carbone et forme un carbocation. Lorsque au minimum deux liaisons sont rompues dans la chaîne peptidique, de nouveaux ions fragments peuvent apparaître. Des ions fragments issus de la perte d'un acide aminé, ils sont souvent localisés au niveau des petites masses sur le spectre et le nom de l'ion correspond à l'acide aminé chargé. D'autres fragments issus de la perte des extrémités Nt et Ct forment des « ions fragments internes ». Lors de la reconstitution du peptide, le logiciel prend en compte la probabilité d'avoir une fragmentation favorisée dépendante de la fragilité de certaines liaisons du peptide, et alors elles vont être plus facilement fragmentées. Les ions se fragmentent en fonction de leur énergie interne et de l'énergie de collision appliquée, plus l'ion est stable et plus sa fragmentation sera retardée, les ions instables sont les premiers à être fragmentés [46, 47].

Dans un QqQ le processus de CID a lieu directement en q_2 au niveau de la cellule de collision en présence d'un gaz neutre [45] (di-azote, hélium, ou argon). Alors que dans le cas du QqLIT, l'ion précurseur est d'abord isolé dans la trappe, suit l'étape où l'ion précurseur sélectionné ainsi que les molécules de gaz entrent en collision pour donner les ions fragments correspondants. Des balayages successifs en fréquence inférieur puis supérieur entraînent l'expulsion des ions qui ont un m/z proches des ions à isoler provoquant ainsi leurs fragmentations [48]. La figure 1.31 illustre une cellule de collision d'un QqLIT.

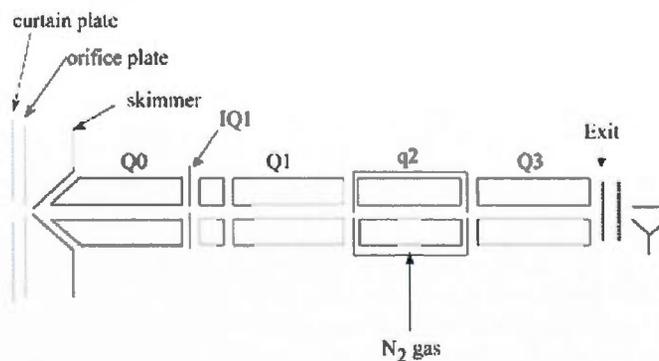


Figure 1.31 : Représentation de la cellule de collision q_2 dans un QqLIT.

L'acquisition des données se fait par l'intermédiaire de logiciels sophistiqués. Les spectres MS/MS sont les spectres obtenus après la fragmentation qui permettent d'avoir des informations sur la structure du peptide analysé. L'identification des peptides issus d'une digestion enzymatique ou autre se fait par l'intermédiaire de logiciels qui vont réaliser la reconstitution de la séquence protéique par le chevauchement de ces différents fragments peptidiques obtenus. La méthode bioinformatique consiste à comparer les spectres MS/MS obtenus à ceux enregistrés dans la base de données telle que Mascot, Sequest [48].

Toutes ces informations sont nécessaires dans la détermination structurale d'un peptide, mais également, elles permettent de prévoir le profil de fragmentation du peptide pour envisager d'autres expériences.

1.4.2 Exemple d'application sur un spectre MS/MS obtenus sur un instrument de type QqLIT

La figure 1.32 représente le type de spectres MS/MS obtenus sur le QTRAP 5500. L'ion $(M+2H)^{2+}$ au m/z 615,6 du peptide synthétique QQCPFDEHVK a été fragmenté en présence d'une énergie de collision de 28 eV. Le séquençage des peptides se fait par l'intermédiaire de base de données permettant directement de calculer la masse de ces ions à partir de la masse théorique du peptide. Ces informations sont comparées aux masses détectées permettant l'identification des fragments et la détermination structurale du peptide. Le tableau 1.5 représente les fragments issus du peptide QQCPFDEHVK.

Tableau 1.5 Masses théoriques des fragments du peptide QQCPFDEHVK

PEPTIDE	#	FRAGMENTS						#	PEPTIDE
		a	b	c	x	y	z		
Q	1	101,1	129	146		1231	1214	10	Q
Q	2	229,2	257,3	274,2	1129,2	1103,2	1086,2	9	Q
C	3	332,4	360,4	377,4	1001,1	975,1	958	8	C
P	4	429,5	457,5	474,5	897,7	872	855	7	P
F	5	576,7	604,7	621,7	800,9	774,9	757,9	6	F
D	6	691,8	719,8	736,8	653,7	627,7	610,65	5	D
E	7	821	849	866	538,6	512,6	495,6	4	E
H	8	958	986	1003	409,5	383,5	366,5	3	H
V	9	1057,2	1085,1	1102,2	272,33	246,3	229,3	2	V
K	10	1185,3	1213,3		173,2	147,2	130,2	1	K
		N-terminale			C-terminale				

Adapté du site : <http://db.systemsbiology.net/proteomicsToolkit/FraglonServlet.html>

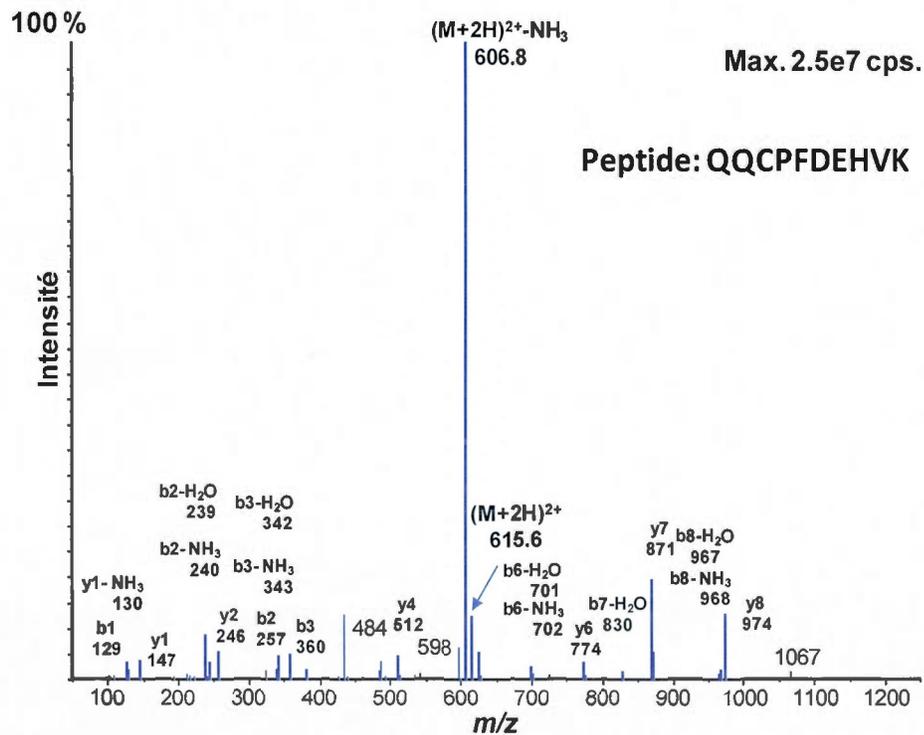


Figure 1.32 : Spectre MS/MS du peptide QQCPFDEHVK au $m/z = 615,6$ (l'ion précurseur) obtenu en laboratoire à une énergie de collision de 28 eV.

L'intensité du pic de l'ion précurseur montre qu'il a été fragmenté, en plusieurs fragments. Les ions fragments de types a, b, c, x, y et z obtenus peuvent également perdre par la suite une molécule d'H₂O ou de NH₃. Elles sont abondantes sur le spectre car le peptide contient des acides aminés basiques contenant un groupement NH₃ et des acides aminés acides avec un groupement COOH. En comparant les masses du tableau 1.5 à celle sur le spectre (figure 1.32), on constate une identification quasi-complète des pics. L'ion précurseur avec perte d'une molécule NH₃ correspondant à $(M+2H)^{2+} - NH_3$ au m/z 606,8 est très abondant.

Cette fragmentation générée après avoir imposé une énergie de collision déterminée par la taille du peptide et par sa composition est une étape clé dans l'identification des peptides, la précision des masses est assurée par des calculs automatiques via la formule de l'exactitude de masse, mesurée en ppm. Pour l'analyse de protéines, il est possible d'effectuer au préalable une digestion enzymatique virtuelle en prévoyant les sites de coupures oubliées, c'est le cas du site internet (http://web.expasy.org/peptide_cutter/).

1.4.3 Les différents modes de balayages d'un instrument classique type QqQ en comparaison aux instruments hybrides QqLIT et QqTOF

Cette partie regroupe les expériences réalisables sur les appareils QqQ, QqLIT et le QqTOF et le type d'informations apportées par ces expériences. La plupart décrites pour le QqQ sont communes aux autres instruments utilisés au cours de nos travaux.

Dans un QqQ classique, le mode balayage complet ou *full scan* est un mode d'acquisition qui permet d'analyser l'ensemble des ions générés par la source ayant une gamme de masse de m/z défini. Si la molécule est connue, il existe le mode SIM ou *single ion monitoring* qui permet de suivre le m/z de cette molécule tout au long de l'acquisition. Ces deux expériences ne nécessitent qu'un simple quadripôle, elles peuvent se faire en Q₁ et Q₃, les deux autres quadripôles sont utilisés pour la focalisation des ions et leurs transmissions. La trappe à ions offre des balayages complet plus sensible et permet également d'effectuer la MSⁿ, elle permet de répéter les étapes de manières successives d'isolement, d'activation d'énergie de dissociation à l'infini, le seul facteur limitant est la taille de la trappe qui peut être saturée en

ions. Les instruments de nouvelles générations englobent les performances de ces différents analyseurs. C'est le cas des instruments de chez ABSciex utilisé durant nos travaux : le Q-TRAP 5500 (QqLIT) et le TripleTOF 5600 (QqTOF), représentés dans la figure 1.33.

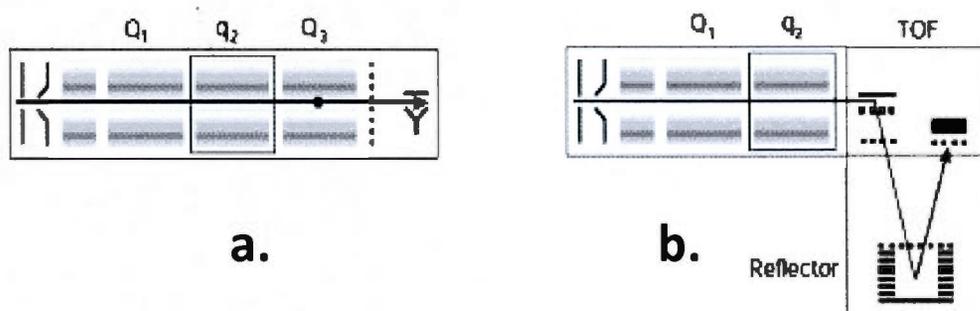


Figure 1.33 : Représentation du QqLIT (a) et du QqTOF (b).

Le Q-TRAP 5500 est constitué de deux filtres de masses Q1 et Q3 fonctionnant en mode RF/DC, ces deux analyseurs sont séparés par une cellule de collision q2, qui est uniquement en mode RF. Il est constitué comme un quadripôle classique, où là le Q3 peut analyser en mode filtre de masse mais aussi en mode LIT. Dans un QqLIT, l'expulsion des ions de la trappe ayant un m/z supérieur à ceux des ions précurseurs se fait généralement par une variation de l'amplitude RF [49].

Les expériences communes à tous les quadripôles comprennent des balayages complets, le SIM mais également les expériences résumées dans la figure 1.34 qui décrit les différents balayages réalisables sur ce type d'instrument. En appliquant une énergie de collision adéquate dans la sélection de l'ion précurseur, il est possible de le dissocier par différents moyens. Le premier type d'expérience représenté dans la figure 1.34 est le mode SRM *selected reaction monitoring* également appelé MRM pour *multiple réaction monitoring* est une réaction de transition qui permet une sélection d'un ion précurseur en Q1 et d'un ion fragment sélectionné en Q3, c'est la seule expérience qui s'effectue sans balayage car les 2 ions sont connus. Cet avantage de travailler en présence de molécules connues permet d'optimiser les conditions de transition et d'augmenter la sensibilité et la spécificité de détection [45]. C'est la méthode la plus utilisée pour l'analyse quantitative en spectrométrie de masse.

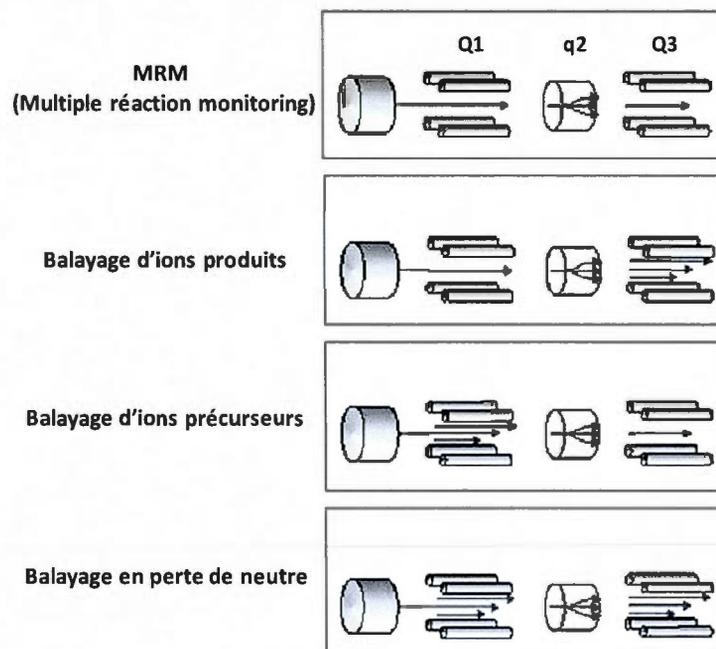


Figure 1.34 : Les différents types de balayages réalisables dans une cellule q2 sur un instrument de type QqQ classique.

La deuxième expérience est le balayage d'ions produits ou *product ion scan* (PI) qui permet de sélectionner un ion précurseur en Q1 de rapport m/z unique, soit en mode SIM, et de faire le balayage en Q3 de tous les ions fragments obtenus par fragmentation induite par collision (CID).

La troisième est la réaction de balayage de précurseurs *precursor ion scan* (PC) qui consiste à sélectionner un ion fragment et d'avoir le spectre de tous les ions précurseurs qui contiennent ce fragment.

La dernière expérience est la réaction de balayage de perte de neutre ou *constant neutral loss* qui consiste à choisir un fragment neutre et par un balayage des deux quadripôles (Q1 et Q3), les spectres obtenus correspondent aux molécules qui ont perdus le fragment neutre sélectionné.

En plus de ces expériences, le QqLIT permet de réaliser le mode EPI ou *enhanced product ion*, il est équivalent au mode PI mais est beaucoup plus performant en améliorant la séparation des ions par la trappe et la MS^n permettant l'accumulation d'expérience de masse.

L'expérience que nous avons le plus utilisée en laboratoire sur le QTRAP 5500 est le balayage des ions produits (*enhanced product ion scan* ou *EPI*) pour la fragmentation des adduits de GSH et QQCPF, où la détermination des ions fragments s'est réalisée par l'intermédiaire des masses connues des précurseurs. En combinant les performances des deux instruments, il est possible d'effectuer plusieurs balayages durant une seule acquisition.

Ce type d'instrument est adapté à la détermination structurale et à la quantification d'une molécule [32]. Le QqLIT est très semblable à un triple quadripôle, sauf que le dernier quadripôle est une trappe linéaire. [45].

Dans le cas du Triple TOF 5600 (QqTOF) représenté dans la figure 1.33b, le Q₃ est un TOF réflectron qui va permettre de mesurer les masses en haute résolution. L'avantage de cet instrument est que tous ces modes d'acquisition sont faits à haute résolution, ce qui nous permet de travailler à haute résolution en mode MS et en mode MS/MS. La gamme de sélection de masse au niveau du quadripôle Q1 comprend les m/z compris entre 50 et 1250, cela permet d'avoir une gamme de masse plus large et de détecter des ions ayant une gamme de masse de m/z comprise entre 5 et 40 000. Sa résolution est comprise entre 25 000 à 40 000. En effet, après avoir fait un balayage complet pour détecter tous les ions précurseurs à un moment donné. Et de manière automatique, l'acquisition des spectres MS/MS des pics de plus hautes intensités pour ensuite fragmenter les ions précurseurs correspondant.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Matériels

L'acétaminophène pure à 98 %, l'hydrochlorate de fipexide, l'atrazine pestanal®, les sels tétra-sodiques de NADPH (β -nicotinamide adénine di nucléotide 2'-phosphate réduit), le *L*-glutathion réduit (*L*-GSH) à 99 %, le DL-dithiotréitol (DTT), l'acide trifluoroacétique (TFA) et le 2 iodo-acétamide (IAM) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

Les sérums albumines humaine, bovine et de rat ont également été fournies par Sigma-Aldrich, ainsi que les enzymes pronase E qui est un mélange de protéase extraite de *Streptomyces griseus*, d'origine bactérienne de type XIV (3.4.24.31) et la pepsine issue de la muqueuse stomacale de porc sous forme solide. Certains produits tels que les sels de phosphate de potassium KH_2PO_4 sont achetés chez Fisher scientifique, le laboratoire chimique Caledon a fourni les sels de bicarbonate d'ammonium NH_4HCO_3 pour la préparation au laboratoire des tampons utilisés pour les incubations, ainsi que la solution de NH_4OH à 30 %. Le QQCPF a été synthétisé en collaboration avec le laboratoire de chimie organique du Professeur René Roy (UQAM), par Shiao Tse.

La trypsine lyophilisée est une trypsine « trypsine modifiée pour un séquençage de qualité ». Elle a été fournie par Promega (Madison, Wisconsin, États Unis) avec son tampon de solubilisation contenant 50 mM d'acide acétique. Les microsomes de foie de rat (20 mg/ml) de type Aroclor sont fournis par BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada). Les cartouches d'extraction à phase solide (SPE) Strata-XC de type SCX (Phase solide échangeuse de cations: 30 mg) sont achetées chez Phenomenex (Toronto, Ontario, Canada) et les cartouches Oasis de type HLB (*hydrophilic lipophilic balance*: 30 mg) sont de chez Waters (Mississauga, Ontario, Canada).

2.2 Méthodologie

2.2.1 Synthèse du QCCPF

Le QCCPF est un peptide synthétisé par le laboratoire de chimie organique, il est constitué de 5 acides aminés : 2 glutamines, 1 cystéine, 1 proline et 1 phénylalanine. Sa synthèse a été effectuée avec une résine de type SPPS (Solid-Phase Peptide Synthesis) en présence d'un réacteur. Les acides aminés sont greffés un à un par couplage où l'extrémité C-terminal de l'acide aminé déjà accroché est relié à l'extrémité N-terminale du nouvel acide aminé à greffer. Afin d'optimiser la fixation des acides aminés, la résine SPPS de type Wang est utilisée et des groupements protecteurs de type Fmoc protègent l'extrémité N-terminale de l'acides aminé. La réaction peptidique nécessite un agent de couplage : le PyBOP [(Benzotriazol-1-yl)oxy]tris-(pyrrolidino)phosphonium), une base *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) dans le DMF, et les acides aminés protégés. Après la réaction, la purification est réalisée avec des lavages successifs par des mélanges de solvants de type diméthylformamide (DMF), dichlorométhane (DCM) et méthanol. La figure 2.1 décrit les composants du cycle dans la synthèse peptidique sur résine.

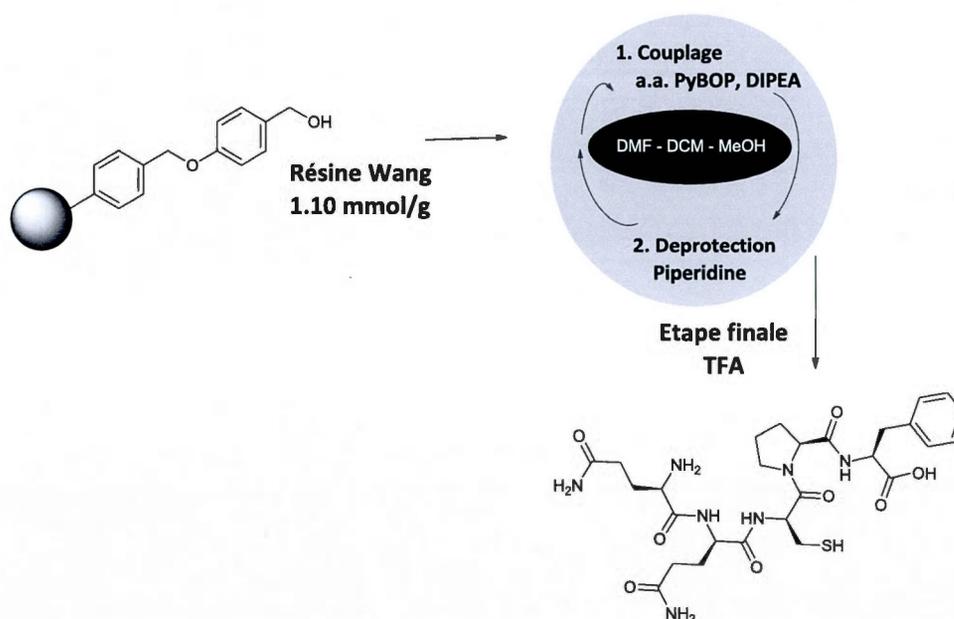


Figure 2.1 : Synthèse du pentapeptide synthétique : le QCCPF.

2.2.2 Validation du trappage du métabolite réactif de médicament par l'utilisation de deux agents de trappage : le glutathion et le QQCPF

Incubations *in vitro* :

Dans un tampon phosphate à 50 mM à pH 7,4, contenant 1 mg/ml de microsomes de foie de rat type Aroclor. L'acétaminophène, le fipexide et l'atrazine sont ajoutés séparément à des concentrations de 50 μ M, suivi de l'ajout de l'un ou l'autre agent de trappage : GSH ou QQCPF à des concentrations de 2 mM. La dernière étape consiste à l'ajout de 1 mM du coenzyme NADPH, c'est une source d'électrons qui va permettre les réactions d'oxydoréductions indispensables au cytochrome P450. Tous ces éléments sont incubés pendant 2 h à 37°C, à 600 rpm à tubes ouverts car la réaction effectuée par le NADPH nécessite de l'oxygène. Les incubations sont effectuées dans un incubateur thermomixeur Eppendorf® de chez Sigma Aldrich. Pour chaque médicament, un échantillon contrôle est effectué en absence d'agent de trappage, pour l'uniformité des volumes des échantillons, le volume de l'agent de trappage est remplacé par un volume de tampon KH_2PO_4^- à 50 mM. L'arrêt de la réaction se fait par l'addition d'un même volume d'acétonitrile froid, les tubes sont mis à centrifuger à 13 000 rpm pendant 10 minutes dans une centrifugeuse type Eppendorf® 5418. Cette étape entraîne la précipitation des protéines délimitant la zone de surnageant à prélever. Ainsi, 400 μ L du surnageant est évaporé à l'aide de l'évaporateur sous vide, le speed vac provenant de chez Thermo-Fischer. Les culots sont resuspendus dans une solution de 10 % ACN dans de l'eau nanopure.

Dans un premier temps, les masses exactes des adduits formés entre les médicaments et l'agent de trappage sont déterminées en LC-MS à haute résolution. Ils sont séparés en utilisant la colonne RP-HPLC Beta-basic fourni par Thermo-scientifique, relié au système HPLC Agilent 1200 couplé au spectromètre de masse ESI-TOF Agilent 6210 de chez Agilent technologies. Dans un second temps, pour l'étude structurale des adduits formés et pour la détermination de leurs profils de fragmentation, cette analyse est faite à basse résolution. La séparation utilise la même méthode chromatographique et la même colonne RP-HPLC reliée pour cette analyse à l'instrument hybride QTRAP 5500 de chez ABSCIEX équipé d'un système HPLC Prominence de chez Shimadzu.

Pour ce qui est des conditions chromatographiques du LC-ESI-TOF, les métabolites et les adduits formés sont séparés sur une colonne C18, en phase inverse Thermo beta-basic de dimension 150 x 2,1 mm, avec un diamètre de particule de 5 μm . L'éluion des adduits se fait en mode gradient avec une phase mobile constitué d'eau et de 0,1 % d'acide formique pour le solvant A, et d'acétonitrile et de 0,1 % d'acide formique pour le solvant B. La figure 2.2 illustre le pourcentage d'acétonitrile contenu dans la phase mobile au cours du temps permettant l'éluion des adduits formés.

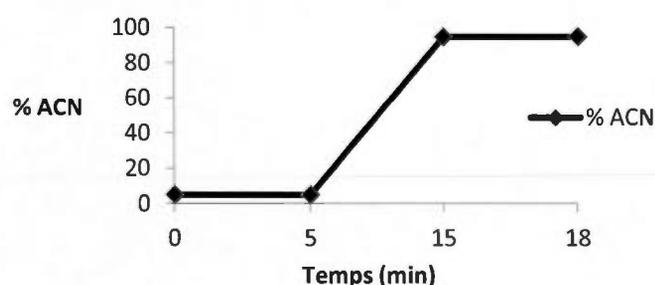


Figure 2.2 : Gradient d'éluion de la colonne RP-HPLC Thermo beta-basic

La température de la colonne est de 35°C, et le débit est de 0.3 ml/min. Le volume injecté est de 20 μL . L'instrument utilisé est un spectromètre de masse LC-ESI-TOF par temps de vol (TOF : Time of Flight), la source utilisée est une source électrospray en mode positif assurant l'ionisation des peptides. Le logiciel d'acquisition est le logiciel Mass Hunter (version B.03.01). Chaque expérience nécessite une étape d'étalonnage de l'instrument qui s'effectue avec un réglage des paramètres du TOF. Les données sont acquises avec un intervalle de m/z compris entre 100 et 1300 avec l'utilisation de calibrants internes fournis par Agilent, les masses de références des calibrants étant $m/z = 121,050873$ et $922,009798$. Pour établir une homogénéité et une reproductibilité pour toutes les injections qui auront lieu, les calibrants sont injectés en continu dans la source et ont ainsi les mêmes conditions que les échantillons. En ce qui concerne les conditions de la source, le voltage du capillaire est de 4000 V, la température du gaz chauffant N_2 de la source est de 350 °C avec un débit de 12 L/min. La pression du nébulisateur est de 35 psi, le voltage du fragmenteur est de 100 V ainsi que 60 V pour le voltage du skimmer. Toutes les données acquises avec le spectromètre à temps de vol sont traitées par les logiciels Mass Profiler et Mass Hunter Qualitative Analysis version 1.1.

Après avoir confirmé la présence de l'adduit ainsi que sa masse précise en haute résolution dans le LC-ESI-TOF, les profils de fragmentations des adduits de GSH et de QQCPF sont analysés par LC-MS/MS dans le QTRAP 5500, c'est un instrument hybride constitué d'un quadripôle et d'une trappe ionique linéaire, la source ESI chauffante est nommée turbospray®. Les conditions chromatographiques HPLC-QTRAP sont identiques à celles utilisées lors de l'expérience précédente sur le HPLC-ESI-TOF.

Concernant les conditions du spectromètre QTRAP 5500. Les conditions de la source sont un voltage du capillaire de 5000 V, une température de la source de 450 °C. La pression du gaz rideau ou *curtain gaz* est de 55 psi, elle permet la protection de l'intérieur de l'appareil à haute pression avec un débit de 35 L/ min, pour ce qui est du gaz de nébulisation et du gaz turbo, elle est de 60 psi. A basse résolution, en présence d'un instrument hybride, comprenant une trappe ionique, Le logiciel d'acquisition est le logiciel Analyst® software Le mode d'acquisition utilisé est un mode CID ou *Collision induced dissociation*. Le réglage de l'appareil pour l'étude structurale des adduits utilisait dans un premier temps les balayages des ions précurseurs acquis en basse résolution, puis ensuite des balayages en mode EPI ou *Enhanced Product ion*, avec un intervalle de *m/z* compris entre 100-1000. Les données MS/MS sont acquises pour chaque adduit avec une énergie de collision de 30V ($\pm 15V$) pour les adduits de GSH, et 40 ($\pm 15V$) pour les adduits du QQCPF.

2.2.3 Préparation à l'analyse des peptides d'albumines.

2.2.3.1 Optimisation du protocole de digestion de l'albumine.

Incubations *in vitro* :

La pronase Son mode d'action est non spécifique, c'est un mélange de protéases, les sites de clivage sont indéterminés [21]. Pour ce faire, les incubations sont effectuées dans un tampon NH_4HCO_3 contenant 500 μg d'albumine humaine, ou de rat, pendant 20 minutes à température ambiante en présence de 20 mM de DTT, cette étape permet une dénaturation de la protéine, par une réduction des ponts disulfures. Après addition d'un volume de 100 μL de

tampon NH_4HCO_3 , la pronase est ajoutée de telle sorte que l'enzyme est un ratio (poids/poids) de 1 pour 10 par rapport à l'albumine, l'incubation est réalisée à 37°C , à 600 rpm pendant 30 à 90 minutes.

La pepsine reconnaît un site de clivage sur la chaîne peptidique, en position C terminale de tripeptides aux extrémités hydrophobes [34, 35]. C'est une enzyme qui est active à des pH très acides, entre 1 et 1,5, pour cela les échantillons sont préparés dans une solution de 1% d'acide trifluoroacétique (TFA). A cette solution est ajoutée 500 μg d'albumine humaine, ou de rat. Après l'incubation avec 20 mM de DTT, pendant 20 min à température de la pièce. Ceci suit une étape d'ajout de 300 μL de solution à 1% TFA, puis c'est l'addition de la pepsine avec un ratio de 1:20 par rapport à l'albumine, l'incubation est réalisée à 37°C , à 600 rpm pendant 2 à 8 heures. L'arrêt de la réaction dénature l'enzyme de manière irréversible, par un changement de pH, l'ajout d'une solution à $\frac{1}{4}$ du volume totale de NH_4OH à 5 %, permet le passage d'un pH acide à un pH basique.

La trypsine coupe à l'extrémité C-terminale des acides aminés basique [31]. Les peptides formés par la trypsine ont des extrémités contenant un groupement amine chargé sous la forme NH_3^+ . Ainsi le pH optimal de coupure est un pH situé entre 8-9, c'est le pH utilisé au cours des incubations *in vitro*. Les échantillons contenant le tampon NH_4HCO_3 et les 500 μg d'albumine humaine ou de rat, sont incubés avec du DTT à une concentration finale de 20 mM pendant 20 minutes à température ambiante. Après ajout de 500 μL de tampon NH_4HCO_3 , la trypsine solubilisée est ajoutée avec un rapport de 1:100 par rapport à l'albumine, l'incubation est effectuée à 40°C , à 600 rpm entre 4 et 18 h. Le passage d'un pH basique à un pH acide avec l'addition de $\frac{1}{4}$ de volume d'une solution de 2% TFA permet l'arrêt de la réaction. Cette étape est suivie d'une étape de centrifugation, permettant la précipitation des protéines à froid avec une centrifugeuse de type Eppendorf® 5402 à 4°C .

Purification des protéines et pré-concentrations des échantillons :

Après la digestion enzymatique terminée, une étape de purification utilisant des cartouches SPE (figure 2.3) de type Oasis HLB pour les peptides issus de la digestion de la pronase et de la pepsine, et de type SPE-Strata-X pour les peptides issus de la digestion tryptiques. Ces

peptides sont chargés, ils contiennent une extrémité à lysine ou à arginine nécessitant des cartouches de type échangeuses de cations. Le lavage des peptides hydrophobes se fait dans l'eau, et l'élution dans le méthanol, alors que en présence de peptides plus basique, l'élution se fait avec du 5% NH_4OH dans le méthanol, précédé de 2 étapes de lavage, la première dans 0,1% HCl dans l'eau, et la seconde dans 0,1% HCl dans le MeOH . Les échantillons sont évaporés à sec et les culots reconstitués dans une solution de 10% ACN dans l'eau.

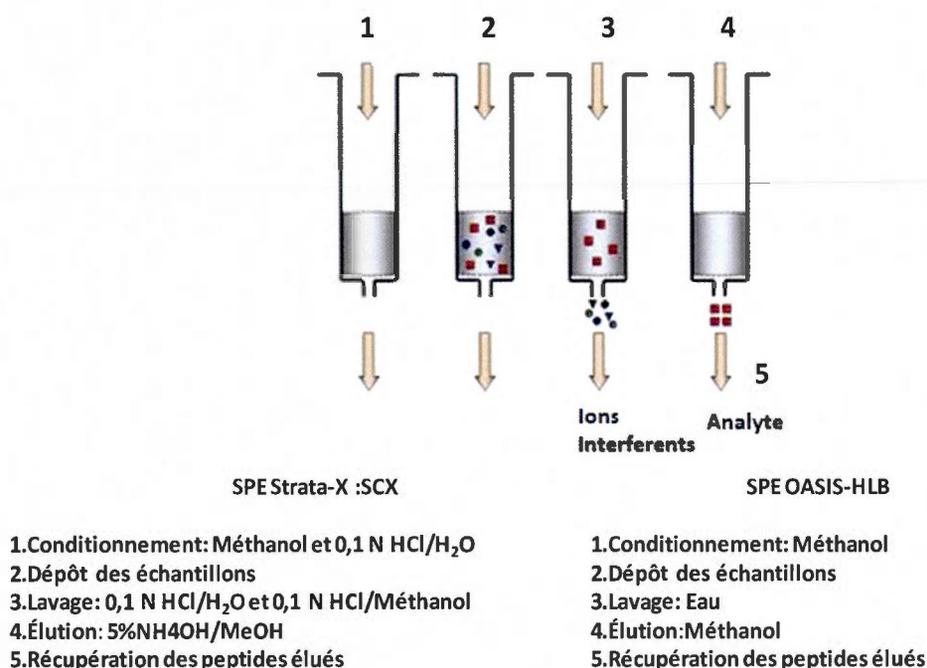


Figure 2.3 : Principe de la purification SPE et l'élution des peptides d'intérêts.

Analyse LC-MS/MS :

L'analyse des peptides issus des différentes albumines utilise une colonne spécifique à la séparation des peptides digérés, la colonne RP-HPLC Kinetex XB-C18 fourni par Phenomenex. Cette colonne est reliée au système constitué de l'HPLC Nexera de chez Shimadzu couplé au spectromètre de masse hybride TripleTOF™ 5600 de chez ABSCIEX. Les peptides sont séparés en RP-HPLC à l'aide d'une colonne Phenomenex Kinetex C18, ayant pour dimension 150 x 2.1 mm et un diamètre de particule de 2.6 μm . Le volume

d'injection est de 15 μL . Le débit de la colonne est de 0.3 ml/min, la phase mobile est constituée d'un mélange de deux solvants. Le solvant A constitué d'eau et de 0.1 % d'acide formique, et le solvant B constitué d'acétonitrile et de 0.1 % d'acide formique. Le gradient dure 28 minutes, il est décrit dans la figure 2.4.

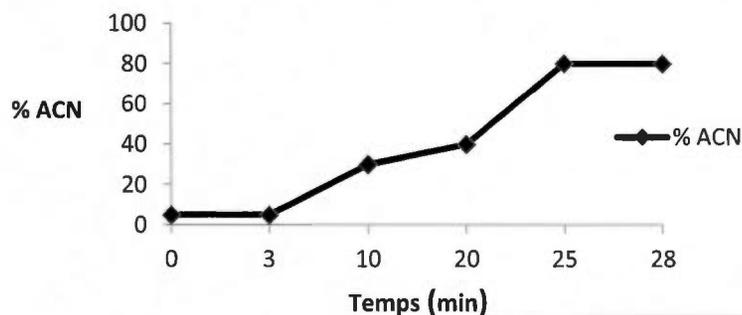


Figure 2.4 : Gradient utilisé pour la colonne RP-HPLC Kinetex C18.

Conditions du spectromètre TripleTOF™ 5600

L'instrument utilisé est un instrument à haute résolution de type quadripôle-temps de vol : Triple TOF 5600 de chez ABSCIEX, la source utilisée est une source duospray en mode positif assurant l'ionisation des peptides, il y a deux sources, une source ESI nommée turbo-ion spray et une source APCI pour l'étalonnage des échantillons. Le logiciel d'acquisition est le logiciel Analyst®TF software. L'étalonnage de l'appareil est réalisé de manière externe, il s'effectue tous les 5 échantillons, en présence d'une source APCI, utilisant des calibrants préparés au laboratoire avec des petites molécules ayant un m/z variables. Les paramètres de la source sont un voltage du capillaire à 5000 V, la température du gaz ionisant, le N_2 pure est à 500 °C. La pression du gaz rideau est de 30 psi, et de 50 psi pour la pression des gaz GS1 et GS2 de la source turbo-ion. Le voltage du DP ou *declustering potentiel* est de 80 V. La méthode utilisée permettant la vérification du profil de fragmentation, directement *in-situ* est la méthode IDA ou *Information dependant acquisition* faite par les instruments d'AB SCIEX, c'est une manière de nommer toutes les expériences réalisables sur un instrument. C'est une méthode qui consiste à effectuer un balayage complet pour détecter tous les ions présent et le système d'acquisition forme une liste de ces ions. Cette liste répond aux paramètres définis

sur le logiciel d'acquisition (QTRAP 5500 : logiciel Analyst[®] software et Triple TOF 5600 : logiciel Analyst[®]TF software) au préalable pour filtrer les ions précurseurs non désirés. Les ions restants sont fragmentés de manière automatique et génèrent leurs spectres MS/MS. Ce cycle est répété durant toute l'acquisition. Ce mode d'exploration utilise l'information donnée par le balayage complet, pour faire des nouveaux balayages MS/MS dépendant du balayage de départ, la méthode contient 10 balayages MS/MS par cycle, où chaque cycle à une durée 1.3 seconde, le balayage d'ions produits s'effectue avec une énergie de collision de 35V (± 15 V). Les données sont traitées par les logiciels correspondants tels que Protein Pilot[™], Peak View[™] et MultiQuant[™]. L'avantage avec ce type d'instrumentation est que chaque balayage va effectuer automatiquement les spectres MS/MS des ions précurseurs ayant une intensité supérieure à 1000 cps.

2.2.3.2 Méthode de quantification par l'utilisation d'un standard interne d'albumine

Digestion simultanée du mélange des deux albumines :

En reprenant le protocole de la pepsine. A la solution de 1% TFA est ajouté un mélange d'albumine de rat et humaine, soit une quantité finale de 120 μ g avec un ratio de 1/5, 1/2, 1/1, 2/1, 5/1 d'albumine humaine par rapport à l'albumine de rat. Suivi de l'étape d'incubation avec 20 mM de DTT, pendant 20 min à température ambiante. L'inconvénient de la pepsine est que des peptides contenant des cystéines peuvent réagir avec l'oxygène cellulaire et formés ainsi des cystéines oxydées et cela peut influencer l'intensité du signal dans la mesure où le même peptide va donner deux signaux distincts un sans oxydation et un avec oxydation. Alors, après la dénaturation au DTT, une incubation dans l'obscurité en présence de 100 mM d'IAM, préparé dans un tampon NH_4HCO_3 , entraîne l'alkylation des cystéines libres, empêchant ainsi leurs oxydations. Puis, l'ajout de 300 μ L de solution à 1% TFA, permet la préparation de l'échantillon à la digestion par la pepsine, la pepsine est additionnée avec un ratio de 1:20 par rapport au mélange d'albumines, les incubations sont réalisées à 37°C, à 600 rpm à 2 heures (2h), 4 heures (4 h) et 8 heures (8h). L'arrêt de la réaction se fait par ajout d' $\frac{1}{4}$ du volume total d'une solution de NH_4OH à 5 %.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Validation du QQCPF comme agent de trappage

La formation de métabolite réactif, à la suite de réactions secondaires à un médicament sont l'objet de nombreuses recherches. Le corps utilise pour piéger ces métabolites réactifs le glutathion. C'est un antioxydant naturel qui existe à une grande concentration dans le corps. Ce glutathion est utilisé dans de nombreuses études comme test de validation de la toxicité d'un médicament *in vitro* par la mise en évidence du piégeage de ces métabolites réactifs (MR).

Nos travaux impliquent la toxicité de la sérum albumine, par la formation d'adduit entre une molécule exogène et la cystéine 34 qu'elle constitue. En effet des études le démontrent, l'albumine à plusieurs sites de fixation par l'intermédiaire de ses poches hydrophobes mais également par cette cystéine 34 qui lui permet d'agir comme antioxydant. Ainsi un peptide modèle, le QQCPF, mimant le site actif de la sérum albumine humaine et bovine a été synthétisé et utilisé au cours de nos expériences comme agent de trappage, en comparaison au glutathion.

Les expériences ont été réalisées en présence de 3 médicaments. Des incubations avec des microsomes de foie de rat ont été réalisées, en utilisant le QQCPF et le GSH comme agent de trappage, en présence de deux médicaments et d'un pesticide qui sont respectivement l'acétaminophène, le fipexide et l'atrazine. L'acétaminophène est un analgésique, plus connu sous le nom de Tylenol®, il permet de diminuer la fièvre mais aussi les maux de têtes. Malheureusement il est aussi connu pour avoir des effets secondaires par la formation du MR : le NAPQI. Une dose d'acétaminophène normale est capable de former une proportion de NAPQI qui est facilement enlevé du corps par la formation d'adduits avec le GSH endogène, cependant à des doses plus élevées, le NAPQI peut se concentrer et produire une toxicité au niveau du foie [13]. Le fipexide est un médicament qui stimule le système

nerveux, il joue un rôle sur le niveau de la dopamine secrétée par le cerveau [23]. Il améliore la mémoire à court terme mais aussi l'apprentissage en augmentant les fonctions cognitives. Néanmoins, il est aussi connu pour ses effets secondaires allergiques mais aussi toxiques vis-à-vis du foie, ce qui lui a valu son retrait du marché du médicament. L'atrazine est un pesticide utilisé en agriculture, les métabolites formés sont dus à l'inhalation de sa molécule volatile contenus dans l'air ou par la transmission par le contact direct avec une plante traitée. Il peut former également plusieurs métabolites réactifs.

Les figures 3.1 et 3.2 décrivent la formation des adduits entre le GSH et le QQCPF ; le même processus de formation s'applique pour les 2 agents de piégeages. Ce processus implique la formation des métabolites réactifs (MR) formés à partir de l'APAP, aussi appelé NAPQI, du fipexide et de l'atrazine et l'adduit formé par la fixation de l'agent de trappage.

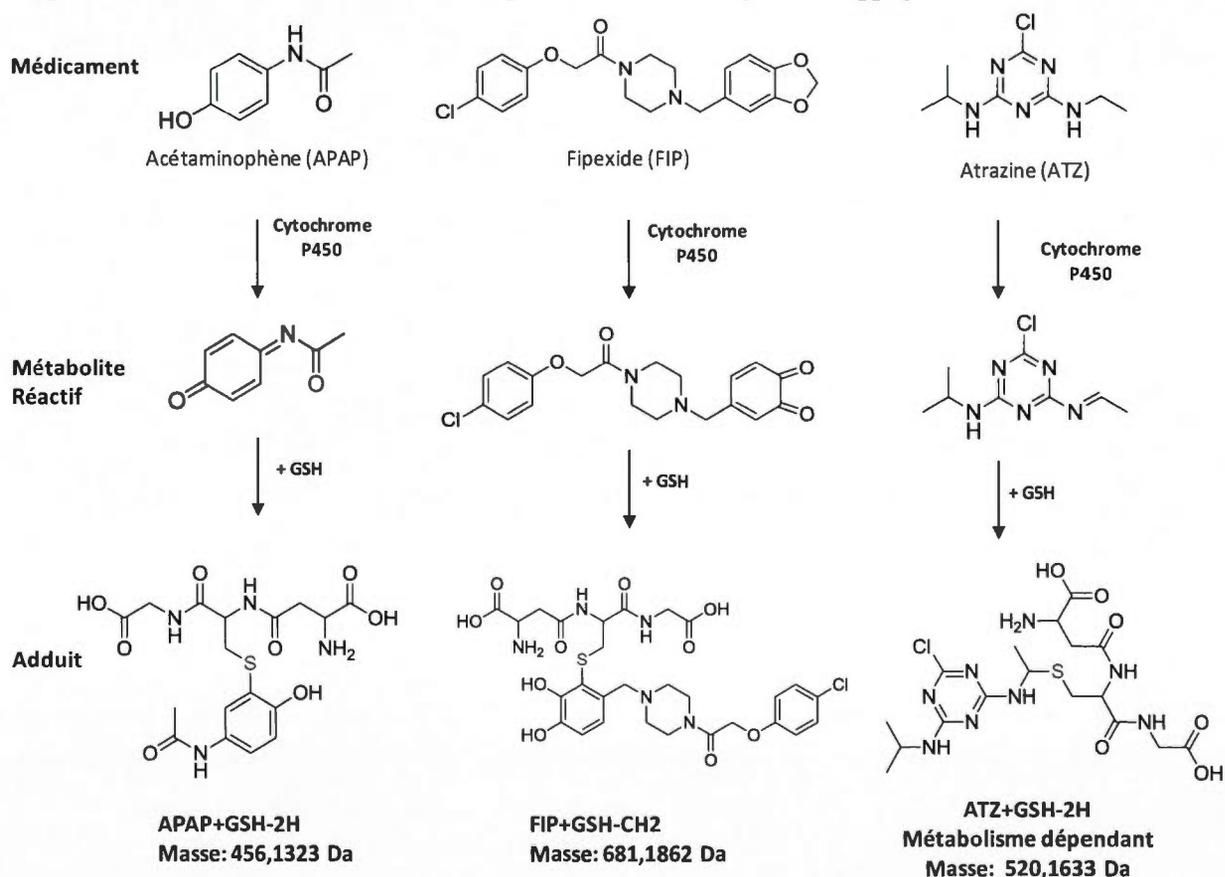


Figure 3.1 : Voies de formation des métabolites réactifs et des adduits de GSH pour l'APAP, le fipexide et l'atrazine

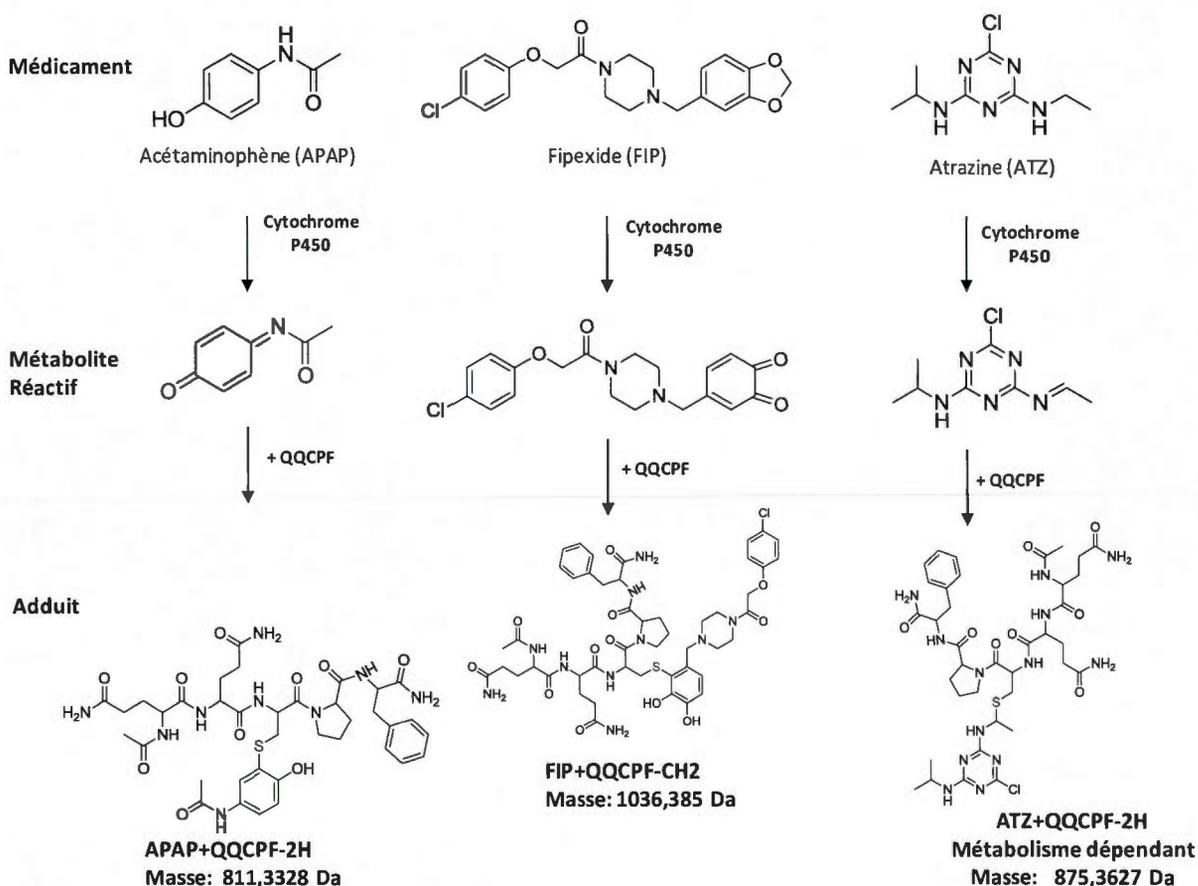


Figure 3.2 : Voies de formation des métabolites réactifs et des adduits de QQCPF pour l'acétaminophène, le fipexide et l'atrazine.

La fixation de ces molécules sur le groupement thiol des agents de trappage se fait par une substitution nucléophile. Nos travaux faits à partir des microsomes de rat en présence de NADPH, un cofacteur nécessaire pour le métabolisme en Phase I, ont montré la formation du NAPQI et sa fixation sur les deux agents de trappage utilisés, le QQCPF et le GSH. Nous avons utilisé le GSH comme un agent de trappage connu, et en parallèle le QQCPF est utilisé comme un peptide modèle, mimant le site actif de la sérum albumine humaine et bovine.

Les figures 3.3 et 3.4 présentent les résultats obtenus par l'analyse LC-ESI-TOF des échantillons contenant les incubations des médicaments en présence de microsomes de rat (partie 2.2.2). Deux contrôles ont été utilisés; l'un en absence d'agent de trappage (en rouge)

et l'autre en absence du NADPH (en vert) pour montrer que la formation de l'adduit implique le cytochrome P450 qui est NADPH-dépendant pour pouvoir effectuer ses réactions d'oxydations. Ce dernier contrôle met en évidence les adduits qui ne sont pas dépendant à l'ajout du NADPH ; c'est le cas de l'adduit GSH-ATZ-HCl, le EIC (*Extracted ion chromatogram*) représenté dans la figure 3.4 montre un pic à 8,6 min, le m/z est de 244,1091 $(M+2H)^{+2}$ dans le contrôle sans NADPH (en vert).

L'accrochage du médicament sur le GSH et sur le QQCPF est identique, les exactitudes de masses en ppm ont été extraites avec les paramètres de calcul du logiciel Mass Hunter imposé à 10 ppm. Cet accrochage est identique, c'est la même perte d'atomes, moins 2H avec l'APAP, moins CH_2 avec le FIP et moins HCl et moins 2H avec l'ATZ. Entre le GSH et le QQCPF, cette exactitude de masse nous montre que ce n'est pas un ion isobarique qui pourrait être confondu avec un peptide de même masse, et que c'est deux agents ont le même comportement pour ce qui est de trapper le MR.

Les tableaux 3.1 et 3.2 sont un résumé des adduits identifiés ayant des ions $(M+H)^+$ et $(M+2H)^{2+}$, avec la structure de ces adduits et la perte des atomes correspondant, le temps de rétention, toutes ces informations sont des informations nécessaires à l'étude en fragmentation à basse résolution. Ce sont des données qui vont préciser l'ion à fragmenter par l'intermédiaire de son temps de rétention (RT ou t_r) et sa masse exacte.

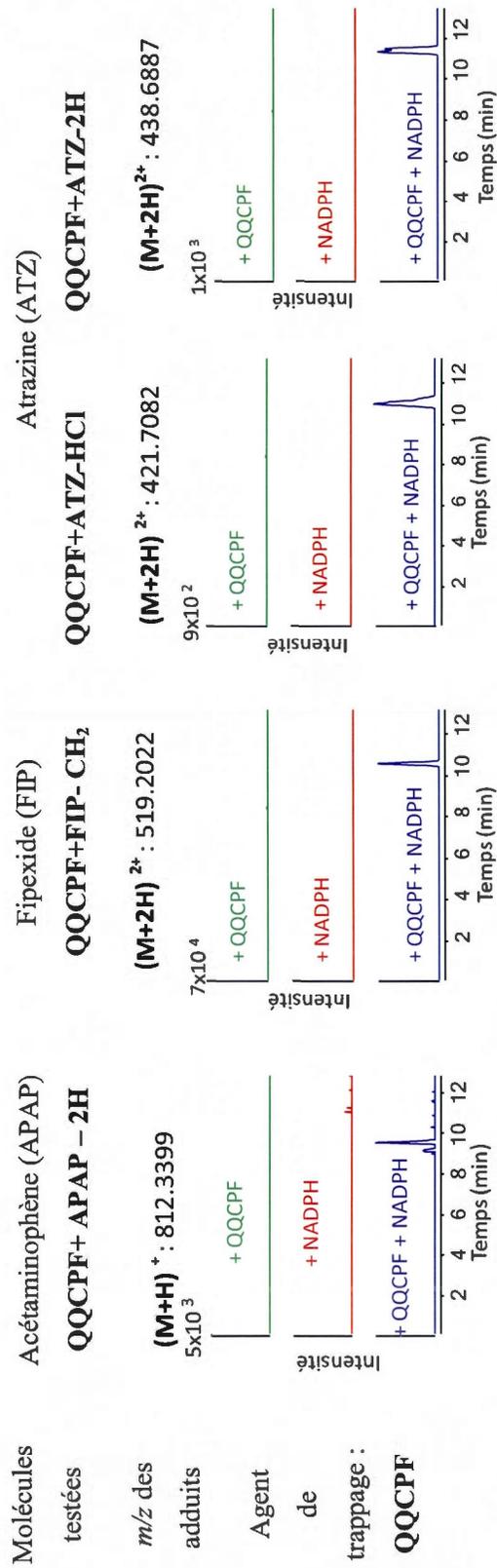


Figure 3.3 : Chromatogramme de l'extraction des ions (EIC) des adduits QQCPF à ± 10 ppm.

Tableau 3.1 : Récapitulatif des adduits du QQCPF identifiés par LC-ESI-TOF.

Molécules testées	QQCPF				Exactitude de la masse en (ppm)	
	<i>m/z</i>		Structure	RT (min)		Formule brute
	MH+	MH2+				
Acétaminophène	812.3401	406.6734	APAP+QQCPF-2H	9.3	C ₃₇ H ₄₉ N ₉ O ₁₀ S	0.8
Fipexide		519.1998	FIP+QQCPF-CH ₂	10.3	C ₄₈ H ₆₁ N ₁₀ O ₁₂ SCI	2.9
Atrazine	842.409	421.7081	Atz+QQCPF-HCl	10.2	C ₃₇ H ₅₅ N ₁₃ O ₈ S	-4.6
	876.37	438.6887	Atz+QQCPF-2H	9.5	C ₃₇ H ₅₄ N ₁₃ O ₈ SCI	25.9

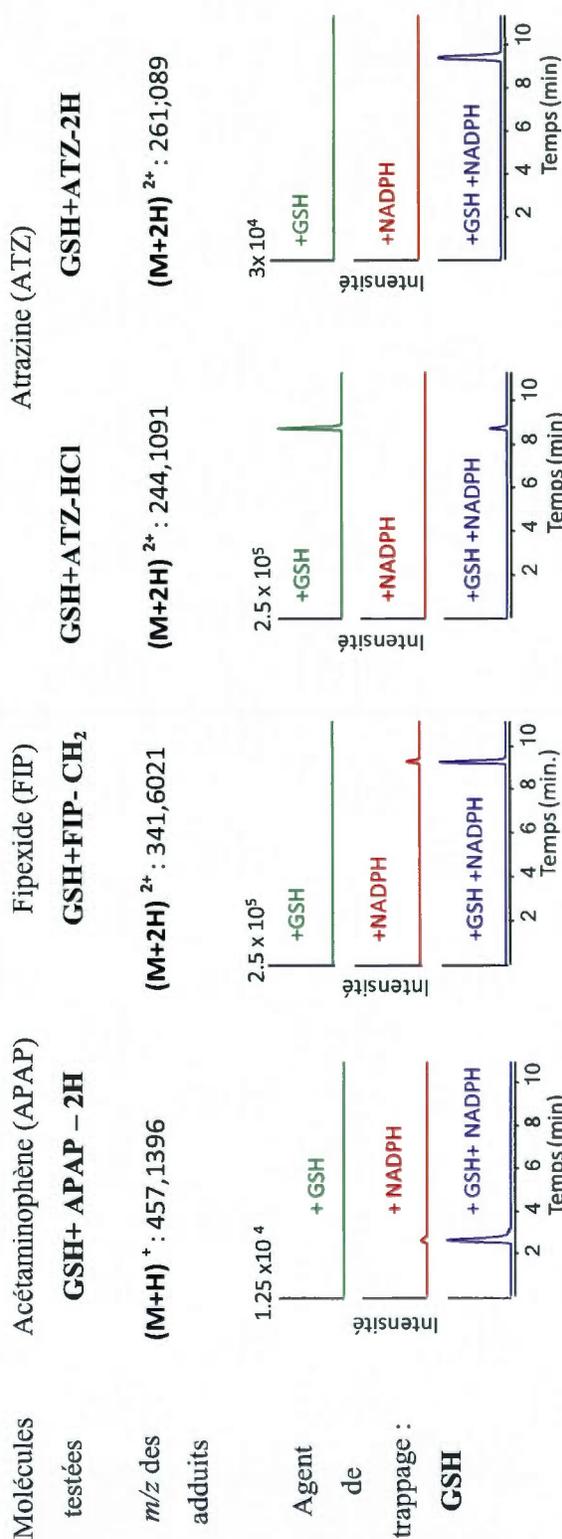


Figure 3.4 : Chromatogrammes de l'extraction des ions (EIC) des adduits de GSH à ± 10 ppm.

Tableau 3.2 : Récapitulatif des adduits du GSH identifiés par LC-ESI-TOF.

Molécules testées	<i>m/z</i>		Structure	RT (min)	Formule Brute	Exactitude de la masse (ppm)
	MH ⁺	MH ²⁺				
Acétaminophène	457.1396		APAP+GSH-2H	2.6	C ₁₈ H ₂₄ N ₄ O ₈ S	-1.4
Fipexide	682.1935	341.6021	Fip+GSH-CH ₂	9.2	C ₂₉ H ₃₆ N ₅ O ₁₀ SCI	0
Atrazine	487.2092	244.1091	Atz+GSH-HCl	8.6	C ₁₈ H ₃₀ N ₈ O ₆ S	-5.6
	521.1706	261.089	Atrazine+GSH-2H	9.4	C ₁₈ H ₂₉ N ₈ O ₆ SCI	-4

La formation des adduits et l'exactitude de leurs masses ont été déterminées en haute résolution par l'intermédiaire du ESI-TOF. Les mêmes échantillons ont été étudiés par MS/MS sur un appareil quadripôle-trappe linéaire (QqLIT, QTRAP 5500 d'AB Sciex). L'étude de l'adduit formé à partir d'un métabolite réactif et le QQCPF nous renseigne sur le comportement que peut avoir ce pentapeptide vis-à-vis d'autres agents de trappage. L'analyse MS/MS s'est faite en mode EPI (*enhanced product ion*) qui enregistre tous les ions produits d'un précurseur qui sont accumulés dans la trappe pour augmenter la sensibilité et la qualité des spectres MS/MS. Ces informations apportées par la fragmentation ont mis en évidence des fragments propres au QQCPF et au GSH, ainsi que les similitudes qu'il peut y avoir entre ces deux agents de trappage. Les figures 3.5 à 3.12 décrivent les fragments obtenus à partir des adduits de GSH et de QQCPF. Pour le QQCPF, sur les figures 3.5, 3.7, 3.9 et 3.10 on peut constater 2 fragments propres qui sont les fragments aux m/z 262 et au m/z 171. En ce qui concerne le GSH, le fragment récurrent d'un adduit à l'autre, que l'on retrouve sur les figures 3.6, 3.8, 3.11 et 3.12 est le fragment aux m/z 129 qui correspond à la perte du γ -glutamate.

Ces renseignements nous permettront d'anticiper le comportement du site actif de l'albumine en présence de ces médicaments.

Fragmentation de l'adduit **QQCPF-APAP** avec perte de **2H**

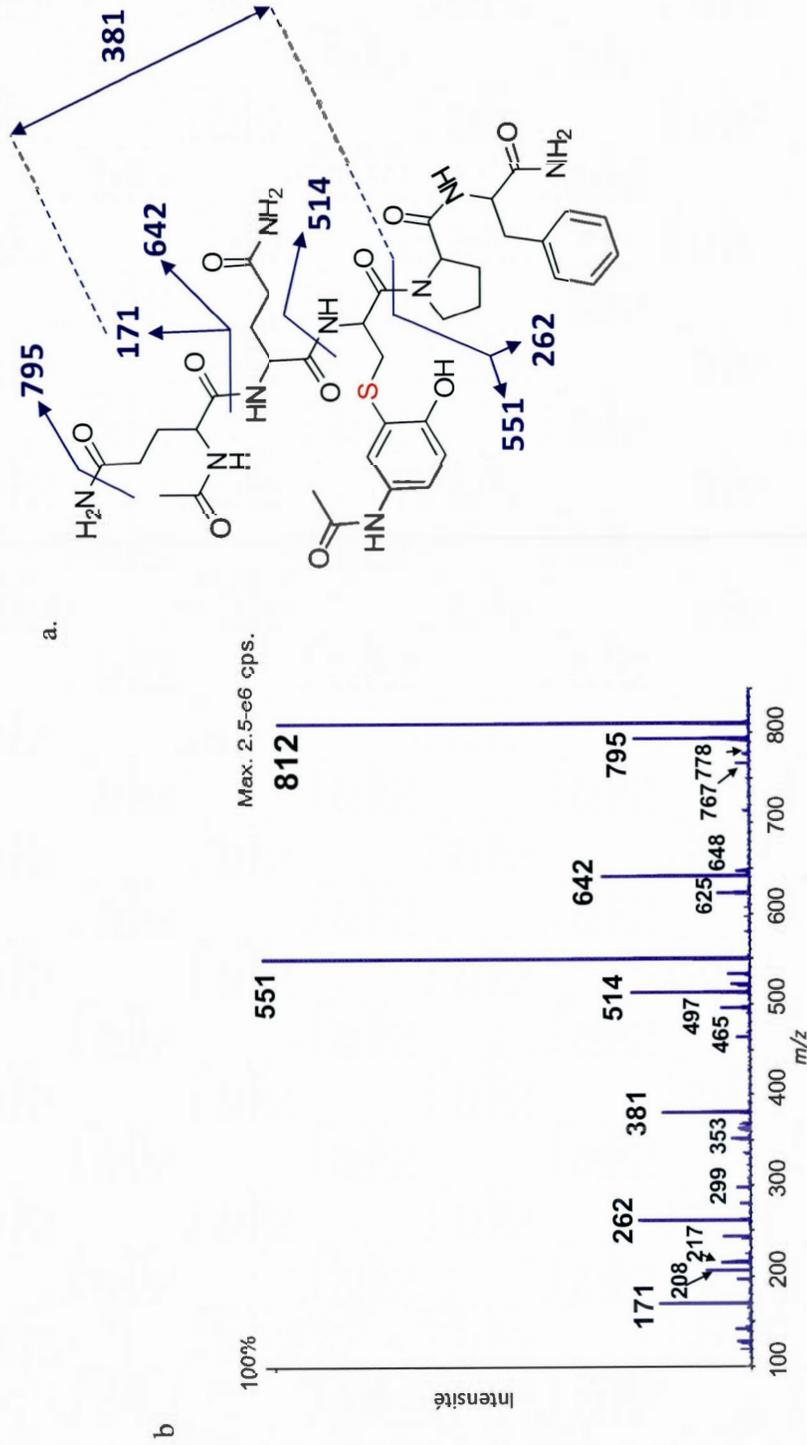


Figure 3.5 : L'identification des fragments obtenus sur le spectre MS/MS (a), et spectre MS/MS de l'adduit QQCPF+APAP (-2H) en mode EPI avec l'ion précurseur au m/z 812,2 et une EC à 40 V (\pm 1.5V) (b).

Fragmentation de l'adduit **GSH-APAP** avec perte de **2H**

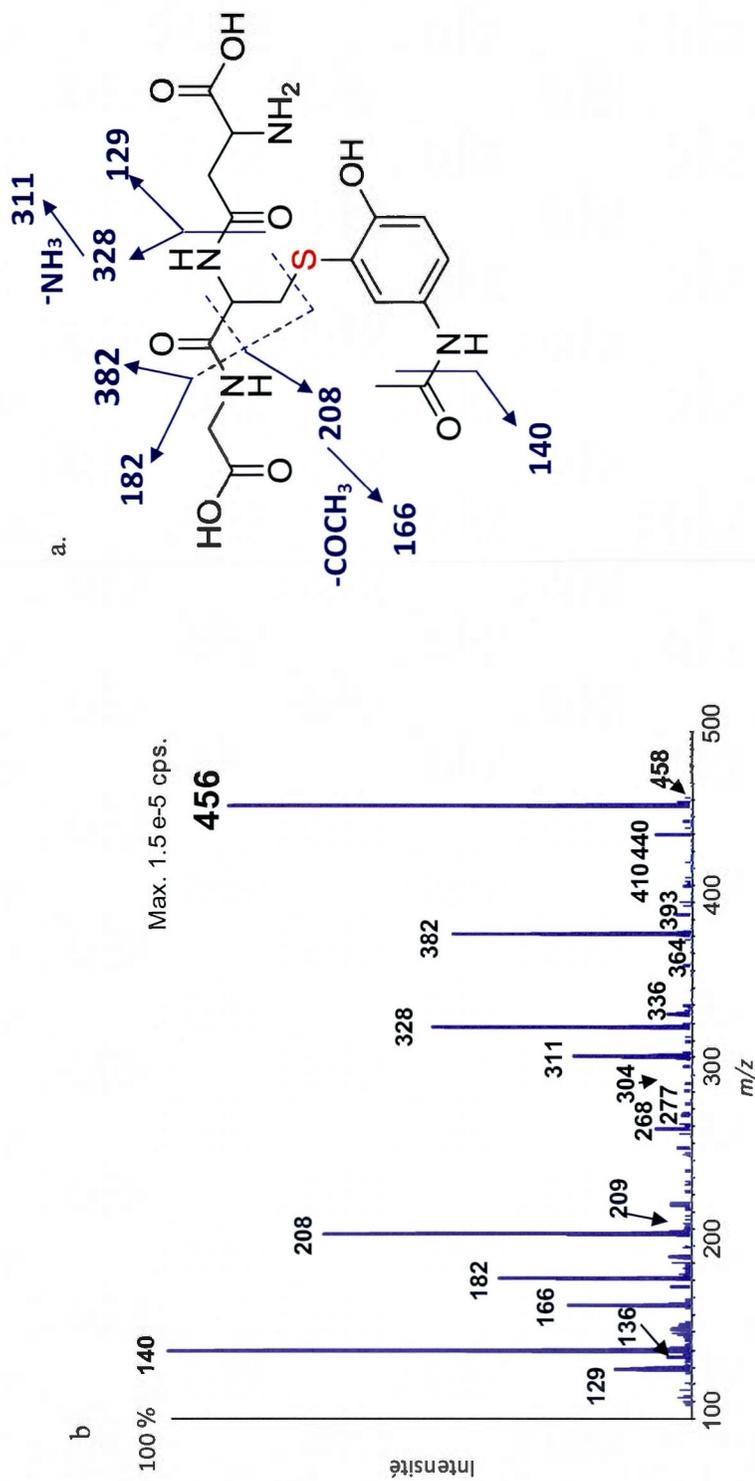


Figure 3.6 : L'identification des fragments obtenus sur le spectre MS/MS (a), et spectre MS/MS de l'adduit GSH+APAP (-2H) en mode EPI avec l'ion précurseur au m/z 457,2 et une EC à 30 V (\pm 15V) (b)

Fragmentation de l'adduit QQCPF-FIPEXIDE avec perte de CH_2

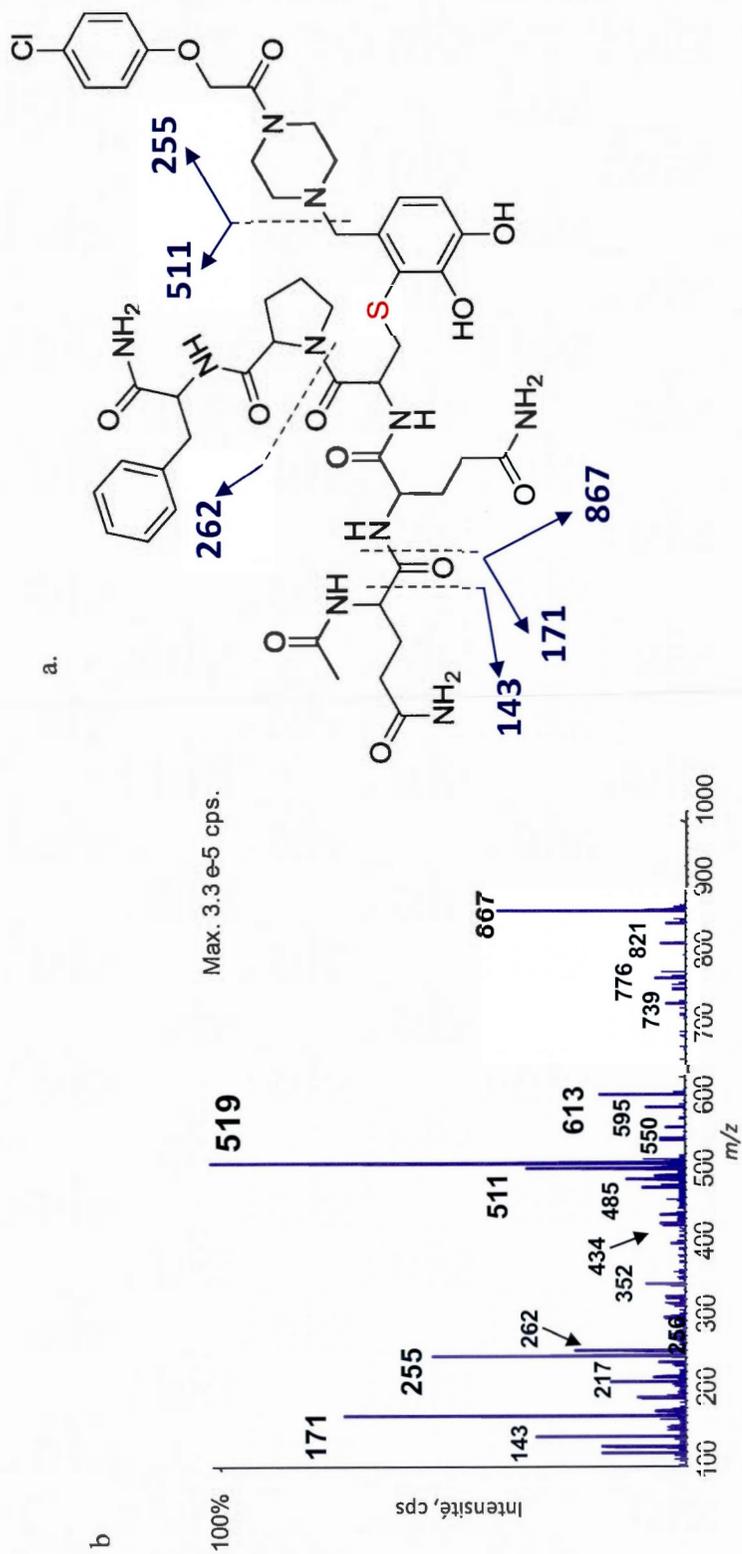


Figure 3.7 : L'identification des fragments obtenus sur le spectre MS/MS (a), et spectre MS/MS de l'adduit QQCPF-FIP-(CH_2) en mode EPI avec l'ion précurseur au m/z 519,2 et une EC à 30 V ($\pm 1.5\text{V}$) (b).

Fragmentation de l'adduit **GSH-FIPEXIDE** avec perte de CH_2

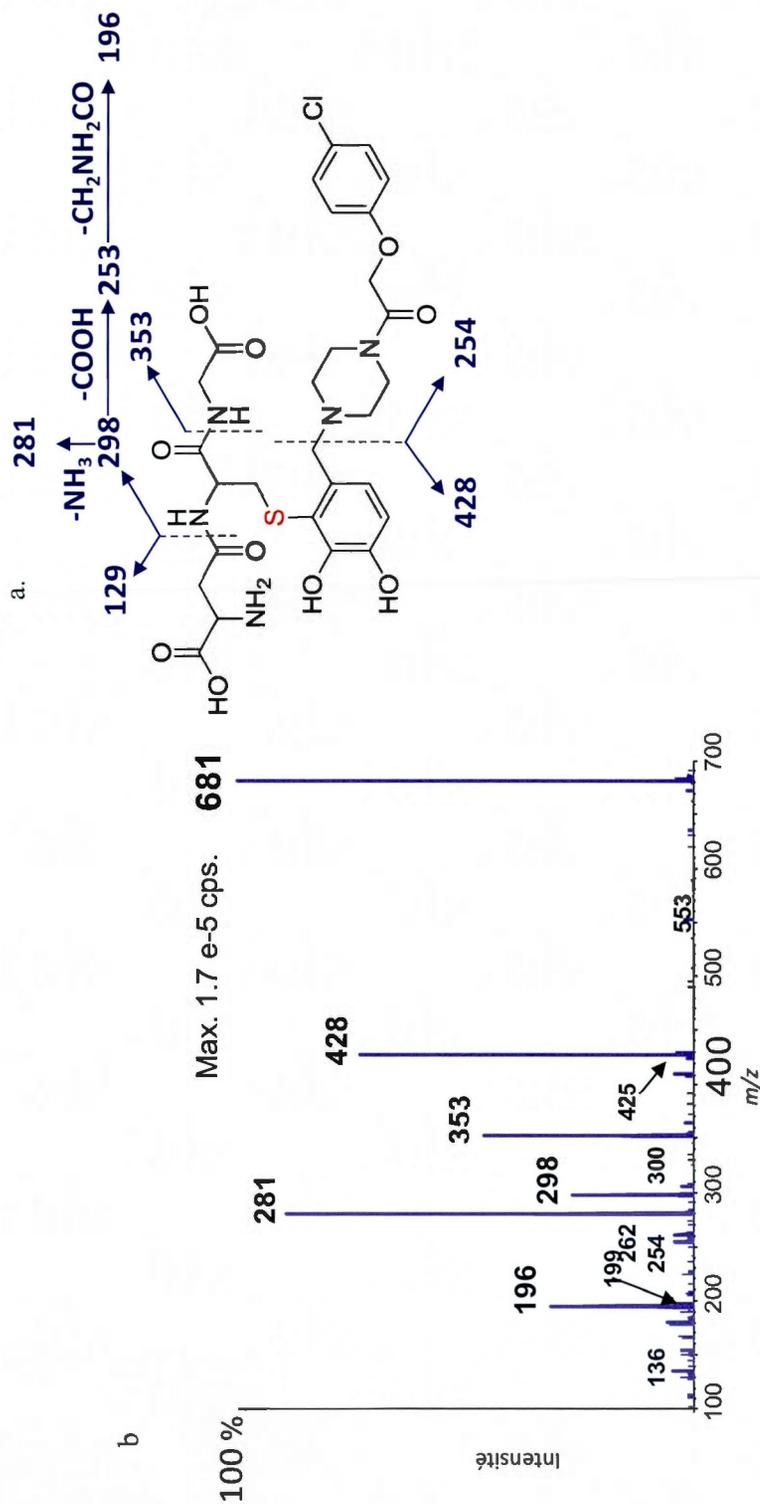


Figure 3.8 : L'identification des fragments obtenus sur le spectre MS/MS (a), et spectre MS/MS de l'adduit GSH-FIP-(CH_2) en mode EPI avec l'ion précurseur au m/z 682,2 et une EC à 30 V ($\pm 15\text{V}$) (b).

Fragmentation des adduits QQCPF-ATRAZINE

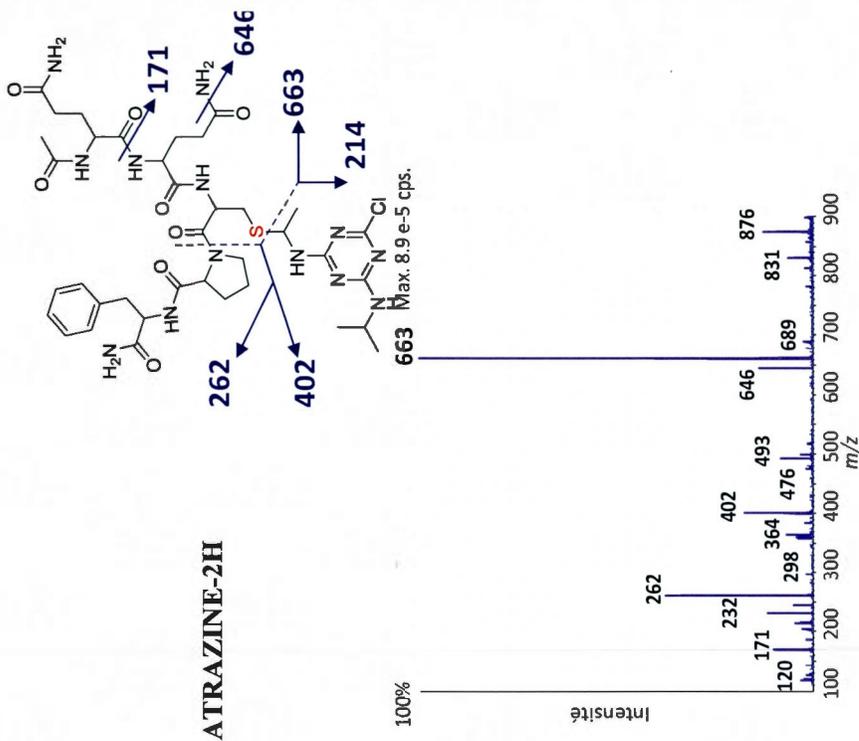


Figure 3.10: L'identification des fragments de l'adduit QQCPF+ATZ (-2H) et spectre MS/MS de cet adduit en mode EPI avec l'ion précurseur au m/z 876,1 à une EC 40 V (± 15 V).

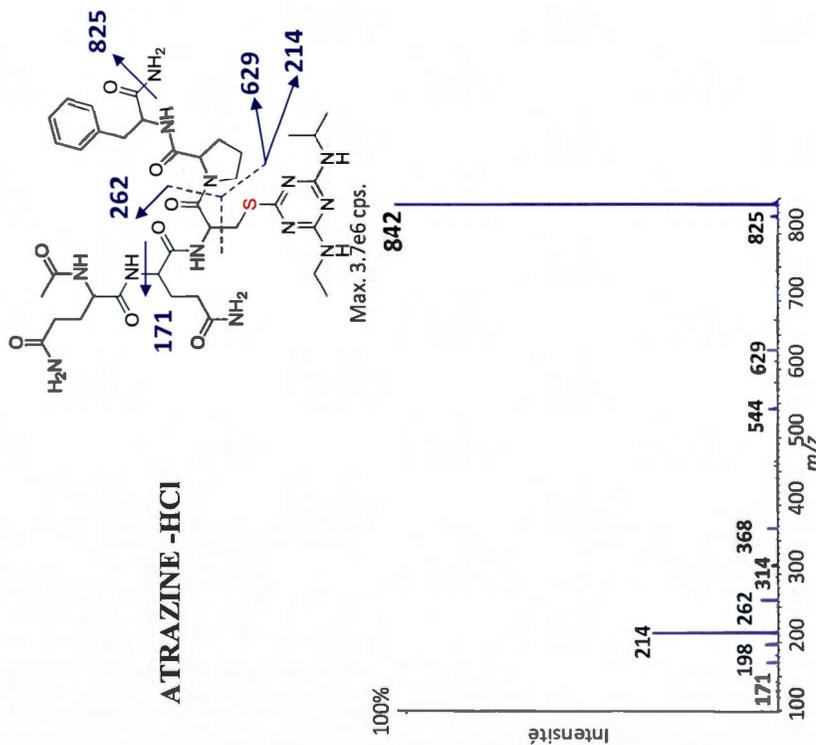


Figure 3.9: L'identification des fragments de l'adduit QQCPF+ATZ (-HCl) et spectre MS/MS de cet adduit en mode EPI avec l'ion précurseur au m/z 842,2 à une EC 40 V (± 15 V).

Fragmentation des adduits GSH-ATRAZINE

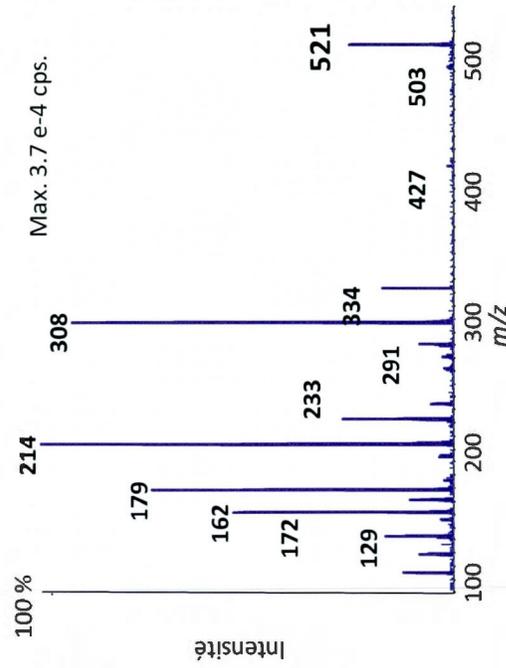
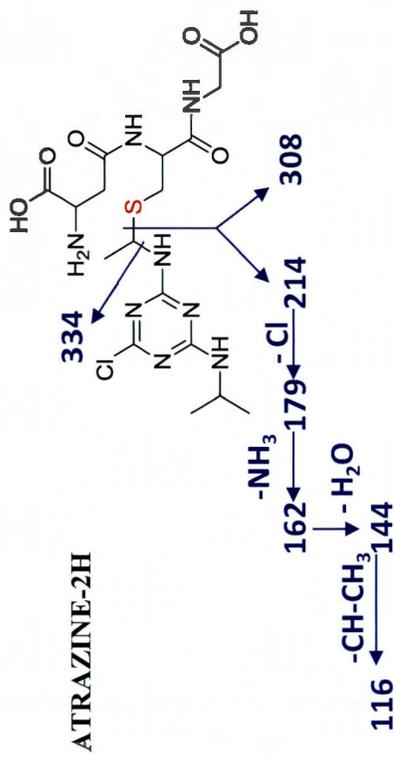


Figure 3.12: L'identification des fragments de l'adduit GSH+ATZ (-2H) et spectre MS/MS de cet adduit en mode EPI avec l'ion précurseur au m/z 521,2 à une EC 30 V (± 15 V).

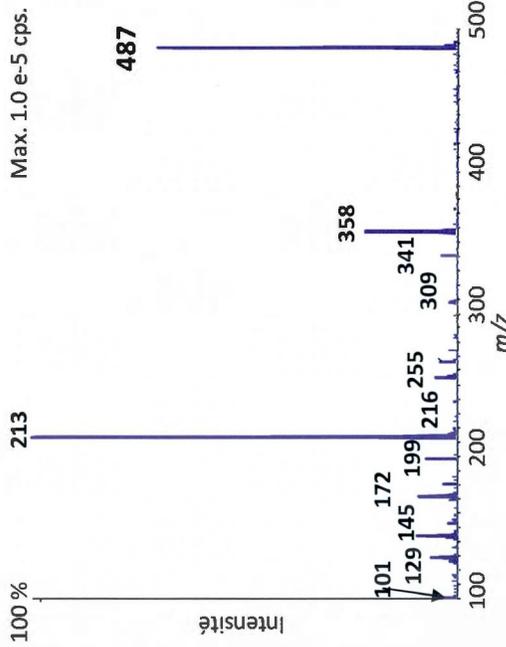
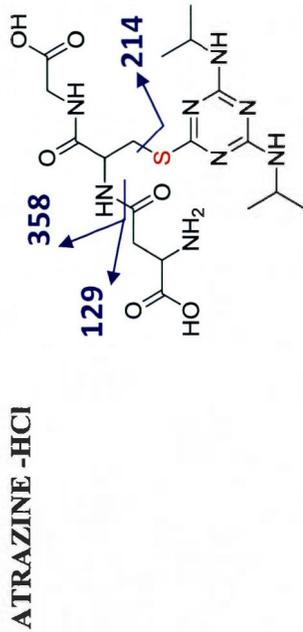


Figure 3.11: L'identification des fragments de l'adduit GSH+ATZ (-HCl) et spectre MS/MS de cet adduit en mode EPI avec l'ion précurseur au m/z 487,2 à une EC 30 V (± 15 V).

La fragmentation de l'adduit APAP-QQCPF et APAP-GSH correspondant respectivement aux figures 3.5 et 3.6 a lieu au niveau de la structure du GSH et du QQCPF. En effet, en fonction de l'énergie de collision appliquée, des liaisons sont fragmentés en fonction de l'énergie interne de la molécule, les liaisons les plus fragiles vont céder en premier, c'est un compromis entre avoir des fragments de taille adaptée à la comparaison contre une énergie de collision élevée qui impliquerait une destruction de la molécule rendant les fragments non identifiables. On peut expliquer la fragmentation de l'APAP par la résistance de sa structure qui est constitué d'un cycle benzénique très difficile à fragmenter dû aux doubles liaisons et l'effet mésomère du cycle qui le rend très tendu et très résistant. Alors la fragmentation a lieu ailleurs dans la molécule. Les deux agents de trappages réagissent de la même manière avec le fipexide (figure 3.7 et 3.8) en formant le fragment au m/z 254. En ce qui concerne l'atrazine, elle reste intacte. Le QQCPF (figure 3.9 et 3.10) et le GSH (figure 3.11 et 3.12) avec les 2 adduits formés par l'atrazine, le fragment commun est au m/z 214 correspondant à l'atrazine, c'est une structure très stable dû également à son cycle.

3.2 Mise en place de la méthode de digestion de l'albumine à l'analyse du peptide constitué de la cystéine 34

3.2.1 Optimisation du protocole de digestion de l'albumine

Après avoir étudié le comportement du QQCPF et des adduits formés vis-à-vis du GSH, le QQCPF est considéré comme un agent de trappage. Ce peptide de 5 acides aminés mime le site actif de la sérum albumine humaine. Alors quel va être le comportement de ce site quand il sera modifié et identifié sur la protéine native? Pour pouvoir analyser le site modifié de la cystéine 34 sur l'albumine humaine, il faut digérer cette protéine et voir les peptides formés les mieux adaptés pour l'analyse en LC-MS/MS et surtout mettre en évidence le peptide comportant la cystéine 34 modifiée. La figure 3.13 résume les traitements de la protéine avant son analyse LC-MS, les enzymes correspondantes, leurs conditions d'incubations et le type de SPE utilisés pour chaque type de peptides formés.

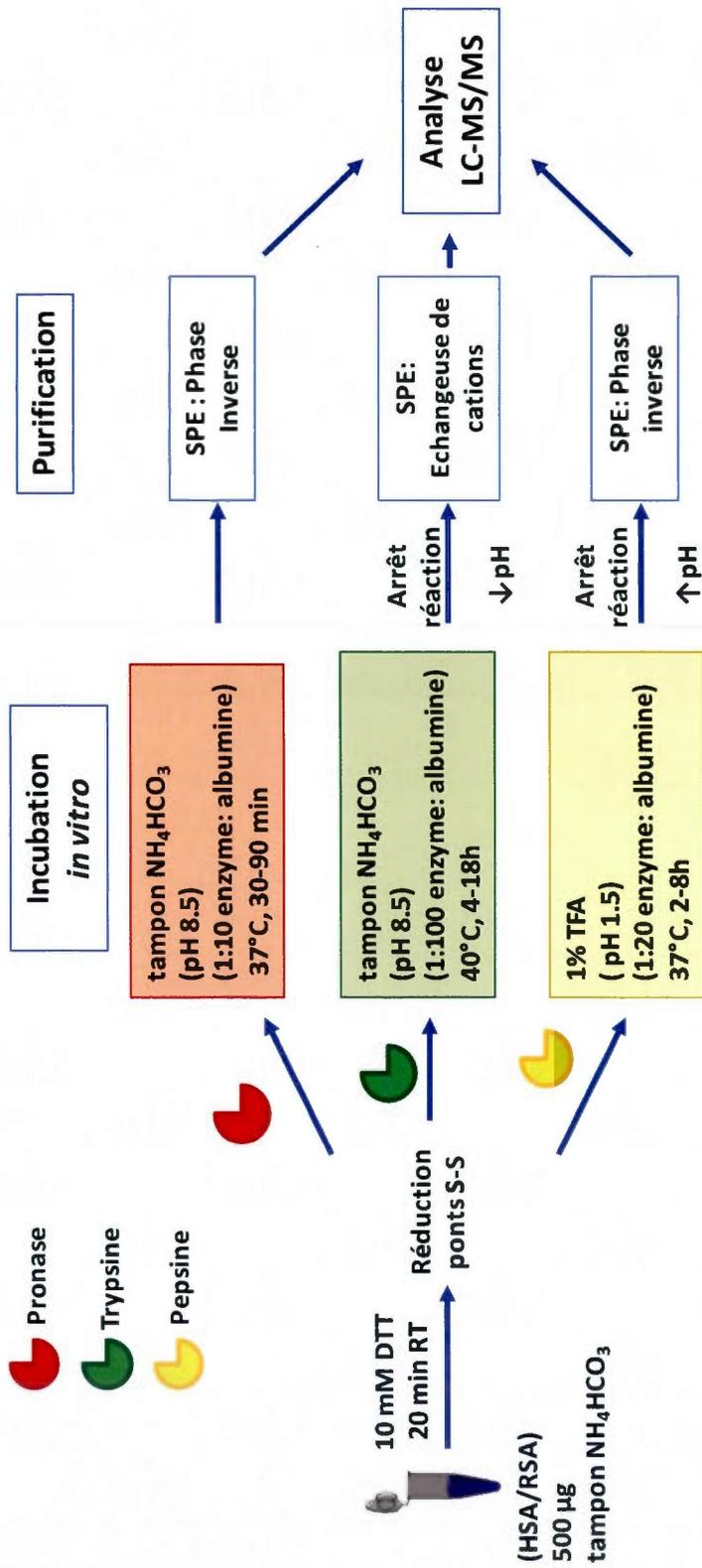


Figure 3.13 : Résumé des conditions d'incubations de chaque enzyme en présence d'albumine humaine ou de rat, suivi de l'étape de purification par SPE et l'analyse en LC-MS/MS.

La méthode de quantification du peptide du site actif implique une autre espèce d'albumine. En effet, pour pouvoir quantifier ce peptide issu de la sérum albumine humaine, un autre peptide similaire va être utilisé, mais provenant d'une autre espèce. Pour cela, nous avons choisi la sérum albumine de rat, car cette protéine est très semblable à l'albumine humaine, mais des différences importantes demeurent au niveau du site actif. L'objectif de cette étape est de sélectionner l'enzyme qui digérera à la fois l'albumine humaine et l'albumine de rat de telle sorte que le peptide contenant la cystéine 34 obtenu, soit le plus semblable d'une espèce à l'autre. Travailler en présence d'une matrice biologique pour le choix de l'étalon interne est pour notre part le meilleur moyen d'éviter toute variation de signal issue de la digestion, des pertes durant la préparation d'échantillon ainsi que des différences de sensibilité instrumentale.

Pour ce faire, une série d'expériences impliquant différentes enzymes ont été effectuées, ces enzymes sont pour la plupart très utilisées en protéomique et ont des sites de clivage variés. Ces expériences ont permis de mettre en place la méthode de digestion de l'albumine ainsi que l'optimisation en termes de quantité d'albumine utilisée et de temps d'incubation.

L'étape de purification est réalisée après la digestion, pour la pronase qui n'a pas de site de coupures spécifique et la pepsine qui coupent après les acides aminés hydrophobes, une cartouche SPE HLB de type lipophile et hydrophile en phase inverse est utilisée, elle favorise les interactions hydrophobes entre les peptides et la phase stationnaire de la cartouche, ce qui entraîne leur rétention.

Pour ce qui est de la trypsine les peptides formés sont moins hydrophobes, la plupart se termine par une lysine ou une arginine. Alors, une cartouche échangeuse de cations (SCX), avec ces groupements SO_3^- , permet de retenir les peptides chargés positivement. L'élution se fait avec du NH_4OH dans le méthanol. Toutes les incubations ont été analysés sur le triple TOF 5600, le logiciel Protein Pilot a permis l'identification d'une liste de peptides contenant la cysteine 34.

Le chromatogramme EIC (*extracted ion chromatogram*) est un graphique représentatif de l'élution d'un analyte (avec son m/z spécifique) en fonction du temps, soit un pic de hauteur relative à la concentration de l'analyte en fonction de son temps de rétention.

3.2.2 Description des logiciels du Triple TOF 5600 dans le traitement des données.

Toutes les incubations ont été analysés sur le triple TOF 5600, tous les logiciels en association avec l'instrument tels que *Protein Pilot*TM, *Peak View* version 1.1.1 et *Protein Quantitation 1.0 Micro Application* ont permis l'identification d'une liste de peptides potentiels pour servir d'étalon interne à la sérum albumine humaine. Afin de comprendre les informations obtenues sur cet instrument, un descriptif des différents logiciels va être fait ainsi que leurs propriétés en termes de précision de l'information. Le premier logiciel utilisé dans le traitement des données est le logiciel Protein PilotTM qui décrit le profilage de peptides et des protéines à travers tous les échantillons. La figure 3.14 illustre une page du logiciel.

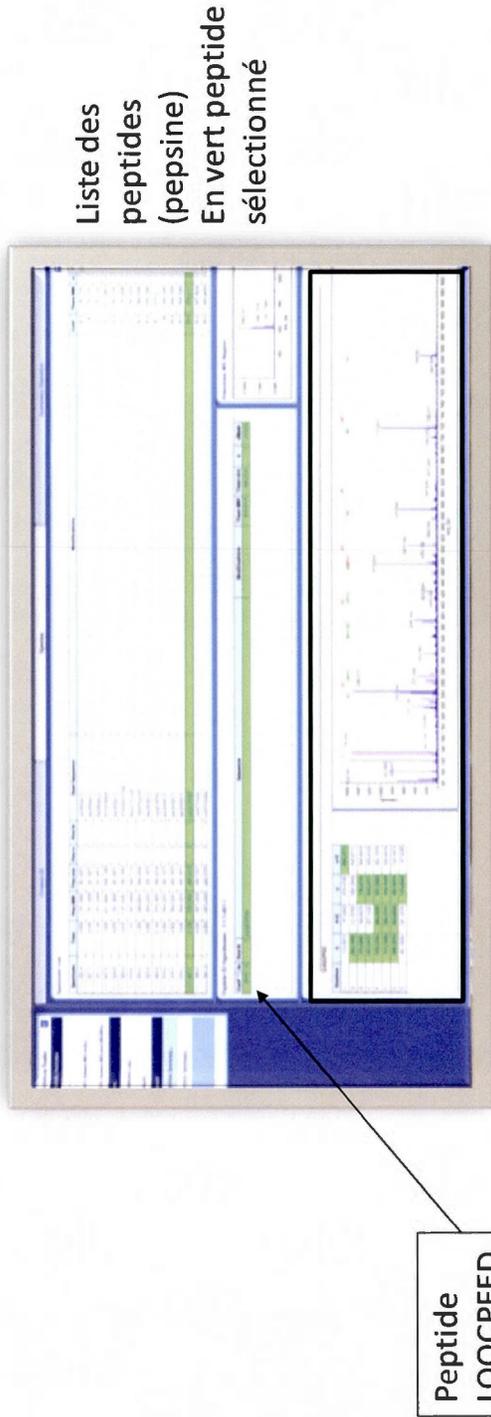


Figure 3.14: Illustration de la page obtenue après l'exécution de la recherche sur Protein PilotTM d'un échantillon d'albumine humaine digéré à la trypsine

Pour cela les données sont exportées sur Protein Pilot™. Les données de Protéine Pilot™ sont des données qualitatives, elles nous informent sur la qualité de la digestion en nous fournissant le pourcentage de recouvrement de la séquence protéique, mais également le nombre et l'identité des peptides détectés. Ce logiciel nous permet de déterminer les paramètres qui vont être pris en compte lors du traitement des données, par exemple, la nature de l'enzyme digestive, l'espèce à laquelle appartient l'échantillon et si des traitements tels que l'alkylation par l'IAM ou l'IAA ont été faits (figure 3.14).

La séquence peptidique de l'albumine humaine est représentée dans la figure 3.14. Le pourcentage de recouvrement est supérieur à 99%, 256 peptides ont été identifiés, le tableau jaune est la liste de ces peptides avec leurs indice de confiance correspondant. Un indice de confiance supérieur à 90% apparaît en vert au niveau de la séquence peptidique de l'albumine, entre 50 et 90 en jaune et inférieur à 50% en rouge. L'indice de confiance est mesuré sur les spectres MS/MS pour l'identification de chaque peptide, selon l'exactitude et la précision des spectres MS/MS théorique de cette séquence peptidique.

De plus, la méthode IDA utilisé sur le TripleTOF 5600 est une méthode impliquant 10 balayages MS/MS par cycle avec une durée de 1.3 seconde pour chaque cycle. . L'avantage de cette méthode est d'obtenir des spectres MS/MS à très haute sensibilité et à haute précision et de grandes quantités de données informatiques. Pour chaque peptide Protein Pilot™ fourni l'information sur la séquence du peptide, sa valeur en ppm, les ions fragments identifiés sur les spectres ainsi que leurs masses respectives. Ces spectres MS/MS avec l'identification des fragments peptidiques apportent une double confirmation sur la précision dans l'identification des peptides trouvés. La figure 3.15 est une représentation par le logiciel Protein Pilot de l'information fournis par ce type de logiciel. Il nous renseigne sur les spectres MS/MS identifié pour le peptide LQQCPFED ainsi que sur les ions fragments x, y, z, a, b et c identifié.



Residue	b	b+2	y	y+2
L	114.0813	116.0813	879.4102	881.4102
I	249.1489	251.1489	850.3349	852.3349
Q	318.2085	320.2085	798.2761	800.2761
C	473.3477	475.3477	840.2177	842.2177
P	578.3764	580.3764	807.2085	809.2085
F	717.3399	719.3399	491.1968	493.1968
E	846.3815	848.3815	283.0874	285.0874
D	921.4204	923.4204	134.0448	136.0448

Liste des fragments, x,y,z
et a,b et c identifiés
Masses des fragments

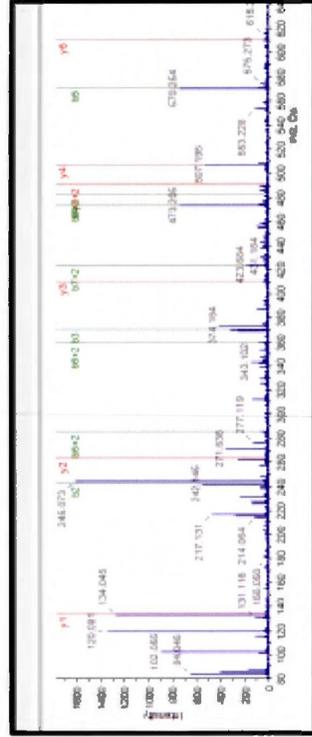


Figure 3.15 : Illustration des données d'un peptide digéré par la pepsine avec l'identification des fragments issus de la fragmentation par Protein Pilot.

La haute résolution de l'instrument TripleTOF 5600 apporte une précision plus importante que la fragmentation du QTRAP, instrument à basse résolution. Ces peptides sont séparés et analysés à haute résolution par le TOF. Après le traitement des données via Protein Pilot™ (données qualitatives). Les données sont transférées via le logiciel Peak View version 1.1.1, dans lequel est installé le logiciel *Protein Quantitation 1.0 Micro Application*. Cela va permettre de comparer de manière quantitative les données issues de Protein Pilot.

Les résultats obtenus sur le logiciel Protein Pilot™ sont importés dans le logiciel Peak View. Le *Protein Quantitation Micro Application* va comparer et quantifier entre elles plusieurs données sélectionnées. Dans notre cas, il s'agira des différents peptides comportant la cystéine 34 issus de la HSA et de la RSA, la comparaison d'un point de vue quantitatif des abondances, soit la surface du pic qui correspond également à l'aire du pic.

On sélectionne parmi la liste des séquences peptidiques contenant une cystéine, les peptides contenant la cystéine 34 avec un indice de confiance supérieur à 90%. Ensuite une superposition des différents pics sélectionnés s'affiche sur un chromatogramme représentant l'intensité des pics, ainsi que la séquence des peptides et leurs temps de rétention. De plus les informations qualitatives comme les spectres MS/MS sont aussi accessibles via Peak View par le résultat simultané obtenu sur le spectre MS du peptide sélectionné sur le chromatogramme.

Les figures 3.16, 3.17 et 3.18 illustrent la superposition des chromatogrammes des EIC des peptides du site actif de l'albumine humaine et de rat issus de la digestion des 3 enzymes utilisées avec les temps d'incubations correspondants (Pronase : 30 min et 90 min; trypsine : 4h, 18h et pepsine 4h, 8h). Les peptides sont présentés par ordre alphabétique ainsi que leurs m/z afin de sélectionner l'enzyme la plus performante pour nos besoins.

Il est important de noter que notre recherche cible l'enzyme qui va nous permettre de voir des peptides contenant la cystéine 34 portant la modification future. Les critères étant une enzyme capable de digérer les peptides à une taille détectable et quantifiable en LC-MS mais aussi une enzyme capable de digérer de manière similaire les protéines humaine et de rat afin de sélectionner le peptide du rat qui servira d'étalon interne pour la quantification de l'albumine modifiée chez l'homme (et vice et versa pour les études chez le rat).

Humain

Rat

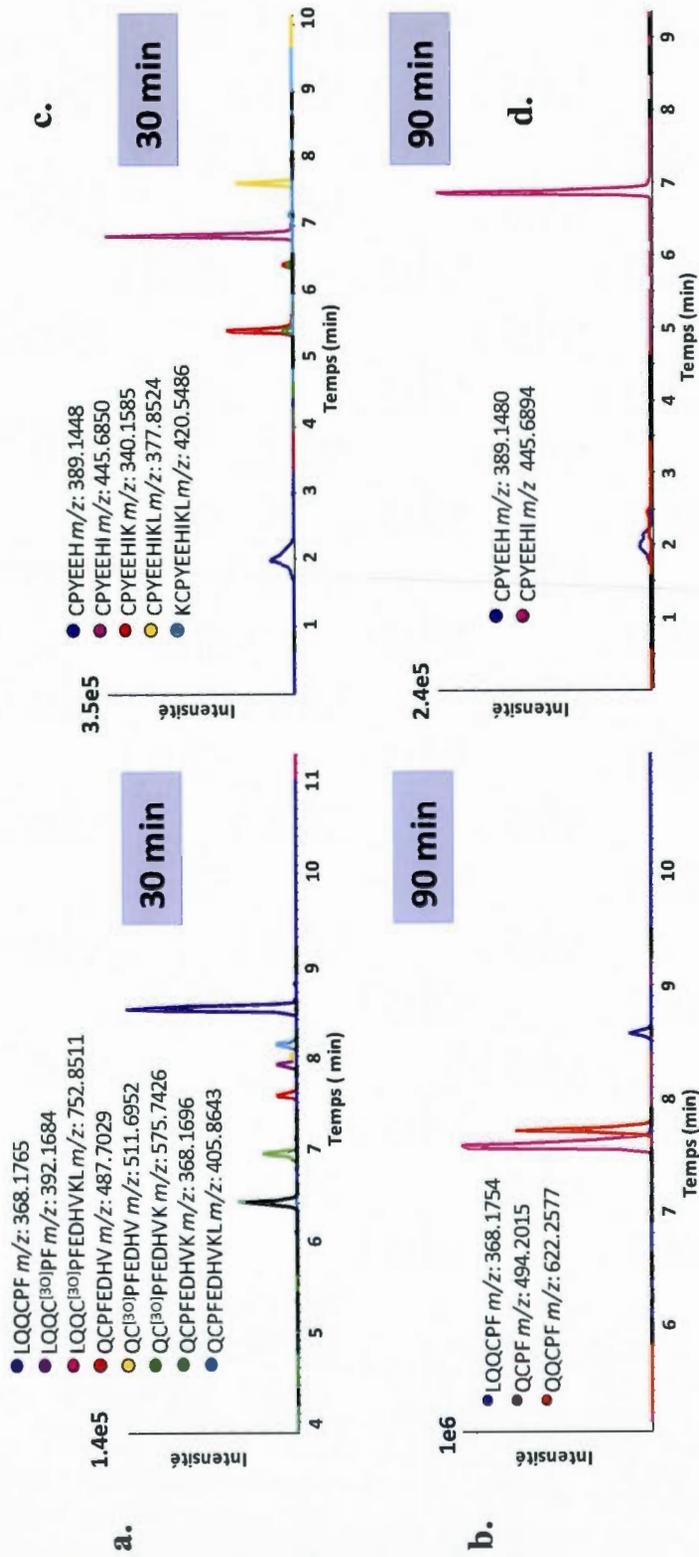
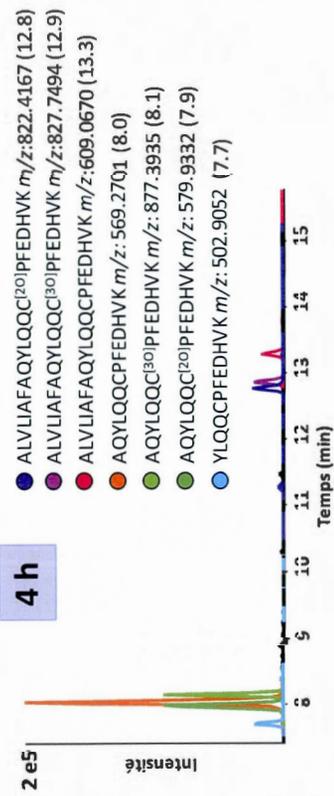


Figure 3.16 : Superposition des EIC des peptides issus de la digestion à la pronase aux temps d'incubation 30 min et 90 min respectivement chez l'homme en a et b et le rat en c et d.

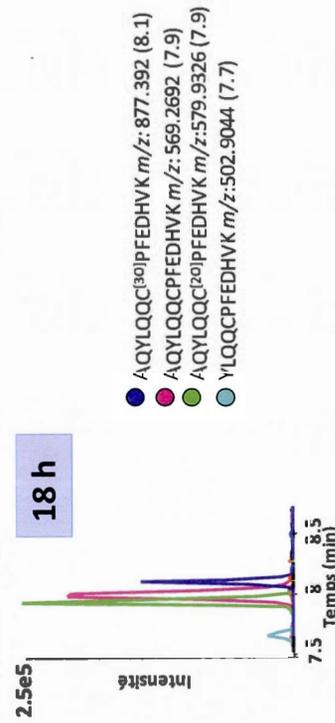
Rat

Humain

a.



b



d

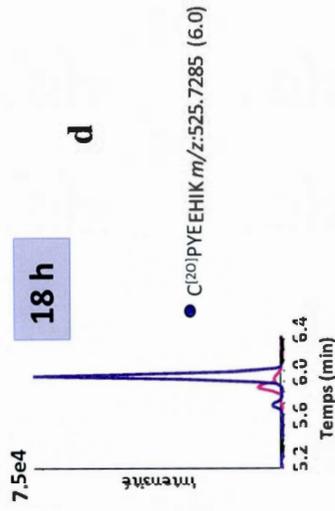
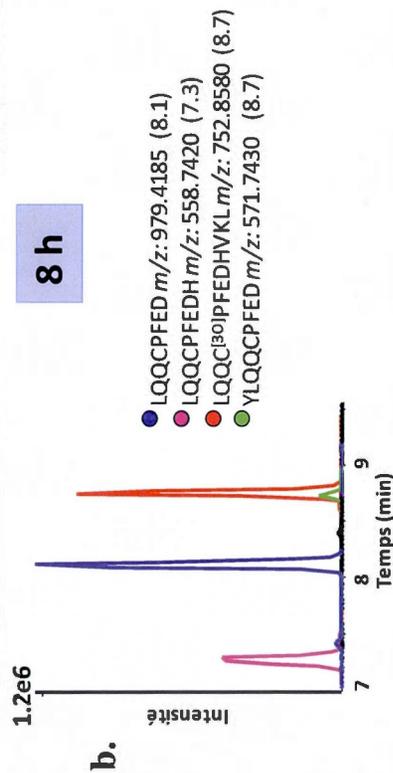
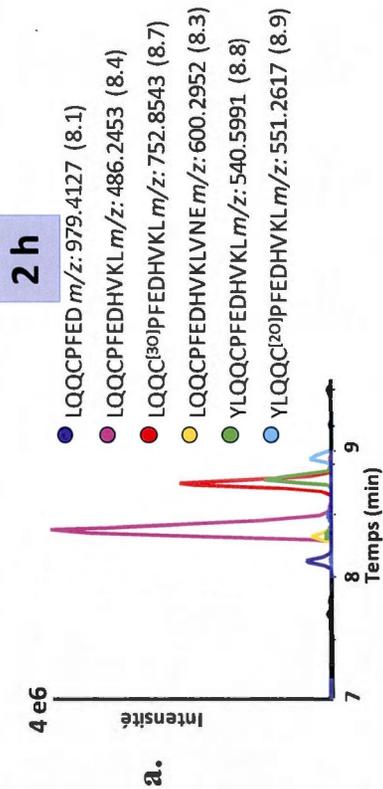


Figure 3.17 : Superposition des EIC des peptides issus de la trypsine aux temps d'incubation 4 h et 18 h respectivement chez l'homme en a et b et le rat en c et d.

Humain



Rat

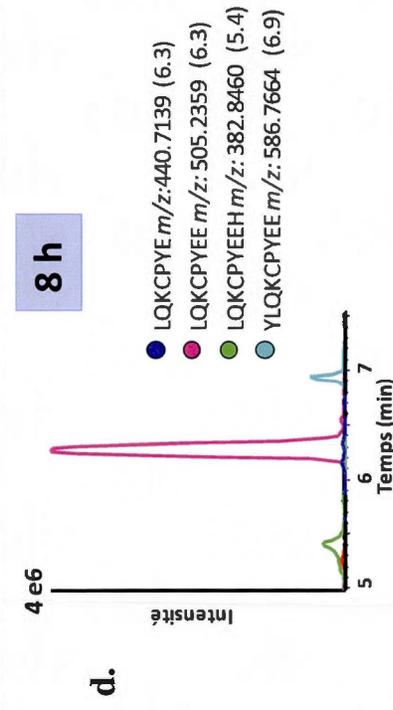
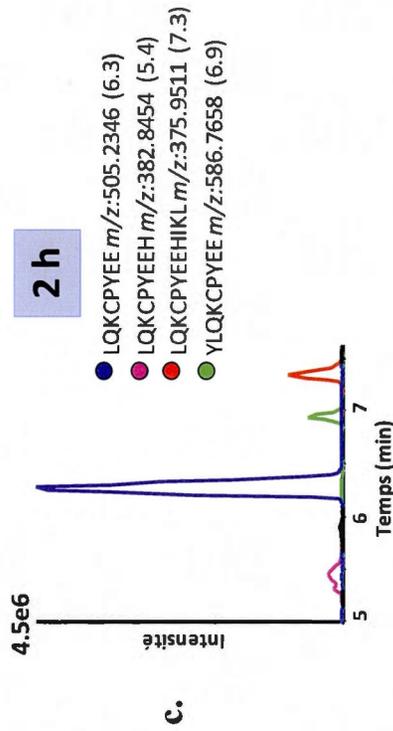


Figure 3.18 : Superposition des EIC des peptides issus de la digestion à la pepsine aux temps d'incubation 2h et 8 h respectivement chez l'homme en a et b et le rat en c et d.

La figure 3.16 nous montre les résultats qui ne rentrent pas dans les critères de notre étalon interne. En effet, malgré l'existence des peptides de l'albumine digérée par la pronase, ils ne sont pas compatibles d'une espèce à l'autre. En effet, chez l'homme le peptide LQQCPF (figure 3.16a) à un m/z de 368,1765 et le peptide du sérum albumine de rat CPYEEHI (figure 3.16b) au m/z 445,6850, ils contiennent tous les deux le même nombre d'acides aminés. Cependant, la position de la cystéine diffère dans les deux peptides : chez l'homme elle constitue le quatrième acide aminé alors que chez le rat c'est le premier. La cystéine 34 est un élément majeur dans le choix de l'étalon interne dans la mesure où cette cystéine est réactive, un environnement similaire autour de cette cystéine d'une espèce à l'autre est un critère essentiel dans le choix de l'EI, car elle joue un rôle dans son interaction avec les autres molécules.

De plus, le peptide chez l'homme est constitué de deux acides aminés basiques, deux glutamines (Q) alors que celui du rat est constitué de deux acides aminés acides, deux acides glutamiques (E), l'état de charge est quasiment opposé d'un peptide à l'autre. Ce caractère physicochimique à un rôle dans l'environnement de la cystéine qui ne sera pas représentatif d'une espèce à l'autre. C'est pourquoi la détermination de l'étalon interne (EI), implique le choix d'un peptide similaire chez l'homme et le rat par sa composition et la nature des acides aminés qui entourent cette cystéine. Le caractère physicochimique, la charge et l'hydrophobicité du peptide sont les paramètres à inclure dans le choix de l'EI.

Comme le montre la figure 3.16, la pronase est une enzyme qui à des temps d'incubations très court, on constate à 90 min que la plupart des peptides d'intérêts ont été digérés que ce soit chez l'homme (figure 3.16a et b) ou chez rat (figure 3.16c et d). Si on compare les résultats obtenus à 30 min et à 90 min, chez l'homme (figure 3.16a) sur les 9 peptides du site actif de la HSA identifié, seuls 4 (figure 3.16b) d'entre eux subsistent à 90 min, on peut faire le même constat chez le rat. Ayant une sélectivité moindre, chez la pronase dû à une multitude de site de clivage, des peptides variés sont formés ce qui pourrait modifier notre signal de la modification de la Cys34. De plus, certaines cystéines ont réagi avec l'oxygène de la cellule et se sont oxydées, ces cystéines apparaissent entre crochet sur la séquence peptidique (figure 3.16a) avec le peptide LQQC^[30x]PF. Elles se sont oxydées au cours de l'incubation et cela réduit l'intensité du signal dans la mesure où le même peptide va

apparaître plusieurs fois en fonction du degré d'oxydation de la cystéine, lui donnant un m/z différent. La protection des cystéines libres avec l'IAM peut prévenir l'oxydation de ces peptides (figure 1.13).

La figure 3.17 illustre les pics obtenus durant la digestion à la trypsine. L'inconvénient est que pour l'albumine de rat, le peptide du site actif est QKCPYEE, il y a une lysine juste avant la cystéine. À 4h (figure 3.17c), les peptides voulus n'ont pas encore été détecté et il n'y a pas de signal de peptide du site actif dans ce cas. À 18h (figure 3.17b) le seul peptide détecté contient une cystéine oxydée. Le site de clivage à côté de la cystéine du site actif n'est pas idéal pour la détection de ce peptide, alors une autre protéase serait plutôt souhaitable dans ce cas.

En ce qui concerne la figure 3.18, la digestion à la pepsine, les séquences sont similaires d'une espèce à l'autre, ils commencent pour la plupart par LQQCPFE chez l'homme (figure 3.18a et b) et LQKCPYE chez le rat (figure 3.18c et d). Ces deux séquences diffèrent par la masse entre la glutamine Q et la lysine K, ainsi que la phénylalanine F et la tyrosine Y. Le Q et K ont tous les deux un groupement amine, et le F et le Y sont tous deux des acides aminés aromatiques, alors les masses sont proches et les propriétés physicochimiques assez similaires entre les deux peptides. On peut également constaté qu'après 8h d'incubation ces peptides ne sont pas dégradés. La pepsine est l'enzyme qui nous a donné les meilleurs résultats. Néanmoins, il reste l'inconvénient des cystéines oxydées et la diminution du signal que cela induit. Alors, une étape de protection en présence d'agent alkylant en présence d'IAM a été ajoutée avant la digestion.

3.3 Méthode de quantification de l'étalon interne à partir d'un mélange d'albumine humaine et de rat

Une fois l'enzyme sélectionnée et la détection du peptide d'intérêt validée, la dernière étape est le développement d'une méthode de quantification de ce peptide avec son étalon interne. Nous utilisons la sérum albumine de rat comme étalon interne pour les échantillons humains et réciproquement. Des incubations sont effectuées en utilisant comme base de protéines le

mélange de sérum albumine de rat et de sérum albumine humaine. La figure 3.19 est un résumé des étapes de digestion à la pepsine ainsi que les ratios utilisés au cours de l'expérience, et l'étape de protection en présence d'IAM

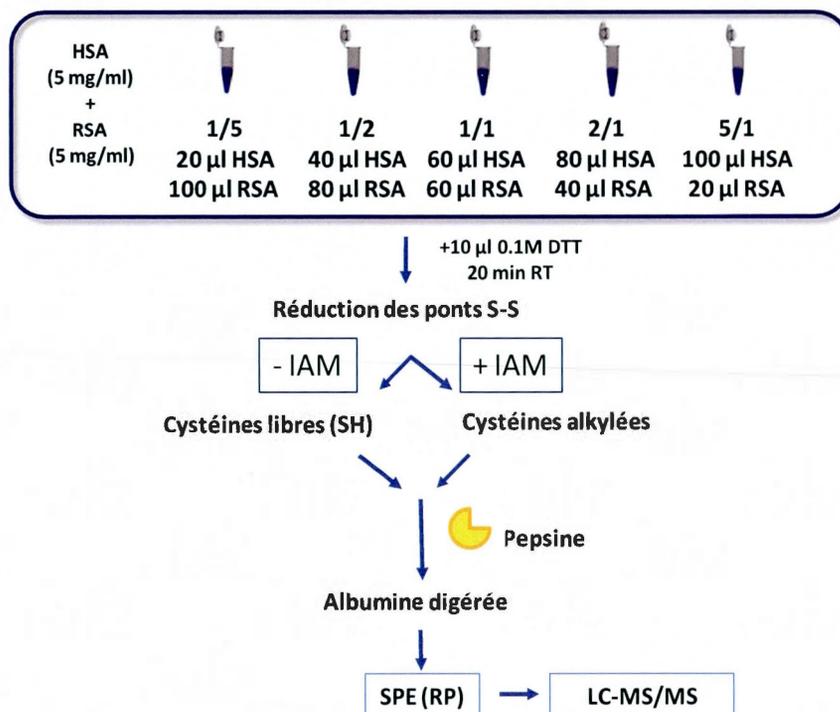
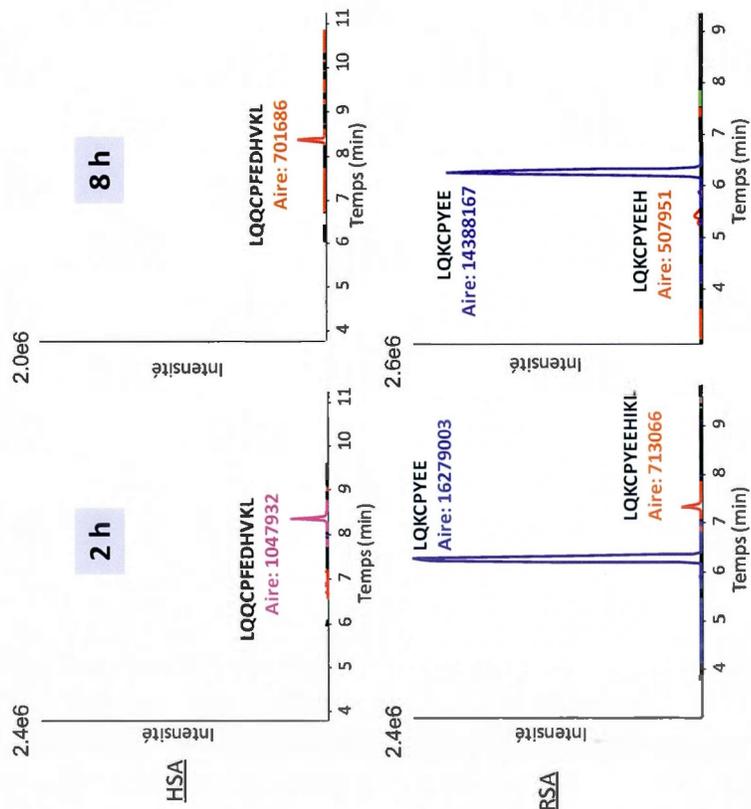


Figure 3.19 : Résumé des étapes impliquant l'analyse d'un mélange d'albumines constitué de ratios différents entre l'albumine de rat et humaine. L'expérience a été effectuée avec des temps d'incubation enzymatique de 2h, 4h et 8h.

Les ratios utilisés sont : 1/5, 1/2, 1/1, 2/1 et 5/1 d'albumine humaine par rapport à l'albumine de rat. Ces différents ratios ont été préparés pour voir si les spectres des pics des peptides d'intérêts obtenus en LC-MS sont représentatifs des ratios de concentrations, et la faisabilité de l'utilisation d'une espèce d'albumine comme étalon interne par rapport à une autre dans le but d'atteindre plus de précision dans l'analyse quantitative des modifications d'albumine après traitement avec un MR. Pour le traitement des données sur Protein Pilot™, deux méthodes, une spécifique à l'albumine humaine et l'autre à l'albumine de rat, ont été appliquée au même échantillon, pour extraire dans un premier temps les peptides issus de l'albumine humaine, suivi de ceux de l'albumine de rat. La figure 3.20 représente les superpositions de ces 2 peptides en absence d'IAM pour les ratios 1/5 et 5/1.

a. RATIO 1/5



b. RATIO 5/1

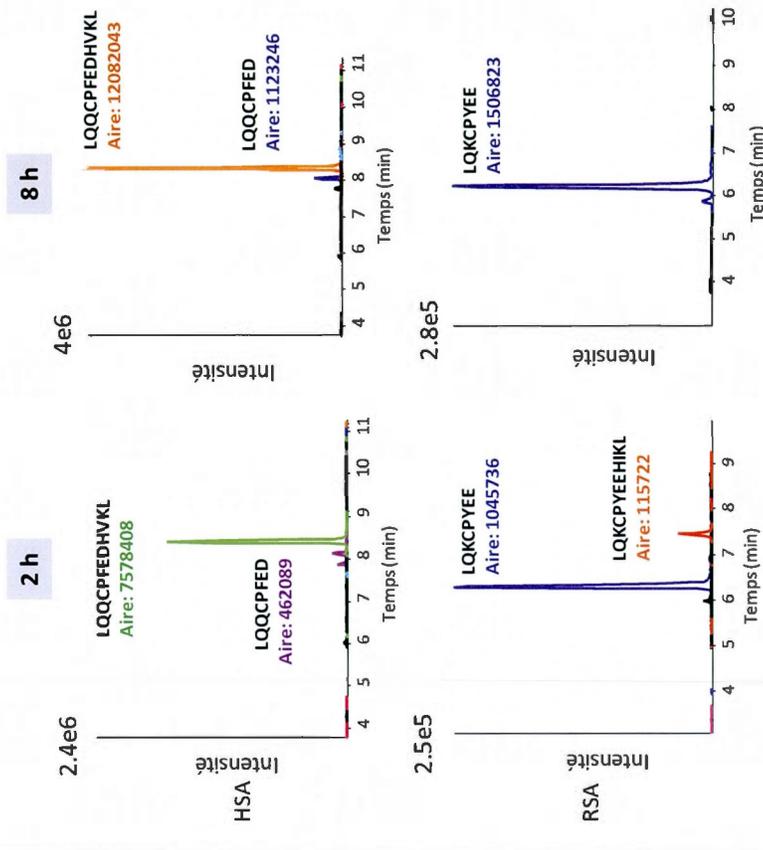


Figure 3.20 : EIC des peptides du site actif des deux albumines (rat et humain) avec un ratio de 1/5 (A) et 5/1 (B) à des temps de digestions de 2h et 8h.

Comme dit précédemment, le chromatogramme EIC est un graphique représentatif de l'élution d'un analyte (avec son m/z spécifique) en fonction du temps, soit un pic de hauteur relative à la concentration de l'analyte en fonction de son temps de rétention. Les résultats obtenus sont comparés en fonction de l'intensité des pics obtenus reflétant la concentration de l'échantillon. Le ratio a été mis en évidence en comparant 2 peptides sélectionnés chez l'homme à 2 peptides similaires sélectionnés chez le rat. En effet, nous voulions voir si cette proportion d'albumines était détectable sur les chromatogrammes, ce qui nous renseignerait sur l'intensité des pics et la proportion d'albumine humaine vis-à-vis de l'albumine de rat. Les peptides de l'albumine de rat (figure 3.20a) ont une intensité plus élevée dans le ratio 1/5 comparé aux ratio 5/1 chez l'homme (figure 3.20b), par ailleurs le profil du chromatogramme de l'albumine de rat au ratio 1/5 est très similaire au profil de l'albumine humaine 5/1. A 2h, le peptide LQQCPFEDHVKL a une intensité d'environ $4,8 \times 10^5$ et une aire de 1047932, en comparaison à l'intensité du peptide du RSA, le LQKCPYEE de $2,4 \times 10^6$ et une aire de 16279003, le ratio de ces 2 intensités montre un rapport de 0,06 soit inférieur à 1 pour 5. Le rapport obtenu est plus petit que le ratio 1/5. Pour ce qui est du ratio 5/1, le peptide HSA LQQCPFEDHVKL à une aire de 7578408 à une intensité de $2,4 \times 10^6$, en comparaison du peptide du rat LQKCPYEEHIKL qui a une aire de 115722, le rapport de ces 2 aires nous donne un rapport d'environ 10.

Pour optimiser les résultats mais aussi pour éviter la formation de cystéine oxydée, une étape d'alkylation des cystéines a été ajoutée avant la digestion. L'alkylation se fait en présence d'IAM, ce qui permet une stabilité des peptides et d'améliorer le signal de la détection. Les expériences ont aussi été réalisées à trois temps de digestions différents (2h, 4h et 8h). Cela a permis de dresser une liste de peptides les plus abondants contenant la cystéine 34 protégée avec l'IAM chez l'homme et le rat aux différents temps d'incubation. La figure 3.21 dresse la liste des peptides détectés en LC-MS/MS aux différents temps d'incubations.

Il est possible de quantifier directement l'abondance des peptides par l'intermédiaire d'un autre logiciel qui a été utilisé, le logiciel MultiQuant™ (MQ). Ce logiciel est un logiciel d'intégration de pics qui permet d'analyser de manière quantitative plusieurs échantillons à la fois.

Peptides HSA	- IAM			+ IAM		
	2h	4h	8h	2h	4h	8h
LQQCPFE	√		√			
LQQCPFED	√	√	√		√	
LQQCPFEDH	√	√	√			√
YLQQCPFED						√
LQQCPFEDHVKL ^a	√	√	√	√	√	√
LQQCPFEDHVKLVNE				√		
AQYLQQCPFEDHVKL				√	√	
AQYLQQCPFEDHVKLVNE				√		

Peptides RSA	- IAM			+ IAM		
	2h	4h	8h	2h	4h	8h
LQKCPYEE	√	√	√	√	√	√
LQKCPYEEH			√			√
YLQKCPYEE	√		√		√	√
LQKCPYEEHIKL				√		√
SQYLQKCPYEE				√	√	√
SQYLQKCPYEEHIKL				√		

Figure 3.21 : Liste des peptides les plus abondants chez l'homme à gauche et chez le rat à droite. En rouge le peptide le plus abondant de l'échantillon. En noir simple détection, le « a » correspond à une cystéine oxydées en absence de IAM.

Dans la figure 3.21, on constate qu'en absence de IAM, les peptides les plus abondants chez l'homme sont le LQQCPFED et le LQQCPFEDH et chez le rat, seul un peptide est très abondant le LQKCPYEE. L'étape avec l'IAM a été réalisée pour optimiser la réaction et augmenter l'abondance des peptides. Alors qu'en absence d'IAM, seul 1 peptide est compatible entre le rat et l'humain, en présence d'IAM les peptides LQQCPFED et LQQCPFEDHVKL sont les plus abondants, équivalent aux peptides LQKCPYEE et LQKCPYEEHIKL chez le rat.

Par l'intermédiaire de ces données récupérées du tableau, une liste de 10 peptides contenant la cystéine 34 a été mise en place comprenant les peptides les plus abondants chez l'homme et le rat, cette liste de peptides est utilisée comme base dans la quantification du peptide du site actif entre la HSA et la RSA dans le logiciel MultiQuant™ ou (MQ). Dans le logiciel Peak View, la comparaison des échantillons se fait en comparant un à un plusieurs peptides sélectionnés dans le même échantillon. Dans le logiciel MQ, le pic correspondant au peptide d'intérêt peut être sélectionné et comparé parmi tous les échantillons au même moment, nous pouvons vérifier l'intégration, corriger le temps de rétention et ainsi valider la valeur de l'abondance de chaque pic chromatographique.

Puis à travers le traitement des données via Protein Pilot, Peak View et le logiciel de quantification MultiQuant, nous avons sélectionné la liste des peptides de la HSA et de la RSA qui serait potentiellement importante dans la quantification d'une modification de la cystéine du site actif de la sérum albumine humaine et de rat.

Lors de l'acquisition des données LC-MS/MS, le peptide traverse la colonne HPLC et est élué à un temps de rétention qui lui est propre. Lors de son élution, l'ionisation est augmentée dans la source du spectromètre de masse. Alors par son ionisation en fonction des sites ionisables qu'il contient, le peptide apparaît sous les différentes formes, il va apparaître sous différents pics sur le spectre de masse avec ses m/z correspondant qui ont tous le même temps de rétention. Pour la quantification, il est important d'intégrer toutes les formes possibles d'ionisation du peptide, c'est le cas du peptide du RSA LQKCPYEEHIKL qui est élué à un t_r de 7,1 min. Ce peptide existe sous la forme $(M+2H)^{2+}$, $(M+3H)^{3+}$ et $(M+4H)^{4+}$. Pour la quantification, il faut en tenir compte de la somme de toutes les aires des m/z ainsi que leur temps d'élution.

La Figure 3.22 montre dans un premier temps, la superposition des pics chromatographiques du peptide LQKC*PYEEHIKL multichargés obtenus via Peak View du rat et son spectre MS, en comparaison au pic chromatographique humain du peptide LQQC*PFEDHVKL sous la forme $(M+3H)^{3+}$ avec un t_r à 8,1 min et son spectre MS, ces peptides ont la cystéine alkylée « * ».

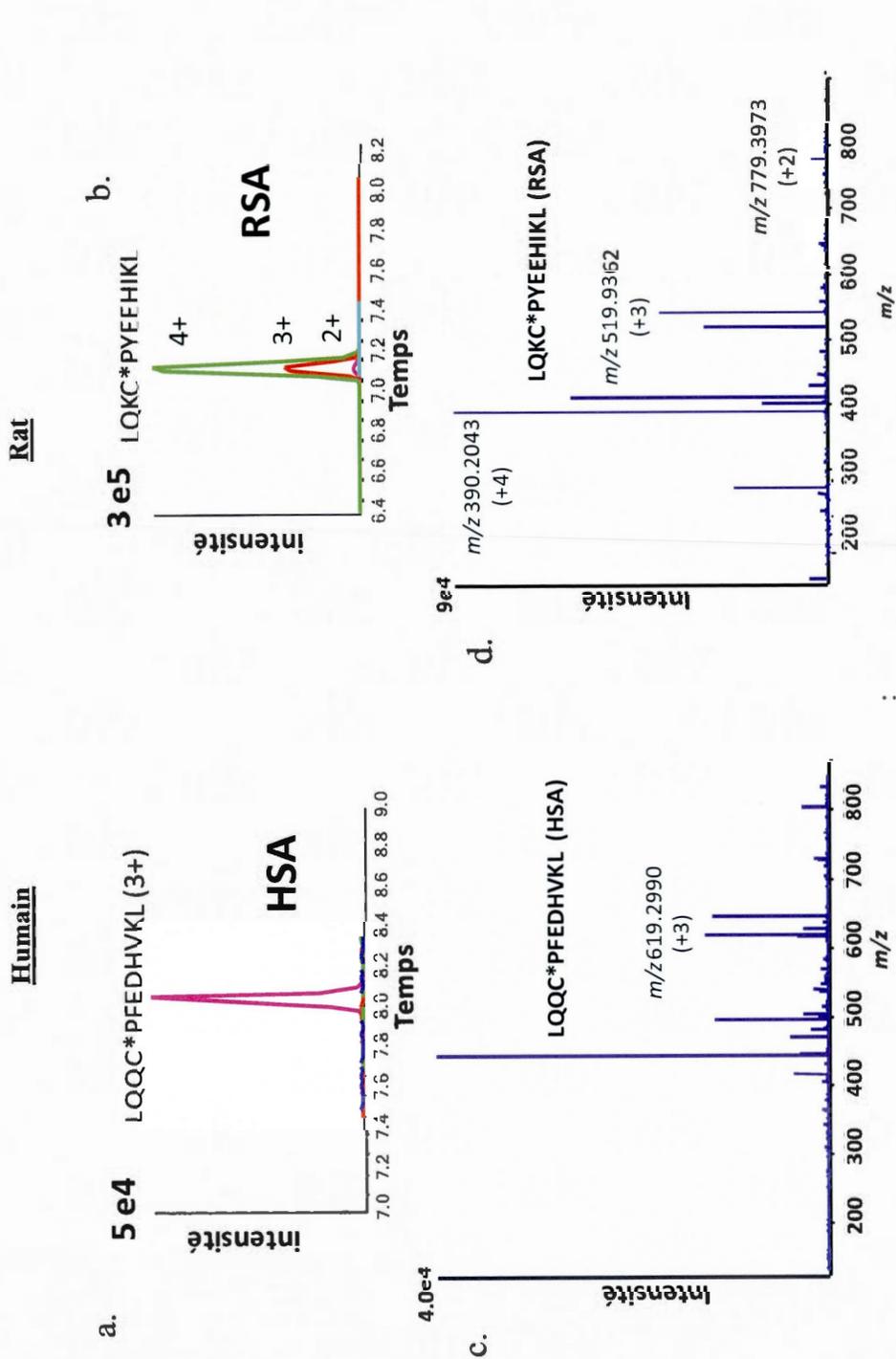


Figure 3.22 : EIC des ions multichargés chez l'homme (A) et le rat (B) ainsi que leurs spectres MS respectifs (en C et D) obtenus en mode ESI(+) sur le triple TOF 5600

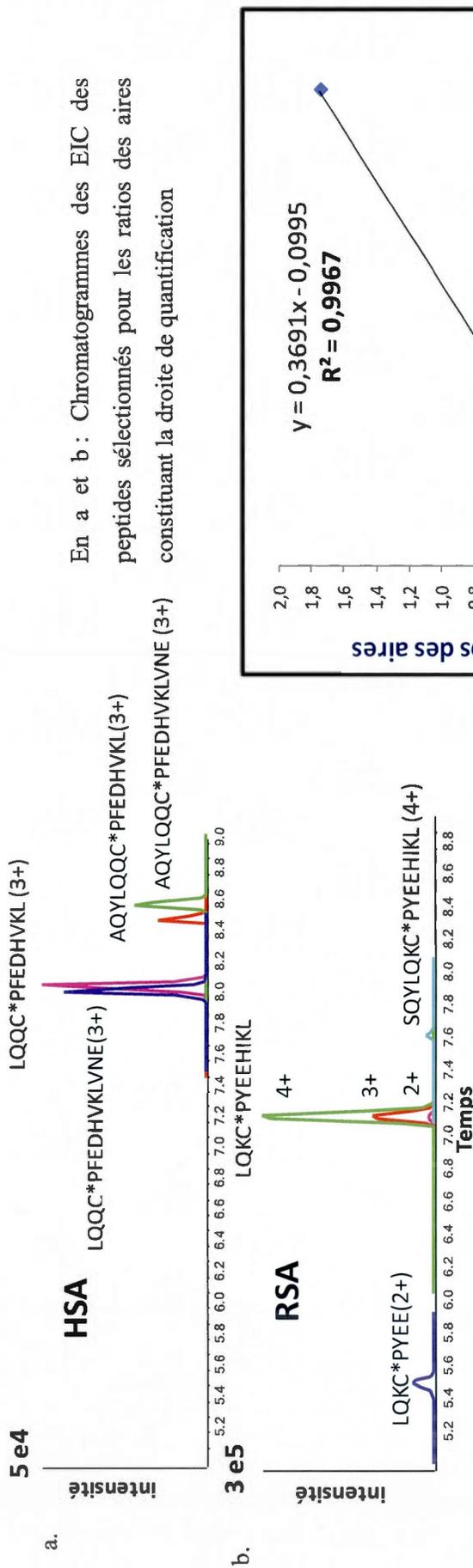
En effet, le peptide LQKCPYEEHIKL (figure 3.22b) du RSA contient deux lysines, qui sont des sites basiques ionisables, alors il y a une multitude de formes chargées de ce peptide. Nous pouvons constater que le chromatogramme du peptide de la RSA est une superposition des aires des différents m/z obtenus sur le spectre MS. Ainsi, nous pouvons voir que ces spectres et ces chromatogrammes illustrent la relation entre les différentes charges d'un peptide (figure 3.22d) et sa séquence.

Les données revues sur MQ de la liste des peptides abondants ayant pour caractéristiques leurs aires, leurs t_r et leurs m/z peuvent être exportées sur Excel pour effectuer les calculs adaptés à la détermination de la droite de quantification relative de HSA, en utilisant RSA comme étalon interne. Nous avons effectué dans un premier temps, le rapport des aires de la somme de tous les peptides abondants chez l'homme et ceux trouvés chez le rat. Puis dans un second temps, nous avons sélectionnés deux peptides les plus abondants dans chaque espèce pour effectuer ce rapport.

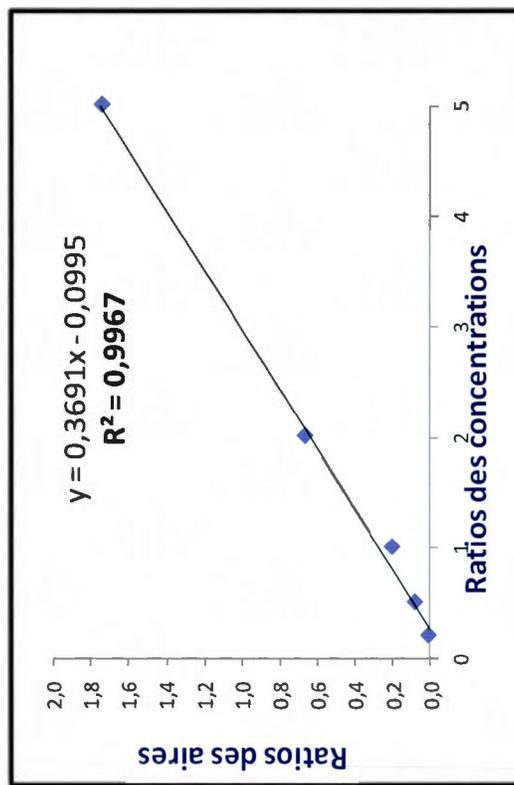
Soit pour chaque ratio de concentration et chaque temps d'incubation, le rapport suivant a été calculé :

$$\text{Ratio des aires} = \frac{\sum \text{des aires des peptides les plus abondants pour HSA}}{\sum \text{des aires des peptides les plus abondants pour RSA}}$$

Chaque droite du ratio des aires des peptides est tracée en fonction des ratios des concentrations pour les 3 temps d'incubations. La Figure 3.23 illustre les EIC les plus abondants utilisés pour le calcul du ratio que l'on retrouve également dans le tableau récapitulatif de ces ratios.



En a et b : Chromatogrammes des EIC des peptides sélectionnés pour les ratios des aires constituant la droite de quantification



d. Droite de la quantitative relative des ratios des aires des peptides les plus abondants en utilisant la RSA comme EI

c. Tableau récapitulatif des sommes utilisés pour les ratios des aires

HSA/RSA	Humain Σ (tous les peptides)	Rat Σ (tous les peptides)	Ratios des aires
0,2	3,01E+04	2,87E+06	0,01
0,5	2,49E+05	3,04E+06	0,08
1	3,72E+05	1,82E+06	0,20
2	6,81E+05	1,01E+06	0,67
5	9,08E+05	5,20E+05	1,74

Figure 3.23 : EIC des peptides du HSA (A) et RSA (B) utilisés pour le calcul du ratio des protéines ainsi qu'un tableau montrant la somme des aires de tous les peptides pour chaque protéine (C) et la quantification résultante (D).

Le tableau (figure 3.23c) a été obtenu par application de la formule de la somme de tous les aires des pics identifiés (figure 3.23a et b) chez l'homme et le rat. Ces données ont permis le calcul des ratios qui sont représentés par la quatrième colonne de la figure 3.23c. Ces ratios sont représentés par la droite (figure 3.23d) en fonction des ratios de concentration. Cette droite de quantification avec un coefficient de régression linéaire supérieur à 99% correspond aux résultats d'incubation à 2h, c'est la droite qui donnait le meilleur R^2 , en sachant que les droites à 4h et 8h avaient des R^2 de 0,9794 et 0,9493, respectivement. Cette droite nous montre que le rapport des aires est représentatif des ratios utilisés pour les concentrations. Cette droite, d'allure linéaire nous permet de valider cette méthode d'analyse et d'utiliser l'albumine de rat comme étalon interne du sérum albumine humaine, et vice versa. Avec la provenance des aires, à partir des données du triple TOF et la double confirmation de l'exactitude des masses des peptides en MS/MS, nous pouvons dire que c'est une méthode fiable pour la quantification du peptide d'intérêt.

Nous avons effectué ces mêmes calculs en prenant en compte le peptide le plus abondants chez l'homme et le rat. Ils correspondent aux peptides LQQC*PFEDHVKL et LQQC*PFEDHVKLVNE chez l'homme, représenté sur le chromatogramme de la Figure 3.23, et le peptide LQKC*PYEEHIKL multichargés chez le rat, soit sous les formes 2^+ , 3^+ et 4^+ . Le tableau 3.3 est un résumé des calculs obtenus.

Tableau 3.3 : résumé des aires des peptides sélectionnés de la HSA et la RSA.

HSA/RSA	Humain 2 peptides HSA les + abondants	Rat LQKCPYEEHIKL (2+,3+,4+)	Ratios des aires
0,2	2,33E+04	2,77E+06	0,01
0,5	1,79E+05	2,88E+06	0,06
1	2,74E+05	1,61E+06	0,17
2	4,78E+05	8,86E+05	0,54
5	5,99E+05	4,55E+05	1,32

Nous constatons que le ratio des aires est très semblable au ratio des aires obtenus pour les peptides totaux. Ce qui nous montre qu'il est possible de retrouver ce même rapport sans inclure toutes les données des peptides.

La figure 3.24 est la représentation de la droite de quantification en utilisant seulement les deux peptides les plus abondants chez l'homme et un seul peptide chargé sous trois formes chez le rat.

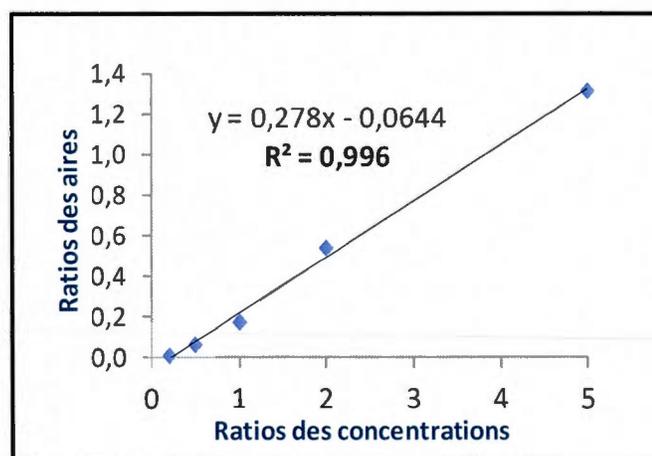


Figure 3.24 : Droite de quantification en utilisant les données du tableau 3.3

On constate que la validation de la méthode peut se faire en utilisant simplement quelques données des peptides les plus abondants. La droite est quasiment identique à celle observée sur la figure de la figure 3.23.

Ainsi, il est possible d'utiliser la HSA ou la RSA comme EI, en appliquant cette méthode mise en place, reste à voir la quantification du peptide lors de sa modification en présence de médicament.

CHAPITRE IV

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus *in vitro*, suite à l'utilisation du QQCPF comme agent de trappage, en comparaison au GSH ont montré la formation d'adduits en présence de l'APAP, le fipexide et l'atrazine. La formation de métabolite réactif à partir de médicament a été mesurée par l'utilisation d'agent de trappage GSH et le peptide synthétique QQCPF. Les analyses sur le système LC-ESI-TOF ont apportées la précision des masses de ces adduits et l'analyse de la fragmentation sur le Q-TRAP 5500 a permis de confirmer sa formation par l'intermédiaire des fragments qui était propre à l'agent de trappage et aux molécules exogènes. Ce peptide modèle qui est une partie du site actif de l'albumine humaine et bovine peut nous renseigner sur le comportement futur de la sérum albumine chez l'homme, en présence de ce type de molécules exogènes. Ce site actif qui contient la cystéine 34 est susceptible de réagir avec des médicaments ou des molécules toxiques comme l'atrazine.

Pour pouvoir mettre en évidence la formation de l'adduit, une méthode de digestion a été mise en place sur l'albumine native, pour voir les peptides détectés par l'analyse LC-MS. L'objectif à long terme est d'utiliser la sérum albumine humaine modifiée comme biomarqueur de toxicité sanguin. Pour l'utiliser comme biomarqueur, l'adduit formé doit être mesurable, et la méthode de mesure utilisée doit être fiable sans avoir d'interférence sur la nature de l'adduit formé entre le médicament ou une molécule exogènes et l'albumine humaine, mais aussi elle ne doit pas jouer un rôle dans la dégradation ou la modification de l'adduit au cours du processus d'analyse.

L'optimisation de la méthode de digestion du sérum albumine a montré que la pepsine était l'enzyme la plus adaptée dans la mesure où elle clivait le peptide du site actif de l'albumine provenant d'espèces différentes avec beaucoup de similitudes.

L'étape d'alkylation à l'IAM a montré que l'IAM permettait de résoudre la formation des cystéines oxydées. L'oxydation des cystéines multipliait le nombre de signaux obtenus pour

un même peptide qui apparaissait sous forme di-oxydé ou tri-oxydé, la protection de ces cystéines à entraîner l'augmentation du signal en LC-MS par la sommation de toutes ces formes, pour les réunir en une seule forme alkylée.

Tous ces résultats obtenus de l'IAM ont amélioré la quantification des peptides d'intérêt. Par l'intermédiaire des ratios de concentrations mis en place, il est possible d'utiliser la HSA comme étalon interne de la RSA et inversement. Nous avons pu voir que l'utilisation de deux peptides sélectionnés nous permettait d'avoir les mêmes résultats que ceux obtenus en présence de l'ensemble des peptides détectés. Donc à l'avenir le ratio se fera directement uniquement sur les deux peptides les plus abondants. Nous avons effectué des incubations microsomaux d'APAP et d'APAP alcyne en présence de l'albumine humaine et de rat, au lieu du QQCPF, pour essayer de détecter les adduits directement sur l'albumine. Cette étape d'incubation de 2h était suivie de la digestion à la pepsine, mais l'adduit n'a pas été détecté. En effet, la détection d'un adduit sur une protéine native est beaucoup plus complexe que la détection d'un adduit avec une petite molécule sur un agent de trappage comme le QQCPF. L'adduit n'a pas été détecté, cela est peut-être dû au fait que la matrice biologique contenant des microsomes rend les échantillons plus complexes, ce qui entraîne sur la détection un signal insuffisant du peptide modifié qui est sûrement beaucoup moins abondants que les protéines non-modifiées. La prochaine étape serait d'optimiser la réaction de ces trois étapes combinées : incubation, purification et digestion. Une bonne purification sélective de l'albumine dans ce cas pourrait régler le problème de la matrice très complexe de ces échantillons.

Notre objectif à long terme est d'utiliser ces résultats obtenus *in vitro* vers une méthode d'analyse applicable *in vivo*. En mettant en place une méthode d'analyse simple, fiable permettant après l'ingestion d'un médicament, un simple prélèvement sanguin pour identifier la présence ou non de l'adduit sur l'albumine. Pour pouvoir détecter cet adduit, l'étalon interne serait ajouté, et dans ce cas cet adduit pourra être quantifiable. Pour améliorer le signal, les cystéines seraient alkylées par l'IAM et ensuite toute l'étape de digestion à la purification mise en place sera appliquée ainsi que la méthode LC-MS/MS. La figure 4.1 illustre l'utilisation à long terme de l'albumine comme biomarqueur de toxicité.

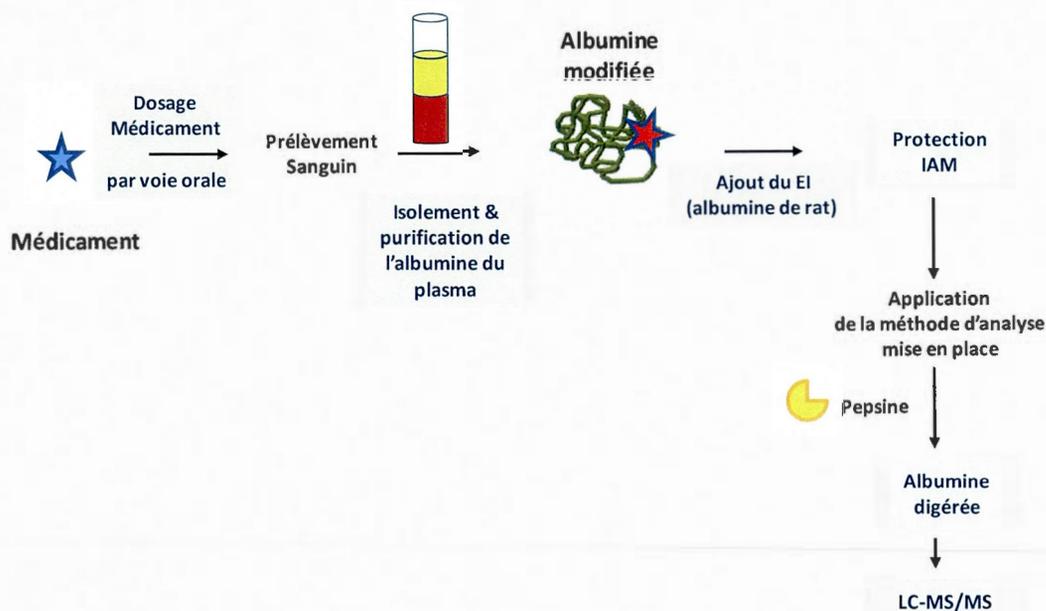


Figure 4.1 : Objectif de l'utilisation de la sérum albumine comme biomarqueur sanguin.

Pour la méthode de digestion et de l'analyse LC-MS/MS, cette méthode a été optimisée et les résultats pour l'albumine non modifiée ont été validés. Cette technique permettra d'établir une classification et une évaluation des médicaments susceptibles de former des adduits d'albumine, afin de mettre en évidence qu'ils sont potentiellement toxiques, en se liant de manière irréversible à l'albumine.

Ce rôle de biomarqueur de l'albumine servirait à la détection d'adduits de nouvelles molécules durant les études précliniques et cliniques. Cela permettra de voir les effets secondaires que pourrait entraîner la fixation du site actif de l'albumine car cette technique sera applicable que pour les adduits formés au niveau de la cystéine 34. À partir de cette classification, on pourrait mieux prévenir le risque de ce médicament avant sa mise sur le marché du médicament.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ghuman, J., et al., *Structural Basis of the Drug-binding Specificity of Human Serum Albumin*. Journal of Molecular Biology, 2005. **353**(1): p. 38-52.
2. Nicholson, J.P., M.R. Wolmarans, and G.R. Park, *The role of albumin in critical illness*. British Journal of Anaesthesia, 2000. **85**(4): p. 599-610.
3. Hanash, S., *Building a Foundation for the Human Proteome: The Role of the Human Proteome Organization*. Journal of Proteome Research, 2004. **3**(2): p. 197-199.
4. Sengupta, S., et al., *Albumin Thiolate Anion Is an Intermediate in the Formation of Albumin-S-S-Homocysteine*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(32): p. 30111-30117.
5. Claude Martin, B.R., Benoit Vallet, *Physiologie humaine appliquée*. 2e édition, ed. Hardcover. 2006.
6. Throop J, K.M., Cohn L., *Albumin in Health and Disease: Protein Metabolism and Function*. Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian December 2004: p. 932-938.
7. Fanali, G., et al., *Human serum albumin: From bench to bedside*. Molecular Aspects of Medicine, 2012. **33**(3): p. 209-290.
8. Tabassum, S., et al., *Synthesis, characterization and interaction studies of copper based drug with Human Serum Albumin (HSA): Spectroscopic and molecular docking investigations*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2012. **114**(0): p. 132-139.
9. Tabassum, S., et al., *Interaction and photo-induced cleavage studies of a copper based chemotherapeutic drug with human serum albumin: spectroscopic and molecular docking study*. Molecular BioSystems, 2012. **8**(9): p. 2424-2433.
10. Oettl, K. and R.E. Stauber, *Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties*. British Journal of Pharmacology, 2007. **151**(5): p. 580-590.
11. Bruyneel, B., et al., *Trace Analysis of Proteins Using Postseparation Solution-Phase Digestion and Electrospray Mass Spectrometric Detection of Marker Peptides*. Analytical Chemistry, 2006. **79**(4): p. 1591-1598.
12. <http://www.dictionnaire-environnement.com/>.
13. Park, B.K., et al., *The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2005. **45**(1): p. 177-202.
14. Stepan, A.F., et al., *Structural Alert/Reactive Metabolite Concept as Applied in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic Drug Toxicity: A Perspective Based on the Critical Examination of Trends in the Top 200 Drugs Marketed in the United States*. Chemical Research in Toxicology, 2011. **24**(9): p. 1345-1410.
15. Laine, J.E., et al., *Acetaminophen bioactivation by human cytochrome P450 enzymes and animal microsomes*. Xenobiotica, 2009. **39**(1): p. 11-21.
16. Zhou, S., et al., *Drug Bioactivation Covalent Binding to Target Proteins and Toxicity Relevance*. Drug Metabolism Reviews, 2005. **37**(1): p. 41-213.
17. Stepan, A.F., et al., *Structural Alert/Reactive Metabolite Concept as Applied in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic Drug Toxicity: A Perspective Based on the*

- Critical Examination of Trends in the Top 200 Drugs Marketed in the United States.* Chemical Research in Toxicology. **24**(9): p. 1345-1410.
18. Zheng, J., et al., *Screening and Identification of GSH-Trapped Reactive Metabolites Using Hybrid Triple Quadruple Linear Ion Trap Mass Spectrometry.* Chemical Research in Toxicology, 2007. **20**(5): p. 757-766.
19. Tornqvist, M., et al., *Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications.* Journal of Chromatography B, 2002. **778**(1-2): p. 279-308.
20. Lohmann, W. and U. Karst, *Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism : Strategies, advantages and limitations.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(1): p. 79-96.
21. Damsten, M.C., et al., *Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Detection of Covalent Binding of Acetaminophen to Human Serum Albumin.* Drug Metabolism and Disposition, 2007. **35**(8): p. 1408-1417.
22. LeBlanc, A. and L. Sleno, *Atrazine Metabolite Screening in Human Microsomes: Detection of Novel Reactive Metabolites and Glutathione Adducts by LC-MS.* Chemical Research in Toxicology, 2011. **24**(3): p. 329-339.
23. Sleno, L., et al., *Investigating the in vitro metabolism of fipexide: characterization of reactive metabolites using liquid chromatography/mass spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(14): p. 2301-2311.
24. Sleno, L., E. Varesio, and G. Hopfgartner, *Determining protein adducts of fipexide: mass spectrometry based assay for confirming the involvement of its reactive metabolite in covalent binding.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(24): p. 4149-4157.
25. Lin, P.H., et al., *Investigation of the cumulative tissue doses of naphthoquinones in human serum using protein adducts as biomarker of exposure.* Chemico-Biological Interactions, 2009. **181**(1): p. 107-114.
26. Rappaport, S.M., et al., *Protein adducts as biomarkers of human benzene metabolism.* Chemico-Biological Interactions, 2005. **153-154**(0): p. 103-109.
27. Switzar, L., et al., *Protein digestion optimization for characterization of drug-protein adducts using response surface modeling.* Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(13): p. 1715-1723.
28. Wong, S.S., *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*, ed. C. press. 2000.
29. Dass, C., *Principles and practice of biological mass spectrometry*, ed. D.M. Desiderio. 2001.
30. Switzar, L., et al., *Protein digestion optimization for characterization of drug-protein adducts using response surface modeling.* Journal of Chromatography A. **1218**(13): p. 1715-1723.
31. Li, F., et al., *Irreversible Alkylation of Human Serum Albumin by Zileuton Metabolite 2-Acetylbenzothiophene-S-oxide: A Potential Model for Hepatotoxicity.* Chemical Research in Toxicology, 2007. **20**(12): p. 1854-1861.
32. Tamvakopoulos, C., *Mass spectrometry for the quantification of bioactive peptides in biological fluids.* Mass Spectrometry Reviews, 2007. **26**(3): p. 389-402.
33. Ibrahim-Granet, O. and O. Bertrand, *Separation of proteases: old and new approaches.* J Chromatogr B Biomed Appl, 1996. **684**(1-2): p. 239-63.

34. Li, B., et al., *Detection of Adduct on Tyrosine 411 of Albumin in Humans Poisoned by Dichlorvos*. Toxicological Sciences, 2010. **116**(1): p. 23-31.
35. Jones, R.G.A. and J. Landon, *A protocol for 'enhanced pepsin digestion': a step by step method for obtaining pure antibody fragments in high yield from serum*. Journal of Immunological Methods, 2003. **275**(1-2): p. 239-250.
36. Li, B., et al., *Detection of adduct on tyrosine 411 of albumin in humans poisoned by dichlorvos*. Toxicological Sciences. **116**(1): p. 23-31.
37. Noort, D., et al., *Covalent binding of organophosphorothioates to albumin: a new perspective for OP-pesticide biomonitoring?* Archives of Toxicology, 2009. **83**(11): p. 1031-1036.
38. Lloyd R., S., Joseph J., Kirkland, Joseph L., Glajch *Practical HPLC method development*, ed. S. Edition. 1997, Canada. 765.
39. Edmond de Hoffman, V.S., *Spectrometrie de masse, cours et exercices corrigés*. Sciences sup, ed. DUNOD. 2005, Paris. 425.
40. Schoneich, C., et al., *Separation and Analysis of Peptides and Proteins*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(12): p. 155-181.
41. Knochenmuss, R.Z.a.R., *ION FORMATION IN MALDI MASS SPECTROMETRY*. Mass Spectrometry Reviews, 1998, **17**, 337-366, November 1998. **17**: p. 337-366.
42. Kam, S.Y., et al., *Characterization of the Human Gastric Fluid Proteome Reveals Distinct pH-Dependent Protein Profiles: Implications for Biomarker Studies*. Journal of Proteome Research. **10**(10): p. 4535-4546.
43. Jungblut, P. and B. Thiede, *Protein identification from 2-DE gels by MALDI mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 1997. **16**(3): p. 145-162.
44. Siuzdak, g., *Mass spectrometry for biotechnology*, ed. A. Press. 1996, San Diego, California. 159.
45. March, R.E., *An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 1997. **32**(4): p. 351-369.
46. Harrison, A.G., *Cyclization of Peptide b9 Ions*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(12): p. 2248-2253.
47. Yalcin, T., et al., *Why are B ions stable species in peptide spectra?* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1995. **6**(12): p. 1165-1174.
48. Jonscher, K.R. and J.R. Yates Iii, *The Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer—A Small Solution to a Big Challenge*. Analytical Biochemistry, 1997. **244**(1): p. 1-15.
49. Hager, J.W., *A new linear ion trap mass spectrometer*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2002. **16**(6): p. 512-526.

RÉFÉRENCES DES FIGURES

Figure 1.1 est tirée de l'article Throop J, K. M., Cohn L. (December 2004). "Albumin in Health and Disease: Protein Metabolism and Function." Compedium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian 932-938..

Figure 1.2 est tirée du site Uniprot :
<http://www.uniprot.org/align/2012091250X1B23IKS>

Figure 1.3 et 1.4 et 1.11 sont tirées de l'article: Fanali, G.; di Masi, A.; Trezza, V.; Marino, M.; Fasano, M.; Ascenzi, P., Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* 2012, 33 (3), 209-290.

Figure 1.5 est tirée de l'article : Oettl, K.; Stauber, R. E., Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *British Journal of Pharmacology* 2007, 151 (5), 580-590.

Figures 1.6, 1.7 et 1.8 sont adaptées à partir de la revue Park, B. K.; Kitteringham, N. R.; Maggs, J. L.; Pirmohamed, M.; Williams, D. P., metabolic activation in drug induced hepatotoxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2005, 45 (1), 177-202.

Figure 1.9 Zheng, J., et al., Screening and Identification of GSH-Trapped Reactive Metabolites Using Hybrid Triple Quadruple Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 2007. **20**(5): p. 757-766.

Figure 1.10 est tirée de l'article Oettl, K.; Stauber, R. E., Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *British Journal of Pharmacology* 2007, 151 (5), 580-590.

Figure 1.12 est adaptée à partir du livre Wong, S. S., *Chemistry of protein conjugation and cross-linking*. 2000.

Figures 1.13 et 1.14 sont adaptées à partir du site :
<http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/4d.html>

Figure 1.15 est adaptée à partir de l'article Humbert*, L. (2012). "Solid phase extraction (SPE): theory and applications." *Ann Toxicol Anal.* 22(2): 61 - 68.

Figure 1.16 est tirée du site <http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X/X-C> et du site <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513209>

Figure 1.17 est adaptée du livre Lloyd R., S., Joseph J., Kirkland, Joseph L., Glajch (1997). *Practical HPLC method development*. Canada.[38]

Figure 1.19 tirée du site :

<http://www.phenomenex.com/Info/WebdocumentServe/reversedguide.pdf>

Figures 1.21, 1.22, 1.27, 1.28 et 1.29 sont adaptées à partir du livre Edmond de Hoffman, V. S., Spectrométrie de masse, cours et exercices corrigés. Paris, 2005; p 425.

Figure 1.23 tirée de l'article Schoneich, C.; Huhmer, A. F. R.; Rabel, S. R.; Stobaugh, J. F.; Jois, S. D. S.; Larive, C. K.; Siahaan, T. J.; Squier, T. C.; Bigelow, D. J.; Williams, T. D., Separation and Analysis of Peptides and Proteins. Analytical Chemistry 1995, 67 (12), 155-181.

Figures 1.24 et 1.25, adaptée du livre Siuzdak, g. (1996). Mass spectrometry for biotechnology. San Diego, California.

Figure 1.30 a été faite à partir de l'article Yalcin, T.; Khouw, C.; Csizmadia, I. G.; Peterson, M. R.; Harrison, A. G., Why are B ions stable species in peptide spectra? Journal of the American Society for Mass Spectrometry 1995, 6 (12), 1165-1174.

Figure 1.31 est tirée de l'article Hager, J. W., A new linear ion trap mass spectrometer. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2002, 16 (6), 512-526.

Figure 1.33 est tirée de l'article Tamvakopoulos, C., *Mass spectrometry for the quantification of bioactive peptides in biological fluids*. Mass Spectrometry Reviews, 2007. 26(3): p. 389-402.

Figure 1.34 est tirée du site <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=514467> :

Figure 2.3 est adaptée du site:

<http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/item.asp?>