



HAL
open science

Nouvel outil de quantification de biomarqueurs couplant la spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse, la Photo-SRM

Quentin Enjalbert

► To cite this version:

Quentin Enjalbert. Nouvel outil de quantification de biomarqueurs couplant la spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse, la Photo-SRM. Optique [physics.optics]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10196 . tel-01072242

HAL Id: tel-01072242

<https://theses.hal.science/tel-01072242>

Submitted on 7 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE

DIPLOME DE DOCTORAT (arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement 8 novembre 2013

par

M. Quentin ENJALBERT

Nouvel outil de quantification de biomarqueurs couplant la spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse, la Photo-SRM.

Composition du jury :

Monsieur Philippe Dugourd (Directeur de thèse)

Monsieur Jérôme Lemoine (Co-directeur de thèse)

Monsieur Yann Bretonnière

Madame Hélène Budzinski

Monsieur Yves LeBlanc

Monsieur Christophe Masselon

Madame Sandrine Sagan

La spectrométrie de masse apparaît depuis plusieurs années, au travers de la technologie SRM (Selected Reaction Monitoring) comme une alternative crédible aux tests immunologiques pour la quantification de biomarqueurs. Cependant, les limites de quantifications et de détections atteintes ne sont pas suffisantes pour réaliser des dosages cliniques. Afin d'améliorer les limites de détections nous nous sommes intéressés au couplage de la spectroscopie optique avec la spectrométrie de masse pour le dosage de biomarqueurs. Ce couplage s'appelle la Photo-SRM.

Durant cette thèse, je me suis donc appliqué, dans un premier temps, à étudier les propriétés optiques de biomolécules dans des domaines de longueurs d'ondes différents allant du VUV au visible.

Par la suite, la preuve de concept de l'outil Photo-SRM a été réalisée. Suite à une modification instrumentale réalisée sur un spectromètre de masse de type triple quadripôle, un laser continu émettant des photons dans le domaine du visible, 532 nm, a été implémenté dans cet instrument.

Afin d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche, nous avons souhaité appliquer la Photo-SRM au dosage de métabolites. En effet, dans de nombreuses pathologies, les métabolites et les protéines jouent un rôle important. Par exemple, les œstrogènes utilisés comme contraceptif ont un impact sur les concentrations des protéines de coagulation. Il semble donc intéressant de pouvoir étudier ces deux familles de biomolécules lors d'une même analyse.

Enfin, avec l'avènement des instruments hybrides, tels que les Q-TOF et le Q-exactive, la quantification n'est plus uniquement réservée à l'usage des instruments de type triple quadripôle. Ces instruments permettent de doser des biomolécules aux mêmes ordres de grandeur que les triples quadripôles en mode SRM. Ces instruments permettent également de réaliser des expériences de découvertes de protéines.

TITRE en anglais

Photo-SRM, a new tool coupling optical spectroscopy and mass spectrometry for biomarker quantification.

RESUME en anglais

Targeted mass spectrometry using Selected Reaction Monitoring (SRM) mode has emerged as an alternative technology to immuno-assays for protein quantification owing to faster development time and higher multiplexing capability. However, the SRM strategy is faced with the high complexity of peptide mixtures after trypsin digestion of whole plasma or cellular proteome that most of the time causes contamination, irremediably, by interference compounds in the transition channels monitored. This event becomes more and more acute when the targeted protein is present at a low concentration. In the present work, the merit of laser induced photo-dissociation implemented in a triple quadrupole mass spectrometer (Photo-SRM) was evaluated for the detection specificity of cysteine-containing peptides.

First of all, optical properties of biomolecules were investigated in gas phase thanks to action spectroscopy.

Then a proof-of-concept of Photo-SRM was performed on a modified triple quadrupole and the comparison of the signals obtained for best proteotypic peptides in SRM mode and those recorded by Photo-SRM on cysteine-containing peptides for the same proteins shows either an increased (up to 10 fold) or similar signal to Photo-SRM detection. Finally, Photo-SRM demonstrates extended response linearity across a calibration curve obtained by diluting human plasma in rat plasma, down to the lowest concentrations. Hence, Photo-SRM may advantageously complement conventional SRM in assaying proteins in complex biological matrices.

Finally, we modified a Q-exactive instrument in order to add the high mass resolution as a new selective step for quantitative analysis. Preliminary experiments on the modified Q-exactive mass spectrometer open new routes for future works.

DISCIPLINES : Physique, chimie, biologie.

MOTS-CLES

Spectrométrie de masse, biomarqueurs, quantification, spectroscopie optique, instrumentation, protéomique

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Institut Lumière Matière UMR5306, bâtiment CLEA, 5 avenue de la Doua, 69100 Villeurbanne

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire
Vice-président du Conseil Scientifique
Secrétaire Général

M. François-Noël GILLY
M. le Professeur Hamda BEN HADID
M. le Professeur Philippe LALLE
M. le Professeur Germain GILLET
M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux
UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation
Département de formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Administrateur provisoire : M. le Professeur G.
KIRKORIAN
Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Directeur : Mme la Professeure C.
VINCIGUERRA.
Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies
Département Biologie
Département Chimie Biochimie
Département GEP
Département Informatique
Département Mathématiques
Département Mécanique
Département Physique
Département Sciences de la Terre
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et
Sportives
Observatoire de Lyon
Polytech Lyon
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI
Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
Directeur : M. N. SIAUVE
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : Mme S. FLECK
Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON
Directeur : M. B. GUIDERDONI
Directeur : M. P. FOURNIER
Directeur : M. G. PIGNAULT
Directeur : M. C. VITON
Directeur : M. R. BERNARD
Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-
DESCHAMPS

Remerciements

Pour commencer, je souhaite remercier Jérôme Lemoine, mon co-directeur de thèse, si j'ai fait cette thèse en spectrométrie de masse, c'est avant tout grâce à ses cours que j'ai pu suivre lors de ma formation à CPE Lyon, comme quoi certains élèves de CPE écoutent en cours. Il m'a donné l'envie de travailler dans ce domaine et, chose plus importante, m'a permis de rencontrer de nombreuses personnes évoluant dans cette communauté. Merci aussi pour les conseils et discussions tout au long de ma thèse tant au niveau scientifique que personnel.

Je souhaite aussi remercier fortement Philippe Dugourd, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans son équipe et m'avoir permis de découvrir la spectroscopie optique en phase gazeuse, domaine dans lequel j'étais totalement novice. Merci aussi pour l'initiation à l'escalade en Croatie, même si je n'ai fait que vous assurer, il ne fallait pas lâcher ...

Merci à Arnaud Salvador pour l'ensemble de ses conseils avisés en spectrométrie de masse, tant au niveau instrumental que développement analytique. Un grand merci pour toutes les discussions sur le travail d'ingénieur d'application chez un constructeur de spectromètre de masse, j'espère m'épanouir pleinement dans ce métier.

Merci à Rodolphe Antoine pour son aide lors des couplages laser/spectrométrie de masse. Les séjours passés à SOLEIL resteront comme des moments très particuliers de ma thèse.

Je tiens à remercier particulièrement ma collègue Marion Girod pour son aide et ses nombreuses relectures de mon manuscrit, elle a pu apprécier mon écriture brute à sa juste valeur ... Merci également pour les bons moments passés durant la thèse que ce soit au labo ou en congrès. Merci à Luke et Fabien pour leur aide et explications, même si j'ai encore du mal à comprendre celles de Luke. Un jour peut être ...

Merci aux doctorants et post-doctorants qui m'ont supporté durant ces trois années, avoir un collègue qui chante, danse et fait des blagues pas toujours drôles ne doit pas être facile tous les jours. Merci à Claire, Romain, Jérémy, Arnaud, Aurore et Jordane.

Merci aux autres personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler, Franck, Tristan et Cathy. Merci pour l'aide au laboratoire et un grand merci à Cathy pour les nombreux gâteaux dégustés au labo. Merci au support technique, notamment Marc et Jacques, sans eux, cette thèse aurait été compliquée à réaliser.

Je n'oublie pas les stagiaires et CDD qui sont passés au labo avec une pensée particulière pour Romain, je trouve que ton stage est beaucoup plus long que les autres ...

Je remercie également l'ensemble des collaborateurs avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler sur mes différents projets. Yann Bretonière, Sébastien Redon, Stéphane Chambert, Miro Radman, Anita Krisko, Alexandre Giuliani, Laurent Nahon, Daniel « boloss » Ortiz, Jean-Yves Salpin, Marie Pérot-Taillandier, Carlos Afonso, David Ropartz, Hélène Rogniaux et tous ceux que j'oublie.

Pour finir, d'un point de vue plus personnel, je souhaite remercier trois personnes, ma sœur pour ses corrections, en effet un manuscrit de thèse est très différent des devoirs de ses élèves de primaire, mais je ne suis pas sûr qu'il y ait moins de fautes ...

Merci à Héloïse de m'avoir supporté durant cette thèse et de me supporter au quotidien. C'est une chose assez fatigante paraît-il ...

Enfin, un grand merci à ma mère, si j'ai eu la chance de pouvoir faire des études et d'avoir la vie que j'ai aujourd'hui c'est en très grande partie grâce à elle. Je ne la remercierai jamais assez.

Un grand merci à ceux que j'oublie.

Abréviations

μL	micro litre
AA	acétate d'ammonium
ACN	Acétonitrile
AF	Acide Formique
AMBIC	bicarbonate d'ammonium
BBO	β-barium borate
CID	Collision Induced Dissociation
cps	Coups Par Seconde
CV	Coefficient de Variation
DP	degré de polymérisation
DTT	Dithiothréitol
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESI	ElectroSpray Ionization
ExD	excitation électronique
FT-ICR	analyseur à résonance cyclotronique d'ion à transformée de Fourier
h	heures
H/R	ratio sérum humain/plasma de rat
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IAM	Iodoacétamide
IDA	Information Dependant Acquisition
IR	Infra-rouge
IRMPD	Infrared multiphoton dissociation
LC	Liquid Chromatography
LDD	Limites de détection
LDQ	Limites de quantification
LID	Laser Induced Dissociation
LTQ	Linear trap quadrupole
M	mol par litre
<i>m/z</i>	rapport masse sur charge
MeOH	Méthanol
min	minutes
mL	millilitre
MRM ³	Multiple Reaction Monitoring Cubed
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
OPO	Oscillateur Paramétrique Optique
PAGE	Electrophorèse sur Gel de PolyAcrylamide
pg/mL	picogramme par millilitre
PSA	Prostate Specific Antigen

RT	Temps de Rétention
S/N	rapport signal/bruit
SDS	Dodécyle Sulfate de Sodium
SPE	Solid Phase Extraction
SR	Radiation du synchrotron
SRM	Selected Reaction Monitoring
<i>t</i>	temps
TCEP	Tris-(2-CarboxyEthyl)Phosphine
TOF	Time Of Flight
U	tension continue
UV	Ultra-violet
V	tension alternative
v/v	ratio volume/volume
VUV	Vacuum Ultra-violet ou Ultra-violet du vide
λ	Lambda (longueur d'onde)

Table des matières

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1	5
COMPOSANTES SANTE	5
COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE.....	5
Remerciements	7
Abréviations	9
Table des matières	11
Liste des figures.....	17
Liste des tableaux.....	25
Introduction générale.....	27
Chapitre I. Quantification de biomarqueurs, état de l'art.....	31
I.1 Introduction.....	33
I.2 Les biomarqueurs	34
I.2.1 Définitions	34
I.2.2 La découverte de nouveaux biomarqueurs.....	35
I.2.3 La validation de nouveaux biomarqueurs	35
I.3 La quantification des protéines.....	38
I.3.1 La structure primaire des protéines	38
I.3.2 Quantification par des méthodes à base d'anticorps	40
I.3.2.1 Dosage après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en deux dimensions	40
I.3.2.2 Dosage par ELISA	41
I.3.3 Dosage par spectrométrie de masse.....	43
I.3.3.1 Structure générale d'un spectromètre de masse.....	43
I.3.3.1.1 Les sources d'ionisation	44
I.3.3.1.2 Les analyseurs	47
I.3.3.1.3 Les détecteurs et ordinateurs	47
I.3.4 Principe de la quantification de protéines par spectrométrie de masse	47

1.	Digestion des protéines et formation de peptides.....	47
I.3.4.1	La chromatographie liquide (LC)	49
I.3.4.2	L'analyse par spectrométrie de masse des peptides (MS).....	49
a)	Principe d'un quadripôle	49
I.4	Amélioration de la spécificité de détection.	56
I.4.1	La préparation d'échantillon	56
I.4.1.1	Déplétion des protéines majoritaires.....	56
I.4.1.2	Fractionnement de l'échantillon	57
I.4.1.3	Immuno-enrichissement	57
I.4.2	Développements instrumentaux.....	57
I.4.2.1	En amont de l'analyseur	58
I.4.2.2	Au niveau de l'analyseur	60
I.4.2.2.1	Améliorer la résolution.....	60
I.4.2.2.2	Le mode de balayage MRM ³	61
I.5	Conclusion	63
Chapitre II.	Photodissociation et Spectroscopie d'action en phase gazeuse des peptides et protéines	65
II.1	Introduction.....	67
II.2	L'utilisation de la spectrométrie de masse pour l'étude de la séquence des protéines et des peptides.....	68
II.2.1	Nomenclature des ions fragments des peptides et des protéines.....	68
II.2.2	Dissociation induite par collision (CID).....	69
II.2.3	Dissociation induite par des photons infrarouges (IRMPD)	70
II.2.4	La photo-excitation par laser UV-Visible	71
II.2.4.1	Principe de la Photodissociation induite par laser	72
II.2.4.2	Photodissociation à 220 nm d'un peptide, la gramicidine	73
II.2.4.3	Utilisation du photo-détachement d'électron pour l'étude de la séquence de peptides, activated-EPD	77
II.3	Caractérisation des propriétés optiques des protéines par spectroscopie d'action	80
II.3.1	Principe et fonctionnement	80
II.3.2	Spectroscopie d'action dans le domaine de l'UV	81
Spectroscopie optique d'une protéine dans l'UV, cas de l'insuline	82	

II.3.3	Spectroscopie d'action dans le domaine du visible	84
	Une Hémoprotéine, le cytochrome C.....	84
II.3.4	Spectroscopie d'action dans le domaine du VUV.....	85
II.4	Conclusion	88
Chapitre III.	Spectroscopie optique en phase gazeuse d'oligosaccharides dans le VUV et le visible	91
1.	Introduction.....	93
III.1	Intérêt des oligosaccharides dans le domaine de la santé.....	94
III.2	Procédés expérimentaux.....	97
III.2.1	Principe du piège linéaire	97
III.2.2	Le mode MS/MS	98
III.2.3	Caractéristiques du piège utilisé	99
III.2.4	Couplage LTQ-SR (Synchrotron Radiation).....	99
III.2.4.1	Le rayonnement du synchrotron.....	99
III.2.4.2	Le couplage DESIRS-LTQ.....	101
III.2.5	Couplage LTQ-Laser UV-Vis	102
III.2.5.1	La source de lumière : OPO, Continuum	102
III.2.5.2	Le couplage LTQ-OPO	104
III.3	Spectroscopie d'action dans le VUV pour l'analyse d'oligosaccharides.....	106
III.3.1	Paramètres expérimentaux.....	106
III.3.1.1	Préparation d'échantillons	106
III.3.1.2	Instrumentation.....	106
III.3.2	Résultats et discussion	107
III.3.2.1	Propriétés optiques dans l'UV	107
III.3.2.2	Effet de taille ou degrés de polymérisation (DP).....	108
III.3.2.3	Effet de charge	112
III.3.2.4	Utilisation du VUV comme outil de fragmentation.....	115
III.3.3	Conclusion	117
III.4	Spectroscopie d'action dans le visible d'oligosaccharide greffé avec un chromophore <i>push-pull</i> .	118
III.4.1	Paramètres expérimentaux.....	118
III.4.1.1	Préparation d'échantillons	118

III.4.1.1.1	Synthèse de chromophore <i>push-pull</i>	118
III.4.1.1.2	Couplage du polysaccharide avec le chromophore	119
III.4.1.2	Instrumentation.....	121
III.4.2	Résultats et discussion	121
III.4.2.1	Comparaison de l'absorbance du couple oligosaccharide-chromophore en phase liquide vis-à-vis de la phase gazeuse.....	121
III.4.2.1.1	Partie expérimentale.....	121
III.4.2.1.2	Partie calculs théoriques	124
III.4.2.2	Utilisation de la dérivation par chromophore pour la photo-fragmentation dans le domaine du visible.	126
III.4.3	Conclusion	128
III.5	Conclusion générale	129
Chapitre IV.	Preuve de principe de la Photo-SRM.....	131
IV.1	Introduction.....	133
IV.2	Implémentation d'un laser continu dans un spectromètre de masse de type triple quadripôle.	136
IV.2.1	Modification du triple quadripôle	136
IV.2.2	Choix du laser	140
IV.2.3	Réglage du trajet optique du laser	141
IV.3	Stratégie de dosage par Photo-SRM	145
IV.3.1.1	Choix des acides aminés à marquer	145
IV.3.2	Modification chimique, choix du chromophore.....	146
IV.4	Dosage de l'Ocytocine	149
IV.4.1	Préparation des échantillons.....	149
IV.4.2	Paramètres expérimentaux.....	150
IV.4.2.1	Paramètres chromatographiques.....	150
IV.4.2.2	Paramètres du spectromètre de masse	152
IV.4.3	Comparaison SRM, SRM avec protéine dérivée, Photo-SRM.....	154
IV.5	Conclusion	158
Chapitre V.	Applications de la Photo-SRM pour le dosage de protéines endogènes	159
V.1	Introduction.....	161
V.2	Implémentation de la Photo-SRM sur un 4 000 Q-trap.	162

V.2.1	Modifications instrumentales du 4 000 Q-trap et choix du laser.....	162
V.2.2	Choix du chromophore à partir des chromophores à thiol commerciaux.....	163
V.2.3	Synthèse de chromophores spécifiques pour la Photo-SRM	166
V.2.4	Stabilité du couplage Chromophore-peptide.....	172
V.3	Amélioration de la détection et de la quantification de protéines plasmatiques par Photo-SRM	174
V.3.1	Introduction.....	174
V.3.2	Expériences.....	175
V.3.2.1	Produits chimiques et biologiques	175
V.3.2.2	Préparation des échantillons.....	175
V.3.2.3	Séparation HPLC	176
V.3.2.4	Instrumentation et paramètres de source et d'analyse sur le spectromètre de masse.	177
V.3.3	Choix des transitions SRM	177
V.3.3.1	Choix des transitions à partir de base de données	177
V.3.3.2	Performance relative de la Photo-SRM vis-à-vis de la SRM	178
V.3.4	Comparaison SRM/Photo-SRM pour les peptides à cystéines dérivés	181
V.3.5	Comparaison SRM/Photo-SRM vis-à-vis des meilleurs peptides protéotypiques.....	183
V.3.6	Linéarité et répétabilité de la réponse	185
V.3.7	Conclusion	188
V.4	Conclusion générale	189
Chapitre VI. Détection simultanée d'œstrogènes et de protéines de coagulation par la combinaison de la SRM et de la Photo-SRM.....		
		191
VI.1	Introduction.....	193
VI.2	Expériences.....	195
VI.2.1	Produits chimiques et biologiques	195
VI.2.2	Préparation des échantillons.....	195
VI.2.3	Séparation HPLC	196
VI.2.4	Paramètres de source et d'analyse sur le spectromètre de masse.	198
VI.3	Résultats	199
VI.3.1	Comparaison SRM/Photo-SRM pour le dosage d'œstrogènes après précipitation des protéines.	199

VI.3.2	Analyse simultanée de métabolites et de peptides.....	203
VI.4	Conclusion et perspectives.....	206
Chapitre VII.	Perspectives : couplage haute résolution/fragmentation laser.....	207
VII.1	Introduction.....	209
VII.2	Fonctionnement d'un Q-exactive.....	211
VII.2.1	Fonctionnement d'une Orbitrap.....	211
VII.2.2	Principe du Q-exactive.....	212
VII.2.3	Couplage Q-exactive/Laser.....	214
VII.2.3.1	Modification de l'instrument.....	214
VII.2.3.2	Réglage du laser à 473 nm et des paramètres de la cellule HCD.....	215
VII.2.4	Couplage LC-MS/photo-fragmentation.....	219
VII.3	Conclusion générale.....	222
Chapitre VIII.	Conclusion générale et perspectives.....	223
	Quantification par Photo-PRM.....	225
	Découverte.....	226
	Références bibliographiques.....	231
Annexes	241
	Publications scientifiques :.....	241
	Communications orales :.....	241

Liste des figures

Figure I-1 : Les étapes du développement d'un nouveau biomarqueur	37
Figure I-2 : Liaison peptidique entre deux acides aminés	38
Figure I-3 : Schéma de séparation par électrophorèse sur gel	41
Figure I-4 : Schéma général d'un spectromètre de masse	44
Figure I-5 : Principe de l'électrospray	46
Figure I-6 : Principe du dosage de protéines par spectrométrie de masse	48
Figure I-7 : Schéma d'un quadripôle avec les potentiels appliqués. ⁷⁴	51
Figure I-8 : Zones de stabilité dans un quadripôle d'un ion donné suivant l'axe x ou y (partie supérieure) et suivant x et y (partie inférieure). <i>u</i> représentant soit x soit y. Les quatre zones de stabilités sont notées de A à D. La zone A, agrandi, est celle utilisée dans un quadripôle. La partie hachurée correspond à un potentiel <i>U</i> positif.	52
Figure I-9 : Diagramme de stabilité en fonction de U et de V pour un ion.	53
Figure I-10 : Schéma d'un triple quadripôle utilisé en mode SIM.	54
Figure I-11 : Schéma de fonctionnement d'un triple quadripôle en mode SRM.	55
Figure I-12 : (a) Photo de la source électrospray Jet stream Agilent. Le rectangle correspond à la zone de la plume étudiée par fluorescence. (b) XY images du signal de fluorescence d'un chromophore fluorescent (Rh6G dans une solution de MeOH/eau 80:20 (% v/v)) au sein de la plume ⁸⁵	59
Figure I-13 : principe de l'utilisation du FAIMS pour l'amélioration de la sensibilité lors de la détection d'analyte en spectrométrie de masse ⁸⁷	60
Figure I-14 : Principe de la MRM ³ , ⁵⁹	61
Figure I-15 : Courbes d'étalonnage en SRM et en MRM ³ du peptide de la protéine TP 435 dans du sérum de femme entre 0 et 1000 ng / mL, ⁵⁹	62
Figure II-1 : nomenclature de la fragmentation peptidique	69
Figure II-2 : Principe de la dissociation induite par collision	70
Figure II-3 : domaine spectral électromagnétique avec les états électroniques, vibrationnels et rotationnels et leurs correspondances en énergie ¹²¹	72
Figure II-4 : transition d'un état électronique stable ψ_0 à un état excité ψ_1	73
Figure II-5 : spectres (a) MS/MS-CID et (b) MS/MS-UVPD (à 220 nm) enregistrés suite à l'analyse du cation $[M + 2H]^{2+}$ de la gramicidine. Spectres (c) MS/MS-CID et (d) MS/MS-UVPD (à 260 nm) enregistrés suite à l'analyse de l'anion $[M - 2H]^{2-}$ de la gramicidine. L'insert (b) montre la distribution isotopique de l'ion précurseur $[M + 2H]^{2+}$ après irradiation UV ¹²	74
Figure II-6 : relaxation d'un cation suite à l'excitation électronique	75
Figure II-7 : relaxation d'un anion M^{n-} suite à l'excitation électronique.	76
Figure II-8 : spectre MS/MS-UVPD de photo-fragmentation à 220 nm d'un dianion disaccharide ¹³⁵	77

Figure II-9 : spectres de masse MS/MS-EXD de l'ion $[M-2H]^{2-}$ du MccJ25 (m/z 1061.0) : A) EDD, B) ac-EDD, and C) a-EPD à 266 nm. Les * montrent les harmoniques du FT ¹¹⁷	79
Figure II-10 : spectre d'absorption des acides aminés aromatiques dans l'ultraviolet à pH 7 dans un tampon phosphate.....	82
Figure II-11 : a) taux de photo-fragmentation de la tyrosine $[M+H]^+$ et de b) l'insuline $[M-4H]^{4-}$ en fonction de la longueur d'onde ¹²	83
Figure II-12 : Taux de photo-détachement d'électron du cytochrome c $[M-6H]^{6-}$ ($\sigma = \ln((parent + fragments)/parent)/(P*\lambda)$) en fonction de la longueur d'onde. La courbe en pointillé est un ajustement gaussien des points expérimentaux (pour guider l'œil) ¹⁴⁷	85
Figure II-13 : Taux de photo-détachement de l'insuline en fonction de l'énergie des photons pour l'état de charge $[M-4H]^{4-}$	87
Figure II-14 : spectre d'action reconstitué à partir de différentes analyses en phase gazeuse du cytochrome C dans le VUV (■), l'UV (▲) et le visible (●).....	89
Figure III-1 : nomenclature de la fragmentation des oligosaccharides.....	95
Figure III-2 : représentation d'un piège quadripolaire linéaire.....	98
Figure III-3 : schéma du synchrotron SOLEIL : (a) LINAC, (b) Booster, (c) Anneau de stockage, (d) Lignes de lumière.....	101
Figure III-4 : représentation schématique de la ligne DESIRS.....	102
Figure III-5 : flux du rayonnement synchrotron de 5 à 16 eV.....	102
Figure III-6 : production du faisceau UV au niveau de l'OPO par conversion de fréquence des BBO.....	103
Figure III-7 : énergie en fonction de la longueur d'onde en sortie d'OPO.....	104
Figure III-8 : schéma détaillé du couplage LTQ-Laser UV/Vis.....	105
Figure III-9 : spectre d'action du maltose $[M-H]^-$ dans l'ultraviolet.....	108
Figure III-10 : structures des 3 polysaccharides.....	109
Figure III-11 : spectres d'action VUV d'oligosaccharides mono-déprotonés en fonction de l'énergie d'irradiation SR.....	110
Figure III-12 : géométrie de l'anion maltose $[M-H]^-$ la plus stable. Les calculs ont été réalisés avec la fonctionnelle <i>B3LYP/aug-cc-pvdz level</i>	111
Figure III-13 : spectre d'absorption théorique calculé pour la plus stable géométrie. Les calculs ont été réalisés par TD-DFT (<i>time dependent density functional method</i>) en utilisant la fonctionnelle LC-wPBE avec la base aug-cc-pvdz.....	111
Figure III-14 : spectres d'action VUV des ions mono-chargé déprotoné $[M-H]^-$, dichargé déprotoné $[M-2H]^{2-}$ et sodiaté $[M+Na]^+$ du maltohexaose.....	113
Figure III-15 : a) spectre de photo-fragmentation pour l'ion maltohexaose $[M-2H]^{2-}$ enregistré à 16 eV. b) Rapport de branchement entre la fragmentation et le photo-détachement pour l'ion maltohexaose $[M-2H]^{2-}$ en fonction de l'énergie d'irradiation SR.....	114
Figure III-16 : spectre de photo-fragmentation pour l'ion maltohexaose $[M+Na]^+$ enregistré à 16 eV.....	115

Figure III-17 : spectres de photo-fragmentation à 16 eV des ions $[M+Na]^+$ a) mélizitose et b) raffinose. Les fragments en rouges sont les ions « signatures » propres à chaque structure. Les spectres de masse en dessous sont les spectres de masse CID.	116
Figure III-18 : structure chimique du chromophore ENS007 d'intérêt.....	119
Figure III-19 : réaction de <i>click chemistry</i>	120
Figure III-20 : structure chimique du maltose greffé avec le chromophore ENS007.....	120
Figure III-21 : spectres en solution dans différents solvants du chromophore seul (a) et du maltose dérivé avec le chromophore (b). Les lignes rouges correspondent aux λ_{max} d'absorption dans l'eau.....	122
Figure III-22 : spectre MS/MS du chromophore seul suite à l'irradiation laser à 610 nm. La structure chimique montre les fragments majoritaires.....	123
Figure III-23 : spectres d'actions du chromophore ENS 007 (■) et du maltose dérivé (■) en fonction de la longueur d'onde.	124
Figure III-24 : molécule modèle utilisée pour les calculs théoriques. Les substituants R_1 et R_2 sont respectivement un méthyl et un éthynylsulfonate, R_3 un méthyl, éthyne ou un triazole greffé au maltose. Les axes sont définis par rapport au cycle phenyl (en rouge).....	125
Figure III-25 : conformation de plus basse énergie pour le maltose dérivé en a) phase gazeuse, b) en phase liquide (ici dans l'eau) ¹⁸⁶	125
Figure III-26 : spectres MSMS du maltose dérivé avec le chromophore ENS007 suite à la fragmentation CID a) ou photo-fragmentation laser à 560 nm b). Les fragmentations principales sont présentées respectivement sur chaque structure.	127
Figure IV-1 : principe de la Photo-SRM (en bas) vis-à-vis de la SRM (en haut).....	135
Figure IV-2 : schéma d'un triple quadripôle de type 5 500 de chez ABSciex.	136
Figure IV-3 : schéma d'un triple quadripôle linéaire.	137
Figure IV-4 : photo d'un quadripôle q2.	138
Figure IV-5 : insertion perpendiculaire d'un faisceau laser dans une cellule de collision.....	138
Figure IV-6 : a) plaque arrière non modifiée et b) plaque arrière modifiée avec une fenêtre en quartz d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle.....	139
Figure IV-7 : montage expérimental de la Photo-SRM dans un triple quadripôle.	139
Figure IV-8 : disaccharide dérivé avec un chromophore push-pull a) et son spectre optique en phase gazeuse b).....	142
Figure IV-9 : spectres de masse en "product ion" dans le spectromètre de masse dérivé du disaccharide dérivé obtenus suite à la photo-fragmentation, à 532 nm a) et suite à la fragmentation par CID b).....	142
Figure IV-10 : courant ionique en mode Single Ion Monitoring suivant l'ion précurseur du disaccharide dérivé. Le laser est allumé au bout de 30 secondes a). Courant ionique en mode SRM suivant la transtion ion précurseur/ion précurseur (rouge) et suivant la transition ion précurseur/ion fragment (noir) b).....	144
Figure IV-11 : mécanisme réactionnel du couplage maléimide - fonction thiol.	145
Figure IV-12 : Spectre optique en phase gazeuse de l'Ocytocine native ou complexée à un atome de cuivre ²¹⁴	147

Figure IV-13 : a) formule chimique du chromophore QSY 7 et le spectre de photo-fragmentation à 532 nm de l'ion [Ocytocine+QSY7] ²⁺ . b) formule chimique du chromophore BODIPY et le spectre de photo-fragmentation à 532 nm de l'ion [Ocytocine+BODIPY] ²⁺	148
Figure IV-14 : gradients chromatographiques pour l'analyse de l'Ocytocine dérivée a) et de l'Ocytocine non dérivée b).	151
Figure IV-15 : Spectres de masse obtenus en mode " <i>product ion</i> " suite à la fragmentation CID de l'Ocytocine non-dérivée a) et de l'Ocytocine dérivée b) et la fragmentation LID de l'Ocytocine dérivée c).	153
Figure IV-16 : Chromatogrammes LC-MS/MS de digestes de sérum humain obtenus (sans OT ajouté) suite à l'analyse SRM de la transition la plus intense (<i>m/z</i> 1124/839) de l'Ocytocine non-dérivée, a), l'analyse SRM de la transition la plus intense (<i>m/z</i> 1327/360) de l'Ocytocine dérivée, b) et de l'analyse Photo-SRM de la transition la plus intense (<i>m/z</i> 1327/465) de l'Ocytocine dérivée, c). Chromatogrammes LC-MS/MS de l'Ocytocine ajouté à une faible concentration (0.41 µg/mL) dans des digestes de sérum humain obtenus suite à l'analyse SRM de la transition la plus intense (<i>m/z</i> 1124/839) de l'Ocytocine non-dérivée, d), l'analyse SRM de la transition la plus intense (<i>m/z</i> 1327/360) de l'Ocytocine dérivée, e) et de l'analyse Photo-SRM de la transition la plus intense (<i>m/z</i> 1327/465) de l'Ocytocine dérivée, f). Les flèches désignent les pics chromatogrammes correspondant aux molécules d'intérêts.	155
Figure IV-17 : Courbes de calibration de la transition la plus intense suite à l'analyse soit en mode SRM de l'Ocytocine non-dérivée (●) et de l'Ocytocine dérivée (■) soit en mode Photo-SRM de l'Ocytocine dérivée (▲). L'insert montre les plus faibles concentrations de la gamme pour l'Ocytocine dérivée analysée en SRM et Photo-SRM.	157
Figure V-1 : montage expérimental de la Photo-SRM dans un triple quadripôle.	163
Figure V-2 : spectre d'action en phase gazeuse du chromophore DABCYL-maléimide greffé sur le peptide IVGGWECEK en fonction de la longueur d'onde ²²⁴ . L'insert montre le spectre d'absorption en solution du DABCYL-maléimide.	164
Figure V-3 : spectre de masse MS/MS de l'ion dichargé [M+2H] ²⁺ IVGGWECEK dérivé avec le DABCYL et irradié à 473 nm (a)). Spectre de masse MS/MS de l'ion dichargé [M+2H] ²⁺ IVGGWECEK dérivé avec le QSY 7 et irradié à 532 nm (b)). Les ions en rouges sont ceux provenant de la fragmentation intra-chromophore. La structure chimique du DABCYL-maléimide est présentée au-dessus des spectres de masse.	165
Figure V-4 : structure de base du DABCYL-maléimide avec, en bleu, le motif chimique comprenant R et R' les substituants variables.	167
Figure V-5 : différents substituants synthétisés sur le DABCYL-maléimide.	167
Figure V-6 : spectres d'absorption en solution dans le MeOH des chromophores DABCYL-maléimide commercial (rouge), ENS121 (vert), ENS292 (magenta), ENS311 (noir) et ENS346 (bleu).	168
Figure V-7 : spectres de masse MS/MS des chromophores DABCYL-maléimide a), ENS121 b), ENS292 c), ENS311 d) et ENS346 e) suite à l'irradiation laser à 473 nm durant 500 ms.	169

Figure V-8 : spectres de masse MS/MS du peptide IVGGWECEK dérivé avec le chromophore ENS121 a), ENS292 b), ENS311 c) et ENS346 d) irradié à 473 nm. Le fragment en rouge 296 sur la figure d) montre un fragment du chromophore.....	171
Figure V-9 : chromatogramme retraçant l'analyse du peptide IVGGWECEK natif (transition SRM 510.5/213.2, 510.5/693.3, 510.5/750.3) et de ce même peptide dérivé (transitions SRM 706.5/252.0, 706.5/1160.5).....	172
Figure V-10 : étude de la stabilité du couplage peptide-DABSYL sur 12h avec trois conditions différentes ((▲) passeur d'échantillon à 4°C et dans l'obscurité, (■) passeur d'échantillon à 4°C avec lumière ambiante et (●) passeur d'échantillon à température et lumière ambiantes).....	173
Figure V-11 : gradients chromatographiques pour l'analyse des peptides protéotypiques à cystéine dérivés a) et des meilleurs peptides protéotypiques b).....	176
Figure V-12 : chromatogrammes reconstitués des 12 transitions les plus intenses détectées soit par Photo-SRM a) soit par SRM b). Les ▼ représentent les interférents alors que les * représentent les molécules d'intérêts.....	179
Figure V-13 : spectres MS/MS en CID enregistrés en <i>data dependant scan</i> pour la validation de peptides : a) Afamine, b) Albumine, c) C4b binding protein alpha chain, d) Complément C3, e) Gelsolin isoforme 1, f) Haptoglobine et g) Plasminogène. Les astérisques (*) montrent les ions précurseurs.....	180
Figure V-14 : chromatogrammes reconstitués des peptides protéotypiques contenant des cystéines de a) l'Afamine, b) le Complement C3, c) la C4b binding protéine chaîne alpha et d) la Gelsoline. Les chromatogrammes en trait noir représentent l'analyse Photo-SRM et les chromatogrammes en trait rouge représentent les analyses SRM.....	182
Figure V-15 : chromatogrammes reconstitués de la transitions la plus intense du peptide protéotypique dérivé de la C4b binding protéine utilisée pour l'analyse SRM a) et Photo-SRM b) dans les échantillons blancs (ratio H/R = 0). Les flèches montrent le temps de rétention de la molécule d'intérêt.....	185
Figure V-16 : chromatogrammes reconstitués de la transitions la plus intense du peptide protéotypique dérivé de la C4b binding protéine utilisée pour l'analyse SRM a) et Photo-SRM b) dans les échantillons de plus basse concentration (ratio H/R = 0.02). Les flèches montrent le temps de rétention de la molécule d'intérêt.....	186
Figure V-17 : droites de calibration obtenues suite à l'analyse complète de la gamme d'étalonnage et de ces triplicats en Photo-SRM (■) et en SRM (▲). L'insert montre les plus faibles concentrations de la gamme.....	187
Figure VI-1 : gradients chromatographiques pour l'analyse des œstrogènes seuls après déplétion du plasma a) et pour l'analyse simultanée des peptides protéotypiques de protéines de coagulation avec les œstrogènes b).....	197
Figure VI-2 : structure chimique de l'œstradiol dérivé avec le chromophore dabsyl. L'ion fragment majoritaire à m/z 225 résultant de la photo-fragmentation à 473 nm est présenté.....	199

Figure VI-3 : chromatogrammes reconstitués LC-MS/MS suivant la meilleure transition SRM de chaque œstrogène (E2D2 562.5/225.0, a) et EE2D4 588.5/225.0, b)) en SRM (noir) et Photo-SRM (rouge).....	200
Figure VI-4 : ratios, en pourcentage, du signal détecté <i>ajout avant précipitation/ajout après précipitation</i> pour les deux œstrogènes.	201
Figure VI-5 : droites de calibrations SRM (■) et Photo-SRM (▲) obtenues suite à l'analyse de l'œstradiol et de l'éthinyl œstradiol. Les inserts montrent les faibles concentrations (0-250 pg/mL).	202
Figure VI-6 : spectres de masse MS/MS pour l'identification des peptides protéotypiques de Héparine cofacteur B, TLEAQLTPR a) et du facteur de coagulation XIIa HC, VVGGLVALR b).	204
Figure VI-7 : chromatogrammes LC-MS/MS reconstitués des transitions les plus intenses des peptides protéotypiques des protéines d'intérêts et de l'éthinyl œstradiol. De 0 à 8 min, analyse SRM des peptides de l'Héparine cofacteur (temps de rétention 6.5 min) et du facteur de coagulation XIIa HC (temps de rétention 7.1 min). De 8 à 16 min, analyse SRM (noir) et Photo-SRM (rouge) de l'éthinyl œstradiol ajouté dans le plasma à 500 pg/mL. Les astérisques montrent les interférents détectés.	205
Figure VII-1 : schéma d'une orbitrap. Une électrode extérieure en forme de tonneau est coupé en deux parties égales séparées par un interstice. A l'intérieur se trouve une deuxième électrode en forme de fuseau.	211
Figure VII-2 : schéma d'un Q-exactive.....	213
Figure VII-3 : schéma du montage expérimental couplant un laser avec un Q-exactive.....	215
Figure VII-4 : spectres de masse MS/MS de l'ion précurseur dichargé du peptide IWGGWECEK dérivé avec le DABCYL-maléimide. Temps de piégeage 3 ms à NCE = 1 laser OFF a), temps de piégeage 3 ms à NCE = 30 laser OFF b), temps de piégeage 3 ms à NCE = 1 laser ON à 473 nm, 500 mW c), temps de piégeage 300 ms à NCE = 1 laser ON à 473 nm, 500 mW d).....	216
Figure VII-5 : taux de fragmentation de l'ion dichargé $[M+2H]^{2+}$ du peptide IVGGWECEK en fonction du NCE. L'insert montre les faibles valeurs de NCE.	218
Figure VII-6 : taux de photo-fragmentation de l'ion dichargé $[M+2H]^{2+}$ du peptide IVGGWECEK en fonction du temps de piégeage HCD pour un NCE = 1.....	219
Figure VII-7 : chromatogrammes LC-MS reconstitués de l'ion précurseur d'intérêt $[M+2H]^{2+}$ m/z 706.3256 \pm 0.0005 a), du fragment signature du chromophore m/z 252.1124 \pm 0.0005 b) et d'un fragment de la chaîne peptidique $[\gamma_7-252]^+$ m/z 948.3868 \pm 0.0005 c) suite à l'irradiation laser à 473 nm de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ du peptide IVGGWECEK dérivé avec le DABCYL-maléimide (temps de piégeage 3 ms, NCE = 1). Les chromatogrammes d), e) et f) ont été enregistrés dans les mêmes conditions que les a), b) et c) mais sans irradiation laser.	221
Figure VIII-1 : comparaison des principes des modes SRM (A) et PRM (B) (Parallel Reaction Monitoring) ²⁸	226
Figure VIII-2 : principe d'une analyse Top N. Temps de 3 cycles pour une analyse Top N (avec N = 10), avec une première analyse MS (70 000 de résolution, flèche verte) suivie d'analyses MS/MS (17 500 de résolution à m/z 200 ou 12 500 à m/z 200, flèche bleu), a). Temps total pour un cycle Top 10, b) ²⁶³	227

Figure VIII-3 : principe de la fragmentation de type pompe-sonde avec deux lasers..... 229

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les 20 acides aminés naturels	39
Tableau 2 : caractéristiques du LTQ.	99
Tableau 3 : caractéristiques des lasers utilisés en Photo-SRM.	141
Tableau 4 : comparaison du nombre d'interférents potentiels lors de l'utilisation des différents modes de balayages en fonction de la résolution appliquée aux quadripôles.	146
Tableau 5 : transitions SRM. Les transitions en gras et en italiques sont les meilleures transitions de chaque méthode.	152
Tableau 6 : limites de quantifications (LDQ) de l'Ocytocine en fonction de la méthode d'analyse. ...	156
Tableau 7 : caractéristiques techniques des lasers continus disponibles au laboratoire.	162
Tableau 8 : transitions SRM suivies pour les peptides dérivés par le DABCYL-maléimide.....	181
Tableau 9 : données de comparaison entre les peptides protéotypiques usuels analysés par SRM et les peptides à cystéines dérivés analysés par Photo-SRM. Les valeurs en gras et en italiques sont celles pour lesquelles la Photo-SRM est plus sensible.	184
Tableau 10 : données analytiques calculées (exactitude : (concentration trouvée/calculée – concentration théorique/concentration théorique) x100 et répétabilité CV) de l'analyse Photo-SRM de la gamme d'étalonnage (ratio H/R) et de ses triplicats pour les peptides à cystéines protéotypiques dérivés.	187
Tableau 11 : coefficients de variations calculés suite aux analyses Photo-SRM et SRM des triplicats.	201
Tableau 12 : données d'analyses SRM pour les protéines impliquées dans la coagulation analysées.	203
Tableau 13 : caractéristiques techniques du Q-exactive et du 4 000 Q-trap.....	214

Introduction générale

La santé est un enjeu majeur dans la société moderne dans laquelle nous vivons, la population devient vieillissante et de nos jours, un homme sur deux et une femme sur trois seront atteints d'un cancer ¹⁻³. Afin de traiter au plus vite ces cancers, les laboratoires développent de nouveaux tests de dépistage et de diagnostic clinique toujours plus performants. La plupart de ces tests mesurent la concentration de « biomarqueurs » dans les fluides ou tissus biologiques. Les biomarqueurs sont des substances utilisées en tant qu'indicateur d'un état biologique. Ces substances peuvent être détectées et quantifiées de manières objectives afin de déterminer si le patient est sain, malade ou s'il y a un risque de développer une pathologie.

Parmi ces marqueurs, les protéines constituent une source de recherche importante. Leur importance est liée à la diversité des fonctions qu'elles remplissent, allant de la catalyse de réactions chimiques jusqu'à la structuration de la matière vivante. Il apparaît donc comme indispensable de disposer de méthodes permettant de doser de manière objective la concentration absolue de ces protéines dans la matrice sélectionnée. Actuellement, dans le cas du cancer de la prostate chez l'homme, le dosage de biomarqueurs comme l'antigène spécifique de la prostate (PSA) se fait par des méthodes de référence telles que les méthodes immuno-enzymatiques tels que les tests ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Ces tests sont principalement utilisés en immunologie pour détecter la présence d'un antigène dans un échantillon grâce à des anticorps spécifiques. Bien que ces tests soient sensibles, répétables et robustes, le développement de nouveaux dosages par ELISA est très long à mettre au point et à valider. En effet, la nécessité de produire et de valider un (ou plusieurs) anticorps spécifique(s) de la protéine ciblée peut prendre plusieurs mois jusqu'à plusieurs années. Par ailleurs, il est très difficile de développer des tests multiplexés permettant de doser plusieurs biomarqueurs en parallèles, des problèmes d'interférences apparaissent très rapidement ⁴.

C'est en tant qu'alternative que la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) a émergée lors de ces dernières années ⁵⁻⁷ avec la technologie SRM (*Selected Reaction Monitoring*). Les avantages de la SRM sont nombreux, il n'est plus nécessaire de produire d'anticorps, le développement de la méthode peut être rapide, quelques semaines seulement dans le cas où la molécule cible est bien identifiée et surtout, il est possible de réaliser des dosages multiplexés de plusieurs dizaines de protéines. Cependant, dans les matrices biologiques complexes comme le plasma, l'une des difficultés dans cette approche, par rapport aux tests ELISA, est la sensibilité de la technique. En effet, la plupart des dosages en SRM ont des limites de détections (LDD) de l'ordre du µg/mL ou dans le meilleur des cas, du ng/mL alors que les tests ELISA peuvent descendre jusqu'au pg/mL ^{8,9}.

Ces hautes limites de détection sont principalement dues à la grande complexité de la matrice dans laquelle se trouvent les molécules cibles. En effet, pour le dosage des protéines, il est généralement indispensable de passer par une étape de digestion de l'échantillon afin de ne pas doser la protéine entière mais seulement un ou plusieurs peptides rapporteurs spécifiques. Cette étape de digestion complexifie la matrice en générant plusieurs centaines de milliers de peptides. Par conséquent, les molécules d'intérêts ayant des concentrations très faibles, ont de fortes chances d'être masquées lors de la détection par d'autres molécules plus abondantes ayant des transitions SRM et des temps de rétentions proches.

Afin d'améliorer la spécificité de détection lors de l'analyse, il est possible de réaliser un fractionnement de l'échantillon. Cependant, une telle préparation d'échantillon est longue, il y a un risque de diluer la molécule d'intérêt dans plusieurs fractions et par ailleurs, un tel fractionnement n'est pas compatible avec un dosage multiplexé. Une autre possibilité est d'améliorer les performances du spectromètre de masse. Pour cela, plusieurs approches sont envisageables. Une nouvelle technique nommée MRM³ propose d'ajouter une étape supplémentaire de fragmentation au niveau de la SRM¹⁰. Une autre approche serait de substituer le processus de fragmentation qu'est la CID, processus non discriminant, par une technique de fragmentation plus spécifique afin de ne fragmenter que les ions d'intérêts.

Parmi le grand nombre de nouvelles techniques de fragmentation émergentes, la photodissociation est depuis de nombreuses années couplée à la spectrométrie de masse dans le but d'étudier les propriétés optiques des biomolécules en phase gazeuse¹¹⁻¹⁴. La force de cette technique provient de la grande variabilité de longueurs d'onde avec laquelle il est possible de travailler. En effet, la photodissociation s'appuie sur les propriétés optiques des biomolécules cibles. Pour qu'une molécule puisse se photo-dissocier après excitation laser à une certaine longueur d'onde, elle doit absorber ces photons. Plusieurs groupes de recherche, dont celui de Philippe Dugourd, se sont intéressés à cette technique pour étudier la photodissociation spécifique des peptides¹⁵⁻¹⁹. De plus, dans le but d'améliorer la spécificité de fragmentation, il est possible de travailler avec des longueurs d'ondes pour lesquelles aucun peptide n'absorbe. Il est alors nécessaire de dériver chimiquement avec un chromophore synthétique les peptides d'intérêts^{20, 21}. Cette dérivation permet d'induire les propriétés optiques spécifiques choisies à la molécule. Le groupe de Jennifer Brodblet a montré que grâce à la dérivation par chromophore, il est possible de simplifier les spectres de masse et ainsi d'obtenir sélectivement des ions fragments γ ²².

Ainsi, dans l'optique d'avoir une meilleure spécificité pour la fragmentation de molécules d'intérêts, nous avons choisi de travailler avec la dérivation chimique et de fragmenter les molécules suite à une excitation laser avec des photons du domaine du visible. Le couplage de la spécificité de la spectroscopie optique avec la sélectivité de la spectrométrie de masse permet de diminuer le nombre d'interférents détectés suite à une analyse de biomarqueur en matrice complexe. Ce nouvel outil de quantification est appelé Photo-SRM.

Durant cette thèse, je me suis donc appliqué à étudier les propriétés optiques de biomolécules dans des domaines de longueurs d'ondes différents allant du VUV au visible.

Par la suite, la preuve de concept de l'outil Photo-SRM a été réalisée. Suite à une modification instrumentale réalisée sur un spectromètre de masse de type triple quadripôle, un laser continu émettant des photons dans le domaine du visible, 532 nm, a été implémenté dans cet instrument²³.

Cet outil a ensuite été appliqué pour un dosage multiplexé des protéines endogènes majoritaires du sérum humain. Ces protéines ont été dosées via des peptides protéotypiques contenant des cystéines²⁴. L'ensemble du sérum a donc été dérivé en amont de l'analyse.

Afin d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche, nous avons souhaité appliquer la Photo-SRM au dosage de métabolites. En effet, dans de nombreuses pathologies, les métabolites et les protéines jouent un rôle important. Par exemple, les œstrogènes utilisés comme contraceptif ont un impact sur les concentrations des protéines de coagulation²⁵⁻²⁷. Il semble donc intéressant de pouvoir étudier ces deux familles de biomolécules lors d'une même analyse.

Enfin, avec l'avènement des instruments hybrides, tels que les Q-TOF et le Q-exactive, la quantification n'est plus réservée qu'à l'usage des instruments de type triple quadripôle. Ces instruments permettent de doser des biomolécules aux mêmes ordres de grandeur que les triples quadripôle en mode SRM^{28,29}. Ces instruments permettent également de réaliser des expériences de découvertes en protéomiques³⁰. Nous nous sommes donc intéressés au couplage de la spectroscopie optique avec la spectrométrie de masse à haute résolution pour la quantification et la découverte de protéines. La modification instrumentale d'un Q-exactive, hybride quadripôle-Orbitrap, est présentée suivi d'expériences préliminaires. Ce couplage ouvre donc de nouvelles perspectives d'étude en quantification mais également en découverte protéomique.

Avant de présenter ces résultats, nous allons tout d'abord revenir, en deux temps, sur les principes de la quantification de protéines par spectrométrie de masse et sur la spectroscopie optique en phase gazeuse.

Chapitre I. Quantification de biomarqueurs, état de l'art.

I.1 Introduction

Ce chapitre a pour but de présenter ce que sont les biomarqueurs, leurs intérêts pour le dépistage et le diagnostic de maladie ainsi que les techniques principales pour les doser. Nous nous intéresserons particulièrement aux biomarqueurs protéiques analysés par spectrométrie de masse. Dans un premier temps, la notion de biomarqueur sera définie puis les différentes étapes permettant de valider un biomarqueur seront abordées. Ensuite, nous verrons pourquoi la spectrométrie de masse est, depuis quelques années, de plus en plus utilisée pour la quantification de biomarqueurs. Nous aborderons également différentes méthodes de quantification par spectrométrie de masse sont utilisées et nous allons décrire deux d'entre elles applicables au spectromètre de masse de type triple quadripôle, instrument de choix pour la quantification. Cependant, la spectrométrie de masse ne permet pas encore d'atteindre de très faibles limites de détection et de quantification, c'est pourquoi nous verrons différentes possibilités envisagées pour améliorer la sensibilité des dosages par spectrométrie de masse, notamment, les développements instrumentaux intervenus ces dernières années.

I.2 Les biomarqueurs

I.2.1 Définitions

Le terme de biomarqueur peut être employé pour le domaine de la santé comme pour le domaine de l'environnement. Un biomarqueur se définit comme une caractéristique biologique mesurable et lié à un processus normal ou non ^{31, 32}.

Dans le domaine de la santé, les biomarqueurs peuvent être utilisés dans plusieurs cas tels que la détection précoce de maladie (dépistage), l'évaluation de l'état du patient lors d'un diagnostic, mais aussi le suivi de l'efficacité d'un traitement. Les biomarqueurs sont très souvent de nature protéique et dosable dans le sang ou les urines ^{33, 34}.

Dans le domaine de l'environnement, les biomarqueurs permettent de détecter la présence de polluants dans l'environnement. Les biomarqueurs peuvent être dans ce cas le nombre d'oiseaux présent dans une forêt. Par exemple, le grand tétras est une espèce de coq de bruyère présente dans les Pyrénées, il est un biomarqueur de la santé de la faune et de la flore de la forêt. ^{35, 36}

Un test idéal de diagnostic de biomarqueur doit être rapide, facile à réaliser et permettre la détection précoce d'une maladie, préférentiellement avec 100% de sensibilité et de spécificité.

La sensibilité est définie par :

$$\textit{sensibilité} = \frac{\textit{nombre de vrais positifs} \times 100}{\textit{nombre de vrais positifs} + \textit{nombre de faux négatifs}} \quad \text{Équation 1}$$

Et la spécificité est donnée par :

$$\textit{spécificité} = \frac{\textit{nombre de vrais négatifs} \times 100}{\textit{nombre de vrais négatifs} + \textit{nombre de faux positifs}} \quad \text{Équation 2}$$

Pour avoir le plus grand impact, un biomarqueur doit être accessible par un prélèvement le moins invasif possible (urine ou sang). Le dosage doit également permettre de suivre des milliers d'échantillons à haut débit et à un coût raisonnable en utilisant des équipements accessibles.

Un des problèmes majeurs de l'utilisation de biomarqueurs est la découverte et la validation de nouveaux biomarqueurs. Nous allons discuter des différentes étapes nécessaires pour la découverte et la validation clinique.

I.2.2 La découverte de nouveaux biomarqueurs

Depuis les années 1950, de nombreux scientifiques développent l'idée que les protéines, l'ADN ou les métabolites présents dans le sang et le donc le plasma, sont des marqueurs de l'activité biologique de l'homme. Ces marqueurs peuvent être produits dans une tumeur, dans le cas d'un cancer, ou dans tout type de tissu en réponse à un dysfonctionnement du système biologique humain.

Au début des années 1960, le développement technologique de tests immunologiques tels que les dosages radio-immunologiques³⁷ permettent de découvrir les premiers biomarqueurs de cancers avec, par exemple, l'alpha-fœtoprotéine³⁸ et l'antigène carcino-embryonnaire³⁹. Dans les années 1980, l'antigène spécifique de la prostate (PSA), considéré comme un des meilleurs biomarqueurs, est découvert par immunoperoxydase, technique de type immunostain dans lesquelles les anticorps sont visualisés via une réaction peroxydase-catalysée^{40, 41}. Cependant, ces méthodes immunologiques nécessitent, en amont, le développement d'anticorps spécifiques.

Actuellement, de nouvelles techniques d'analyse protéomique telles que les bio-puces^{42, 43} ou la spectrométrie de masse offrent de nombreuses perspectives¹. En effet, la spectrométrie de masse ne nécessite pas le développement d'anticorps. Un des nombreux avantages de la spectrométrie de masse est sa capacité à analyser un grand nombre de protéines dans un seul échantillon. Cependant, elle souffre encore d'un problème de sensibilité vis-à-vis des méthodes immunologiques.

De nombreux laboratoires de recherche utilisent donc la spectrométrie de masse dans le but de découvrir de nouveaux biomarqueurs en développant l'aspect laboratoire, préparation d'échantillons et développement analytique, mais aussi en améliorant le retraitement informatique, indispensable suite au grand nombre d'informations recueillies après une analyse.

Durant ma thèse, je me suis intéressé plus fortement à l'étape de validation de biomarqueurs qu'à celle de découverte.

I.2.3 La validation de nouveaux biomarqueurs

Parmi les différentes matrices biologiques dans lesquelles se trouvent des biomarqueurs, le sang et l'urine sont des matrices facilement accessibles. Lors de cette thèse, les méthodes de dosage de biomarqueurs ont été développées pour des analyses dans du plasma ou du sérum. Dans de telles matrices, trois principales difficultés peuvent être distinguées lors de la validation de nouveaux biomarqueurs :

- la complexité du plasma.
- la faible abondance de biomarqueurs spécifiques de maladies.
- la grande variabilité biologique (*i.e.* deux individus sains peuvent présenter des concentrations assez variables de la même protéine).

Le groupe de Steven Carr du Broad Institute (Cambridge, Etats-Unis) a décrit un processus détaillé pour la validation clinique de biomarqueurs au travers de six étapes ⁴ :

- la découverte (identification de candidats biomarqueurs).
- la qualification (confirmation de la différence d'expression entre patient sain et malade dans le plasma humain sur peu d'échantillons (quelques dizaines)).
- la vérification (confirmation de la différence entre patients sains et malades sur un grand nombre d'échantillons (plusieurs centaines); insertion de la variabilité biologique des patients).
- l'optimisation (amélioration de la méthode d'analyse, diminution des coûts et développement d'un test ayant une bonne reproductibilité et un haut débit d'analyse).
- la validation clinique (test de la méthode finale sur plusieurs milliers d'échantillons qui vont refléter toutes les variations possibles d'une population. La sensibilité et la spécificité sont définies).
- la commercialisation

Ces différentes étapes sont décrites dans la Figure I-1 extraite de la publication du groupe de Steven Carr ⁴. Il est ainsi visible que le nombre de candidats biomarqueurs diminue drastiquement au travers des différentes étapes alors que le nombre d'échantillons augmente afin d'obtenir un maximum d'information sur la fiabilité du test.

La plupart des tests de validations de biomarqueurs sont actuellement réalisés par des tests immuno-enzymatiques. Cependant, du fait de la complexité de mise en place d'un test immuno-enzymatique (difficulté d'obtention d'anticorps spécifiques et de la mise en place de diagnostics multiplexés), la spectrométrie de masse est devenue, depuis plusieurs années, une alternative crédible aux dosages immuno-enzymatiques. Dans les paragraphes suivants, les trois principales méthodes de quantification de protéines vont être décrites. Dans un premier temps, les deux premières méthodes que sont l'électrophorèse sur gel et les tests immuno-enzymatiques vont être abordées, puis sera développée plus en détails celle de la spectrométrie de masse.

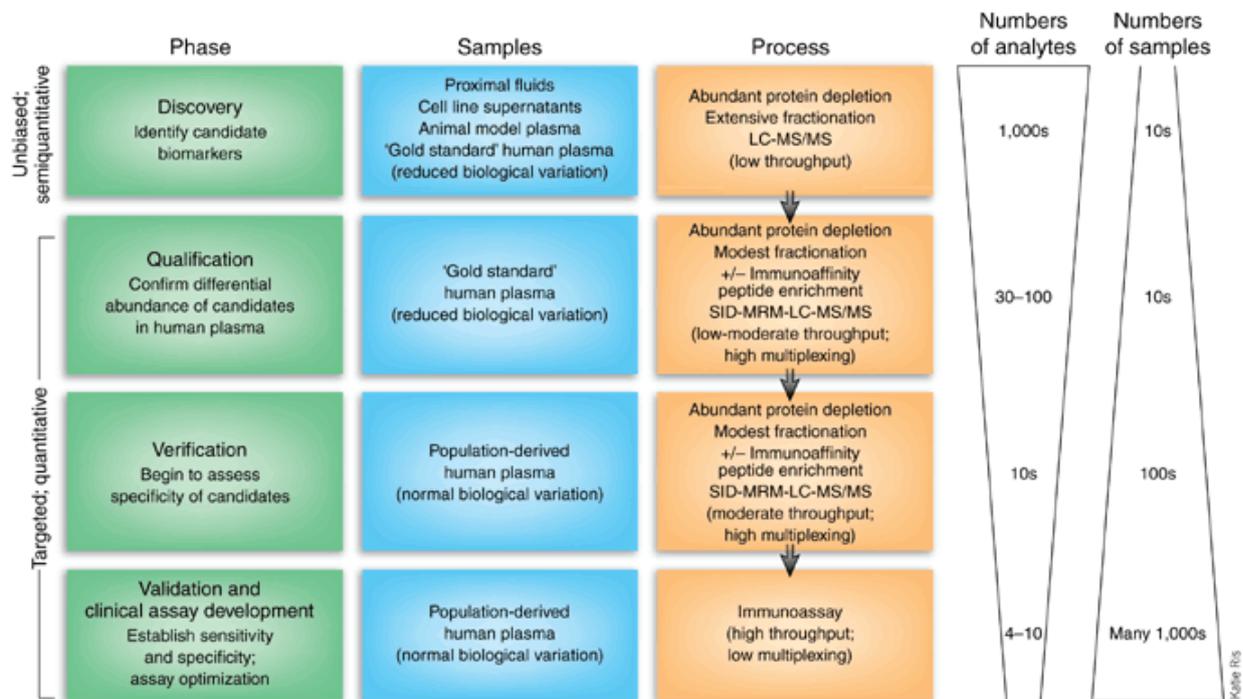


Figure I-1 : Les étapes du développement d'un nouveau biomarqueur

I.3 La quantification des protéines

I.3.1 La structure primaire des protéines

Les protéines sont des biopolymères naturels constituées d'un enchainement linéaire d'acides aminés. Les acides aminés ont tous en commun la formule chimique $H_2N-C(R)-COOH$ et possèdent deux groupements fonctionnels, un groupe carboxyle ($COOH$) et un groupe amine (NH_2), permettant le couplage peptidique entre les différents monomères (Figure I-2). Il existe 20 acides aminés naturels listés dans le Tableau 1. Ils se différencient entre eux de par leurs chaînes latérales R. C'est cette chaîne latérale qui va définir les propriétés de l'acide aminé. Selon leur point isoélectrique, on peut distinguer les acides aminés basiques (Lys, Arg, His) des acides aminés acides (Asp et Glu). Les acides aminés basiques ont tendance à capter un proton et sont donc naturellement positivement chargés tandis que les acides aminés acides possèdent un hydrogène labile sur leur groupement $COOH$ et portent les charges négatives par déprotonation.

La charge portée par la protéine dépendra du nombre de résidus acides et basiques qu'elle contient dans sa séquence ainsi que du pH de la solution. Au point isoélectrique, la protéine ne possède aucune charge nette (en d'autre terme, la protéine possède autant de charges positives que de charges négatives).

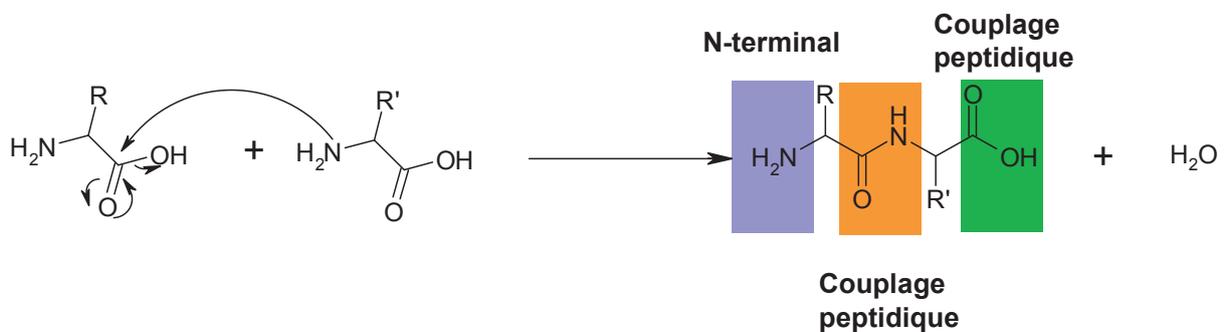


Figure I-2 : Liaison peptidique entre deux acides aminés

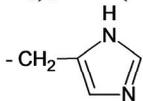
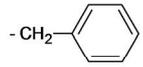
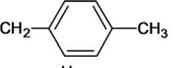
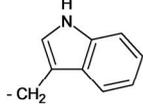
	<i>Nom</i>	<i>Code 1 lettre</i>	<i>Code 3 lettres</i>	<i>Masse mono- isotopique (M en Da)</i>	<i>pI</i>	<i>Acide aminé R =</i>
Chaines aliphatiques	Glycine	G	Gly	75.03	6.06	-H
	Alanine	A	Ala	49.05	6.11	-CH ₃
	Leucine	L	Leu	131.10	6.01	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂
	Isoleucine	I	Ile	131.09	6.05	-CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃
	Valine	V	Val	117.08	6.00	-CH(CH ₃) ₂
Chaines carboxyliques	Aspartate	D	Asp	133.04	2.85	-CH ₂ -COOH
	Glutamate	E	Glu	147.05	3.15	-CH ₂ -CH ₂ -COOH
Chaines aminées	Lysine	K	Lys	146.11	9.60	-CH ₂ -(CH ₂) ₃ -NH ₂
	Arginine	R	Arg	174.11	10.76	-CH ₂ -(CH ₂) ₂ -NHC(NH ₂)-NH ₂
	Histidine	H	His	155.07	7.60	
Chaines hydroxylées	Sérine	S	Ser	105.04	5.68	-CH ₂ -OH
	Thréonine	T	Thr	119.06	5.60	-CH(OH)-CH ₃
Chaines amidées	Asparagine	N	Asn	132.05	5.41	-CH ₂ -CONH ₂
	Glutamine	Q	Gln	146.07	5.65	-CH ₂ -CH ₂ -CONH ₂
Chaines soufrées	Cystéine	C	Cys	121.02	5.05	-CH ₂ -SH
	Méthionine	M	Met	149.05	5.74	-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃
Chaines aromatiques	Phénylalanine	F	Phe	165.08	5.49	
	Tyrosine	Y	Tyr	181.07	5.64	
	Tryptophane	W	Trp	204.09	5.89	
Hétérocycles	Proline	P	Pro	115.06	6.30	

Tableau 1 : Les 20 acides aminés naturels

Avant d'être de potentiels biomarqueurs, les protéines assurent différentes fonctions dans l'organisme. Elles peuvent avoir des rôles structurels, catalytiques, de transport ou de reconnaissance. Elles sont synthétisées par les ribosomes à partir du code génétique qui définit la structure primaire de la protéine, séquence d'acides aminés la constituant. Elles peuvent parfois subir également des modifications post-traductionnelles (PTMs) de type phosphorylation, glycosylation ou oxydation. Toutes ces caractéristiques (la séquence en acides aminés, les PTMs...) font des protéines un ensemble diversifié et complexe de macromolécules impliquées dans une grande variété de mécanismes biologiques. C'est pourquoi leur caractérisation précise est indispensable.

Lors de cette thèse, dans les chapitres suivants, nous discuterons de l'utilisation de la spectrométrie de masse en tant que technique d'analyse pour l'identification et la caractérisation de protéines. Cette technique est utilisée dans l'analyse de protéines pour une caractérisation structurale de la molécule mais également pour localiser les sites et la nature des différentes modifications post-traductionnelles (PTMs) portées par la protéine.

I.3.2 Quantification par des méthodes à base d'anticorps

I.3.2.1 Dosage après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en deux dimensions

Cette technique a été introduite dans les années 1970 et consiste en la séparation de molécules chimiques telles que l'ADN^{44,45} ou les protéines^{46,47} selon leur point isoélectrique (pH auquel la molécule est globalement neutre) dans une première dimension puis selon leur masse dans une seconde dimension.

Ainsi, l'échantillon à traiter est déposé sur une plaque de gel au niveau d'un angle. Pour la première séparation, en fonction du point isoélectrique, une différence de potentiels est appliquée entre deux électrodes et les protéines chargées vont alors migrer à travers le gel dont le pH varie d'une extrémité à l'autre. Ainsi, lorsque la protéine arrive dans la zone de pH correspondant à son point isoélectrique, elle devient neutre et sa migration s'arrête. Dans un second temps, un agent dénaturant comme le dodécyle sulfate de sodium (SDS) est ajouté. Le SDS va alors se fixer sur les protéines, plus une protéine sera lourde, plus le nombre de molécules de SDS fixées sur cette protéine sera grand. Ensuite, une autre différence de potentiels entre deux autres électrodes est appliquée perpendiculairement à la première. La séparation induite dans la seconde dimension dépend de la charge totale de la protéine, directement liée au nombre de molécules de SDS fixées. Ce nombre de molécules SDS fixées est directement relié à la taille de la protéine donc de la masse de la molécule d'intérêt. Les protéines migrent alors à travers le gel et sont ralenties selon leur rapport masse sur charge : plus une protéine a un rapport masse sur charge élevé et plus elle sera ralentie. La Figure I-3 présente un schéma de l'électrophorèse sur gel.

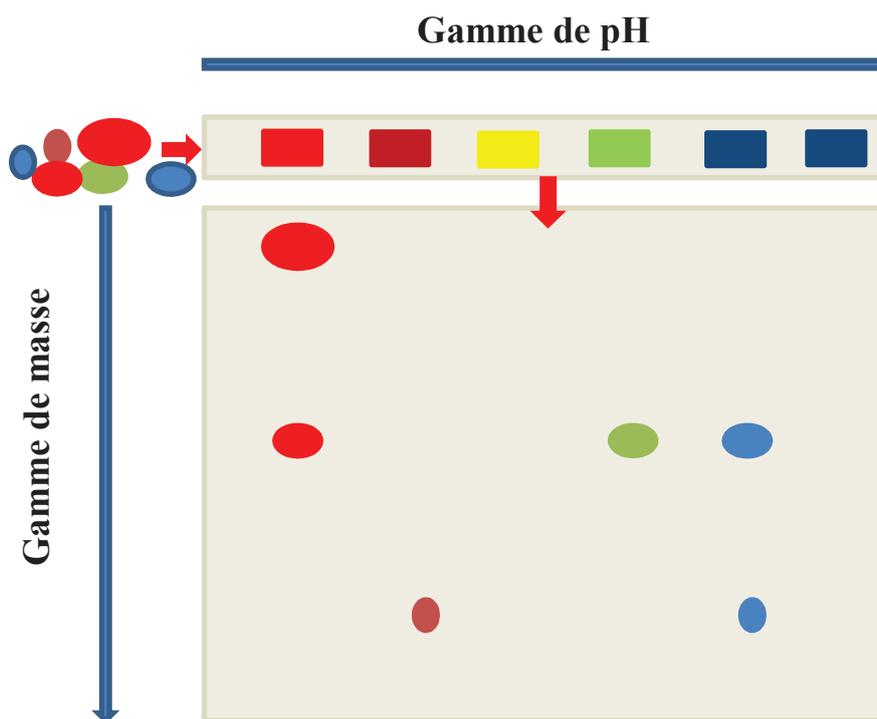


Figure I-3 : Schéma de séparation par électrophorèse sur gel

Après électrophorèse bidimensionnelle, les protéines séparées sont détectées par coloration des gels. Plusieurs procédés de détection et de sensibilité existent et sont choisis en fonction de l'utilisation ultérieure des gels 2D. Le procédé de détection le plus utilisé est le bleu de coomassie qui permet de détecter un minimum de 100 ng de protéine par spot ⁴⁸. Il présente l'avantage de donner une intensité de coloration proportionnelle à la quantité de protéines mais est très peu sensible. La coloration au nitrate d'argent permet, elle, de détecter des spots contenant 0,1 ng de protéines soit une sensibilité 1000 fois supérieure au bleu de coomassie. Elle présente néanmoins certains inconvénients : la stœchiométrie de la coloration n'est pas totalement linéaire donc ne peut pas être utilisée sur toutes les gammes de concentrations. Par ailleurs, le couplage de l'électrophorèse sur gel à la spectrométrie de masse a largement été développé au début des années 2000 ⁴⁹⁻⁵². Les protéines sont alors séparées sur gel électrophorèse 1D ou 2D puis sont récupérées et à nouveau séparées par chromatographie liquide afin d'être analysées et détectées en spectrométrie de masse. Le groupe de Rudi Aebersold a utilisé cette technique pour l'analyse et le séquençage de protéines par spectrométrie de masse dans le domaine de la recherche en post-génomique ⁴⁹.

1.3.2.2 Dosage par ELISA

Cette méthode est actuellement la méthode de référence lors du développement de test biomarqueurs. Son acronyme signifie « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » et est souvent traduit en français en dosage d'immunoabsorption par enzyme liée. Cette méthode a été développée

au début des années 1970 par un groupe suédois⁵³. Cette méthode fait appel à l'utilisation d'un anticorps pour la détection spécifique d'antigène. Ainsi, Engvall et Perlmann ont quantifié l'immunoglobuline G dans du sérum de lapin après avoir couplé leur anticorps à la phosphatase.

Il existe trois grandes méthodes de dosages par ELISA :

- ELISA indirect : l'antigène connu est mis en contact et fixé sur une surface fixe souvent appelée puits, le sérum (contenant les anticorps à doser) est ensuite ajouté et les anticorps vont alors se lier aux antigènes. La plaque est rincée afin d'éliminer les anticorps non liés puis un second anticorps dirigé contre le premier est ajouté. Ce dernier anticorps est lié à une enzyme de substrat qui permet de suivre l'évolution de la réaction. C'est l'application d'un substrat qui, s'il est converti par l'enzyme, émet un signal chromogénique ou fluorescent permettant la quantification du résultat par spectrométrie ou tout autre appareil d'optique. Ce test est utilisé pour le dépistage en routine du VIH^{54,55}.
- ELISA en sandwich : une quantité connue d'anticorps de capture est fixée sur une surface (puits). L'échantillon est ensuite ajouté et les antigènes (analytes à doser) vont être capturés par les anticorps. Un deuxième anticorps lié cette fois-ci à une enzyme et dirigé contre l'antigène d'intérêt est ajouté. Enfin, l'application d'un substrat qui va être converti par l'enzyme émet un signal chromogénique ou fluorescent directement proportionnel à la concentration de l'antigène dosé.
- ELISA par compétition : un antigène marqué est ajouté en quantité connue dans l'échantillon contenant l'antigène à doser. L'échantillon est ensuite transféré sur une plaque contenant un défaut d'anticorps dirigés contre l'antigène. Il y a donc compétition entre l'antigène à doser et l'antigène marqué pour se fixer au niveau des anticorps. Après rinçage et élimination des réactifs non fixés en excès, le signal est mesuré. Puisque le signal provient exclusivement de l'antigène marqué, plus le signal est important, plus il y a d'antigènes marqués liés aux anticorps et donc plus faible est la quantité d'antigènes endogènes. Le signal est ainsi inversement proportionnel à la quantité d'antigènes présents dans l'échantillon à doser.

Un des avantages majeurs des tests ELISA est sa simplicité d'utilisation. En effet, la préparation de l'échantillon et l'utilisation des tests commerciaux sont très simples et très rapides.

Malgré cela, les tests ELISA possèdent quelques désavantages. En effet, la plus grande difficulté, dans la mise en place d'un dosage par ELISA, est la disponibilité d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt. Lors de recherches réalisées sur de nouveaux antigènes, il est rare que l'anticorps spécifique soit identifié et disponible. Le développement d'un test afin de déterminer l'anticorps adéquat peut coûter jusqu'à plusieurs dizaines de milliers d'euros et prendre au minimum un an (pour une seule protéine)^{56,57}.

Par ailleurs, il peut arriver que les anticorps fixés sur le support soient saturés par l'analyte ce qui empêche la formation du sandwich. On parle alors d'« hook effect » soit effet hameçon. Cela se produit lorsque la concentration d'analyte est si importante que le signal est saturé et se met à diminuer. La courbe retraçant l'intensité du signal en fonction de la concentration ressemble alors à un hameçon. Ainsi, dans ce cas la concentration déterminée est sous-estimée. Cet effet a été reporté entre autres lors du dosage de la prolactine dans le sérum chez un patient souffrant d'une tumeur⁵⁸.

Enfin, une des limites du test ELISA est la difficulté rencontrée lors de la mise en place de tests multiplexés. En effet, chaque test permet le dosage spécifique d'une protéine et il faut donc développer une nouvelle méthode avec de nouveaux anticorps pour le dosage d'une ou plusieurs autres molécules d'intérêts.

Afin de bien valider et conforter les tests ELISA lors de problèmes similaires au « hook effect » ou dans le but de doser simultanément plusieurs dizaines ou centaines d'analytes, il est intéressant de disposer de méthodes alternatives. Comme nous l'avons mentionné précédemment, une autre méthode également très spécifique peut être utilisée pour doser les protéines. La spectrométrie de masse peut être utilisée en couplage avec l'électrophorèse sur gel mais aussi de manière indépendante. En effet, plusieurs laboratoires, dont le nôtre, ont montré que les résultats obtenus en spectrométrie de masse pouvaient être corrélés et étaient similaires à ceux obtenus par ELISA^{59,60}. Le principe de cette approche va maintenant être décrit.

I.3.3 Dosage par spectrométrie de masse

I.3.3.1 Structure générale d'un spectromètre de masse

Le spectromètre de masse comporte quatre parties principales. La première partie est la source d'ionisation qui permet de transformer les analytes en ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite transmis au sein d'un ou plusieurs analyseurs où ils seront séparés selon leur rapport masse-sur-charge (m/z). A la sortie de l'analyseur, le détecteur va alors compter les ions et amplifier le signal transmis au système informatique pour le retraitement. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'abondance relative de ces ions selon l'axe des ordonnées (Figure I-4).

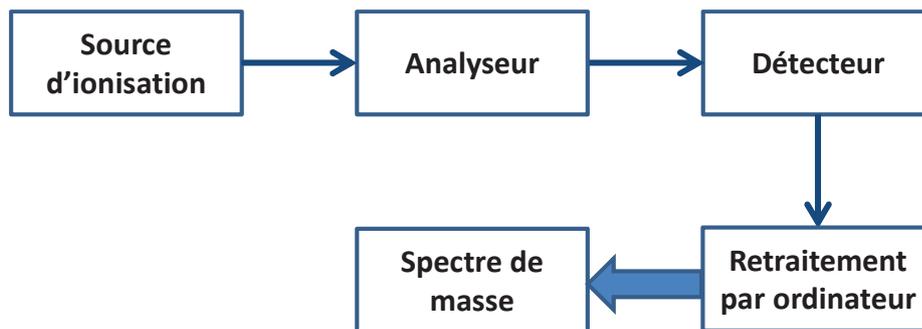


Figure I-4 : Schéma général d'un spectromètre de masse

I.3.3.1.1 Les sources d'ionisation

La source d'ionisation permet de vaporiser les molécules et de les ioniser. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif, soit en mode négatif. Plusieurs types de sources peuvent être couplées à un spectromètre de masse et leurs utilisations varient en fonction du résultat recherché et des molécules analysées ⁶¹.

Les sources d'ionisations les plus utilisées actuellement sont :

- l'ionisation électronique (EI)
- l'ionisation chimique (CI).
- l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).
- la photoionisation à pression atmosphérique (APPI).
- l'électronébulisation ou électrospray (ESI).
- la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI).

D'autres sources d'ionisation à pression atmosphérique existent et permettent l'analyse directe d'échantillons en atmosphère ouverte au sein du laboratoire ou dans leur environnement naturel. La source DESI, développée par le groupe du Professeur Cooks, est une des sources à pression atmosphérique les plus utilisées ⁶².

Durant cette thèse, la source d'ionisation utilisée sur les différents spectromètres de masse a été la source ESI. Cette technique a été développée durant les années 1980 par le groupe de Fenn pour l'analyse de protéines en phase gazeuse et démontrait à l'époque que l'analyse de molécule pouvant aller jusqu'à 130 kDa était tout à fait réalisable ⁶³. Cependant, son utilisation a été rapidement élargie aux petites molécules organiques et aux polymères. L'ESI est donc devenue depuis plusieurs années la technique la plus répandue en spectrométrie de masse. En effet, la source d'ionisation ESI peut être facilement couplée à la chromatographie en phase liquide pour l'analyse de tous les types de

composés. C'est dans cette configuration que nous avons majoritairement utilisé cette source lors des expériences présentées dans cette thèse.

1.3.3.1.1.1 La source électrospray

La source électrospray permet la désolvatation à pression atmosphérique d'ions présents en solution. Nous pouvons dégager trois étapes principales dans le processus de formation des ions par électrospray.

Premièrement, la production de gouttelettes chargées est réalisée sous l'influence d'un champ électrique intense appliqué à la surface du liquide contenant l'analyte. Ce champ électrique est obtenu suite à une différence de potentiel (DP), pouvant varier entre 3 et 6 kVolts, appliquée entre le capillaire transférant le liquide et la contre électrode. Ce champ provoque une accumulation de charge positive (en mode positif) ou négative (en mode négatif) à la surface du liquide. Lorsque trop de charges sont accumulées à la surface, la goutte se déforme pour optimiser sa surface puis celle-ci se rompt et se transforme alors en un « cône de Taylor » composé de petites gouttelettes chargées (Figure I-5).

La deuxième étape est alors l'évaporation des gouttelettes chargées. Ces gouttelettes migrent en traversant simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression pour passer de la partie électrospray à pression atmosphérique (760 Torr) vers l'entrée de l'analyseur à pression de l'ordre du Torr. Sous l'effet du chauffage (variant de 250°C à 450 °C) et d'un gaz nébuliseur (N₂), la taille des gouttelettes, initialement de quelques µm de diamètre, diminue par évaporation. Lorsque les répulsions électrostatiques au sein des gouttelettes atteignent le niveau des tensions superficielles, légèrement inférieur à la limite de stabilité de Rayleigh⁶⁴, les gouttelettes explosent pour donner de microgouttelettes (0.1 µm environ).

Enfin, la dernière étape est la formation d'ions chargés générée par la fission de ces microgouttelettes. Ces ions ainsi produits sont porteurs d'une ou plusieurs charges en fonction du nombre de sites ionisables présents sur la molécule.

Ce modèle appelé *Ion Evaporation Model* (IEM) a été décrit par Iribane et Thomson dans les années 1970^{65,66}. La Figure I-5 représente un schéma de la source ESI :

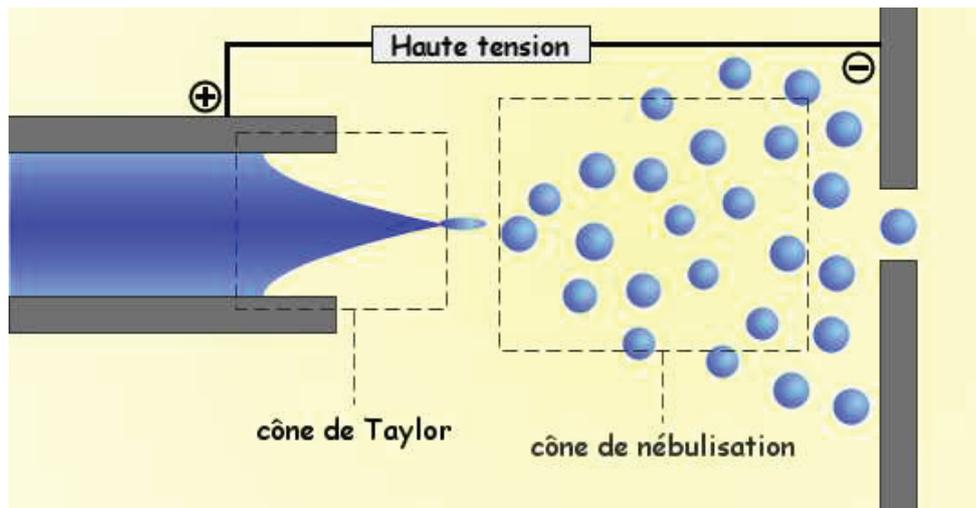


Figure I-5 : Principe de l'électrospray

Par ailleurs, en électrospray, la génération des espèces chargées en phase gazeuse peut se faire selon 4 procédés :

- L'ionisation par la séparation de charges : les analytes qui existent en solution comme ions se retrouvent directement ionisés dans les gouttes.
- La formation d'adduits : elle se produit avant la séparation de charge. En mode positif, les analytes s'adduisent avec du sodium, du lithium, de l'ammonium ou d'autres cations présents dans les solvants et éluants utilisés. En mode négatif, très peu d'adduits sont formés.
- L'ionisation par réactions en phase gazeuse : puisque de larges quantités de molécules chargées sont générées, la réponse ESI-MS peut être affectée par des interactions en phase gazeuse. Des transferts de protons peuvent avoir lieu entre les molécules déjà protonées en solution vers des molécules de plus forte basicité en phase gazeuse. Des analytes neutres qui s'évaporent peuvent donc être chargés en phase gaz. La basicité en solution et l'affinité protonique en phase gaz ne sont, en effet, pas nécessairement liées.
- L'ionisation par oxydation ou réduction électrochimique au niveau du capillaire métallique : des réactions électrochimiques peuvent convertir un analyte non chargé en ion.

Après avoir été générés dans la source, les ions produits vont être transférés dans l'analyseur par une succession de lentilles optiques, ce qui permettra la suppression des molécules neutres non guidées. La pression régnant dans un analyseur diffère selon le type d'analyseur mais varie généralement entre 10^{-5} Torr (quadripôle) et 10^{-10} Torr (Orbitrap).

I.3.3.1.2 Les analyseurs

Les analyseurs permettent de séparer les ions en fonction de leur rapport masse-sur-charge (m/z). Tout comme il existe une grande variété de source d'ionisation, il existe là aussi plusieurs types d'analyseurs. Les analyseurs à basse résolution (environ 2 000 de résolution) de type quadripôle (Q), le piège à ions 3D (*Ion Trap*) ou linéaire (*Linear Ion Trap*) et les analyseurs haute résolution (de 30 000 à 1 000 000 de résolution), permettent de mesurer la masse exacte des analytes. Les instruments à haute résolution sont : le secteur magnétique couplé à un secteur électrique, le temps de vol (TOF), la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FTICR) et l'Orbitrap.

Trois types d'analyseurs ont été utilisés durant cette thèse, il s'agit du piège linéaire, du quadripôle et de l'Orbitrap.

Nous verrons en détail leur fonctionnement respectif lors de leurs utilisations dans cette thèse.

I.3.3.1.3 Les détecteurs et ordinateurs

Une fois que le faisceau d'ions a traversé l'analyseur, il est nécessaire de détecter et de transformer ce faisceau en signal utilisable. Les détecteurs utilisés sur spectromètres de masse sont généralement basés sur la détection d'un courant d'ions ou sur la génération d'un courant électrique suite à la collision des ions avec une surface de type multiplicateur d'électrons ou de photons.

Une fois le signal détecté, il est transmis à l'ordinateur. Celui-ci a trois grandes fonctions qui sont :

- Le pilotage du spectromètre de masse.
- L'acquisition de données et le retraitement du signal.
- L'interprétation des résultats via une base de données.

I.3.4 Principe de la quantification de protéines par spectrométrie de masse

En spectrométrie de masse, la quantification de molécule se fait généralement par couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse (LC-MS). De plus, les protéines ne sont généralement pas quantifiées sous leurs formes natives mais sous forme de peptides rapporteurs obtenus suite à une digestion enzymatique.

1. Digestion des protéines et formation de peptides

Tout comme une protéine, un peptide est un enchaînement d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques (fonction amide). Cependant, un peptide est généralement constitué de moins de cinquante acides aminés alors qu'une protéine peut en comporter plus de cent. Entre les deux, le terme de polypeptide est employé. Dans les matrices biologiques, il existe à la fois des

protéines entières et des peptides endogènes. Pour le dosage de protéines biomarqueurs, celles-ci sont généralement digérées sous forme de peptides suite à une digestion enzymatique.

Tout d'abord, la protéine est dénaturée en milieu salin afin de la déplier et de réduire les interactions intra et intermoléculaires. Puis un agent réducteur (souvent le Dithiothréitol-DTT ou Tris(2-carboxyethyl)phosphine-TCEP) est ajouté afin de rompre les ponts disulfures qui la rendent rigide. Les fonctions thiols ainsi libres sont ensuite alkylées avec un agent alkylant (notamment l'Iodoacétamide-IAM) afin de bloquer la reformation des ponts disulfures. Puis une enzyme, généralement la trypsine, permet de couper spécifiquement certaines liaisons peptidiques afin de former les peptides. La trypsine coupe les liaisons peptidiques formées entre une lysine ou/et une arginine et l'acide aminé suivant vers la terminaison C-terminale. Ainsi, les peptides obtenus suite à une digestion par la trypsine auront tous une lysine ou une arginine en position C-terminale, à l'exception du peptide C-terminal de la protéine. Le principe général de quantification des protéines par spectrométrie de masse est décrit sur la Figure I-6 ci-dessous. Des protocoles de digestions seront détaillés dans les différentes parties expérimentales présentées dans ce rapport. Une fois les peptides générés, le mélange est généralement reconcentré et purifié par extraction en phase solide (SPE) puis séparé par chromatographie liquide et analysé par spectrométrie de masse. En cas d'ajout d'étalon interne peptidique, celui-ci est intégré à l'échantillon avant la purification par SPE. L'ajout d'étalon au niveau protéique est réalisé dès le début de la préparation d'échantillon^{67, 68}.

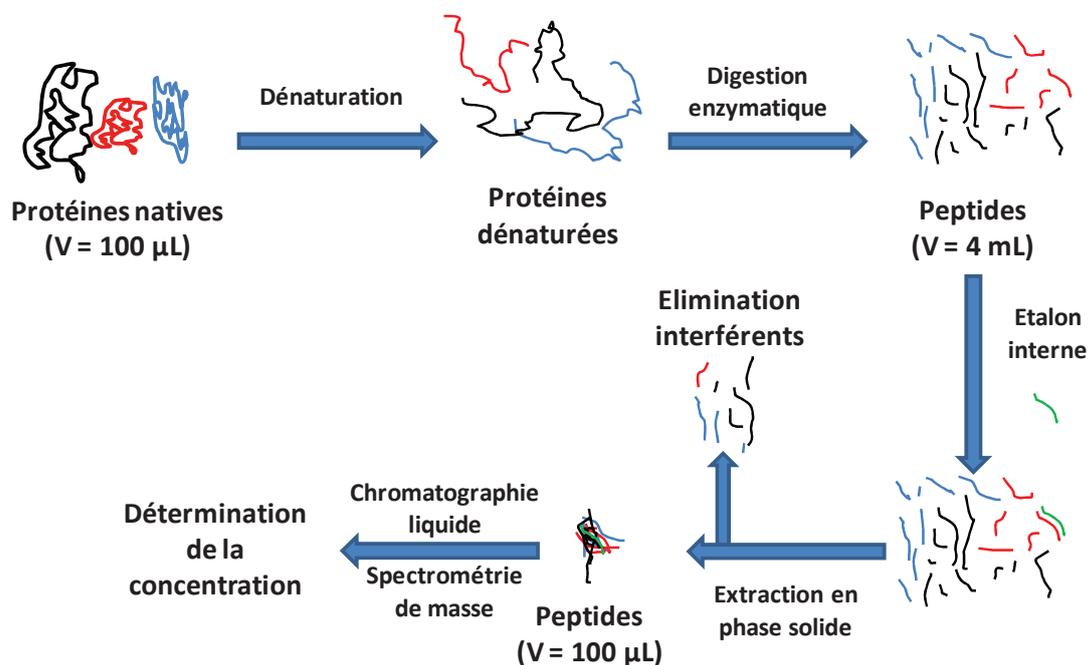


Figure I-6 : Principe du dosage de protéines par spectrométrie de masse.

1.3.4.1 La chromatographie liquide (LC)

Pour la quantification de protéines par spectrométrie de masse, l'analyse MS est très souvent précédée d'une méthode séparative telle que la chromatographie en phase liquide. Ainsi grâce à cette séparation de constituants en amont de l'analyse, les produits sont introduits successivement dans le spectromètre de masse^{69, 70}. L'analyse MS se faisant en continu, le signal détecté est représenté en fonction du temps de rétention. Il s'agit d'un chromatogramme reconstitué. Suite à l'obtention du chromatogramme, c'est l'intégration du pic chromatographique propre à l'ion d'intérêt qui est directement proportionnelle à sa concentration dans l'échantillon analysé. La plupart des analyses chromatographiques sont réalisées avec des colonnes en phase inverse, C₁₈, mais de nouveaux développements analytiques s'intéressent aux colonnes HILIC (*hydrophilic interaction liquid chromatography*)⁷¹ ainsi qu'à la chromatographie en 2 dimensions. La chromatographie 2D permet de réaliser un fractionnement en ligne de l'échantillon⁷². Dans cette thèse, seule la chromatographie en phase inverse a été utilisée.

1.3.4.2 L'analyse par spectrométrie de masse des peptides (MS)

La quantification en spectrométrie de masse peut être réalisée sur tout type d'analyseur couplé à une chromatographie liquide. Cependant les quadripôles sont des analyseurs de choix de par leurs rapidités de balayage de gamme de masse, la possibilité de sélection spécifique de certaines gammes de rapport m/z et une transmission d'ions rapide au sein du spectromètre de masse. Cette transmission va en effet jouer sur la sensibilité de l'analyse. Une meilleure transmission des ions permettra de détecter des quantités d'analytes plus faibles.

a) Principe d'un quadripôle

Le quadripôle est un analyseur qui utilise la stabilité des trajectoires d'ions dans un champ électrique oscillant afin de séparer les ions selon leur m/z . Le fonctionnement du piège à ion linéaire (Linear Ion Trap) est basé sur le même principe. La description du fonctionnement est tirée du livre « spectrométrie de masse » d'Edmond de Hoffmann et Vincent Stroobant⁶¹.

Les analyseurs quadripolaires sont, comme leur nom l'indique, constitués de quatre barres parallèles de section hyperbolique ou circulaire^{73, 74}. Ces quatre barres sont soumises à des potentiels, ces potentiels sont de valeurs opposées sur les barres qui se trouvent côte à côte. Ainsi, si l'on considère les 4 barres d'un quadripôle comme les 4 points cardinaux, lorsque les barres Nord et Sud sont positives, celles Est et Ouest sont négatives, lorsque ces tensions changent et que les barres Nord et Sud passent négatives, les barres Est et Ouest passent elles, positives.

Ainsi, lorsqu'un ion positif entre dans le quadripôle, celui-ci se dirige vers une des deux barres négatives, puis lorsque les potentiels sont inversés, sa direction change et il sera alors attiré vers une des deux autres barres étant cette fois-ci soumises à un potentiel négatif. Ainsi, à un instant t , deux barres sont soumises à un potentiel positif et deux barres à un potentiel négatif. Les ions suivent donc l'axe des z (voir Figure I-7) soumis à l'influence d'un champ électrique constitué de deux

champs superposés, un champ alternatif quadripolaire (RF) superposé et un champ constant résultant de l'application de potentiels $+ \Phi_0$ et $- \Phi_0$ sur les barres avec Φ_0 définie dans l'équation suivante :

$$\Phi_0 = (U - V \cos \omega t) \quad \text{Équation 3}$$

Dans cette équation, ω représente la fréquence angulaire (en radian/s avec $\omega = 2\pi f$ où f est la fréquence du champ alternatif), U est la tension continu et V l'amplitude « zéro à pic » du voltage RF ⁶¹.

Lorsque les ions sont accélérés suivant l'axe z , ils pénètrent entre les barres du quadripôle tout en conservant leur vitesse suivant cet axe. Cependant, les ions sont aussi soumis à des accélérations, suivant les axes x et y , résultantes de forces provenant des champs électriques. Deux équations du mouvement suivant les axes x et y peuvent alors être établies en prenant m , la masse d'un ion, a l'accélération et $-q = ze$ la charge de l'ion suivi. On obtient donc :

$$F_x = ma = m \frac{d^2x}{dt^2} = -ze \frac{\delta\phi}{\delta x} \quad \text{Équation 4}$$

$$F_y = ma = m \frac{d^2y}{dt^2} = -ze \frac{\delta\phi}{\delta y} \quad \text{Équation 5}$$

Φ est une fonction de Φ_0 défini précédemment, r_0 étant le rayon du cercle inscrit entre les 4 barres d'un quadripôle :

$$\Phi_{(x,y)} = \frac{\Phi_0(x^2 - y^2)}{r_0^2} \text{ soit } \Phi_{(x,y)} = \frac{(U - V \cos \omega t)(x^2 - y^2)}{r_0^2} \quad \text{Équation 6}$$

Suite à une dérivation et en réarrangeant et en posant les termes suivant :

$$u = x \text{ ou } y, \quad \varepsilon = \frac{\omega t}{2}, \quad a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2} \quad \text{et} \quad q_u = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2} \quad \text{Équation 7}$$

$$\text{avec } a_u = a_x \text{ ou } -a_y \quad \text{et} \quad q_u = q_x \text{ ou } -q_y \quad \text{Équation 8}$$

On obtient :

$$\frac{d^2u}{d\varepsilon^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\varepsilon)u = 0 \quad \text{Équation 9}$$

Ces équations ont été établies en 1866 par le physicien Mathieu pour décrire la propagation d'ondes dans les membranes.

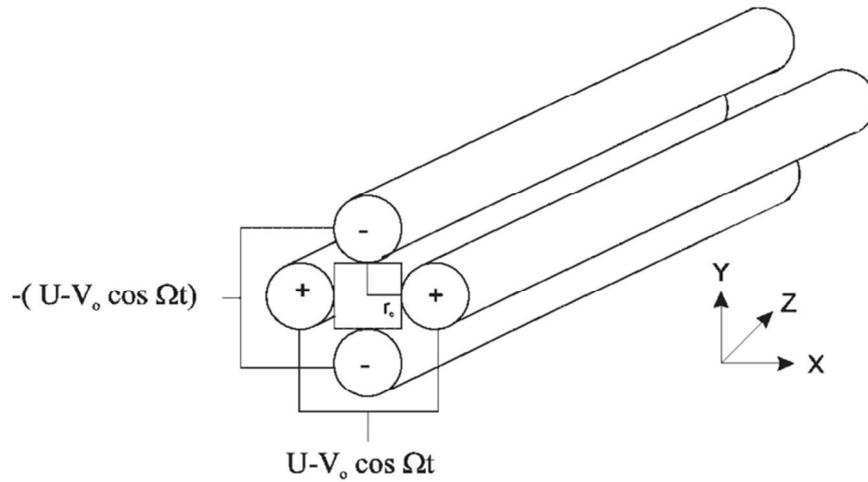


Figure I-7 : Schéma d'un quadripôle avec les potentiels appliqués.⁷⁴

Pour un quadripôle donné, r_0 , le rayon interne du quadripôle, est constant. $\omega = 2 \pi f$ est maintenu constant. U et V sont les variables. Dans un diagramme a_u en fonction de q_u , il est possible de représenter les zones de stabilité elles que x et y n'atteignent pas, au cours du temps, des valeurs supérieures ou égales à r_0 . Ces diagrammes sont présentés dans la Figure I-8. Quatre zones de stabilité sont identifiées. Cependant, nous ne nous intéresserons qu'à la zone A pour la suite.

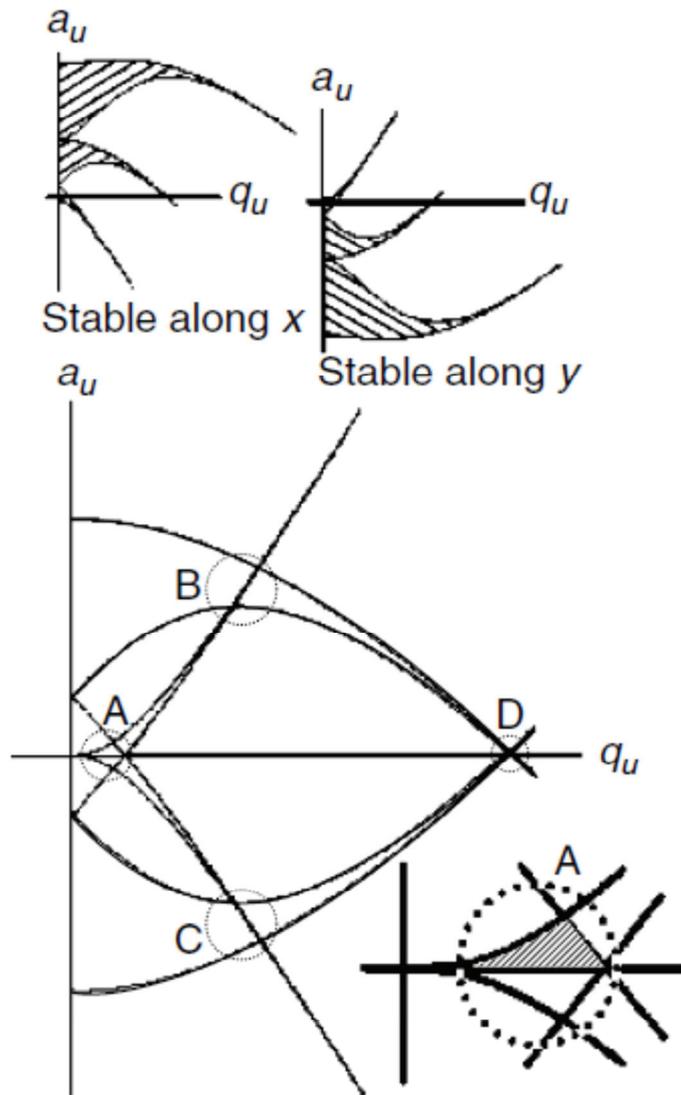


Figure I-8 : Zones de stabilité dans un quadripôle d'un ion donné suivant l'axe x ou y (partie supérieure) et suivant x et y (partie inférieure). u représentant soit x soit y . Les quatre zones de stabilités sont notées de A à D. La zone A, agrandit, est celle utilisée dans un quadripôle. La partie hachurée correspond à un potentiel U positif.

En examinant les équations suivantes, on remarque que passer d'un m/z à un autre, revient à diviser proportionnellement a_u et q_u et à changer les proportions du schéma.

$$u = x \text{ ou } y, \quad \varepsilon = \frac{\omega t}{2}, \quad a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2\omega^2} \quad \text{et} \quad q_u = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2} \quad \text{Équation 10}$$

La zone A, plus couramment utilisée, est une sorte de triangle qui va évoluer d'une masse à l'autre. La Figure I-9 présente pour 3 masses les zones A obtenues. Il est ainsi visible que pour effectuer un balayage dans un quadripôle, il faut faire varier simultanément U et V tout en gardant le rapport U/V constant. Plus ce rapport sera élevé, plus la sélectivité du filtre en masse sera importante (donc meilleure sera la résolution). Autrement dit, lorsque le coefficient directeur de la droite U/V augmente, la résolution de détection augmente. En revanche, la transmission des ions va être réduite ce qui va engendrer une diminution de la sensibilité. Il est donc important de noter que nous pouvons ainsi jouer sur la résolution afin d'augmenter la sensibilité. Lors de différentes expériences de cette thèse, la résolution a parfois été abaissée ou « cassée » afin d'augmenter le signal détecté. Nous y reviendrons en détail lors des parties expérimentales.

Le quadripôle est donc un analyseur séquentiel, il analyse les ions masse après masse d'abord m_1 pendant une durée t_1 , puis m_2 pendant une durée t_2 et ainsi de suite. Une grande partie des ions arrivant à l'entrée du quadripôle est ainsi perdue. Un quadripôle permet donc soit l'analyse d'un seul ion à la fois, soit le balayage d'une plage de masse. Il est ainsi important que la vitesse de balayage d'un quadripôle soit rapide afin de pouvoir analyser plusieurs ions dans une même méthode.

En revanche, si la tension continue U est fixée à 0V, et que V n'est pas trop élevé, tous les ions auront une trajectoire stable. Dans ce cas, le quadripôle sert uniquement de guide d'ions. On dit qu'il fonctionne en radiofréquence seulement ou *rf only*.

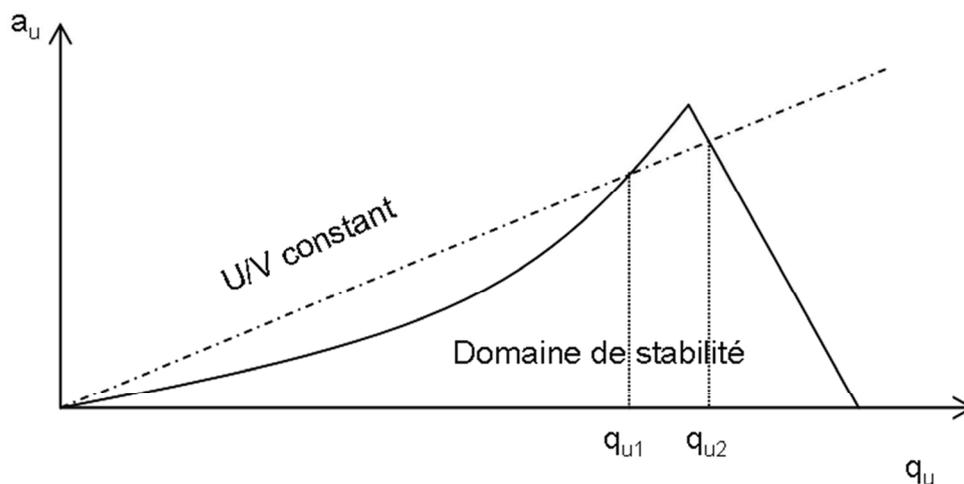


Figure I-9 : Diagramme de stabilité en fonction de U et de V pour un ion.

Lors de cette thèse, l'analyseur quadripolaire a été utilisé dans un instrument de type triple quadripôles. Cet instrument est ainsi un enchainement de trois quadripôles, le premier et le troisième servent de filtre analytique (Q1 et Q3) alors que le deuxième servira de guide d'ion et de cellule de fragmentation (q2). Le q2 fonctionne ainsi en radiofréquence uniquement.

Nous allons maintenant discuter des deux modes de balayage utilisés sur un quadripôle ou triple quadripôle pour la quantification, le mode *Single Ion Monitoring* (SIM) et le mode *Selected Reaction Monitoring* (SRM).

1.3.4.2.1.1 Le mode SIM

Ce mode est utilisé lors de l'analyse de composé en matrice simple. En effet, ce mode n'utilise qu'un seul des 3 quadripôles de l'instrument, généralement Q1 (même si Q3 pourrait être utilisé). En mode SIM, le quadripôle servant de filtre de masse va alors être réglé dans le but de ne laisser passer qu'un seul rapport m/z , celui correspondant à la molécule d'intérêt. Les deux autres quadripôles seront alors en mode radiofréquence uniquement et ne serviront qu'à guider les ions jusqu'au détecteur. La Figure I-10 représente le fonctionnement d'un triple quadripôle en mode SIM.

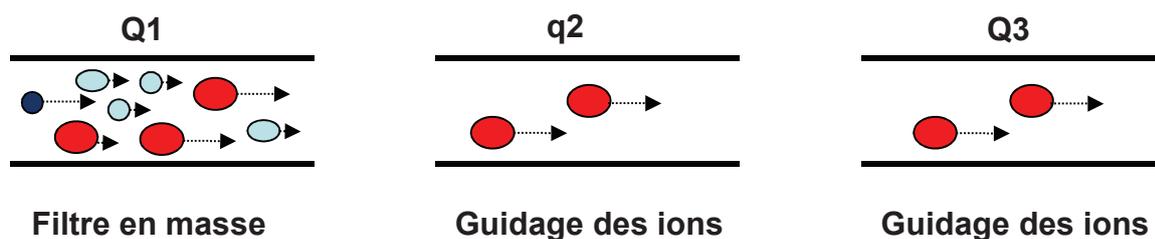


Figure I-10 : Schéma d'un triple quadripôle utilisé en mode SIM.

De par l'utilisation d'un seul quadripôle, cette méthode n'est pas très spécifique. En effet, en matrice complexe comme le plasma humain, si l'on souhaite doser en mode SIM un peptide protéotypique d'un biomarqueur tel que le Prostate Specific Antigen (PSA)⁵⁹, une protéine biomarqueur du cancer de la prostate chez l'homme, une rapide recherche dans une base de données tel que SRM Collider (<http://www.srmcollider.org/>) permet d'obtenir une estimation du nombre d'interférents.

Lorsque l'on recherche le nombre de peptides ayant un ratio $m/z = 539.25 \pm 0.35$ correspondant au précurseur du peptide IVGGWECEK, nous obtenons 1079 peptides, le peptide d'intérêt inclus. Ainsi, il y a 1078 interférents potentiels susceptibles de gêner l'analyse.

Une seconde sélection en masse a donc été rajoutée afin d'affiner la spécificité de détection et diminuer le nombre d'interférents potentiels. Cette méthode est le mode SRM.

1.3.4.2.1.2 Le mode SRM

Le mode SRM (Selected Reaction Monitoring) aussi appelé MRM (Multiple Reaction Monitoring) permet de réaliser une double sélection en masse. Le premier analyseur Q1 sert de filtre afin de ne laisser passer que les ions ayant un ratio m/z égal à celui de l'ion d'intérêt (comme pour le mode SIM). Puis, les ions sont guidés dans la cellule de collision q2 afin d'être fragmentés suite à une collision avec un gaz (fragmentation par Collision Induced Dissociation (CID)) Cette méthode de fragmentation sera décrite de manière plus détaillée dans le chapitre 2. Enfin, le deuxième filtre, Q3, ne laisse alors passer que les ions ayant une valeur de m/z égale à celle d'un ion produit spécifique du peptide d'intérêt. Le couple ion précurseur/ion fragment est appelé transition SRM. La Figure I-11 représente le fonctionnement d'un triple quadripôle en mode SRM. Généralement, plusieurs transitions sont suivies pour un même peptide. Les transitions suivies sont celles qui répondent le mieux, c'est-à-dire qui donne le meilleur signal suite à la détection SRM. Tout au long de l'analyse d'une même molécule, le ratio d'intensité entre les transitions doit rester le même. Ce ratio est propre à la molécule analysée.

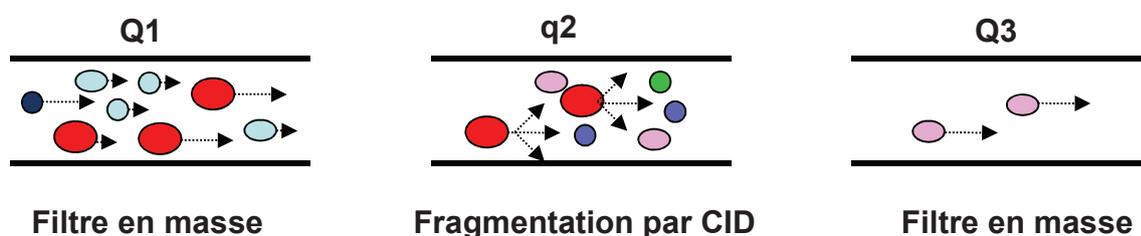


Figure I-11 : Schéma de fonctionnement d'un triple quadripôle en mode SRM.

Comme décrit précédemment pour le mode SIM, si l'on veut rechercher le nombre d'interférents potentiels ayant la même transition SRM que la transition la plus intense de peptide IVGGWECEK ($539.25 \pm 0.35 / 213.2 \pm 0.35$)⁵⁹ dans la base de données SRM Collider, ce nombre doit considérablement diminuer. En effet, il n'y a plus que 40 peptides provenant de protéines présentes dans le plasma humain ayant pour transition SRM le couple ($539.25 \pm 0.35 / 213.2 \pm 0.35$), soit 39 interférents potentiels.

Lors de dosage en SRM, il est fréquent d'abaisser la résolution du quadripôle afin d'augmenter le signal d'ions détectés pour un dosage plus sensible. En effet, comme nous l'avons décrit dans la partie fonctionnement d'un quadripôle, lorsque la résolution de l'analyseur est diminuée, le nombre d'ions stabilisés par le quadripôle croît fortement. Cependant, le nombre d'ions interférents augmente lui aussi fortement. Ainsi, si l'on recherche la même transition SRM 539.25/213.2 avec une résolution moindre ($539.25 \pm 0.55 / 213.2 \pm 0.55$), le nombre d'interférents potentiels augmente à 87.

Nous nous sommes donc intéressés à la manière d'améliorer la spécificité de détection afin de limiter au maximum le nombre potentiel d'interférents.

I.4 Amélioration de la spécificité de détection.

La spécificité de détection peut être améliorée de plusieurs manières. Premièrement, la préparation de l'échantillon à analyser peut permettre de partitionner ou de purifier celui-ci afin de diminuer le nombre de molécules présentes dans la matrice. Il est aussi possible, comme pour le mode SRM par rapport au mode SIM, de travailler sur l'amélioration de l'instrument en rajoutant des degrés de sélectivité.

Nous allons dans cette partie décrire ces deux différents axes d'étude.

I.4.1 La préparation d'échantillon

I.4.1.1 Déplétion des protéines majoritaires

Afin de simplifier l'échantillon à analyser et donc de limiter l'effet matrice, il est fréquent lors de l'analyse de petites molécules mais également lors de la quantification protéomique de déléter les protéines majoritaires. Pour cela, l'approche la plus utilisée est l'immuno-capture d'un certain nombre de protéines majoritaires. En effet, il existe des kits commerciaux pour éliminer uniquement l'albumine⁷⁵ qui représente à elle seule près de la moitié de la masse protéomique présente dans du plasma humain. Il est aussi possible de simplifier la matrice en déléterant par exemple l'albumine et les immunoglobulines G⁷⁶ ou les six protéines les plus abondantes (albumine, immunoglobuline G, immunoglobuline A, transferrine, anti-trypsine et haptoglobine)⁷⁷.

Lors du développement d'une méthode de quantification de protéine, il est important d'étudier à la fois la répétabilité et l'efficacité de ces kits de déplétion. Björhall *et al.* ont comparé l'efficacité de la déplétion de l'albumine à partir de cinq kits commerciaux et les rendements de déplétion vont de 96,0 à 99,5%⁷⁸. Bien qu'un rendement de déplétion de 99,5% puisse être considéré comme excellent, il faut garder à l'esprit que la concentration de l'albumine endogène est très importante (au tour de 40 mg/mL), les 0,5% d'albumine restant correspondent donc à une concentration de 200 µg / mL. Ainsi, même après une telle déplétion, l'albumine reste parmi les protéines les plus concentrées et son implication dans l'effet matrice reste important.

Par ailleurs, si une étape de déplétion est choisie lors d'un dosage, il faut absolument évaluer l'impact de la déplétion sur la protéine cible. En effet, cette protéine peut être perdue en quantité non négligeable. Par exemple, il a été montré par l'équipe du laboratoire que 95% du PSA pouvait être perdu lors de cette étape en fonction du kit utilisé⁵⁹. Dans de tels cas extrêmes, la déplétion des protéines majoritaires est à proscrire puisque le gain de signal obtenu par la baisse de l'effet matrice ne va pas compenser la perte non spécifique de la protéine cible. La déplétion n'étant pas une méthode universelle applicable pour tout type de dosage, d'autres stratégies ont été développées pour purifier l'échantillon.

I.4.1.2 Fractionnement de l'échantillon

Une des stratégies les plus utilisées est le fractionnement par échange de cation ou SCX suite à la digestion enzymatique. Cette technique utilise le point isoélectrique des peptides. La colonne est en général un support greffé d'acide sulfonique sur lequel les peptides sont déposés en milieu acide donc majoritairement retenus (peptides chargés positivement en milieu acide). Un gradient de solutions à différents pH est alors réalisé afin de fractionner l'échantillon en plusieurs échantillons simplifiés dans lesquels l'effet matrice sera moindre lors de l'analyse⁷².

Une autre méthode de fractionnement est aussi fréquemment utilisée, il s'agit de la chromatographie d'exclusion stérique ou SEC qui consiste à fractionner les protéines avant digestion enzymatique selon leur taille⁷⁹.

Le principal inconvénient du fractionnement réside dans l'augmentation du temps d'analyse. En effet, l'étape de séparation par SCX ou SEC est assez longue. De plus le nombre d'échantillons obtenus suite au fractionnement est assez important, pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines, ce qui augmente le temps d'analyse MS. Par ailleurs, le fractionnement d'un même peptide dans différentes fractions constitue également un problème car cela peut engendrer des pertes et du coup diminuer la sensibilité de détection.

I.4.1.3 Immuno-enrichissement

La méthode de l'immuno-enrichissement est basée sur un enrichissement de l'analyte via l'utilisation d'anticorps. Le principe de cette méthode est premièrement la fixation d'un anticorps dirigé contre l'analyte sur un support solide, puis l'incubation de l'échantillon sur ce même support. L'échantillon est ensuite rincé afin d'éliminer toutes les molécules non fixées. Enfin, les analytes sont décrochés. Deux principales stratégies ont été développées afin de réaliser des immuno-enrichissement pour l'analyse protéomique : l'enrichissement au niveau de la protéine ou au niveau peptidique⁸⁰⁻⁸². L'utilisation d'anticorps engendre les mêmes inconvénients que les dosages ELISA à savoir la disponibilité de l'anticorps, sa spécificité et le coût de l'analyse.

Ainsi, l'utilisation de l'immuno-enrichissement ou d'autres techniques de préparation visant à partitionner ou purifier un échantillon est spécifique d'un seul analyte. Cette approche est donc difficilement envisageable et applicable à l'analyse multiplexée de différents analytes.

Dans le but de réaliser des analyses multiplexées, il est ainsi intéressant de travailler sur l'amélioration de la spécificité de détection en réalisant des développements instrumentaux qui permettront alors d'analyser un échantillon complexe sans passer par une étape de purification en amont.

I.4.2 Développements instrumentaux

Les développements instrumentaux en spectrométrie de masse permettant l'amélioration de la sensibilité ou de la spécificité de détection peuvent être réalisés sur chaque partie qui compose un

spectromètre de masse. Nous allons dans cette partie discuter de quelques développements effectués en amont de l'analyseur ou au niveau du mode de balayage de l'analyseur.

1.4.2.1 En amont de l'analyseur

La sensibilité d'analyse en spectrométrie de masse dépend très largement du nombre d'ions détectés en fin d'analyse. Ce nombre découle directement du nombre d'analytes ionisés en source. La sensibilité lors de l'ionisation électrospray dépend majoritairement de deux paramètres. Le premier étant l'efficacité de production des ions en phase gazeuse (désolvatation ou efficacité d'ionisation), le second étant la capacité à transférer une espèce chargée de l'enceinte de la source, à pression atmosphérique, à la partie analyseur, sous vide à 10^{-5} Torr, (efficacité de transmission).

Afin d'étudier les mécanismes de la désolvatation, plusieurs groupes de recherche ont développé des stratégies d'analyse par fluorescence de la plume électrospray^{83, 84}. Au sein même de notre laboratoire, nous avons démontré que seul un nombre infime d'ions est transféré dans le capillaire d'entrée du spectromètre de masse suite à la désolvatation réalisée dans la source⁸⁵. La Figure I-12 montre qu'un grand nombre d'ions produits n'est pas envoyé vers le spectromètre de masse. Cette faible quantité d'ions transférés engendre alors un plus faible signal détecté. Bien évidemment, il est impossible d'envoyer la plume électrospray directement dans l'analyseur, le spectromètre de masse serait alors très vite encrassé par les molécules interférentes et la sensibilité n'en serait que diminuée. Cependant, les constructeurs travaillent activement à l'amélioration de la désolvatation des sources en rajoutant des gaz annexes (source Jet stream Agilent) ou en optimisant le chauffage appliqué sur la source (source AB sciex).

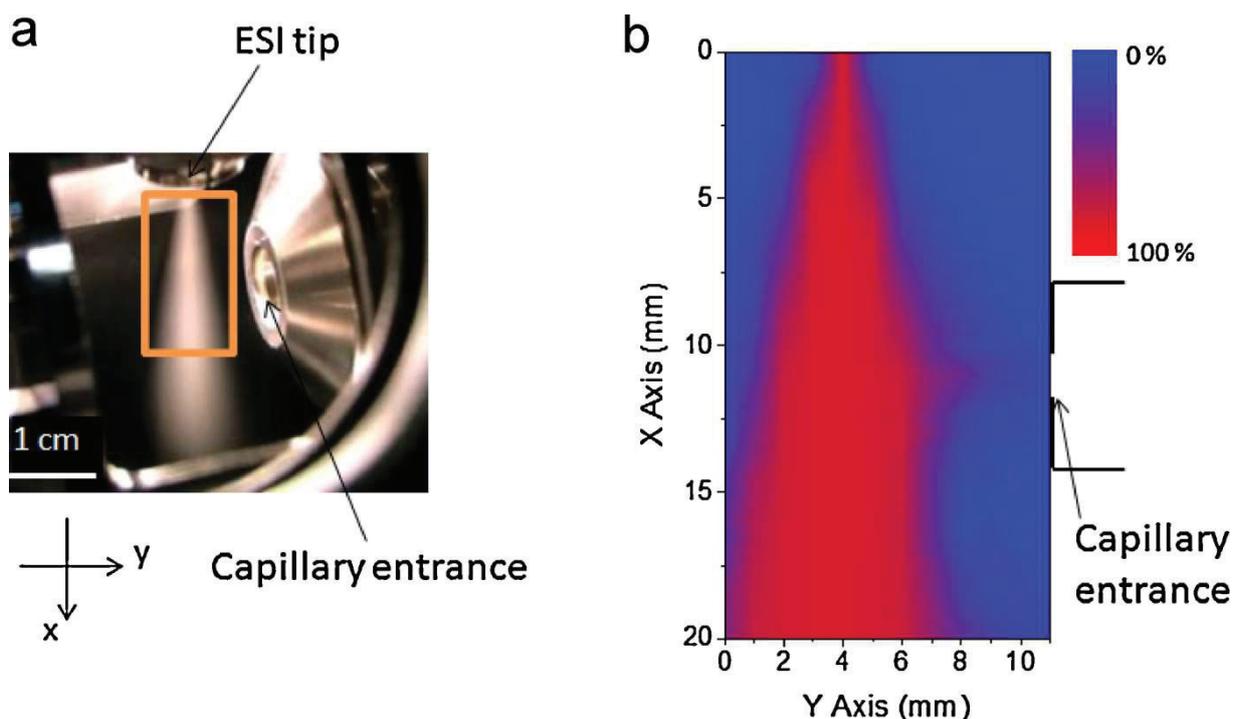


Figure I-12 : (a) Photo de la source électrospray Jet stream Agilent. Le rectangle correspond à la zone de la plume étudiée par fluorescence. (b) XY images du signal de fluorescence d'un chromophore fluorescent (Rh6G dans une solution de MeOH/eau 80:20 (% v/v)) au sein de la plume⁸⁵.

En ce qui concerne l'efficacité de transmission, le groupe de Richard Smith a développé une nouvelle source électrospray nommée SPIN (*Subambient Pressure Ionization with Nanospray source*). Cette source dispose d'un entonnoir de transmission à une pression intermédiaire, 30 Torr, qui permet d'améliorer la sensibilité d'une analyse d'un facteur 5 par rapport à l'utilisation d'une source classique⁸⁶.

Afin d'augmenter le rapport signal sur bruit et donc d'améliorer la spécificité de détection lors de l'analyse par spectrométrie de masse, il est aussi possible, comme en préparation d'échantillon, de réduire le nombre d'interférents. Le groupe de recherche dirigé par Colin Creaser a démontré que l'utilisation du FAIMS (*Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry*) lors de l'analyse de peptides pouvait fortement améliorer la sensibilité pour la détection lors d'analyses quantitatives ou qualitatives⁸⁷ en réduisant considérablement le nombre d'interférents grâce à une pré-séparation. La Figure I-13 présente le principe de ce couplage.

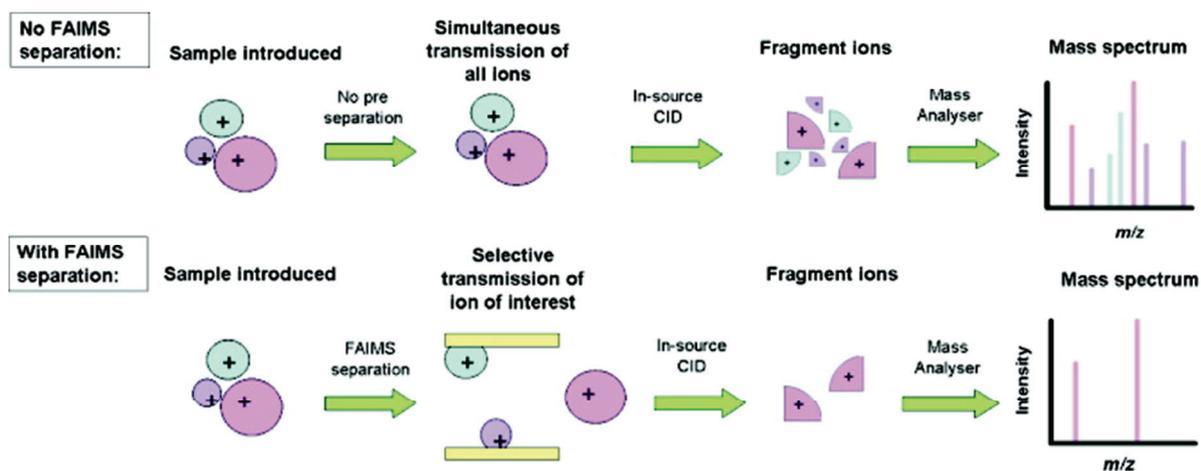


Figure I-13 : principe de l'utilisation du FAIMS pour l'amélioration de la sensibilité lors de la détection d'analyte en spectrométrie de masse ⁸⁷.

Ainsi, le développement en amont de l'analyseur sur les sources d'ionisation ou par l'ajout de module supplémentaire (type FAIMS) apparaît comme un des axes fondamentaux du développement instrumental. Nous allons maintenant discuter des améliorations apportées sur la partie analyseur d'un spectromètre de masse afin d'augmenter la spécificité lors d'analyses qualitatives ou quantitatives.

I.4.2.2 Au niveau de l'analyseur

I.4.2.2.1 Améliorer la résolution

Afin d'améliorer la spécificité de détection de méthodes analytiques usuelles, il est possible d'augmenter la résolution des quadripôles pour ne laisser que les ions ayant le rapport m/z désiré avec une fenêtre de sélection plus sélective que celle généralement utilisée (0.7 Th ou $m/z \pm 0.35$). En effet, si on se rapporte aux courbes de stabilité décrites précédemment (Figure I-9) on peut noter que plus la résolution est haute, meilleure sera la sélection de l'ion et donc, moins d'interférents ayant des rapports m/z proches de l'analyte cible seront détectés. Jemal et Ouyang ont, entre autres, expérimenté cet aspect au début des années 2000 ⁸⁸ pour l'analyse de molécules endogènes en matrice complexe. L'augmentation de la résolution (0.2 Th soit $m/z \pm 0.1$) engendre une baisse de sensibilité en terme d'ions cibles détectés mais la diminution d'interférents abaisse considérablement le bruit. Le rapport signal sur bruit est donc globalement augmenté.

Cependant, lorsque la concentration endogène de biomolécules est très faible (quelques ng/mL), cette méthode n'est plus suffisante. Il est alors possible de rajouter une étape de spécificité supplémentaire.

I.4.2.2.2 Le mode de balayage MRM³

Le Q-trap est un spectromètre de masse hybride couplant deux types d'analyseurs. Le premier analyseur est un quadripôle classique alors que le deuxième est en fait un piège à ions linéaires. Le principe du piège à ions sera détaillé dans le chapitre Chapitre III, dans lequel ce type d'analyseur a été largement utilisé. Le Q-trap peut fonctionner comme un triple quadripôle conventionnel afin de réaliser des expériences SRM classiques mais peut aussi, grâce à son piège, fonctionner en mode *Multiple Reaction Monitoring*³ (MRM³).

Introduit en 2009 par l'équipe de Jérôme Lemoine¹⁰, ce mode de balayage est réalisable sur un Q-trap mais pas sur un simple triple quadripôle. Le fonctionnement de ce mode est le suivant, le premier quadripôle Q1 sélectionne en masse un ion parent qui va être fragmenté dans le deuxième quadripôle q2. Le piège linéaire va ensuite isoler un ion fragment spécifique puis le fragmenter à nouveau. Des ions de deuxième génération sont ainsi générés. Ensuite, un balayage de tous ces ions fragments de deuxième génération est réalisé. Enfin, les ions spécifiques de la molécule étudiée sont sélectionnés puis sommés afin de reconstituer un chromatogramme. Le principe de la MRM³ est montré sur la Figure I-14 :

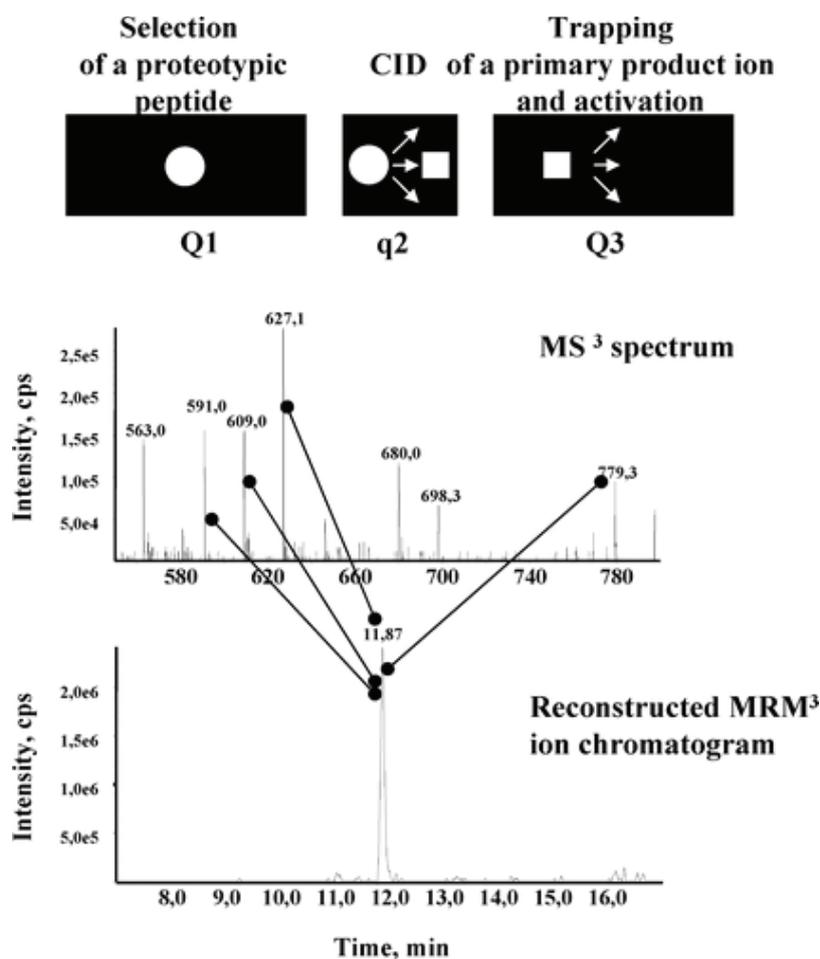


Figure I-14 : Principe de la MRM³,⁵⁹.

Ainsi, une sélectivité en masse supplémentaire est apportée par rapport à la SRM. Le bruit de fond observé en SRM est alors considérablement diminué et le rapport signal sur bruit est lui augmenté. La sensibilité pour la quantification dans des matrices complexes comme le plasma ou le sérum est améliorée comme décrit par la Figure I-15. En SRM, la réponse n'est linéaire qu'à partir de 100 ng / mL alors qu'en MRM³, elle l'est à partir de 50 ng / mL. Pour cette protéine, un gain de sensibilité d'un facteur deux a donc été obtenu. Pour d'autres protéines, un gain d'un facteur cinq peut être obtenu.

Cependant, la MRM³ possède quelques inconvénients majeurs tels que le temps nécessaire pour acquérir un point ou bien la nécessité d'avoir un signal suffisant avant la seconde fragmentation pour obtenir des ions de deuxième génération spécifiques. En effet, de par l'utilisation du piège linéaire, il faut un intervalle de temps d'au minimum 200 ms entre chaque expérience (contre moins de 10 ms pour un triple quadripôle). Ceci peut donc être un frein lorsqu'une quantification multiplexée (plusieurs dizaines de peptides) est envisagée.

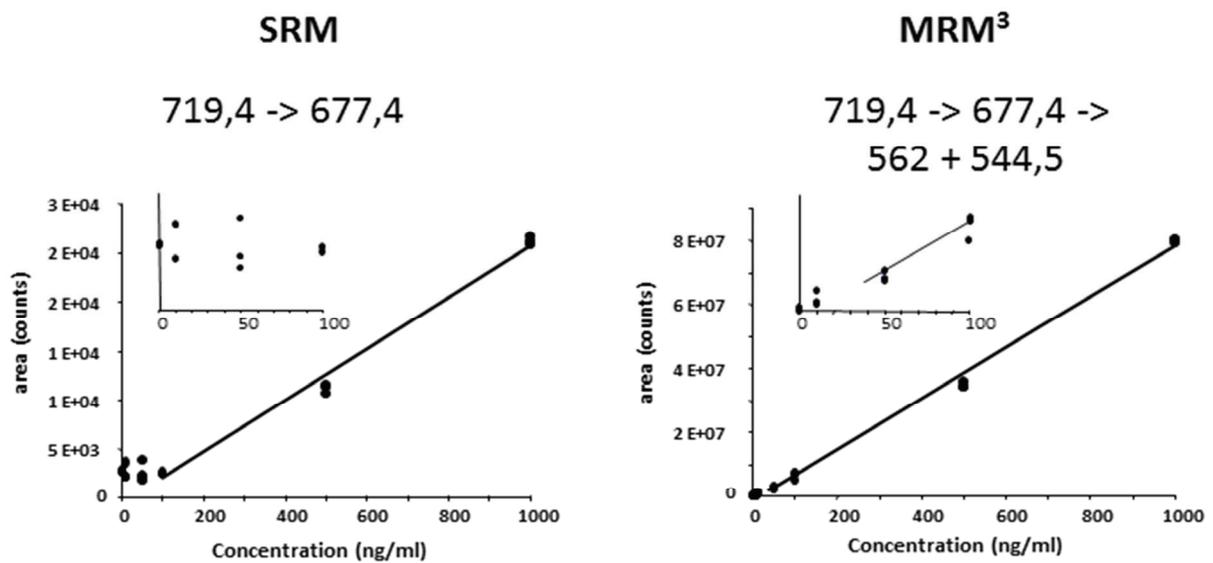


Figure I-15 : Courbes d'étalonnage en SRM et en MRM³ du peptide de la protéine TP 435 dans du sérum de femme entre 0 et 1000 ng / mL,⁵⁹.

I.5 Conclusion

Lors de ce premier chapitre, différentes méthodes de quantification de protéines ont été décrites. Nous avons vu en quoi la spectrométrie de masse pouvait être une alternative crédible aux méthodes classiques basées sur les tests immunologiques. Un des principaux avantages de la spectrométrie de masse vis-à-vis des tests immunologiques reste la possibilité de réaliser des dosages multiplexés de biomarqueurs, c'est-à-dire doser différentes biomolécules lors d'une même analyse.

Cependant, le dosage par spectrométrie de masse n'est pas aussi sensible qu'un dosage immunologique et de nombreuses recherches sont axées sur le développement de nouvelles méthodes plus sensibles. Deux axes principaux sont au cœur de la recherche et du développement analytique. Le premier axe est l'amélioration de la préparation d'échantillon afin de purifier celui-ci et donc de s'affranchir de nombreux interférents avant l'analyse de l'échantillon en LC-MS. Le deuxième axe est le développement de nouveaux instruments plus sensibles. Nous avons vu qu'il était possible de rajouter une étape supplémentaire de fragmentation, avec la MRM³, afin d'améliorer la spécificité de détection. Par ailleurs, l'ajout d'étape de fragmentation ne peut pas être infini, en effet, suite à une nouvelle étape de fragmentation, le signal global détecté est plus faible car dilué sur un grand nombre de fragments. Il apparaît comme intéressant de se focaliser sur l'amélioration de l'étape de fragmentation lors d'une simple analyse SRM. En effet, malgré une double sélection en masse, le processus de fragmentation par dissociation induite par collision n'est lui ni spécifique, ni sélectif. On peut donc envisager de le substituer par un autre processus, plus spécifique afin de ne fragmenter que les ions d'intérêts et ainsi diminuer le nombre potentiel d'interférent.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la photodissociation, technique de fragmentation utilisée en spectrométrie de masse mettant en jeu les propriétés optiques des molécules et ne fragmentant que les molécules pouvant absorber à la longueur d'onde de travail.

Dans le chapitre suivant, nous allons donc nous intéresser à la photodissociation et son implémentation dans les spectromètres de masse.

Chapitre II. Photodissociation et Spectroscopie d'action en phase gazeuse des peptides et protéines

II.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la fragmentation par dissociation par collision n'est pas spécifique et ne permet pas de sélectionner sélectivement les ions que nous souhaitons fragmenter lors de l'analyse. Nous souhaitons donc étudier la possibilité de substituer cette technique par une autre méthode de fragmentation plus spécifique comme la photodissociation.

Ce chapitre est consacré à l'état de l'art de la photodissociation et son application pour la spectroscopie optique en phase gazeuse. Dans un premier temps, nous discuterons des différentes méthodes de fragmentations utilisées en spectrométrie de masse permettant d'étudier la séquence des protéines et peptides. Puis, nous verrons comment une de ces méthodes, la photodissociation peut être appliquée à l'étude des propriétés optiques de ces molécules par spectroscopie d'action optique en phase gazeuse.

II.2 L'utilisation de la spectrométrie de masse pour l'étude de la séquence des protéines et des peptides

Dans le chapitre précédent, nous avons discuté de l'utilisation de la spectrométrie de masse pour la quantification de protéines ciblées bien identifiées. Cependant, pour l'étude et la caractérisation complète d'une protéine nouvelle ou pour son identification à partir d'un échantillon inconnu, la mesure seule de sa masse ne suffit pas. En effet, selon la résolution du spectromètre de masse utilisé, pour un ion d'un rapport masse sur charge (m/z) donné, plusieurs protéines peuvent correspondre. Par exemple, la protéine PSA possède une masse mono-isotopique de 28712.28 Da, or 27 autres protéines du protéome humain (sans compter les éventuelles modifications post-traductionnelles) ont une masse comprise entre 28 710.5 et 28 713.5. Une résolution en masse supérieure à 20 000 est nécessaire pour séparer ces protéines ⁶.

Afin de permettre une meilleure identification de la protéine, la spectrométrie de masse s'appuie sur l'interprétation d'ions fragments. Ces ions fragments sont générés suite à différentes méthodes de fragmentation telle que la dissociation induite par collision (CID), méthode de référence.

II.2.1 Nomenclature des ions fragments des peptides et des protéines

Comme décrit précédemment, une protéine est une succession d'acides aminés liés entre eux par une liaison amide, la liaison peptidique. Par convention, la séquence d'un peptide est donnée de l'extrémité N-terminale (fonction amine libre) à l'extrémité C-terminale (fonction acide carboxylique libre). La fragmentation des peptides et des protéines par spectrométrie de masse peut se produire à deux niveaux différents, soit au niveau du squelette peptidique, soit au niveau de la chaîne latérale des acides aminés. Une nomenclature universelle a été proposée en 1984 par Roepstorff et Fohlman ⁸⁹ puis modifiée par Biemann en 1988 ⁹⁰. Comme présenté sur la Figure II-1, l'appellation du fragment détecté varie selon le lieu de rupture au niveau de la liaison peptidique, la localisation de la charge et le nombre d'acides aminés restant.

Ainsi, un fragment chargé contenant l'extrémité N-terminale du peptide précurseur fera partie des séries a, b ou c ; alors qu'un fragment contenant l'extrémité C-terminale du peptide précurseur, fera partie des séries x, y ou z. Ensuite, en fonction de la liaison rompue, avant, au milieu ou après le groupement amide, la structure de l'ion fragment varie. Chaque type de fragmentation est défini par une série d'ion : a (ou x), b (ou y), c (ou z) (Figure II-1). Enfin, le numéro associé, en indice, correspond au nombre de résidus d'acides aminés composant le fragment. A noter que pour le mode négatif, aucune nomenclature universelle n'existe, c'est donc celle du mode positif qui est utilisée ^{91, 92}. A noter, que d'autres fragments, provenant de la fragmentation des chaînes latérales peuvent également être détectés. Ces fragments sont appelés ions immoniums.

Le type de fragments observés suite à la fragmentation dépend de deux paramètres. Le premier est l'état de charge de l'ion précurseur. Le deuxième est la méthode d'excitation des ions (CID, dissociation induite par photons infrarouges ou IRMPD, dissociation induite par photo-détachement d'électron activé ou a-EPD, dissociation induite par détachement d'électron ou EDD...). Un bref récapitulatif de certaines techniques de fragmentation est proposé ci-dessous.

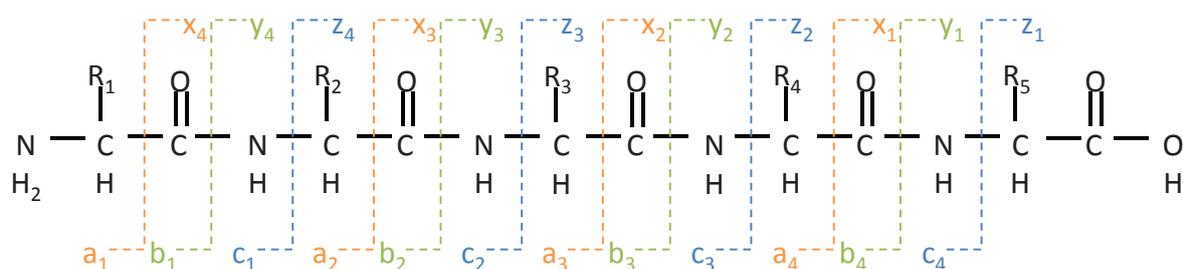


Figure II-1 : nomenclature de la fragmentation peptidique

II.2.2 Dissociation induite par collision (CID)

La CID est la méthode de fragmentation la plus courante. Il s'agit d'une technique d'activation vibrationnelle par chauffage. Elle est disponible sur la plupart des spectromètres de masse commerciaux. La fragmentation est réalisée dans une cellule de collision pré-remplie d'un gaz inerte, généralement de l'Hélium ou de l'Azote (Figure II-2). Les processus de cette technique sont décrits dans un article de R. G. Cooks⁹³.

Pour permettre la fragmentation des ions précurseurs, ils doivent subir une activation, c'est-à-dire une augmentation de leur énergie interne, de manière à provoquer leur décomposition. Plusieurs méthodes existent pour activer les ions par collision. La plus courante consiste à faire entrer en collision les ions avec des molécules de gaz. Les ions sont accélérés et injectés dans une cellule de collision. Suite à cette accélération, les ions ont une énergie cinétique importante, la collision avec le gaz inerte va donc engendrer, par transfert collisionnel ($E_{\text{cinétique}} - E_{\text{interne}}$), la dissociation de l'ion précurseur en ions fragments. Cette technique est celle utilisée dans les instruments de type triples quadripôles décrits précédemment.

Une autre technique consiste à piéger les ions dans un piège à ions rempli de gaz puis à les exciter par radiofréquence. Suite à l'excitation, de nombreuses collisions avec le gaz inerte se produisent et permettent d'augmenter l'énergie progressivement l'énergie interne de l'ion précurseur jusqu'à le fragmenter. Cette méthode est donc utilisée dans les pièges à ions^{94, 95}.

L'avantage de la première méthode est la possibilité de régler l'énergie cinétique apportée à l'ion lors de son accélération. Cette énergie est de l'ordre de la dizaine d'électrons volts.

Les spectres de masse obtenus suite à la fragmentation CID, en basse énergie (de l'ordre de la dizaine d'eV), génèrent principalement des ions fragments de séries b et y. A noter qu'il existe également un régime de CID haute énergie (énergie de l'ordre du kiloélectronvolt) ⁹⁶. Cette technique permet d'observer des types de fragmentations nécessitant de grandes énergies d'activation telles que la fragmentation des chaînes latérales (ions *d*, *w* et *v*) ou la fragmentation à distance, pour laquelle la rupture de la liaison n'est pas adjacente à la localisation de la charge. Nous noterons également la possibilité de fragmentations consécutives. Elle n'a pas été utilisée durant cette thèse.

Un des principaux inconvénients de la CID est la limitation de l'énergie transférée à l'ion et donc la limitation de son degré de fragmentation. D'autres approches consistent à remplacer le gaz soit par un faisceau d'électrons, soit par de photons. Dans un premier temps, nous allons voir une autre méthode d'excitation vibrationnelle mettant en jeu un faisceau de photons infrarouge.

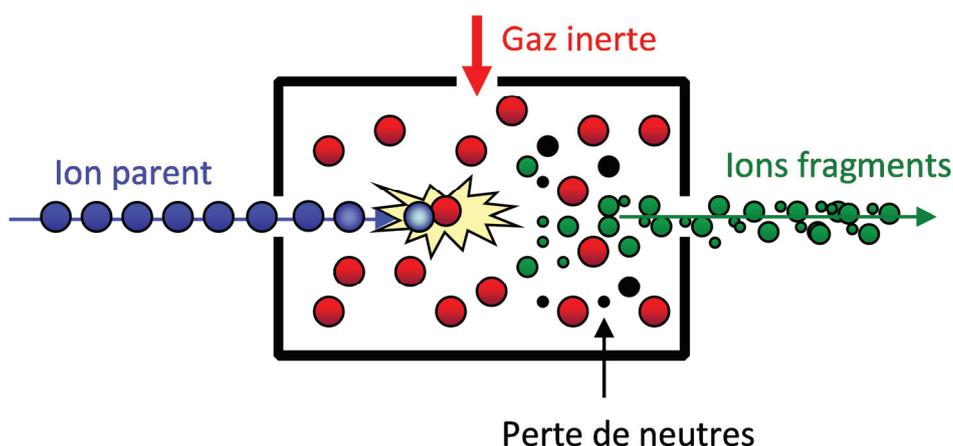


Figure II-2 : Principe de la dissociation induite par collision

II.2.3 Dissociation induite par des photons infrarouges (IRMPD)

La dissociation induite par des photons infrarouges consiste en l'excitation des ions avec un laser IR (IRMPD : *infrared multiphotons dissociation*) ^{97,98}. L'énergie des photons est d'environ 0.1 eV alors que l'énergie de dissociation de l'édifice moléculaire selon la voie la plus basse est typiquement de 1 à 2 eV. C'est l'absorption de plusieurs photons infrarouges qui permet d'accumuler suffisamment d'énergie pour mener à la fragmentation. On parle alors de processus multiphotonique.

Afin d'obtenir des temps d'irradiation suffisamment longs pour avoir une bonne fragmentation, cette technique est généralement implantée dans des pièges à ions ou des spectromètres de masse à résonance cyclotronique d'ion (FT-ICR)^{99,100}.

Dans le cas d'une excitation vibrationnelle, l'énergie se répartit de façon statistique sur l'ensemble des modes de vibration du système. Ainsi, si un canal de fragmentation est beaucoup plus bas en énergie que les autres, ce canal sera ouvert préférentiellement et conduira principalement à l'observation d'un seul type de fragmentation. Peu d'informations sur la séquence d'une protéine pourront alors être obtenues. Afin de compléter les informations obtenues suite aux fragmentations CID ou IRMPD, des méthodes d'activation alternatives ont été développées.

II.2.4 La photo-excitation par laser UV-Visible

Entre la fin des années 1990 et le début des années 2000, de nombreux groupes de recherche ont travaillé sur de nouvelles méthodes de fragmentation avec l'avènement de la haute résolution en spectrométrie de masse. Ces nouvelles techniques mettent généralement en jeu une activation électronique. Mc Lafferty fut un des pionniers en développant la fragmentation induite par capture d'électron (ECD) en 1998¹⁰¹⁻¹⁰³. Cette technique a été suivie par la fragmentation induite par transfert d'électron (ETD) développée par le groupe de Hunt en 2004^{104,105}. Ces deux méthodes permettent de générer des séries d'ions fragments différentes de celles générées par la CID avec des fragments de type c et z. En 2001, Zubarev développa une méthode de fragmentation par dissociation induite par détachement d'électron (EDD) pour l'analyse de polyanions¹⁰⁶. Par ailleurs, avec l'émergence de nouvelles sources de lumières, le développement de techniques de photodissociation par excitation optique a lui aussi été un axe majeur de recherche. La photodissociation par absorption de photons UV (UVPD) à 193 nm fut introduite par le groupe de Bowers en 1984¹⁰⁷ dans un spectromètre de masse à transformé de Fourier. Depuis, plusieurs groupes travaillent dans le domaine de l'UV en excitant les chromophores des chaînes latérales des acides aminés¹⁵. De plus, de nombreuses équipes de recherche travaillent également sur l'UVPD avec des lasers allant de l'ultra-violet du vide (*Vacuum Ultra-violet*, VUV) comme le groupe de Reilly à 157 nm^{13,108,109} et 193 nm¹¹⁰⁻¹¹², de Brodbelt à 193 nm^{113,114} ou de Clemmer à 168 nm¹¹⁵ au proche-UV. Parmi ces groupes de recherche, celui de Philippe Dugourd a mis au point une nouvelle méthode de fragmentation nommée la dissociation par photo-détachement d'électron activée (a-EPD) pour la fragmentation des protéines et peptides¹¹⁶.

Durant ma thèse, je me suis fortement intéressé à la photodissociation UVPD et a-EPD. Nous allons donc décrire en détails ces méthodes. Nous décrivons ensuite brièvement l'EDD que nous avons comparé à l'a-EPD lors d'une collaboration¹¹⁷.

II.2.4.1 Principe de la Photodissociation induite par laser

La dissociation induite par des photons, également appelée dissociation induite par lasers (LID), consiste en l'excitation d'ions d'intérêt avec un laser. Dans le visible et aux longueurs d'ondes inférieures, cette méthode permet d'activer les états électroniques excités des molécules, orbitales moléculaires¹¹⁸⁻¹²⁰.

Pour que les molécules soient excitées électroniquement, elles doivent absorber à la longueur d'onde du laser. Les énergies permettant d'exciter les transitions électroniques sont les énergies correspondant aux photons émis dans les domaines de l'ultra-violet du vide (*Vacuum Ultra-violet*, ou VUV), l'ultra-violet (UV) et le visible (Figure II-3).

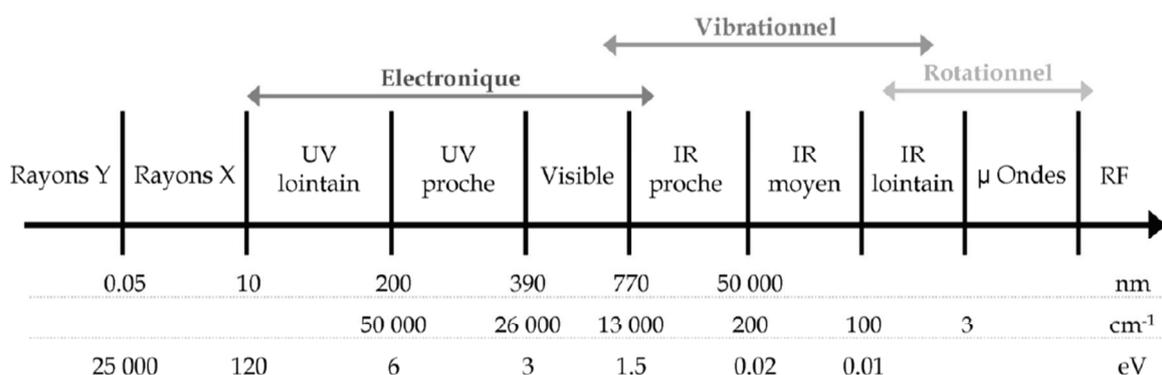


Figure II-3 : domaine spectral électromagnétique avec les états électroniques, vibrationnels et rotationnels et leurs correspondances en énergie¹²¹.

Pour le cas simple d'une molécule diatomique, la Figure II-4 représente l'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ par un état électronique fondamental ψ_0 d'énergie E_0 jusqu'à un état excité ψ_1 d'énergie E_1 . Avec $E_1 - E_0 = h\nu$. Les orbitales moléculaires se différencient en trois catégories :

- Orbitales liantes : une orbitale telle que, si on la considère initialement vide et qu'on y dépose un électron puis deux électrons, la liaison A-B devient plus forte (plus difficile à rompre), orbitale constructive.
- Orbitales anti-liantes : orbitale telle que, si on la considère initialement vide, et qu'on y dépose un puis deux électrons, la dite liaison A-B en est affaiblie (plus facile à rompre), orbitale destructive.
- Orbitales non-liantes : orbitale telle que, si on la considère initialement vide, et qu'on y dépose un puis deux électrons, la dite liaison A-B n'est ni affaiblie, ni renforcée.

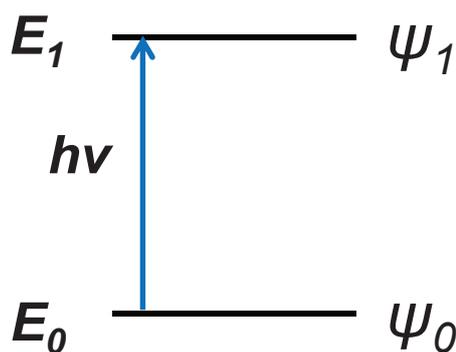


Figure II-4 : transition d'un état électronique stable ψ_0 à un état excité ψ_1 .

La transition d'un état fondamental vers un état excité peut être décrite par l'excitation d'une orbitale liante, dite occupée, vers une orbitale non-liante, dite virtuelle. Dans le modèle simple d'une molécule diatomique, si l'énergie apportée par le photon est telle qu'elle permet de passer d'un état fondamental ψ_0 à un état excité non lié ψ_1 , la molécule va se dissocier. Dans le cas de molécules plus complexes, les surfaces de potentiels sont à $3N-6$ degrés de liberté (avec N nombre d'atomes). La dynamique sur l'absorption des états électroniques excités peut être complexe conduisant à différents mécanismes de relaxation.

Comme nous l'avons décrit précédemment, plusieurs types de lasers sont utilisés pour l'UVPD. Les lasers émettant dans le VUV (150 - 220 nm) permettent d'exciter, entre autres, toutes les liaisons amides du squelette peptidique sans aucune dérivation^{108, 109, 114, 122, 123}. Dans l'UV proche (220 - 400 nm), seuls les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine ou l'histidine peuvent absorber l'énergie des photons^{12, 124}.

Aux longueurs d'onde inférieures à 260 nm, la plupart des électrons des liaisons π des peptides peuvent être excités et, en mode positif, de nombreuses fragmentations du squelette peptidique sont observées mais également des ions fragments de type v et w , non observées en CID basse énergie. Pour les ions négatifs, comme nous allons le voir avec la gramicidine, il y a compétition entre la photo-fragmentation de l'ion et le photo-détachement d'électron. Le VUV a également été utilisé en photo-fragmentation pour différentes études réalisées sur les oligonucléotides¹²⁵ et les oligosaccharides^{123, 126-129} et l'identification de fragments différents de ceux observés en CID conventionnelle.

II.2.4.2 Photodissociation à 220 nm d'un peptide, la gramicidine

Le processus de relaxation, suite à l'excitation laser, est propre à l'état de charge de l'ion irradié. Nous allons discuter de ces processus de relaxation avec un peptide modèle, la gramicidine. La gramicidine est un peptide contenant 15 acides aminés, dont des tryptophanes, ce qui lui confère

une bonne absorbance dans le domaine de l'UV. Par ailleurs, ses canaux de fragmentations ont déjà été étudiés et sont bien connus^{14, 130, 131}.

La Figure II-5 présente les spectres de masse MS/MS-CID et MS/MS-UVPD obtenus suite à l'analyse du cation $[M+2H]^{2+}$ et de l'anion $[M-2H]^{2-}$ de la gramicidine.

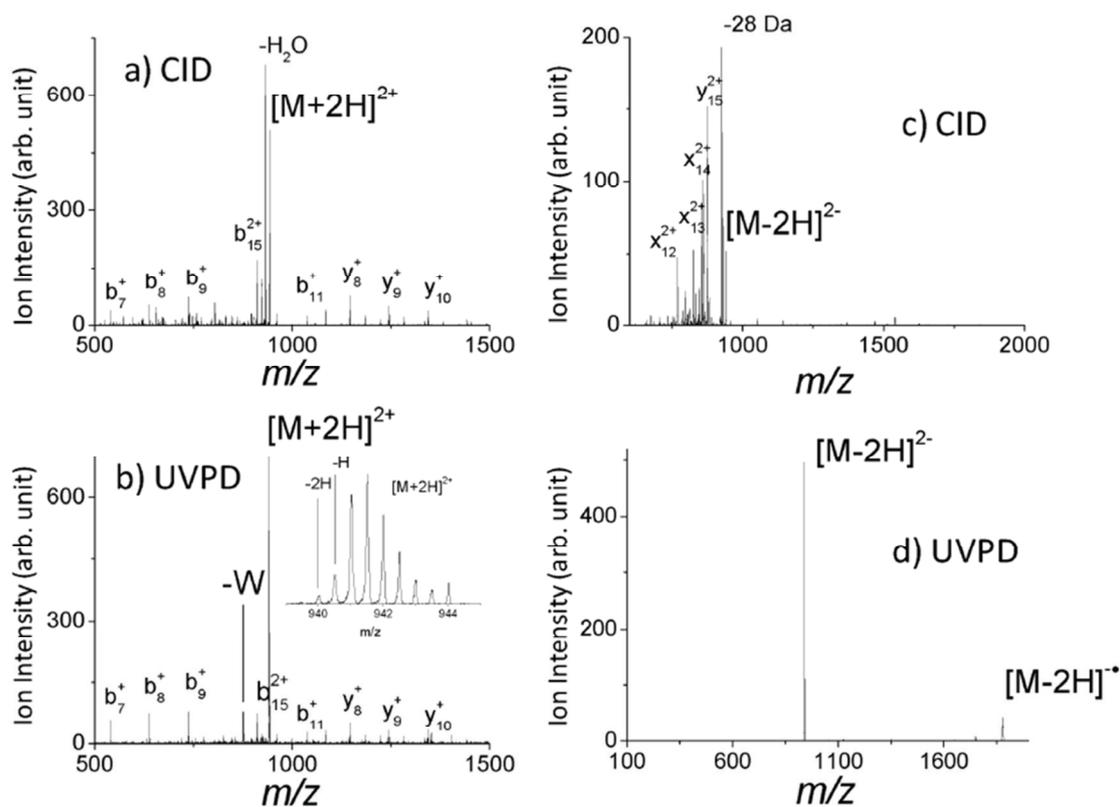


Figure II-5 : spectres (a) MS/MS-CID et (b) MS/MS-UVPD (à 220 nm) enregistrés suite à l'analyse du cation $[M + 2H]^{2+}$ de la gramicidine. Spectres (c) MS/MS-CID et (d) MS/MS-UVPD (à 260 nm) enregistrés suite à l'analyse de l'anion $[M - 2H]^{2-}$ de la gramicidine. L'insert (b) montre la distribution isotopique de l'ion précurseur $[M + 2H]^{2+}$ après irradiation UV¹².

En mode positif, le spectre de masse MS/MS-CID du cation $[M+2H]^{2+}$ (Figure II-5a) montre des ions fragments provenant des séries b et y ainsi qu'une perte d'eau. Le spectre de masse MS/MS-UVPD enregistré à une longueur d'onde d'irradiation de 220nm (Figure II-5b) montre les mêmes séries d'ions fragments b et y mais aussi la perte de la chaîne latérale du tryptophane (-W). De plus, l'insert de la Figure II-5b montre des pertes d'hydrogènes, engendrées par l'irradiation laser, visibles sur le massif isotopique de l'ion précurseur. Ces différents mécanismes sont décrits dans la Figure II-6. Suite à l'excitation électronique (absorption d'un photon d'énergie $h\nu_o$ correspondant à la différence d'énergie entre deux états, état fondamental ψ_0 et état excité ψ_1), le cation peut se désexciter de différentes manières. La première possibilité est l'émission de lumière sous forme de fluorescence (émission d'un photon d'énergie $h\nu_e$). La deuxième possibilité est la fragmentation à partir de l'état

électronique excité ψ_1 . Ce mécanisme de fragmentation ayant lieu sur une surface d'énergie potentielle différente de l'état fondamental, il peut entraîner des fragments spécifiques, fragments non détectés en CID. Enfin, pour le troisième mécanisme qui est le plus souvent rencontré chez les biomolécules, la relaxation du système peut se faire par conversion interne (IC) conduisant alors à une reconversion de l'énergie électronique en énergie vibrationnelle. Cette énergie est redistribuée sur l'ensemble des modes de vibrations du système par un processus IVR (*Internal Vibrational Redistribution*, IVR). Si cette énergie est suffisante, elle entraîne une fragmentation de la molécule. Les fragments ainsi obtenus sont similaires à ceux détectés par CID.

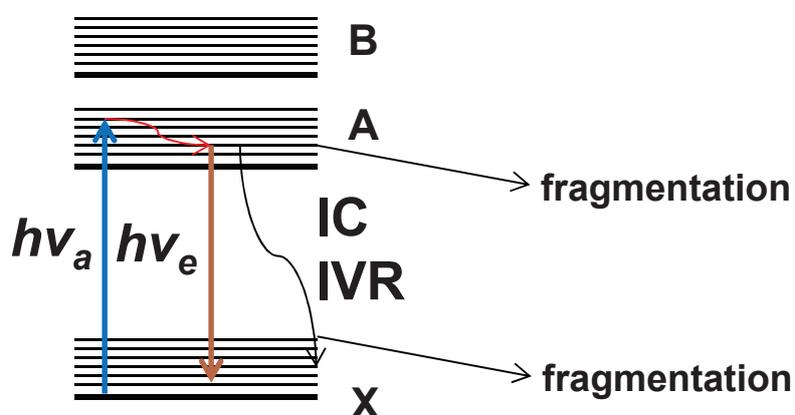
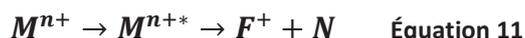


Figure II-6 : relaxation d'un cation suite à l'excitation électronique

En mode négatif, le spectre de masse MS/MS-CID de l'anion $[M-2H]^{2-}$ (Figure II-5c) montre un ion fragment majoritaire, -28 Da, correspondant à la perte d'une molécule de CO. Des ions y et x sont aussi présents. Le spectre de masse MS/MS-UVPD de l'anion $[M-2H]^{2-}$ (Figure II-5d) montre un seul ion produit généré correspondant au détachement d'un électron à partir du précurseur. Différents modes de relaxation sont aussi possibles pour les anions (Figure II-7). Les mécanismes de fragmentation à partir de l'état excité et suite à la redistribution de l'énergie électronique en énergie vibrationnelle sont aussi présents pour les anions. Cependant, l'excitation électronique du système peut également conduire au photo-détachement d'un électron. Pour que ce processus ait lieu, il faut que l'énergie du photon soit supérieure à l'énergie de liaison de l'électron le moins lié sur l'ion précurseur. Le mécanisme d'émission est très rapide et malgré la compétition avec les autres, celui-ci l'emporte la plupart du temps.



Deux processus de détachement d'électron sont possibles. Le premier consiste en un transfert direct depuis l'état fondamental vers le continuum (énergie de l'ion oxydé plus énergie cinétique de l'électron émis). La conservation de l'énergie doit donc prendre en compte l'énergie cinétique de l'électron. Si l'énergie du photon d'excitation augmente, le taux de détachement d'électron va augmenter dû à l'augmentation des transitions possibles. Le deuxième processus nécessite une excitation résonnante de l'état fondamental vers un état excité de l'ion précurseur. Si l'état excité croise un état auto-ionisant, il est alors possible d'observer le détachement d'un électron depuis cet état vers le continuum. Ce dernier mécanisme va donc se produire lorsque l'état excité peut être atteint de façon résonnante suite à l'irradiation avec le laser à une longueur d'onde donnée. Ceci dépendra donc directement de l'absorbance de la molécule cible.

Par ailleurs, il est important de noter que cet état du continuum est aussi accessible pour les cations, cependant il l'est plus facilement pour les molécules anioniques. En effet, l'énergie de liaison d'un électron sur un système protéine ou peptidique chargé négativement est de l'ordre de 0-3 eV alors que l'énergie à fournir pour atteindre le seuil d'ionisation d'un cation est de l'ordre de 10 eV.

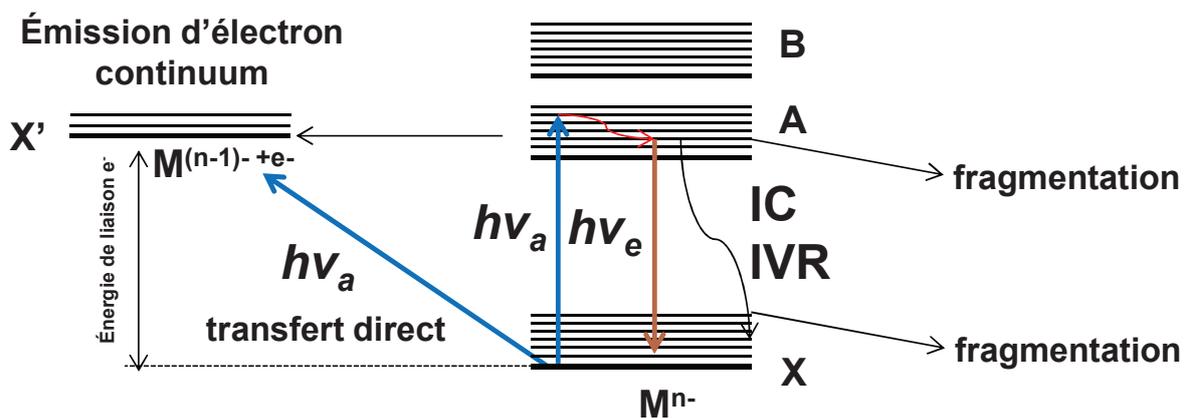


Figure II-7 : relaxation d'un anion M^{n-} suite à l'excitation électronique.

Par ailleurs, il est important de noter que les protéines ne sont pas les seules biomolécules ayant été étudiées en phase gazeuse. Différentes études ont été réalisées sur des brins d'ADN^{132, 133}, des polysaccharides^{134, 135} ou des polymères synthétiques^{136, 137}.

Il est intéressant de noter que la photodissociation des polyanions d'oligosaccharides se traduit généralement par des voies de fragmentations internes contrairement aux protéines et à l'ADN pour lesquelles le canal de relaxation principal est le détachement d'électron. La Figure II-8 montre que suite à l'irradiation laser à 220 nm d'un oligosaccharide anionique, le canal de relaxation principal n'est plus le photo-détachement d'un électron mais bien la fragmentation intramoléculaire¹³⁵.

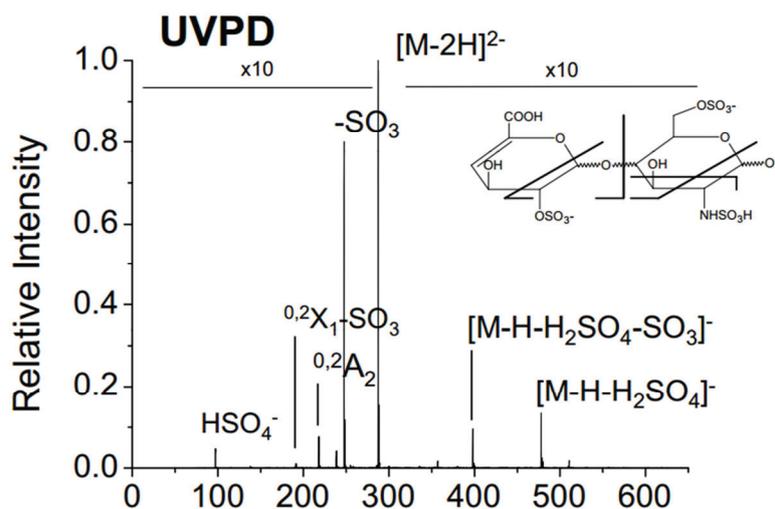
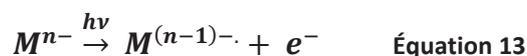


Figure II-8 : spectre MS/MS-UVPD de photo-fragmentation à 220 nm d'un dianion disaccharide ¹³⁵.

II.2.4.3 Utilisation du photo-détachement d'électron pour l'étude de la séquence de peptides, activated-EPD

Le photo-détachement d'un électron suite à l'irradiation laser dans l'UV d'un polyanion se traduit par la formation d'une espèce chargée négativement portant un radical. L'énergie emmagasinée par l'ion suite au détachement d'électron étant souvent très faible (< 1 eV), il n'y a pas de fragmentation induite automatiquement comme on peut le voir sur la Figure II-5d.

Cependant, il est possible d'activer cet ion radicalaire par CID afin de lui apporter l'énergie suffisante qui va pouvoir engendrer sa dissociation. Cette méthode de fragmentation est la dissociation par photo-détachement d'électron activée (a-EPD) ¹¹⁶. La fragmentation engendrée par cette méthode apporte un bon recouvrement de séquence, complémentaire aux autres techniques. Le principe de cette technique développée dans le groupe de Philippe Dugourd est décrit ci-dessous :



Il existe d'autres méthodes mettant en œuvre le détachement d'électron servant à étudier la séquence des protéines. Parmi elles, la dissociation par détachement d'électron (EDD) a fait l'objet d'une comparaison avec l'a-EPD. L'EDD consiste en l'irradiation de poly-anions par des électrons d'énergie supérieure à 10 eV. La première expérience réalisée en 2001 a été faite sur un peptide dianionique. Les électrons utilisés sont suffisamment énergétiques pour ioniser l'anion en créant un radical stable avec pertes de CO₂. Parallèlement, la création d'une charge positive radicalaire, *hole*,

est obtenue. Cette charge est mobile et la recombinaison exothermique de celle-ci avec une charge négative portée par le système entraîne une excitation électronique et la rupture des liaisons peptidiques¹⁰⁶.

La Figure II-9 présente une comparaison de trois expériences de fragmentation différentes réalisées sur un même peptide antibactérien, le MccJ25. La première, Figure II-9a, montre un spectre de masse de l'espèce dichargée $[M-2H]^{2-}$. Un ion fragment majoritaire radicalaire $[M-2H]^{1\cdot-}$ est visible, cet ion correspond au détachement, à partir de l'ion précurseur, d'un électron. De plus, des ions de séries *a* et *x* ainsi que des pertes de CO₂ sont détectés. La Figure II-9b montre la réactivation par CID de l'ion fragment radicalaire $[M-2H]^{1\cdot-}$. Des ions fragments de deuxième génération identiques à ceux de première génération apparaissent et sont détectés (ions C₁₄ et ion a'₁₄). Maintenant, si l'on regarde la Figure II-9c et le spectre de masse enregistré suite à l'analyse a-EPD du peptide d'intérêt, des pertes de neutres non visibles suite aux analyses EDD sont détectées en a-EPD. De plus, l'ion fragment a₁₉ est bien plus abondant que celui détecté en EDD. Ceci peut s'expliquer par la déprotonation de la tyrosine 19 de la chaîne peptidique, tyrosine absorbant à 266 nm. Cette hypothèse est soutenue par la détection de la perte d'une molécule de C₇H₆O correspondant à la chaîne latérale de la tyrosine.

Ainsi, l'a-EPD est une technique analytique émergente permettant d'apporter des informations complémentaires par rapport aux autres techniques de dissociations existantes, et similaire à l'EDD.

Bien évidemment, pour qu'une molécule puisse photo-détacher suite à l'irradiation laser, il est nécessaire que cette molécule absorbe à la longueur d'onde du laser. Pour cela, de nombreuses études de spectroscopies sont réalisées afin de déterminer les gammes d'absorbances, donc les propriétés optiques, des peptides et des protéines.

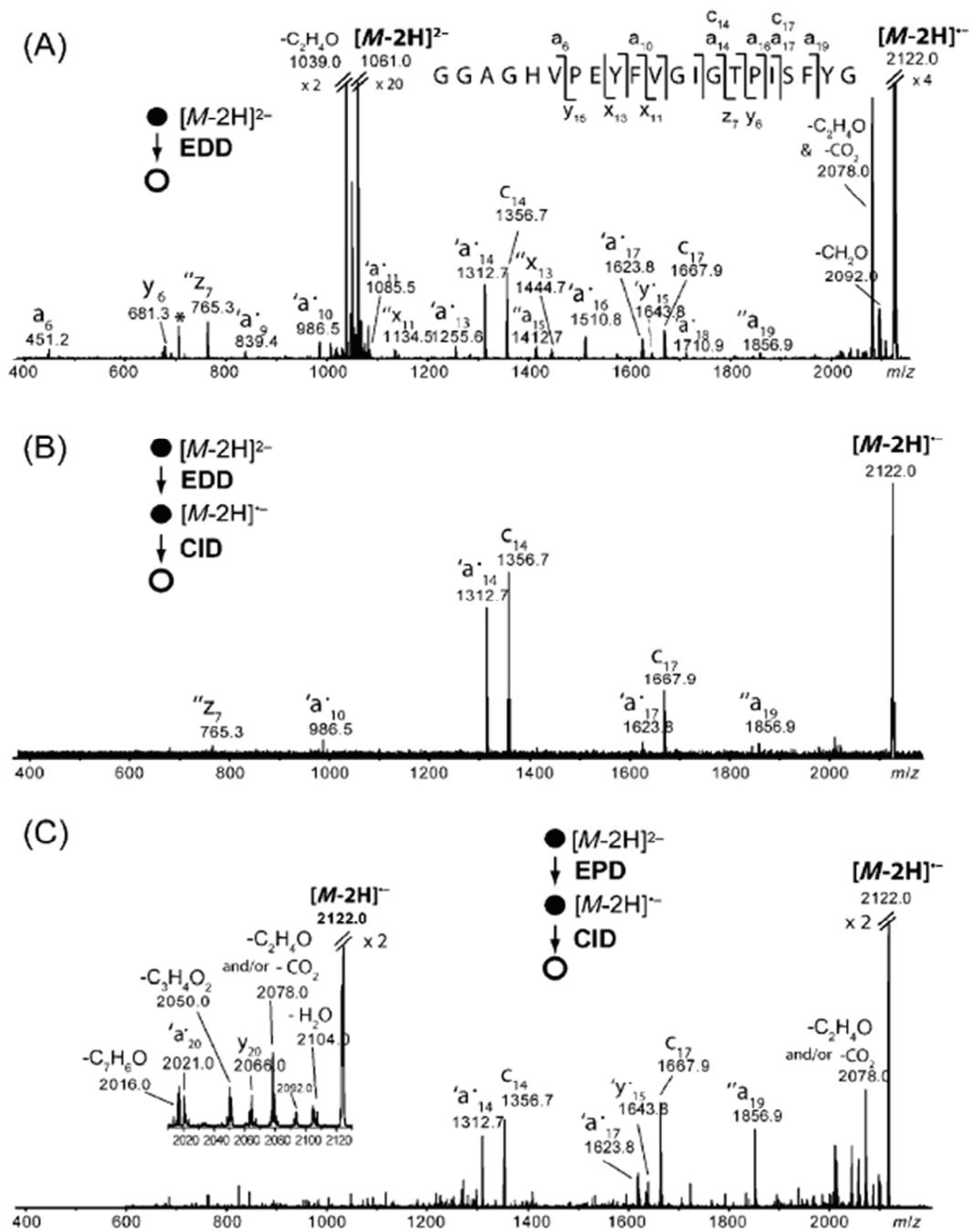


Figure II-9 : spectres de masse MS/MS-EXD de l'ion $[M-2H]^{2-}$ du MccJ25 (m/z 1061.0) : A) EDD, B) ac-EDD, and C) a-EPD à 266 nm. Les * montrent les harmoniques du FT¹¹⁷.

II.3 Caractérisation des propriétés optiques des protéines par spectroscopie d'action

Afin de déterminer les propriétés optiques d'une protéine pour l'application de la photodissociation, il est nécessaire de mesurer son absorbance par spectroscopie d'action.

Le terme de spectroscopie d'action traduit une technique que l'on pourrait qualifier de spectroscopie indirecte. Contrairement à une mesure d'absorption en solution suivant la loi de Beer-Lambert, la densité des ions présents dans un piège ionique est trop faible pour permettre de mesurer une éventuelle variation d'intensité de la source d'excitation laser passant au travers du nuage d'ions. On ne va donc pas mesurer directement l'absorption mais l'apparition d'un événement produit suite à l'absorption des photons. Ainsi, l'activation, ou excitation, par irradiation laser d'ions piégés en phase gazeuse doit conduire à l'apparition de nouvelles espèces ioniques résultantes de la fragmentation des ions. Cette fragmentation, spécifique de la nature des photons incidents, lorsqu'elle est observée, peut être corrélée à l'absorption de la molécule d'intérêt. Ainsi, si la molécule absorbe dans le domaine d'énergie correspondant aux photons de la source laser, son énergie interne va augmenter. Si cette augmentation est suffisante, il est alors possible d'atteindre le seuil de dissociation entraînant la photodissociation de la molécule. Le spectre de fragmentation ou de dissociation d'une molécule est ensuite enregistré pour une longueur d'onde donnée puis, suite à un changement de longueur d'onde, un nouveau spectre est enregistré. Une fois la gamme de longueur d'onde balayée, un rendement de dissociation en fonction de la longueur d'onde est retracé. Nous nous intéresserons principalement à trois domaines de longueurs d'ondes, l'ultra-violet (UV), le visible et l'ultra-violet du vide (*Vacuum Ultra-Violet*, VUV)¹² dans lesquels les propriétés optiques des protéines ont été étudiées par spectroscopie d'action.

II.3.1 Principe et fonctionnement

Lors de l'irradiation d'anions avec une lumière UV-Vis, plusieurs processus sont en concurrence, le photo-détachement et la photo-fragmentation. Ces deux mécanismes de photodissociation peuvent être utilisés comme sonde pour enregistrer des spectres d'action en phase gazeuse de larges systèmes comme les protéines et les oligosaccharides. L'absorption relative de la molécule peut ainsi être détectée en mesurant l'action du laser sur la molécule cible par spectrométrie de masse. Le spectre d'action est obtenu en traçant le taux de photodissociation de l'ion d'intérêt corrigé du flux de photons ($\Phi \propto \lambda P$) en fonction de la longueur d'onde du laser selon l'équation :

$$\ln \frac{(I_{parent} + I_{fragment})}{I_{parent}} / (\lambda * P) \quad \text{Équation 15}$$

Avec I_{parent} , l'intensité de l'ion parent ; $I_{fragments}$, l'intensité de ou des ions fragments/ions produits formés ; λ , la longueur d'onde et P , la puissance du laser pour une longueur d'onde donnée.

II.3.2 Spectroscopie d'action dans le domaine de l'UV

La spectroscopie UV permet d'étudier les excitations électroniques des biomolécules entre 220 et 400 nm. Dans le cas des protéines et des peptides, les principales sources d'absorption sont les chaînes latérales des acides aminés aromatiques et leurs chromophores (transitions $\pi\pi^*$ à 257.4 nm pour la phénylalanine, 274.6 nm pour la tyrosine et 279.8 nm pour le tryptophane...) ¹³⁸ (Figure II-10).

Historiquement, le premier spectre optique en phase gazeuse d'acide aminé a été enregistré par le groupe de Levy en 1985 ¹³⁹. Ensuite, Schlag et al. ont utilisé différents lasers pour étudier les mécanismes de transfert de charge et la dynamique de relaxation d'acides aminés neutres ¹⁴⁰. La spectroscopie de peptide et de protéine en piège à ions a été implémentée dans un premier temps par McLafferty dans un analyseur à résonance cyclotronique d'ion à transformé de Fourier (FT-ICR). Ce spectromètre de masse était couplé à un oscillateur optique Infrarouge (IR) ^{11, 141}.

Ces travaux ont été suivis par de nombreuses études. Les premiers spectres optiques en phase gazeuse réalisés par le couplage de la spectroscopie optique UV et de la spectrométrie de masse dans un piège ionique ont été publiés au milieu des années 2000 ¹⁴²⁻¹⁴⁴. Par exemple, l'équipe de Philippe Dugourd a publié le spectre optique du tryptophane protoné entre 215 et 320 nm, analyse réalisée dans un piège à ion 3D. Cette analyse a ainsi permis de comparer le spectre optique en phase gazeuse du tryptophane avec celui de la phase liquide et un décalage d'un maximum d'absorbance vers les basses longueurs d'ondes a été observé.

Ce type d'expérience a ensuite été étendu aux peptides et protéines ^{124, 145, 146} et les résultats obtenus ont confirmé que les voies de relaxation des peptides et protéines après absorption d'un photon UV dépendent fortement de la nature de la charge, donc du mode d'ionisation. Les deux modes d'ionisation pouvant être utilisés pour enregistrer des spectres d'action en phase gazeuse, le retraitement de l'information sera fait de manière différente. Pour les cations, c'est le taux de fragmentation qui sera étudié alors que pour les anions, il s'agira du taux de photo-détachement.

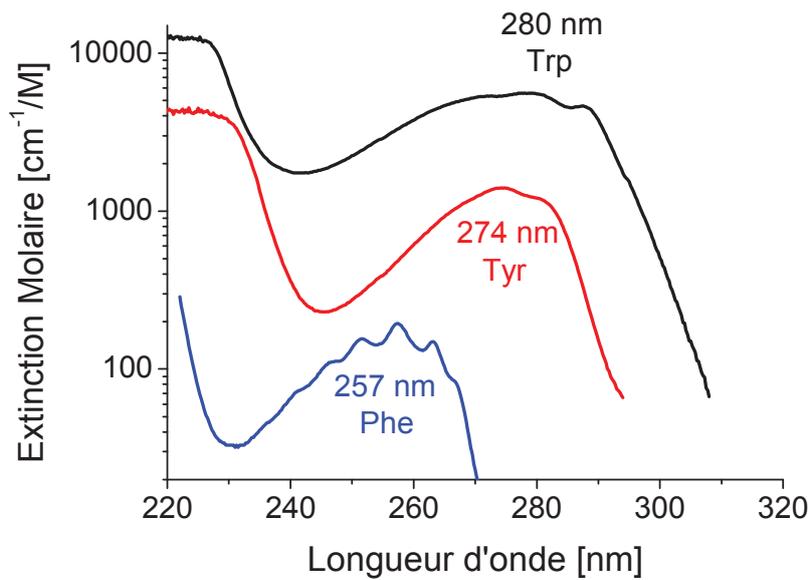


Figure II-10 : spectre d'absorption des acides aminés aromatiques dans l'ultraviolet à pH 7 dans un tampon phosphate

Spectroscopie optique d'une protéine dans l'UV, cas de l'insuline

Une étude réalisée par Laure Joly démontre que l'absorbance des protéines, telle que l'insuline, provient principalement des acides aminés aromatiques présents¹⁷. Pour cela, le spectre d'action en phase gazeuse de la tyrosine protonée $[\text{Tyr}+\text{H}]^+$ a été comparé à celui de l'anion quatre fois déprotonés de l'insuline $[\text{M}-4\text{H}]^{4-}$ (Figure II-11).

Le spectre d'action de l'insuline $[\text{M}-4\text{H}]^{4-}$ montre une bande d'absorption centrée à 275 nm. Cette bande est similaire à celle visible sur le spectre optique de la tyrosine protonée (Figure II-11a). L'absorbance est donc majoritairement due aux excitations π du chromophore neutre de la tyrosine.

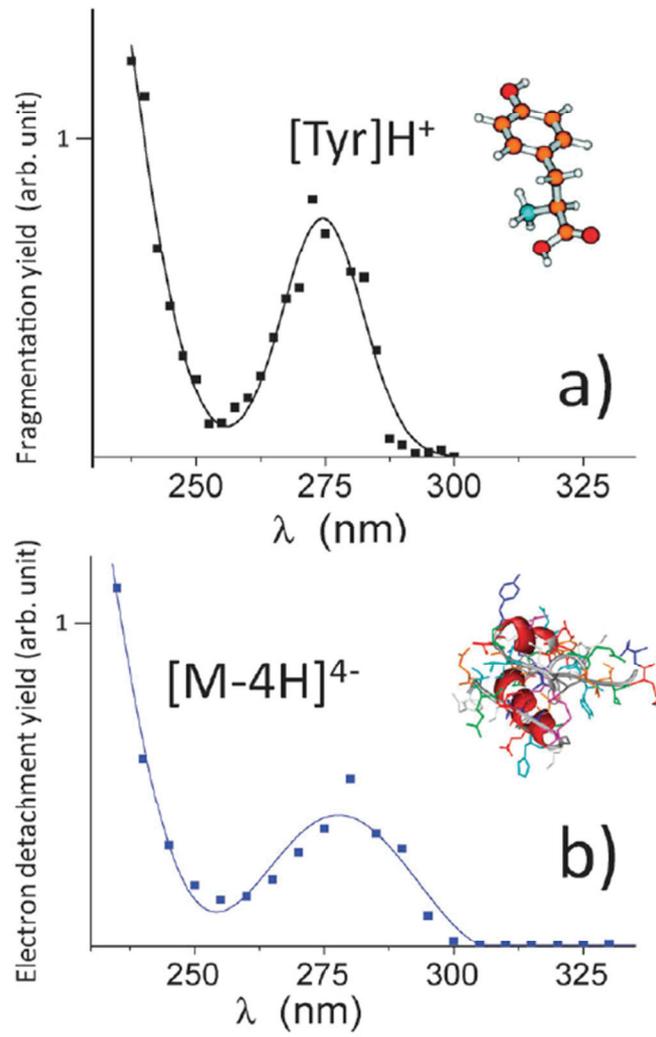


Figure II-11 : a) taux de photo-fragmentation de la tyrosine $[M+H]^+$ et de b) l'insuline $[M-4H]^{4-}$ en fonction de la longueur d'onde¹².

II.3.3 Spectroscopie d'action dans le domaine du visible

De plus, il existe des protéines, telles que les métalloprotéines, qui absorbent dans le domaine du visible grâce à des propriétés optiques particulières. Ces protéines possèdent des chromophores différents de ceux présents sur les acides aminés. Afin d'étudier ces propriétés particulières, la spectroscopie d'action a été étendue aux longueurs d'onde du visible.

Une Hémoprotéine, le cytochrome C

Naturellement, certaines protéines possèdent des hèmes (cofacteur contenant un atome de fer au centre d'un large anneau organique) et ces hèmes absorbent dans le domaine du visible. Le cytochrome C est une hémoprotéine contenant un atome de fer relié à quatre groupes pyrroles au centre d'un anneau organique appelé porphyrine. Cet hème est lié de façon covalente à la chaîne polypeptidique. Il permet d'augmenter le degré de délocalisation des électrons et ainsi permet à la molécule d'absorber dans le visible. Les deux bandes d'absorption de l'hème dans le visible sont la bande de Soret autour de 400 nm et les bandes Q (Q_0 et Q_1) autour de 500 - 600 nm.

Le premier spectre optique en phase gazeuse de l'hémoprotéine dans le domaine du visible a été réalisé récemment dans notre laboratoire et révèle la bande de Soret¹⁴⁷.

En effet, Claire Brunet a sondé l'absorbance optique du cytochrome C dans le domaine du visible afin de mieux comprendre l'influence de l'environnement sur la conformation de la protéine. Pour réaliser cette comparaison, ce spectre optique a été comparé au spectre de l'hème seul ainsi qu'à celui du cytochrome C en solution. La Figure II-12 représente le spectre optique en phase gazeuse de l'hémoprotéine, dans le domaine du visible. La bande de Soret mesurée en phase gazeuse est proche de celle analysée en phase liquide.

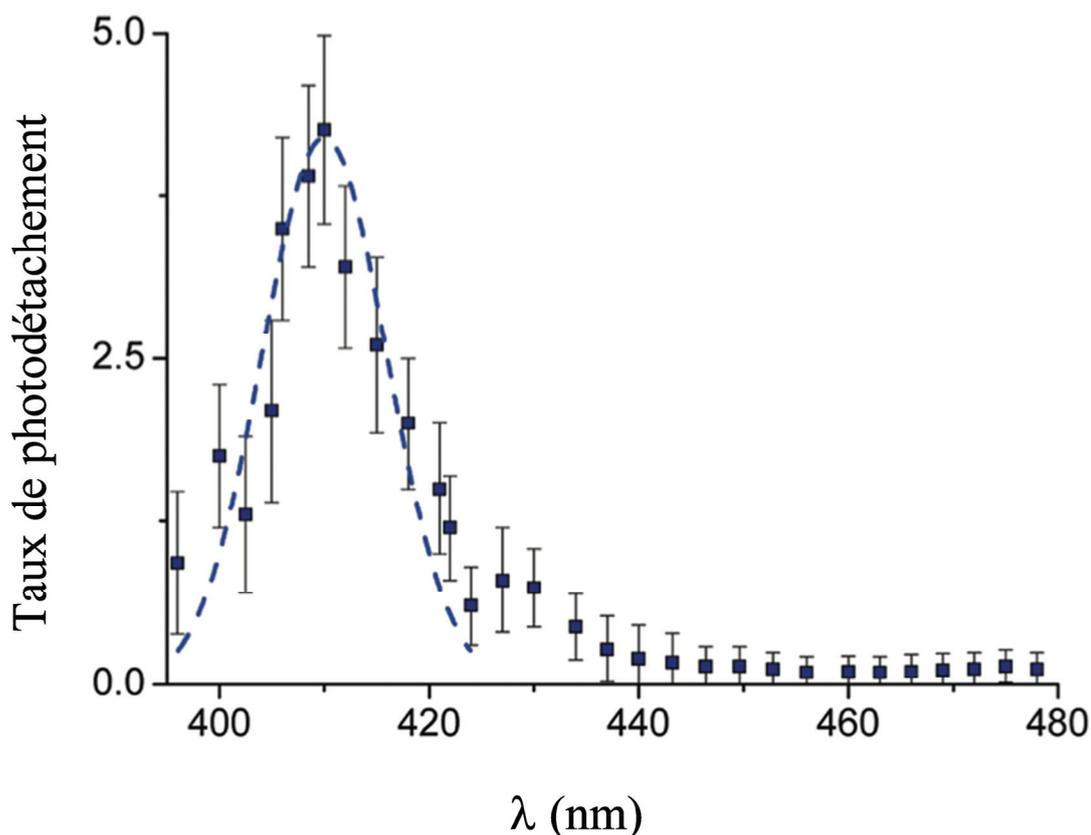


Figure II-12 : Taux de photo-détachement d'électron du cytochrome c $[M-6H]^{6-}$ ($\sigma = \ln((\text{parent} + \text{fragments})/\text{parent})/(P*\lambda)$) en fonction de la longueur d'onde. La courbe en pointillé est un ajustement gaussien des points expérimentaux (pour guider l'œil)¹⁴⁷.

II.3.4 Spectroscopie d'action dans le domaine du VUV

Une autre gamme de longueur d'onde fait depuis quelques années l'objet d'études spectroscopiques en phase gazeuse, il s'agit du Vacuum Ultra-Violet (VUV) ou Ultra-violet du vide. Ce rayonnement VUV démarre à des énergies de photons supérieures à 6.2 eV (soit $\lambda < 200$ nm). Le nom Vacuum Ultra-violet provient de la nécessité de travailler sous vide afin de générer de telles longueurs d'ondes. En effet, en dessous de 200 nm, l'air absorbe, il est donc indispensable de travailler sous un vide poussé afin de s'affranchir de toute absorbance résiduelle.

Cette gamme de longueur d'onde est très intéressante d'un point de vue physico-chimique, elle correspond à l'énergie nécessaire pour atteindre le premier potentiel d'ionisation de tout atome ou molécule neutre (entre 6 et 20 eV). L'absorption de radiations VUV par les protéines peut provoquer, entre autres, de la photo-destruction ou de la photo-ionisation¹⁴⁸.

Le groupe de recherche de Philippe Dugourd s'est donc intéressé depuis quelques années au rayonnement VUV et aux processus d'excitation et de photo-détachement des biomolécules en phase gazeuse. Bien que des lasers commerciaux VUV à longueurs d'onde fixes existent (193 et 157 nm), il est nécessaire de travailler avec un couplage synchrotron/spectrométrie de masse pour pouvoir enregistrer des spectres d'action de protéines entières dans le VUV sur une gamme étendue (4-40 eV). Ce couplage permet d'obtenir des photons à haute énergie (>10 eV), à fort flux et surtout, à énergie variable.

Suite à différents projets SOLEIL, plusieurs spectres d'action dans le VUV ont été réalisés^{149, 150}. Lors de sa thèse, Claire Brunet a notamment travaillé sur l'insuline. Là aussi, une étude du taux de photo-détachement d'un polyanion en fonction de l'énergie des photons (longueur d'onde) a notamment été effectuée (Figure II-13). Le canal principal de relaxation observé est le détachement d'un électron.

Le spectre d'action montre une bande d'absorption centrée à 7 eV, puis une absorption croissante de 9 à 16 eV. Les excitations visibles en VUV sont dues aux transitions $n\pi^*$ et $\pi\pi^*$, ainsi qu'aux transitions provenant des orbitales moléculaires n et π vers les orbitales de Rydberg, suivies d'une étape d'auto-ionisation¹²². Ainsi, tous les atomes peuvent photo-dissocier suite à l'excitation laser dans le VUV et aucune spécificité de fragmentation ne peut être appliquée.

Par ailleurs, il semble très probable que les deux mécanismes de photo-détachement, détachement direct vers le continuum et détachement après auto-ionisation, coexistent dans cette gamme de longueur d'onde.

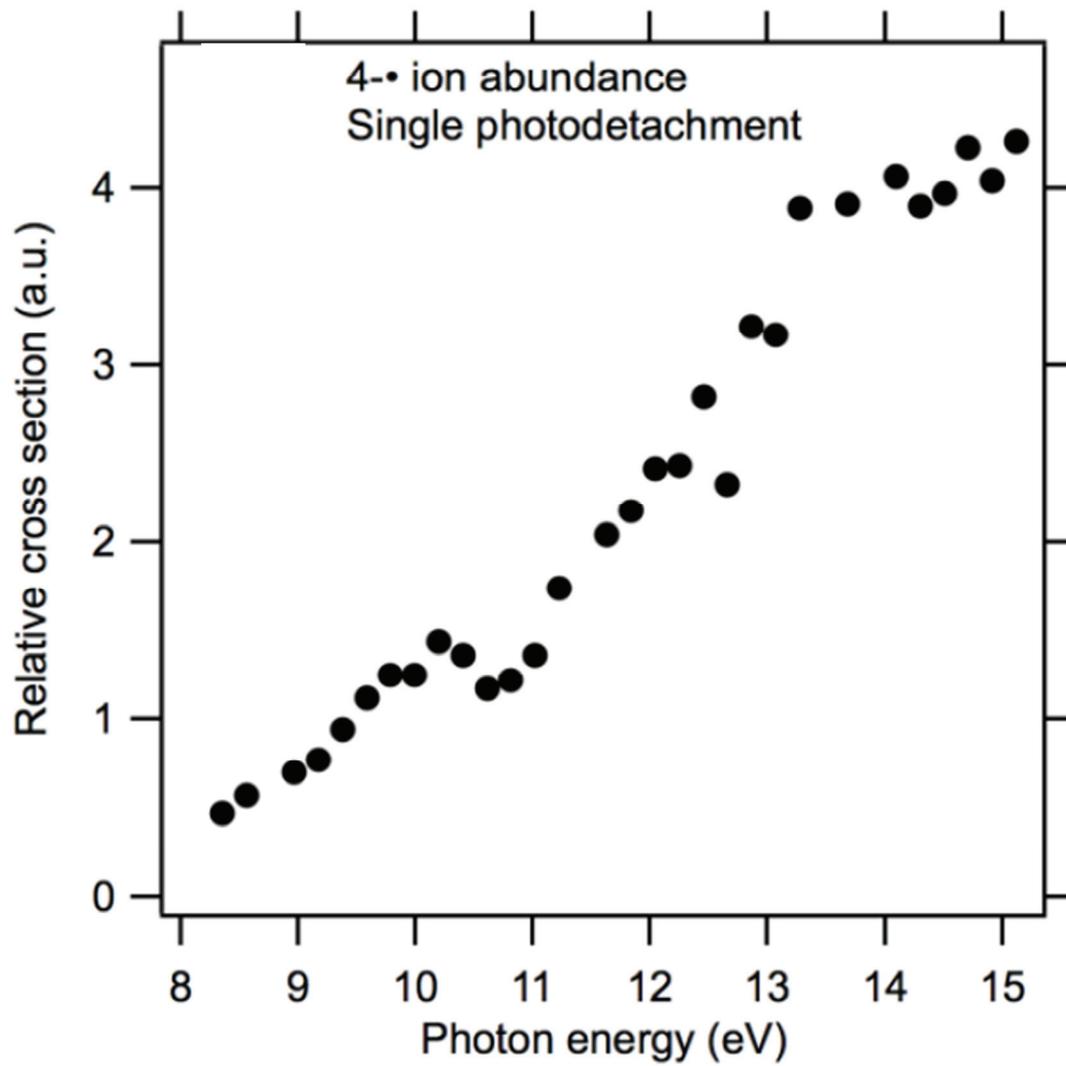


Figure II-13 : Taux de photo-détachement de l'insuline en fonction de l'énergie des photons pour l'état de charge $[M-4H]^4$.

II.4 Conclusion

Dans un premier temps, ce chapitre a été consacré à une méthode de fragmentation, la photodissociation, utilisée en spectrométrie de masse afin d'obtenir des informations complémentaires sur la séquence des protéines ou sur le photo-détachement d'électron en mode négatif. Puis, nous avons vu que grâce à cette photodissociation, la spectroscopie optique en phase gazeuse a pu être couplée à la spectrométrie de masse afin de réaliser des spectres optiques d'action. La spectroscopie d'action permet l'étude de propriétés optiques intrinsèques des protéines en phase gazeuse principalement dans le domaine de l'ultra-violet, où les cycles aromatiques des peptides absorbent, ou dans le domaine de l'ultraviolet dans le vide (VUV) où toutes les liaisons chimiques peuvent absorber.

Ainsi, la Figure II-14 montre une synthèse des domaines de longueurs d'onde dans lesquels il est possible d'étudier les propriétés optiques des molécules. Ce spectre d'action reconstitué présente différentes études réalisées sur le Cytochrome C dans les trois gammes de longueurs d'ondes étudiées par l'équipe de Philippe Dugourd. L'axe des ordonnées est présenté à titre indicatif et non qualitatif, il est très difficile d'ajuster les spectres de deux gammes différentes les uns par rapport aux autres.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le but de ma thèse est de substituer la dissociation induite par collision pour le dosage de biomarqueur par la photodissociation. La spectroscopie d'action va donc nous permettre d'étudier les propriétés optiques des protéines cibles biomarqueurs que nous souhaiterons doser par spectrométrie de masse et nous informer sur les absorbances spécifiques.

Dans le chapitre suivant, nous étudierons les propriétés optiques d'oligosaccharides, biomolécules importantes dans le domaine de la santé, et nous discuterons de leur absorbance dans le domaine du VUV. Puis, nous verrons qu'il est possible d'induire des propriétés optiques spécifiques, par dérivation chimique, à des molécules n'absorbant pas dans un domaine de longueurs d'onde particulier.

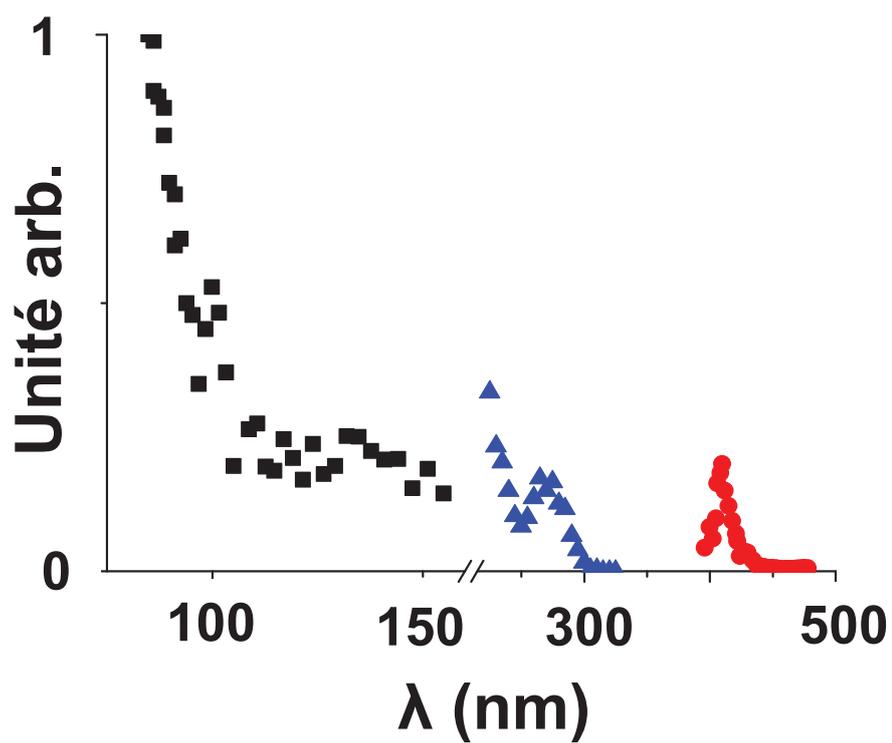


Figure II-14 : spectre d'action reconstitué à partir de différentes analyses en phase gazeuse du cytochrome C dans le VUV (■), l'UV (▲) et le visible (●).

**Chapitre III. Spectroscopie optique en
phase gazeuse
d'oligosaccharides dans le
VUV et le visible**

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons vu comment étudier les propriétés optiques des molécules en phase gazeuse. Afin d'implanter la photodissociation pour la quantification des biomarqueurs, il est important de connaître les domaines d'absorbances de ces molécules. Pour cela, dans ce troisième chapitre, nous étudions l'absorbance d'oligosaccharides, biomolécules importantes dans le domaine de la santé, dans différentes gammes de longueurs d'ondes par spectroscopie d'action. Nous avons fait ce choix car ce sont des molécules qui à priori n'absorbent pas dans le domaine du visible ni le proche UV (260-400 nm). Leur étude par spectroscopie sera particulièrement compliquée mais sera généralisable à de nombreuses classes de molécules. En effet, les polysaccharides n'absorbent qu'aux longueurs d'onde inférieures à 240 nm, comme nous allons le voir.

Contrairement aux protéines, et aux brins d'ADN, les propriétés optiques des oligosaccharides ont été très peu étudiées en phase gazeuse. Les principaux résultats ont été publiés par le groupe de Bendiak¹⁵¹ suivi par celui de Simons¹⁵²⁻¹⁵⁴. Le groupe de Philippe Dugourd a également publié des spectres d'actions en phase gazeuse d'héparines dans le domaine de l'UV¹³⁴. Le groupe de Jennifer Brodblet a ensuite utilisé la dérivation par chromophore afin de photo-fragmenter les oligosaccharides à 355 nm et observer des fragments complémentaires à ceux obtenus par dissociation induite par collision (CID)²¹.

Ce chapitre décrit deux stratégies différentes pour étudier la photodissociation de biomolécules n'absorbant pas dans le domaine du visible ou dans le proche ultra-violet. La première stratégie est l'utilisation de l'ultraviolet du vide (VUV), domaine de longueur d'onde dans lequel les liaisons moléculaires absorbent. La deuxième stratégie met en jeu une dérivation de la biomolécule par un chromophore spécifique absorbant dans le domaine du visible. Comme nous le verrons dans les chapitres suivants, le choix de la dérivation chimique par un chromophore semble le plus pertinent d'un point de vue analytique. De plus, dans l'optique d'ajouter une étape supplémentaire de spécificité lors du dosage de biomolécules par spectrométrie de masse, il est important de fragmenter sélectivement les molécules cibles et non toutes les molécules présentes dans un mélange. Enfin, la dérivation chimique par chromophore est une technique universelle pouvant s'appliquer sur différents types de molécules^{22, 155, 156}.

III.1 Intérêt des oligosaccharides dans le domaine de la santé

Les polysaccharides (appelés aussi oligosaccharides ou carbohydrates) sont les biopolymères les plus abondants sur terre et dans la mer. Un monomère est généralement appelé un ose. Ils sont présents dans de nombreux domaines scientifiques très différents tels que la biochimie ou la science des matériaux^{157, 158}. Avec les protéines et les acides nucléiques, il s'agit des biomolécules ayant un rôle primordial dans les systèmes biologiques^{159, 160}. Leurs différents rôles sont très variés allant de l'agent structurant des végétaux, la cellulose, à une source d'alimentation pour l'homme, l'amidon. En effet, la cellulose, principal constituant des végétaux, est un glucide constitué d'une chaîne linéaire de molécules de D-Glucose. L'amidon, est lui aussi composé de chaînes de molécules de D-Glucose. Il s'agit d'une molécule de réserve énergétique pour certains végétaux et d'un constituant essentiel de l'alimentation humaine. Les polysaccharides sont également impliqués dans l'activité des glycoprotéines, en protégeant les protéines de l'hydrolyse mais aussi en évitant toutes agrégations au sein même d'une protéine. Par ailleurs, ils interviennent également dans différentes maladies comme les cancers et les maladies inflammatoires¹⁶¹. De par leurs rôles majeurs dans les systèmes biologiques les polysaccharides ont attiré l'attention de nombreux groupes de recherche pour le développement de méthodes d'analyses structurales et quantitatives en spectrométrie de masse¹⁶²⁻¹⁶⁶. En raison de cet intérêt croissant, une nomenclature propre aux polysaccharides a été développée par Domon et Costello pour définir les fragments suites aux analyses MS/MS¹⁶⁷. La Figure III-1 présente cette nomenclature. Les ions de séries B, C (extrémité non réductrice) Y et Z (extrémité réductrice) correspondent à des fragments provenant des ruptures glycosidiques (entre deux oses) tandis que les fragments des séries A (extrémité non réductrice) et X (extrémité réductrice) proviennent des ruptures de liaisons intra-cycliques. Les nombres en exposants correspondent aux deux liaisons rompues. Le nombre en indice correspondent au nombre d'oses restants dans l'ion fragment.

Non-Reducing End

Reducing End

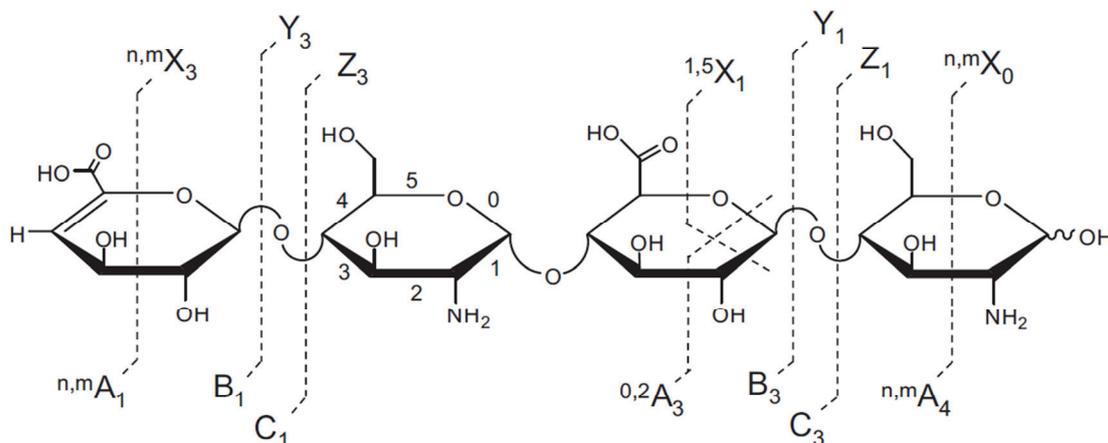


Figure III-1 : nomenclature de la fragmentation des oligosaccharides.

Parmi les différentes méthodes analytiques utilisées pour l'étude de leurs propriétés physico-chimiques, la spectroscopie optique est limitée par l'absorbance nulle dans le visible et l'UV de ces molécules. Pour pallier à ce problème, deux axes de recherche sont envisageables.

Le premier, utiliser des photons de l'ultraviolet du vide (VUV) afin d'exciter les liaisons chimiques et permettre la dissociation des molécules. Le deuxième axe vise à dériver les polysaccharides avec un chromophore absorbant dans le visible et ainsi étudier l'influence potentielle de l'oligosaccharide sur le chromophore.

Ainsi, nous allons discuter dans un premier temps de l'utilisation du couplage radiation Synchrotron-spectrométrie de masse pour l'étude des propriétés optiques des polysaccharides dans le domaine du VUV. Nous verrons ensuite que la photo-fragmentation induite par l'excitation VUV peut aussi être utilisée pour l'analyse structurale des carbohydrates. Le groupe de recherche dirigé par Reilly a démontré que la fragmentation induite suite aux rayons VUV à 157 nm permet d'obtenir des informations complémentaires aux fragmentations classiques notamment en vue de la discrimination d'isomère ¹⁶⁸. L'avantage d'un synchrotron vis-à-vis d'un laser monochromatique à 157 nm est de pouvoir faire varier la longueur d'onde et ainsi étudier l'influence de la longueur d'onde sur le taux de fragmentation. Par ailleurs, il sera intéressant de vérifier si les canaux de photo-fragmentation varient sur l'ensemble de la gamme du VUV étudiée (7-18 eV ou 69-177 nm).

Ensuite, parce que le VUV est un domaine de longueur d'onde non spécifique, toutes les liaisons chimiques absorbent et un grand nombre de fragments est généré suite à l'irradiation. Nous nous intéresserons à la dérivation chimique de la molécule d'intérêt par des chromophores absorbant dans le domaine du visible. Ce chromophore permettra d'induire des propriétés optiques

particulaires à la molécule cible afin de pouvoir l'exciter et la fragmenter spécifiquement. Dans un deuxième temps, nous étudierons donc les propriétés optiques de polysaccharides dérivés par un chromophore *push-pull* absorbant dans le visible. Ces chromophores sont notamment utilisés lors d'analyses par fluorescence de biomolécules ^{169, 170}. De plus, le greffage de chromophore sur les oligosaccharides est très souvent exploité pour améliorer la séparation des composés en chromatographie liquide ^{171, 172}. Par ailleurs, comme dans le VUV, l'irradiation par laser de molécules dérivées par des chromophores peut engendrer de nouveaux canaux de fragmentation pour l'analyse structurale des carbohydrates ¹⁷³. Dans l'optique de remplacer la CID par la fragmentation laser pour la quantification de biomolécule, l'ouverture de nouveaux canaux de fragmentation permettrait d'ajouter une étape de spécificité supplémentaire dans la mesure où seuls les ions pouvant photo-fragmenter génèreraient ces fragments spécifiques.

III.2 Procédés expérimentaux

Les expériences de spectroscopie optique décrites dans ce chapitre ont toutes été réalisées sur un spectromètre de masse de type LTQ couplé avec une source de lumière. La source de lumière est soit un Synchrotron SOLEIL (pour le domaine VUV) soit, dans notre laboratoire, un laser OPO (pour le domaine du visible).

III.2.1 Principe du piège linéaire

Le piège linéaire LTQ (Thermo Electron, San Jose, CA, USA) comporte trois grandes parties : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur.

La source est une source électrospray avec un principe identique à celui décrit dans le chapitre 0.

L'analyseur est un piège à ion linéaire (piège 2D) basé sur les quatre barres d'un quadripôle fermé par des électrodes d'entrée (E1) et de sortie (E2) (Figure III-2). Ces électrodes permettent de repousser les ions vers l'intérieur du quadripôle, en appliquant des tensions continues positives pour piéger les cations, et inversement, en appliquant des tensions négatives pour piéger les anions. Une revue de ces pièges ioniques a été publiée par Douglas en 2005¹⁷⁴. Au sein du piège, les ions sont refroidis par collision avec un gaz inerte, dans notre cas de l'hélium, à faible pression. Les ions volent dans le piège en faisant des allers-retours entre les deux électrodes suivant l'axe z tout en oscillant dans le plan xy.

Les tensions appliquées aux extrémités repoussent les ions dans le quadripôle et cette répulsion augmente lorsque les ions sont proches des électrodes extérieures. Le diagramme de stabilité est le même que celui d'un quadripôle présenté dans le Chapitre I.

Pour éjecter les ions, deux modes d'expulsions sont utilisés, l'éjection axiale et l'éjection radiale. En éjection axiale, suivant l'axe z, les ions sont expulsés en utilisant les effets de champs à l'extrémité en appliquant une tension alternative, V , appropriée entre les barres du quadripôle et l'électrode de sortie¹⁷⁵. Ce type d'éjection est utilisé dans les instruments hybrides de type Q-trap commercialisés par AB Sciex et utilisés dans les chapitres Chapitre V et Chapitre VI.

En éjection radiale, les ions sont expulsés radialement à travers des fentes creusées dans deux barres opposées du quadripôle, en appliquant une tension alternative, V , adaptée sur ces deux barres¹⁷⁶.

Ici, dans le piège à ion linéaire LTQ de chez Thermo, l'éjection est radiale, les ions traversent les fentes percées sur deux barreaux du quadripôle pour être détectés à l'aide de multiplicateurs d'électrons.

L'avantage d'un piège à ion est de pouvoir faire de l'éjection résonante. Les ions piégés ont une fréquence de résonance spécifique, la fréquence séculaire. Il est possible d'éjecter sélectivement certains ions grâce à ces fréquences propres. Une tension est appliquée aux électrodes, cette tension

étant choisie pour avoir une fréquence égale à la fréquence séculaire des ions d'intérêts. Suite à l'application de cette tension, les ions d'intérêts entrent en résonance avec la tension appliquée, leurs énergies cinétiques et par conséquent leurs trajectoires augmentent jusqu'à l'expulsion du piège. L'éjection résonante permet donc de conserver sélectivement dans le piège certains ions de valeur m/z donnée tandis que les autres sont éjectés. Ce mode est fortement utilisé pour les expériences MS/MS.

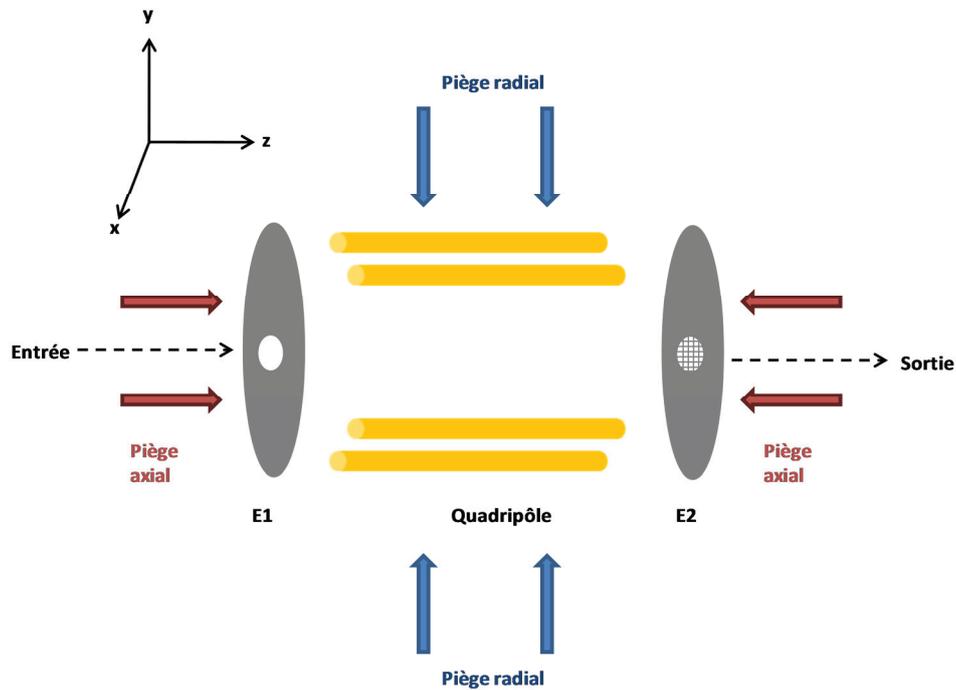


Figure III-2 : représentation d'un piège quadripolaire linéaire.

III.2.2 Le mode MS/MS

Le mode MS/MS permet de travailler sur des ions d'intérêts présents dans le piège après expulsion des autres ions. Une fois isolés dans le piège, les ions cibles peuvent être activés par excitation résonante. Suite à cette excitation, l'énergie cinétique de l'ion va augmenter, pas suffisamment pour que l'ion soit instable et soit éjecté, mais assez pour que des collisions se produisent entre cet ion et le gaz inerte présent dans le piège. Ces collisions induisent une fragmentation (CID) de l'ion. Ces ions fragments peuvent ensuite être analysés par éjection dans l'ordre croissant des rapports m/z . Cette opération peut être reproduite sur les ions fragments afin d'obtenir des ions fragments de deuxième génération. On parle alors de fragmentation MS³.

Par rapport à un quadripôle, les avantages d'un piège ionique sont la résolution (voir Tableau 2) et la possibilité de travailler en MSⁿ, c'est-à-dire de pouvoir sélectionner à l'infini (dans la limite du signal détecté) un ion fragment afin de le fragmenter à nouveau. Les inconvénients de ce type d'analyseur proviennent principalement lors de la quantification de molécules. Lors d'une fragmentation d'ion précurseur, le piège linéaire doit d'abord piéger les ions avant de pouvoir générer un signal. Le temps nécessaire à ce piégeage (de l'ordre de quelques dizaines à centaines de millisecondes) n'est généralement pas compatible avec une quantification sensible et simultanée de plusieurs dizaines à centaines de composés. En revanche, couplés avec un analyseur comme le quadripôle, les pièges à ions peuvent apporter un réel gain de spécificité qui va se traduire par un gain de sensibilité comme lors de son utilisation en mode MRM^{3 10, 177}.

III.2.3 Caractéristiques du piège utilisé

Les caractéristiques de l'analyseur utilisé pour ces travaux sont décrites dans le Tableau 2 ci-dessous. Il est important de noter qu'il est possible de travailler en haute résolution avec ce type d'analyseur (30 000 pour $m/z = 1000$) mais ce mode engendre un temps d'analyse particulièrement long et peu sensible.

Vitesse d'analyse (uma/s)	11 000 (Normal Scan)
Transmission	50-70%
Exactitude en masse (Da)	0.1 (Ultra Zoom Scan)
Gamme de masse (m/z)	50-4 000
Résolution	30 000 (Ultra Zoom Scan) pour $m/z = 1000$
Capacité de piégeage (nombre de charges)	20 000

Tableau 2 : caractéristiques du LTQ.

III.2.4 Couplage LTQ-SR (Synchrotron Radiation)

Les expériences de photo-fragmentation et de photo-détachement dans le domaine VUV ont été réalisées sur la ligne DESIRS (Dichroïsme Et Spectroscopie par Interaction avec le Rayonnement Synchrotron) du synchrotron SOLEIL.

III.2.4.1 Le rayonnement du synchrotron

Le rayonnement du synchrotron SOLEIL (Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE) fonctionne depuis janvier 2008. Il s'agit d'une source de troisième

génération, conçue pour obtenir des sources de rayonnement très brillantes, très stables et adaptables à diverses applications¹⁷⁸.

Tout d'abord, les électrons sont produits par un canon puis sont accélérés dans un accélérateur linéaire appelé LINAC (16 m de long) à 100 MeV. Après avoir été accélérés dans ce pré-injecteur linéaire, les paquets d'électrons sont dirigés vers un deuxième accélérateur, le Booster. Cet accélérateur est circulaire avec une circonférence de 157 m. Là, en une fraction de seconde, leur énergie va augmenter considérablement et passer de 100 MeV à 2 750 MeV (ou 2.75 GeV). Une fois cette énergie atteinte, les électrons sont transférés dans un anneau de stockage de 354 m de circonférence et qui peut accumuler jusqu'à 500 mA (la circulation des particules correspond alors à un courant continu). L'anneau de stockage est en fait un polygone de 32 côtés composé d'une succession de longues parties droites et de parties courbes, des virages, où s'effectue la séparation entre les électrons et les photons : le rayonnement synchrotron. Les électrons y circulent à l'intérieur d'un tube, d'environ 5 cm de diamètre, dans lequel un vide poussé est créé, l'ultravide, avec des pressions résiduelles de 10^{-9} hPa. Cela permet de minimiser le nombre de collisions avec des molécules de gaz qui font perdre les électrons. Pour atteindre les exigences extrêmes de stabilité de position du faisceau d'électrons, il est indispensable d'assurer la stabilité thermique et mécanique de l'anneau de stockage. Ainsi, le tunnel de l'anneau est une zone à température contrôlée : 21° C (+ ou - 0.1° C) en permanence. Les électrons peuvent ainsi rester en orbite plusieurs heures (Figure III-3). Lorsque la trajectoire d'un faisceau d'électrons est courbée sous l'action de champs magnétiques très forts, les électrons perdent une petite partie de leur énergie en émettant des photons, le rayonnement synchrotron est créé.

Dans l'anneau de stockage, deux types d'aimants sont présents. Des aimants de courbure dipolaires qui maintiennent les électrons sur une orbite fermée et des aimants quadripolaires et hexapolaires qui permettent de focaliser le faisceau d'électrons. Les pertes d'énergie du faisceau dues à l'émission de rayonnement sont compensées par deux cryomodules contenant des cavités RF. Seuls les électrons qui arrivent en phase avec l'oscillation du champ RF sont maintenus en orbite stable. Les électrons peuvent ainsi être ramassés en paquets, ce qui est à l'origine de la structure temporelle du rayonnement synchrotron.

Les aimants de courbure et les éléments d'insertion sont les deux principales sources du rayonnement. Les aimants de courbure produisent une lumière blanche tangentielle à la trajectoire des électrons. Les sections droites accueillent des éléments d'insertions magnétiques appelés *wigglers* et des onduleurs. C'est une série de petits aimants dont les polarités sont alternées et servent ainsi à intensifier le rayonnement dans l'ultraviolet lointain (VUV) et les rayons X (RX).

Les expériences se déroulent dans des lignes de lumière. Ce sont des installations expérimentales d'une vingtaine de mètres de long en moyenne. Chaque ligne est animée et prise en charge par une équipe dédiée. L'équipe est composée de scientifiques travaillant sur les applications mais aussi de techniciens veillant au bon fonctionnement de la ligne. Les lignes de lumière sont composées de différents modules permettant d'assurer le transport de la lumière vers les stations expérimentales.

La ligne DESIRS (Dichroïsme Et Spectroscopie par Interaction avec le Rayonnement Synchrotron) a été utilisée pour réaliser nos expériences.

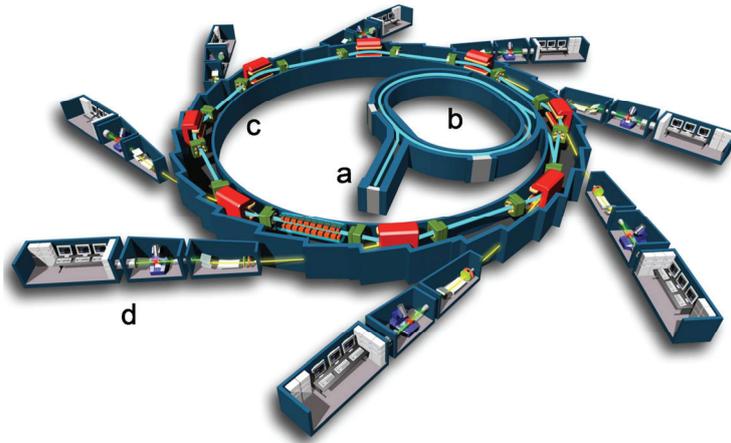


Figure III-3 : schéma du synchrotron SOLEIL : (a) LINAC, (b) Booster, (c) Anneau de stockage, (d) Lignes de lumière.

III.2.4.2 Le couplage DESIRS-LTQ

La ligne de lumière DESIRS est basée sur un onduleur couvrant la gamme VUV (5-40 eV). Cet onduleur est constitué de succession de bobines fixes de trois types différents (bobines à champ horizontal, à champ vertical et à champ vertical déphasé). Il est capable de produire tous types de polarisations (de circulaire à linéaire à phase variable), ceci est une spécificité unique de cette ligne de lumière qui permet d'étudier la chiralité moléculaire ainsi que les propriétés d'anisotropies de la matière au travers différents types d'expériences de dichroïsme.

La ligne de lumière comporte 3 branches différentes. Une branche de spectroscopie d'absorption à transformée de Fourier¹⁷⁹ et 2 branches monochromatisées permettant de réaliser tous types d'expériences de spectroscopie ou de dichroïsme. C'est sur le deuxième type de branche que le spectromètre de masse peut être couplé pour enregistrer les spectres d'action dans la gamme VUV (Figure III-4). Un *shutter* installé avec un système de pompage de vide primaire permet de synchroniser l'irradiation du SR avec l'activation des ions dans le piège ionique¹⁸⁰.

Le flux de photon émis par le synchrotron n'étant pas constant, il est nécessaire de le mesurer. Pour cela, une photodiode de type AXUV 100 (IDR), permettant de donner un courant en fonction de la puissance qu'elle reçoit, est utilisée pour mesurer le flux de photon (Figure III-5). Cette diode a été calibrée à l'aide de la diode de Bessy II (« *detector calibration facilities* » de Berlin)¹⁸¹. Le fichier de calibration permet de relier le courant fournit par la diode avec la puissance reçue.

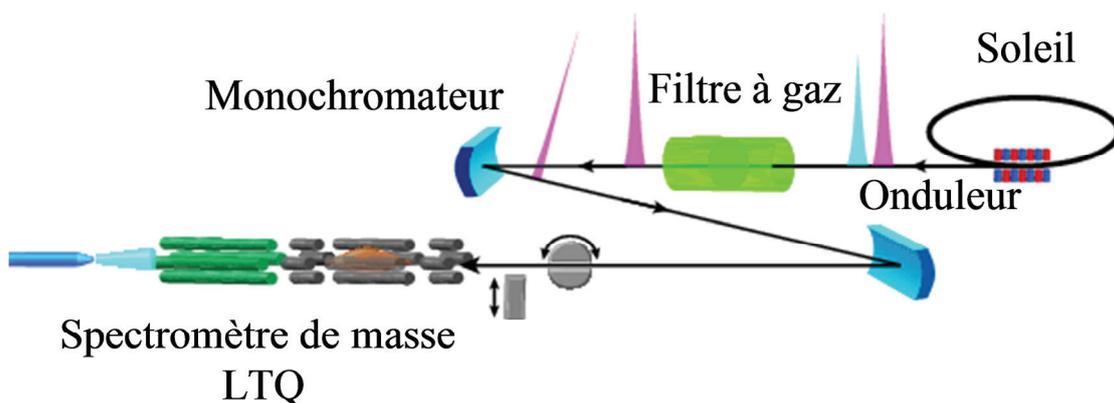


Figure III-4 : représentation schématique de la ligne DESIRS.

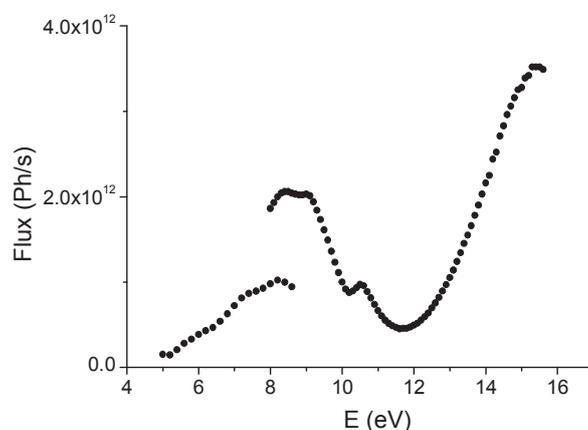


Figure III-5 : flux du rayonnement synchrotron de 5 à 16 eV.

III.2.5 Couplage LTQ-Laser UV-Vis

III.2.5.1 La source de lumière : OPO, Continuum

Le laser couplé au LTQ est un laser accordable en longueur d'onde commercialisé par Continuum. Il est composé d'un oscillateur paramétrique optique (OPO) (PantherTMEx) pompé par un laser Nd³⁺ : YAG (grenat d'yttrium aluminium dopé au néodyme Y₃A₁₅O₁₂) (SureliteTM).

Le laser pompe est un laser Surelite II de fréquence 10 Hz, composé d'un oscillateur et d'un amplificateur, comportant un cristal et une lampe flash fournissant des impulsions laser à 1064 nm de 5 ns. A la sortie de l'amplificateur, le faisceau traverse des cristaux Bêta Borate de Baryum (BBO), il est ainsi doublé puis triplé en fréquence (Figure III-6). C'est le faisceau résultant de 355 nm possédant une énergie par impulsion de 160 mJ et une largeur d'impulsion de 5 ns qui est ensuite

injecté dans l'OPO. La boîte OPO contient deux cristaux, un premier cristal BBO permettant de balayer les longueurs d'onde de 410 à 710 nm pour le λ_{signal} et de 710 à 2200 nm pour λ_{idler} et un second cristal permettant de doubler λ_{signal} et λ_{idler} pour obtenir respectivement des longueurs d'onde de 215 à 355 nm et de 355 à 410 nm. Ainsi ce système permet de couvrir une large gamme de longueur d'onde, allant de 215 à 2200 nm. Le diamètre du faisceau en sortie d'OPO est d'environ 7 mm avec une divergence inférieure à 2 mrad.

Cependant, l'énergie du faisceau n'est pas équivalente à toutes les longueurs d'onde et elle varie en fonction de sa longueur d'onde. La Figure III-7 montre que la puissance est très faible entre 320 nm et 410 nm (< 1 mJ) obtenue autour de la dégénérescence (355 nm). En pratique, il est très difficile de réaliser des spectres optiques dans cette gamme (entre 320 et 410 nm) avec cette génération d'OPO. Les différents composants du laser sont pilotés par le logiciel Panther OPO Software.

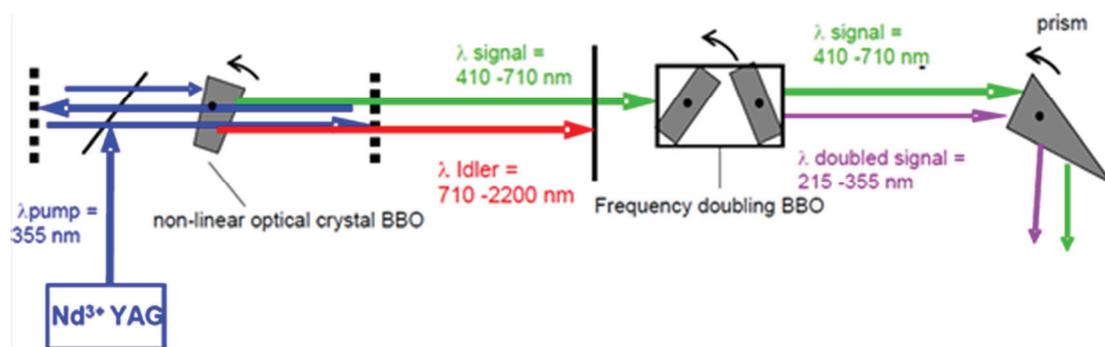


Figure III-6 : production du faisceau UV au niveau de l'OPO par conversion de fréquence des BBO.

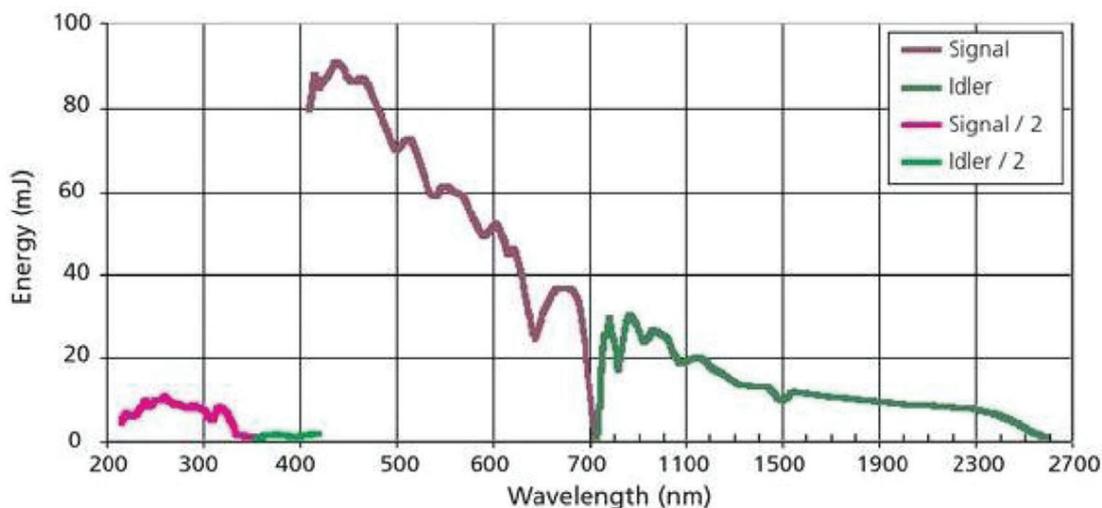


Figure III-7 : énergie en fonction de la longueur d'onde en sortie d'OPO.

III.2.5.2 Le couplage LTQ-OPO

Afin de réaliser les expériences de spectroscopie dans le spectromètre de masse, une modification instrumentale sur le LTQ a été nécessaire. Une fenêtre en quartz (silice fondue) de 30 mm de diamètre et de 3 mm d'épaisseur a été aménagée à l'arrière du LTQ dans l'axe des quadripôles du piège ionique. Le faisceau laser est introduit sur l'axe central du quadripôle du piège linéaire (Figure III-8). Cette modification instrumentale a été réalisée durant la thèse de Laure Joly (2007-2010).

Une série de lentilles (+200, -100 et +500 mm) et de miroirs permet de collimater et de focaliser le faisceau laser ainsi que d'assurer son introduction dans le piège. Pour optimiser la fragmentation, la zone de recouvrement entre le faisceau laser et le nuage d'ion doit être maximal. Le jeu de miroirs permet donc de maximiser cette zone.

Deux mesureurs de puissance sont installés sur le trajet optique. Le premier est situé directement à la sortie du laser, il n'est utilisé que pour régler les positions des cristaux BBO de l'OPO et vérifier que la puissance du faisceau est maximale à la longueur d'onde choisie. Le second sert à mesurer la quantité de photons qui parvient jusqu'au nuage d'ions. Une lame de quartz qui transmet 90% du faisceau est alors placée en amont du hublot. Ainsi, les 10% réfléchis peuvent être récupérés par le second mesureur.

La seconde mesure de puissance est donc réalisée en continue lors des expériences et est essentielle pour étudier les propriétés optiques linéaires d'un ion. Le taux de fragmentation mesuré pour la

réalisation des spectres optiques est directement relié à la puissance laser et comme le montre la Figure III-7, la puissance n'est pas égale à toutes les longueurs d'onde.

Une synchronisation temporelle permet de synchroniser l'irradiation laser durant la période d'activation des ions. Elle est assurée par un obturateur électromécanique placé sur le trajet du faisceau (Figure III-8). Relié à un générateur de délai synchronisé avec le spectromètre de masse, l'obturateur permet de contrôler le déclenchement de l'irradiation laser et d'ajuster sa durée en fonction de la période d'activation des ions dans le piège. Le temps nécessaire par l'obturateur pour se déclencher est de l'ordre de la milliseconde et n'influe donc pas devant les différents temps d'expériences (> 100 ms). La durée de l'activation des ions, définie en unité de temps (milliseconde), est donc reliée à la durée de l'irradiation, exprimée en nombre d'impulsions laser. Ainsi, pour une fréquence laser de 10 Hz, 100 ms d'activation correspondent à l'injection d'un seul pulse laser.

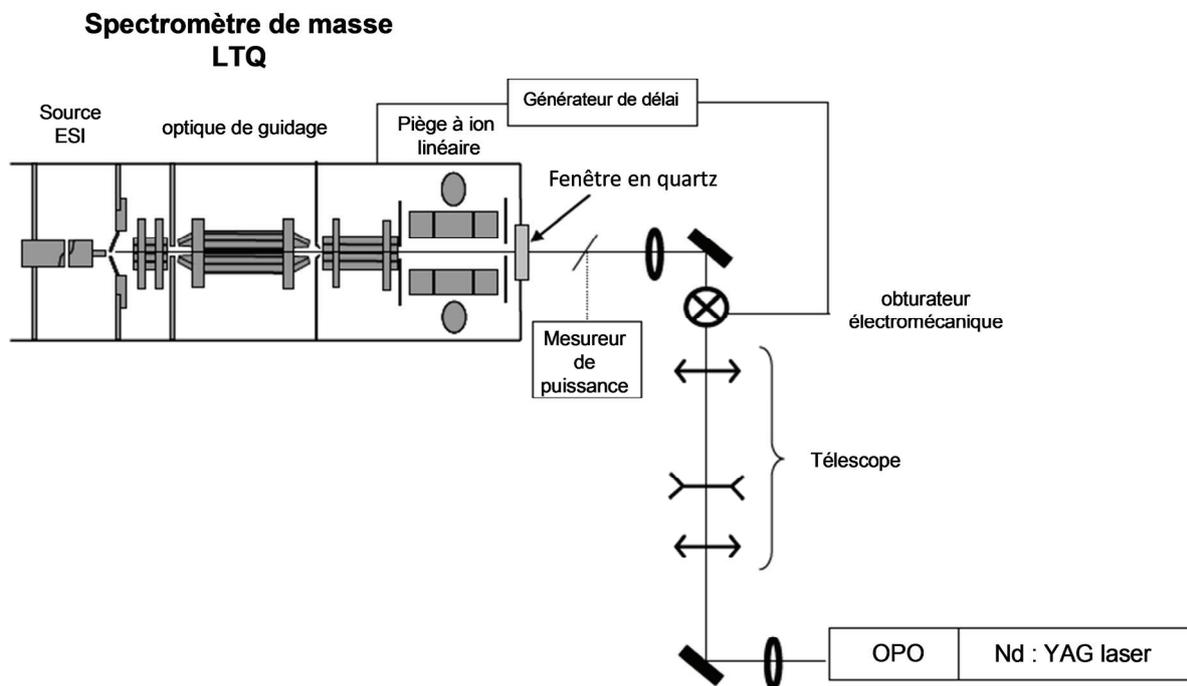


Figure III-8 : schéma détaillé du couplage LTQ-Laser UV/Vis.

III.3 Spectroscopie d'action dans le VUV pour l'analyse d'oligosaccharides.

Nous allons dans cette partie étudier les propriétés optiques d'oligosaccharides en phase gazeuse dans le domaine du VUV grâce au couplage LTQ-SR présenté précédemment.

III.3.1 Paramètres expérimentaux

III.3.1.1 Préparation d'échantillons

Les oligosaccharides ont été obtenus chez Dextra Laboratories (Reading, Royaume-Unis) et dissous à 100 μM dans une solution de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (v/v ; 50/50). Les échantillons sont infusés avec un débit de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ et ionisés par électrospray.

III.3.1.2 Instrumentation

Deux montages sont utilisés pour cette étude. Le premier, Couplage LTQ-Laser UV-Vis, permet de réaliser les spectres d'action optiques dans le domaine de l'UV du maltose et du maltohexaose. Le second est le montage expérimental décrit dans la partie Couplage LTQ-SR (Synchrotron Radiation). Il permet de réaliser les expériences dans le domaine du VUV.

Dans les deux cas, l'ion précurseur d'intérêt est dans un premier temps isolé dans le piège puis irradié 400 ms. Suite à l'enregistrement du spectre de masse correspondant à la longueur d'onde associée, un spectre d'action est obtenu en mesurant le taux de fragmentation (ou de détachement) en fonction de l'énergie des photons (ou longueur d'onde).

$$\sigma = \ln\left(\frac{\text{parent} + \Sigma\text{frag}}{\text{parent}}\right) / \varphi \quad \text{Équation 16}$$

Avec φ correspondant au flux de photons (Figure III-5) pour le rayonnement synchrotron ou $\varphi = \lambda * P$ avec λ correspondant à la longueur d'onde de travail et P à la puissance mesurée à la longueur d'onde de travail pour l'irradiation UV, *parent* l'intensité du pic de l'ion précurseur, Σfrag la somme des intensités des pics des ions fragments (ou des ions radicalaires provenant du photo-détachement).

Lors de l'étude d'ion précurseur mono-déprotoné, une déplétion du signal est observée. En effet, le détachement d'un électron de l'ion précurseur engendre la formation d'une espèce neutre radicalaire non détectée en spectrométrie de masse. Afin de mesurer cette déplétion, le spectre de masse est enregistré alternativement avec et sans irradiation, 50 scans avec irradiation et 50 scans sans irradiation. Dans ce cas-ci, le taux de photo-détachement en fonction de l'énergie des photons SR est calculé grâce à cette formule :

$$\sigma = \ln(I_0/I)/\varphi \quad \text{Équation 17}$$

Avec φ correspondant au flux de photons (Figure III-5) pour le rayonnement synchrotron ou $\varphi = \lambda * P$ avec λ correspondant à la longueur d'onde de travail et P à la puissance mesurée à la longueur d'onde de travail pour l'irradiation UV, I_0 l'intensité du pic de l'ion précurseur sans irradiation et I l'intensité du pic de l'ion précurseur avec irradiation SR.

III.3.2 Résultats et discussion

Lors de ces expériences, nous avons, dans un premier temps, étudié les propriétés optiques de polysaccharides non-substitués dans le domaine de l'UV et nous avons vu que les oligosaccharides n'absorbaient pas. Nous nous sommes donc intéressés aux propriétés dans le VUV. Trois études différentes ont été réalisées, la première expérience permet de comparer les propriétés optiques de polysaccharides avec un degré de polymérisation (DP) différent (effet de la taille), la deuxième traite de l'effet de la charge sur une même molécule cible et enfin, la troisième expérience utilise le VUV comme méthode de fragmentation pour différencier 2 isomères.

III.3.2.1 Propriétés optiques dans l'UV

Dans cette étude préliminaire, nous avons réalisé le spectre d'action en phase gazeuse du maltose anionique monochargé $[M-H]^-$. La déplétion du maltose suite à son irradiation dans l'ultra-violet a donc été enregistrée en fonction de la longueur d'onde d'excitation. La Figure III-9 montre que le maltose possède une absorbance très faible, voire nulle, en dessous de 240 nm (5.2 eV). Ceci est cohérent avec la théorie, les oligosaccharides ne possèdent pas de liaisons conjuguées permettant d'absorber au-delà de 250 nm. Nous allons généraliser ce résultat aux deux autres polysaccharides que nous allons étudier.

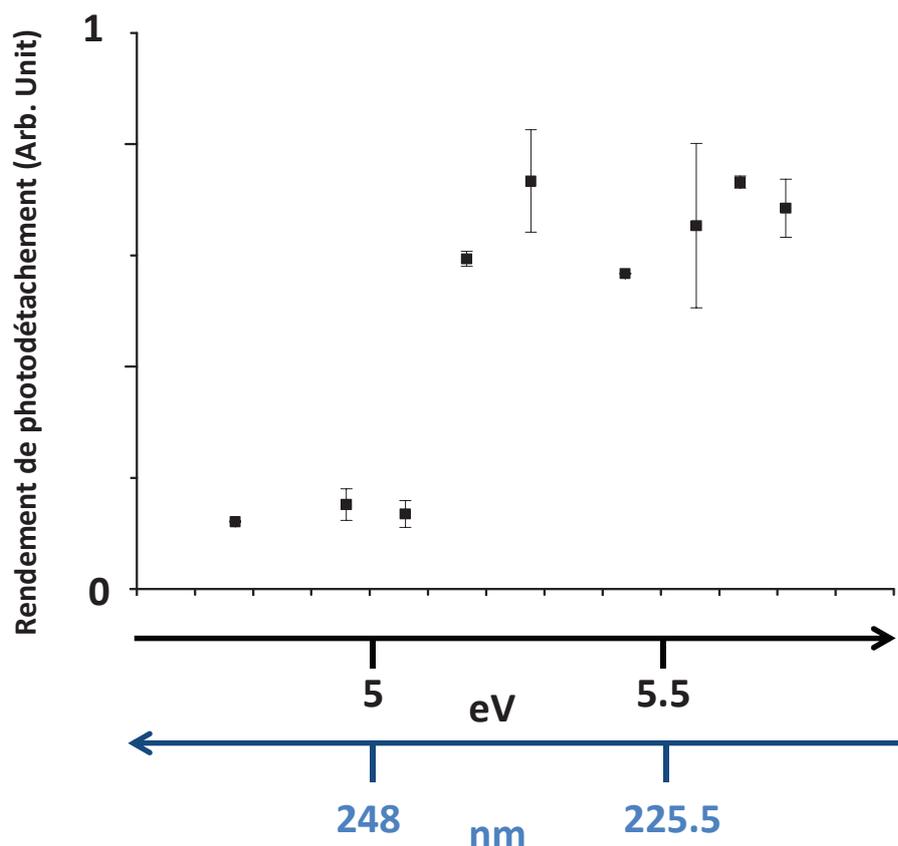


Figure III-9 : spectre d'action du maltose [M-H]- dans l'ultraviolet.

III.3.2.2 Effet de taille ou degrés de polymérisation (DP)

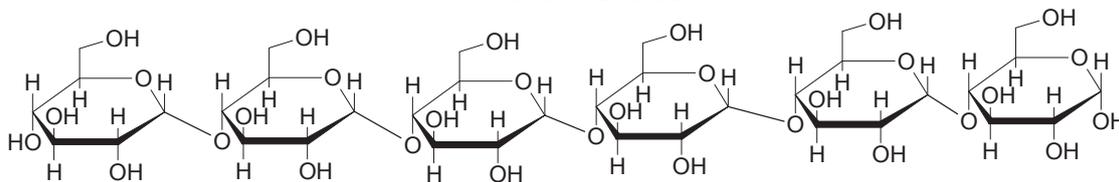
Comme nous venons de le voir, le maltose n'absorbe pas dans le proche-UV. Nous souhaitons donc étudier maintenant ces propriétés optiques dans le domaine du VUV entre 7.5 et 18 eV.

Pour cela, nous allons discuter, dans un premier temps, de l'influence du degré de polymérisation (DP) d'un oligosaccharide sur son absorbance dans cette gamme de longueur d'onde. Pour cela, nous allons travailler avec le maltose (DP 2), le maltotétraose (DP 4) et le maltohexaose (DP 6), Figure III-10.

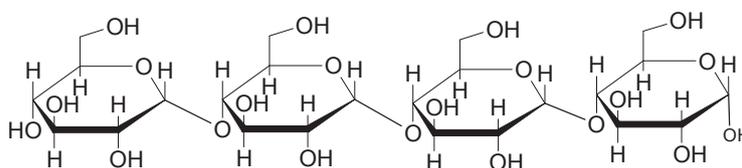
Lors de cette expérience, chaque oligosaccharide est étudié avec le même état de charge. De par sa petite taille, il est difficile d'obtenir un ion maltose négatif deux fois chargé (répulsion de charge), nous allons donc travailler sur des ions mono-déprotonés. Comme expliqué précédemment, l'irradiation d'anions mono-chargés engendre de la déplétion et aucune fragmentation. La Figure III-11 montre le photo-détachement d'électron en fonction de l'énergie des photons SR pour les trois ions mono-chargés. On peut noter que l'efficacité de détachement augmente lorsque le DP des oligosaccharides croît aussi. Plusieurs bandes d'absorptions identiques sont visibles au niveau des 3

polysaccharides, comme celles à 9.5 et 11eV. La nature de ces bandes d'absorption est difficile à expliquer car un grand nombre d'excitation électronique entre en jeu. Des spectres d'absorption dans le domaine du VUV, jusqu'à 9.9 eV, ont déjà été enregistré par Dickinson et al. ¹⁸² et ces spectres montrent également des bandes entre 6.2 et 8.1 eV. Ces bandes ont été attribuées à la présence de l'atome d'oxygène et aux transitions $n\sigma^*$.

Maltohexaose



Maltotetraose



Maltose

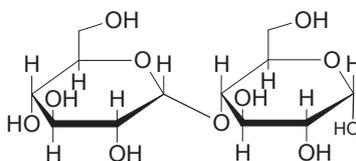


Figure III-10 : structures des 3 polysaccharides.

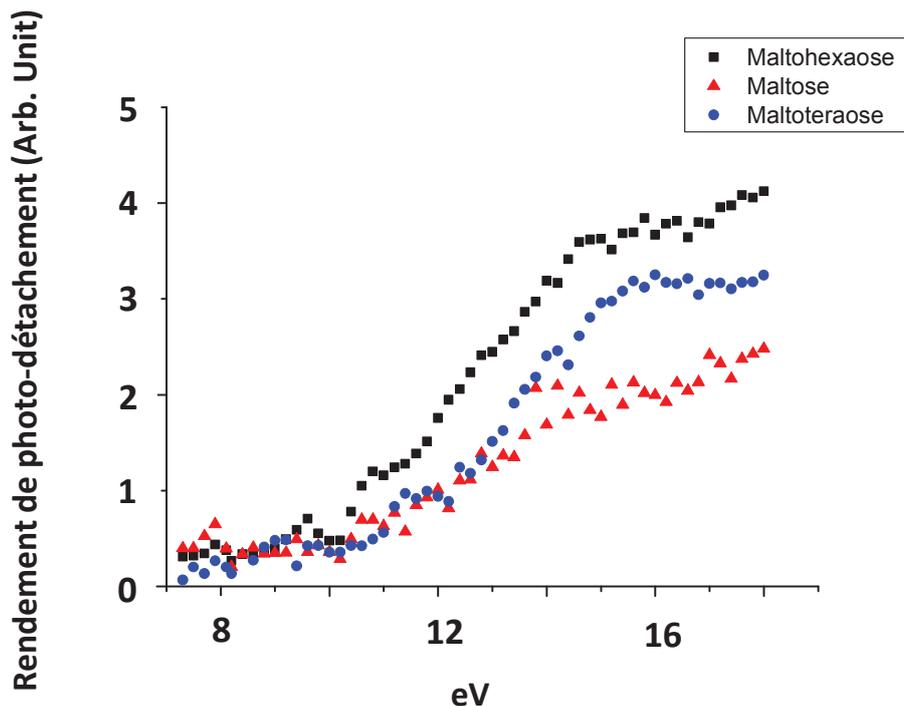


Figure III-11 : spectres d'action VUV d'oligosaccharides mono-déprotonés en fonction de l'énergie d'irradiation SR.

Afin de comprendre ces résultats expérimentaux, des calculs de TD-DFT ont été réalisés sur le maltose (DP = 2) par Abdul Rahman Allouche. La structure la plus stable de l'anion du maltose est présentée Figure III-12 et est caractérisée par des torsions d'angles π (OC_1OC_4) et $\psi(C_1OC_4C_5)$ respectivement égales à 112° et -90° . Le spectre d'absorption théorique présenté Figure III-13 montre une augmentation globale de l'absorption pour les hautes énergies. Cette augmentation est cohérente avec les spectres d'action expérimentaux. Par ailleurs, ce spectre théorique montre un début d'absorbance entre 5 et 5.5 eV en accord avec le spectre d'action du maltose dans l'UV Figure III-9.

De plus, l'augmentation du photo-détachement en fonction du degré de polymérisation peut être corrélée à l'augmentation de la densité d'états électroniques provenant de l'augmentation du nombre d'atomes. L'équation suivante montre donc que l'absorbance augmente lorsque le DP de l'oligosaccharide augmente.

$$A^\lambda = n\varepsilon_{ose}^\lambda \quad \text{Équation 18}$$

Avec n le nombre de monosaccharide (ou DP), et $\varepsilon_{ose}^\lambda$ le coefficient d'extinction du monosaccharide à une longueur d'onde donnée. Cette formule permet de prédire globalement une augmentation du

photo-détachement d'un facteur 2 pour le maltotétraose (facteur 3 pour le maltohexaose) vis-à-vis du maltose. On retrouve donc une absorbance qui augmente lorsque le DP croît, ceci est cohérent avec les spectres d'action expérimentaux.

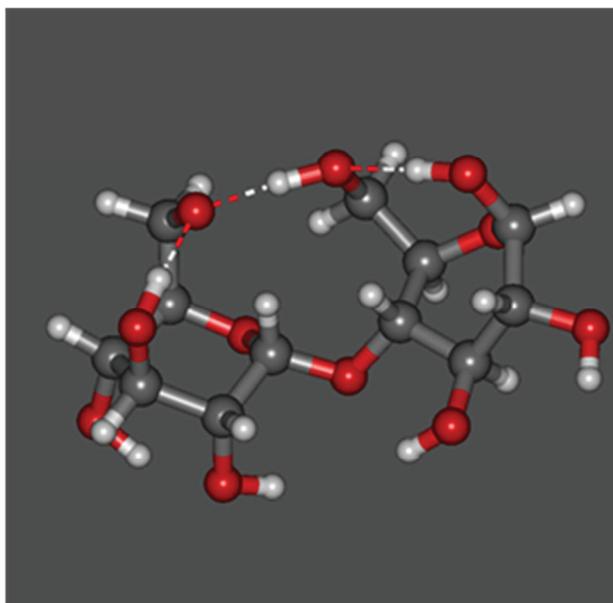


Figure III-12 : géométrie de l'anion maltose [M-H]- la plus stable. Les calculs ont été réalisés avec la fonctionnelle *B3LYP/aug-cc-pvdz level*.

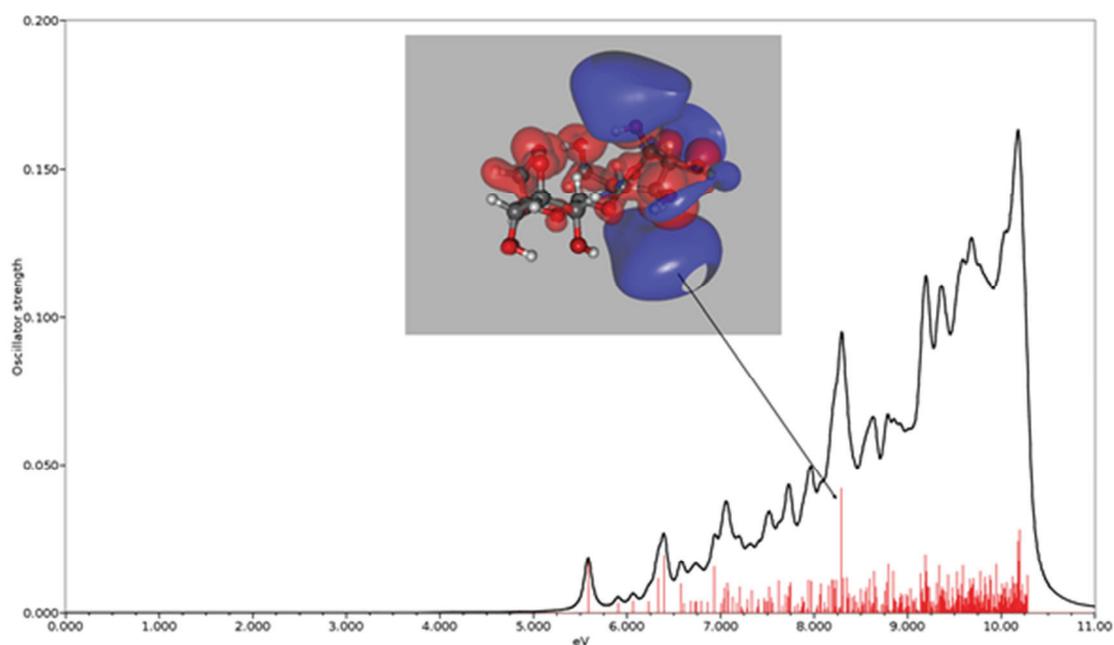


Figure III-13 : spectre d'absorption théorique calculé pour la plus stable géométrie. Les calculs ont été réalisés par TD-DFT (*time dependent density functional method*) en utilisant la fonctionnelle LC-wPBE avec la base aug-cc-pvdz.

III.3.2.3 Effet de charge

Une fois l'influence de la taille de l'analyte étudiée, il semble important d'étudier l'influence de la charge sur l'ion d'intérêt. En effet, nous avons vu dans le chapitre Chapitre II que, bien que les cations et les anions possédaient les mêmes mécanismes de relaxation, les canaux préférentiels n'étaient pas toujours les mêmes.

Cette étude a été réalisée sur le maltohexaose. Trois états de charges différents ont été étudiés, l'ion mono-chargé déprotoné $[M-H]^-$, l'ion dichargé déprotoné $[M-2H]^{2-}$ et l'ion sodiaté $[M+Na]^+$. La Figure III-14 montre les spectres d'action de ces 3 espèces ionisées.

Comme décrit précédemment, le mode de relaxation privilégié pour les anions, suite à l'excitation laser, est le détachement d'un électron. Ce mode de relaxation est le seul visible pour l'anion $[M-H]^-$. L'ajout d'une charge négative supplémentaire, anion $[M-2H]^-$, permet d'ouvrir de nouveaux canaux de relaxation et, en plus du détachement d'électron, de la fragmentation est détectée comme le montre la Figure III-15a suite à l'irradiation SR à 16 eV. Cette fragmentation est le canal de relaxation principal comme le montre la Figure III-15b avec un rapport de branchement entre la photo-fragmentation et le photo-détachement. Ce rapport de branchement est stable tout au long de la gamme d'énergie étudiée. Il n'y a donc aucune influence de l'énergie des photons sur les rapports de processus de relaxation. Contrairement à ce qui a été expliqué pour les protéines dans le chapitre Chapitre II, dans le cas des oligosaccharides, le mécanisme de relaxation le plus rapide est très certainement la fragmentation et non l'émission d'un électron. Cette compétition entre la photo-fragmentation et le photo-détachement est en adéquation avec l'étude réalisée par Amandine Rcaud sur les héparines dans le domaine de l'UV ¹³⁵. Ainsi, l'ajout d'une deuxième charge doit abaisser l'énergie de liaison des liaisons covalentes et permet au processus de fragmentation de rentrer en compétition avec le processus de détachement d'électron.

De plus, l'ajout d'un cation sodium sur l'analyte engendre une forte augmentation du taux de fragmentation avec des fragments intra et inter-cycliques, Figure III-16. En effet, de nombreux fragments intra-cycliques, avec de fortes intensités, sont visibles sur ce spectre de masse. Cette augmentation du taux de fragmentation des cations sodiatés vis-à-vis des anions déprotonés peut s'expliquer par la solvatation du cation Na^+ par l'oligosaccharide. Cette solvatation Na^+ pourrait fragiliser les liaisons moléculaires et abaisser l'énergie de dissociation de ces liaisons. Ainsi, les liaisons sont plus faibles et cassent plus facilement. Ce phénomène a déjà été observé par Harvey et al. ¹⁸³. Cependant, seuls des calculs de dynamique moléculaire sur des cations protonés (H^+) et des cations sodiatés (Na^+) permettraient de valider cette hypothèse. Il semble donc plus intéressant de travailler en mode positif, avec un adduit sodium, qu'en mode négatif pour étudier la fragmentation des oligosaccharides.

Concernant les spectres d'action, les courbes pour les deux anions sont similaires. Ce résultat est difficile à expliquer, en effet l'ajout d'une charge supplémentaire crée une nouvelle paire d'électron faible plus facile à ioniser, le taux de photodissociation devrait être plus important. La courbe correspondant au cation montre une nette augmentation du taux de photo-fragmentation entre 12

et 18 eV par rapport aux deux autres courbes. Cette augmentation est en accord avec la discussion sur l'accroissement du taux de fragmentation d'une molécule suite à l'ajout d'un adduit sodium décrite précédemment.

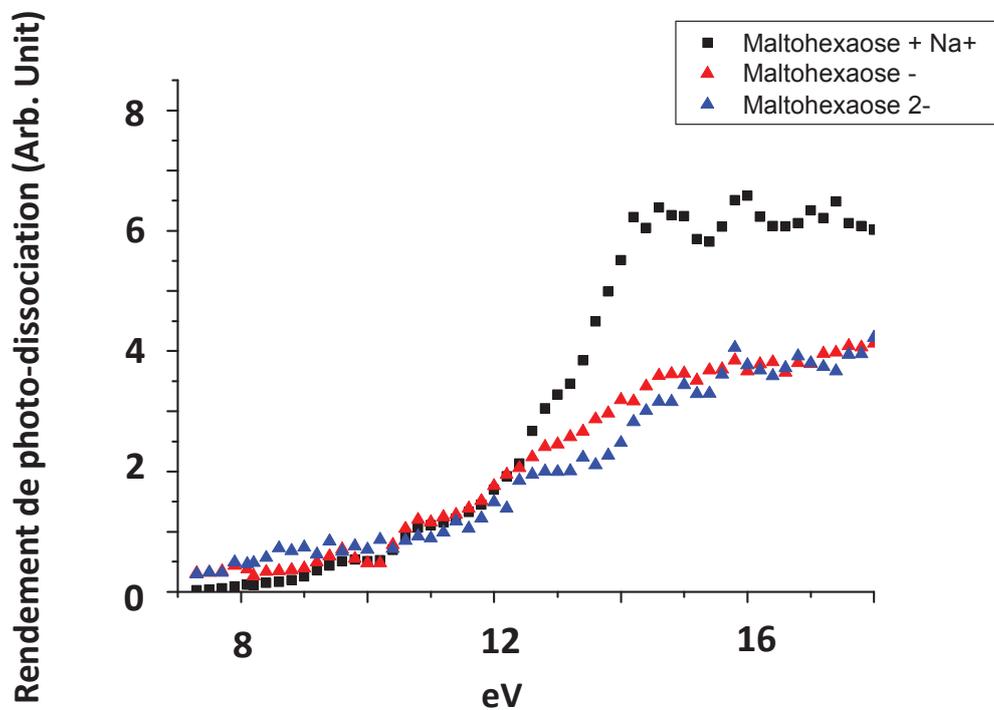


Figure III-14 : spectres d'action VUV des ions mono-chargé déprotoné $[M-H]^-$, dichargé déprotoné $[M-2H]^{2-}$ et sodié $[M+Na]^+$ du maltohexaose.

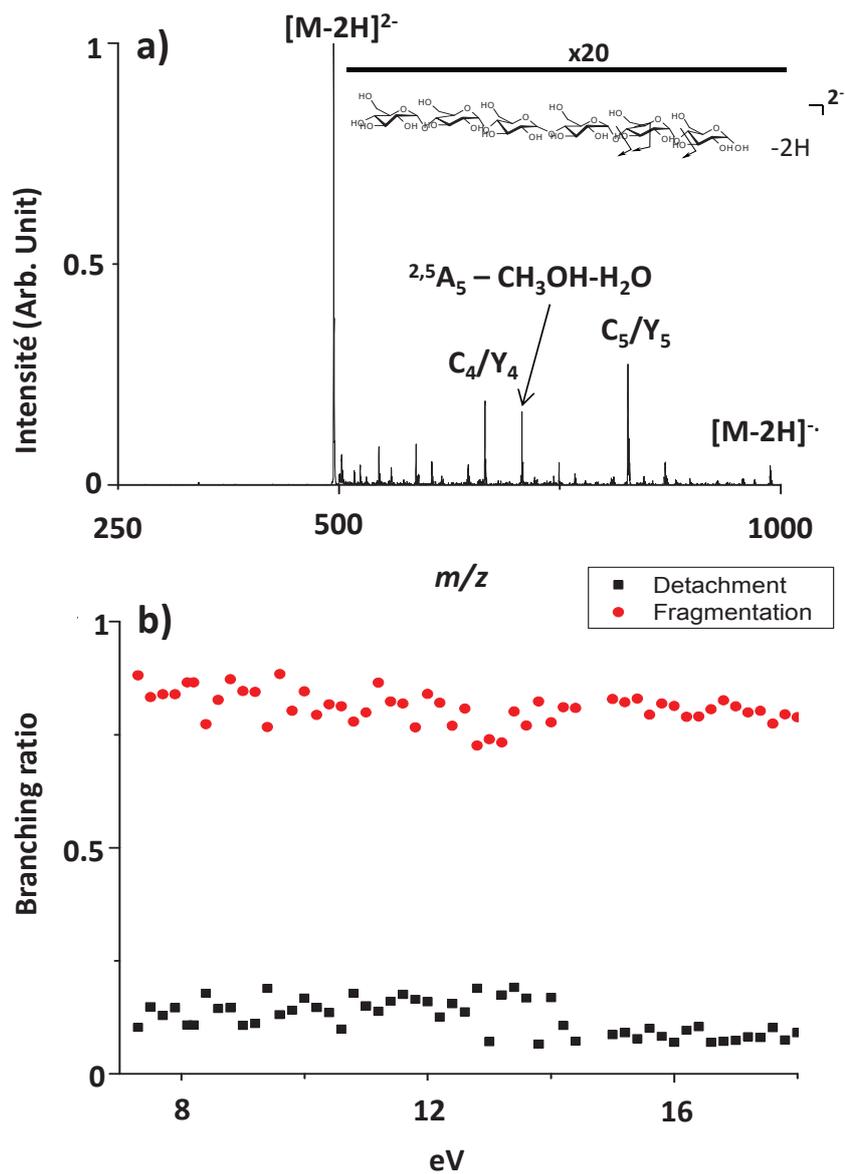


Figure III-15 : a) spectre de photo-fragmentation pour l'ion maltohexaose $[M-2H]^{2-}$ enregistré à 16 eV. b) Rapport de branchement entre la fragmentation et le photo-détachement pour l'ion maltohexaose $[M-2H]^{2-}$ en fonction de l'énergie d'irradiation SR.

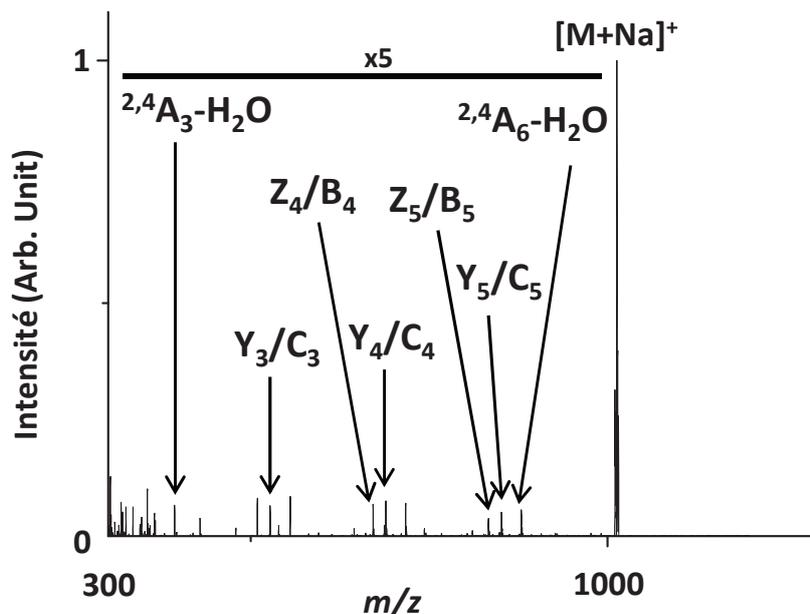


Figure III-16 : spectre de photo-fragmentation pour l'ion maltohexaose $[M+Na]^+$ enregistré à 16 eV.

III.3.2.4 Utilisation du VUV comme outil de fragmentation

Dans cette troisième partie nous allons utiliser les propriétés de photo-fragmentation d'ion sodiaté dans le VUV afin de discriminer deux molécules isomères (même formule brute). Récemment, grâce aux lasers à 157 nm (7.9 eV) la photo-fragmentation d'oligosaccharide a été développée en tant qu'outil analytique. En effet, suite à l'irradiation à 157 nm de nombreux fragments intra-cycliques sont obtenus et permettent une meilleure information structurale pour la discrimination d'isomères^{127, 128, 168}. Nous souhaitons vérifier la faisabilité de telles expériences avec une énergie de photons supérieure de l'ordre de 16 eV. La Figure III-17 montre la fragmentation à 16 eV et en CID des deux isomères, le mélizitose (Figure III-17a)) et le raffinose (Figure III-17b)). Tout d'abord, la CID n'offre que très peu de fragments et seulement les ruptures glycosidiques Y_2 et Z_2 des oligosaccharides sont détectées. Cette technique ne permet donc pas de discriminer ces deux isomères. En VUVPD, la plupart des fragments détectés sont communs pour les deux molécules, cependant, le spectre MS/MS du mélizitose contient un fragment « signature » à m/z 333 (Y_2-CH_2OH) non détecté chez le raffinose (Figure III-17a)). De même, un fragment « signature » est détecté seulement chez le raffinose à m/z 364 (Figure III-17b)). Ces deux fragments ont déjà été reportés lors de précédentes expériences avec un laser à 157 nm¹⁶⁸. Le VUVPD à 16 eV n'apporte donc pas d'information supplémentaire par rapport à une photo-fragmentation à 157 nm (7.9 eV).

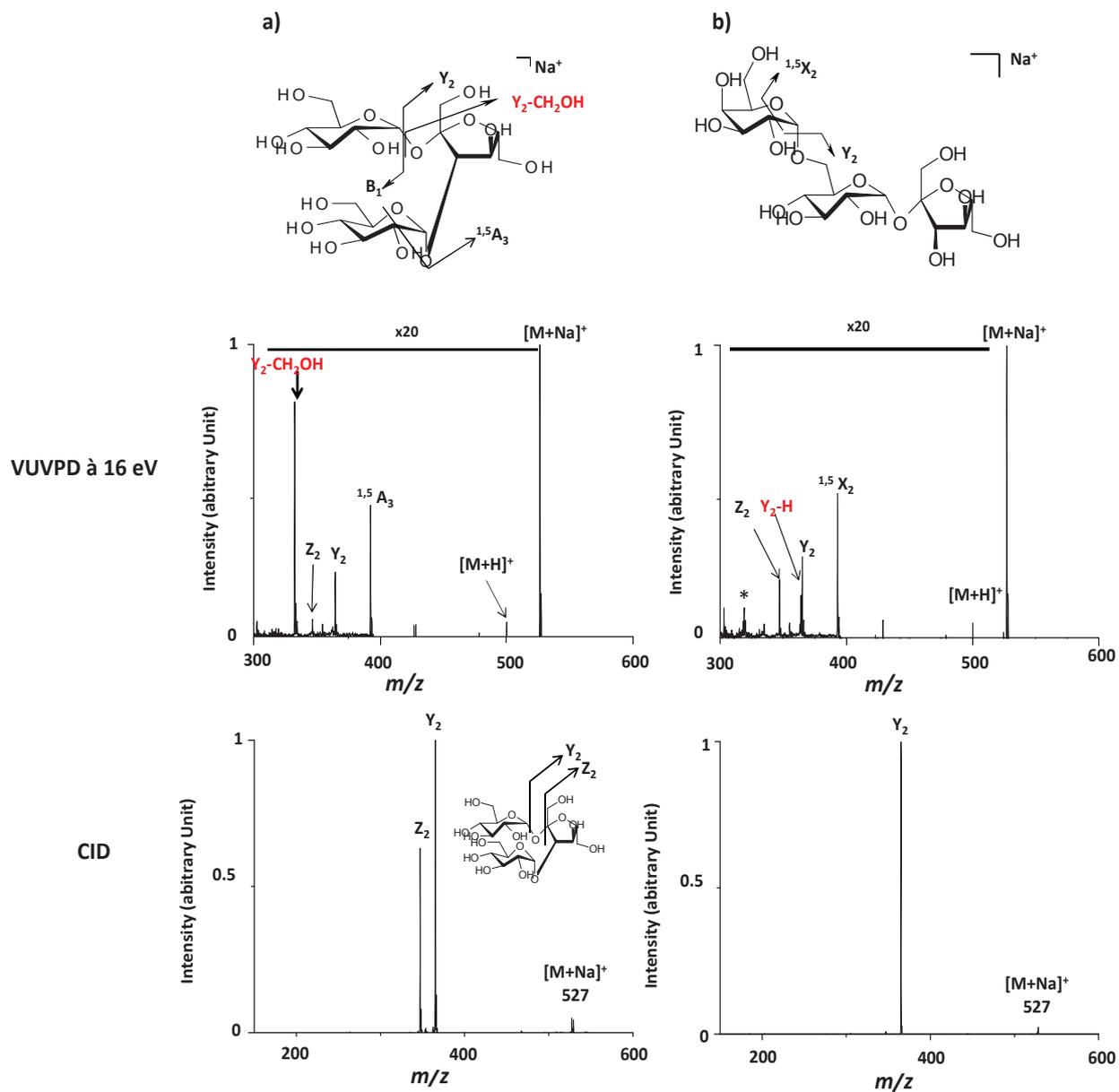


Figure III-17 : spectres de photo-fragmentation à 16 eV des ions $[M+Na]^+$ a) mélizitose et b) raffinose. Les fragments en rouges sont les ions « signatures » propres à chaque structure. Les spectres de masse en dessous sont les spectres de masse CID.

III.3.3 Conclusion

Dans cette partie, nous avons premièrement montré que les oligosaccharides n'absorbent pas dans le domaine de l'UV au-dessus de 220 nm (en dessous de 5.6 eV). Nous avons ensuite exploré pour la première fois les propriétés optiques en phase gazeuse d'oligosaccharides dans le domaine du VUV (7.2 à 18 eV) en fonction du degré de polymérisation (DP) du carbohydrate ainsi que de la charge portée par le polysaccharide.

Premièrement, le photo-détachement apparaît donc comme le canal de relaxation préférentiel des ions mono-chargés et ce photo-détachement augmente considérablement lorsque le DP du polysaccharide croît. Les spectres d'action obtenus peuvent servir de signature spectrale lors d'analyses spectroscopiques futures.

Ensuite, la nature de la charge portée par l'espèce étudiée a un effet important sur le type de relaxation (détachement ou fragmentation) mais aussi sur le taux de fragments de l'ion avec une fragmentation bien supérieure lors de l'étude d'ion sodiaté.

Enfin, la photo-fragmentation VUV apparaît comme un outil efficace pour la distinction de deux isomères suite à l'ouverture de canaux de fragmentation différents de ceux observés en CID.

Cependant, le VUV est un domaine de longueur d'onde dans lequel toutes les liaisons peuvent être excitées suite à l'irradiation laser et donc toutes les molécules sont susceptibles de fragmenter suite à la relaxation. N'oublions pas que le but de cette thèse est de développer une nouvelle méthode de quantification de biomolécule ayant une étape de sélectivité supplémentaire par rapport à la SRM-CID classique. Contrairement à l'UV et au VUV, l'irradiation laser du visible est très spécifique, peu de molécules natives absorbent dans ce domaine de longueur d'onde. Pour absorber, plusieurs alternatives sont possibles. La première, les molécules doivent avoir des chromophores natifs spécifiques, comme le cytochrome C¹⁴⁷. La deuxième, est basée sur une dérivation chimique. En effet, il est possible de greffer des chromophores spécifiques absorbant à une longueur d'onde bien précise sur les molécules d'intérêts. Grâce à cette dérivation chimique et à un grand choix de chromophore, il sera possible de choisir la longueur d'onde de travail.

Dans la partie suivante, nous allons discuter de l'influence du greffage d'un chromophore sur un disaccharide afin d'étudier les propriétés optiques de ce couple.

III.4 Spectroscopie d'action dans le visible d'oligosaccharide greffé avec un chromophore *push-pull*.

L'utilisation de chromophores absorbants dans le domaine du visible pour l'analyse de polysaccharides est un outil analytique de plus en plus crédible dans un contexte médical pour le diagnostic ou le traitement de maladie. En effet, afin d'améliorer l'analyse d'oligosaccharides, il est possible de dériver, en amont de l'analyse, ces derniers avec des chromophores fluorescents et de réaliser une détection par fluorescence après séparation par chromatographie liquide^{155, 184}. Cependant, à cause de la forte influence de l'analyte sur la fluorescence globale du couple oligosaccharide-chromophore, il est très souvent difficile de prédire quantitativement les intensités de fluorescence.

Ces techniques de dérivation ont ensuite été importées à la spectrométrie de masse pour l'analyse structurale des polysaccharides après irradiation laser à 355 nm²¹. D'un point de vue quantitatif, il est important d'étudier les propriétés optiques en phase gazeuse d'un couplage chromophore-oligosaccharide afin de vérifier si, comme en phase liquide, il existe une forte influence de l'analyte sur les propriétés du chromophore après dérivation. Par ailleurs, un autre point important, il semble indispensable d'étudier les canaux de fragmentation ouverts suite à l'excitation du chromophore. Une fragmentation au sein de l'oligosaccharide induite après excitation du chromophore s'avèrerait très intéressante d'un point de vue analytique.

Nous allons dans cette partie discuter d'un couplage rapide et efficace de chromophore *push-pull* sur des oligosaccharides puis nous étudierons les propriétés optiques du chromophore seul ainsi que celles du couple chromophore-oligosaccharide. Un chromophore *push-pull* est un chromophore possédant des propriétés physico-chimiques à la fois accepteur et donneur d'électrons¹⁸⁵. En d'autres termes, l'excitation électronique se traduit par un transfert d'électron d'une partie « donneur » du chromophore vers une autre partie « accepteur » du chromophore. Ensuite, l'énergie est évacuée soit sous forme de lumière par fluorescence soit sous forme vibrationnelle.

III.4.1 Paramètres expérimentaux

III.4.1.1 Préparation d'échantillons

III.4.1.1.1 Synthèse de chromophore *push-pull*

La synthèse du chromophore ENS007 a été réalisée par l'équipe de Yann Bretonnière à l'ENS de Lyon. Il s'agit d'une synthèse multi-étapes réalisée en « one-pot » c'est-à-dire sans purification intermédiaire¹⁸⁶. Ce composé a été développé dans les années 1960 pour ses propriétés optiques et a été utilisé dans la coloration de textile¹⁸⁷. C'est seulement durant les années 2000 que le cycle

aromatique 4-cyano-5-dicyanomethylene-2-oxo-3-pyrroline a été reporté comme un excellent accepteur d'électron ¹⁸⁸. La Figure III-18 montre la structure du chromophore ENS007 avec cycle aromatique 4-cyano-5-dicyanomethylene-2-oxo-3-pyrroline comme groupement accepteur et la fonction diméthylamino comme groupe donneur d'électron. A noter qu'aucune propriété de fluorescence n'a été reportée sur ce type de chromophore.

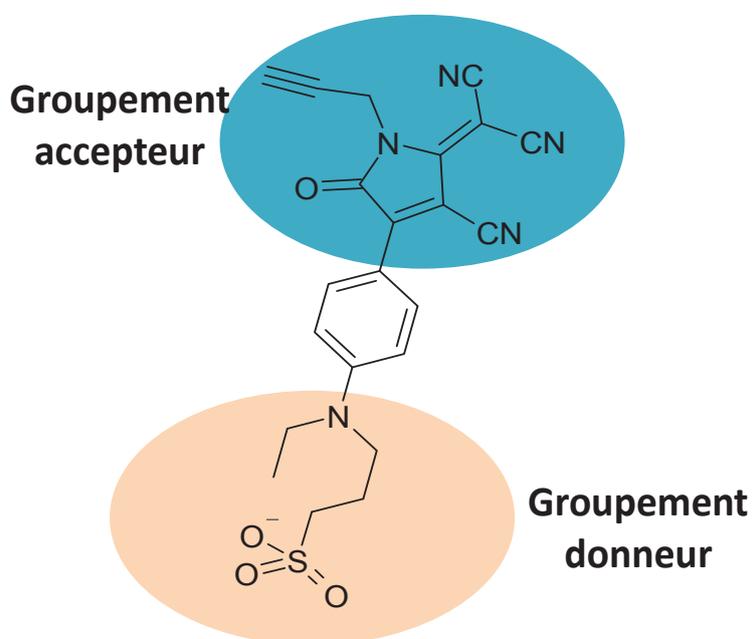


Figure III-18 : structure chimique du chromophore ENS007 d'intérêt.

III.4.1.1.2 Couplage du polysaccharide avec le chromophore

Afin de coupler la terminaison alcyne du chromophore au maltose, il est nécessaire de dériver ce dernier avec une fonction azide en terminaison réductrice ¹⁸⁹. Une fois cette dérivation réalisée, une réaction de « *click chemistry* » ¹⁹⁰ entre la fonction alcyne du chromophore et la fonction azide du sucre permet de coupler les deux entités ¹⁹¹ (Figure III-19).

Une fois le couplage réalisé le produit final est purifié ¹⁸⁶ et dissout à 100 μ M dans une solution de H₂O/MeOH (v/v ; 50/50). Les échantillons sont infusés avec un débit de 5 μ L/min et ionisés par électrospray.

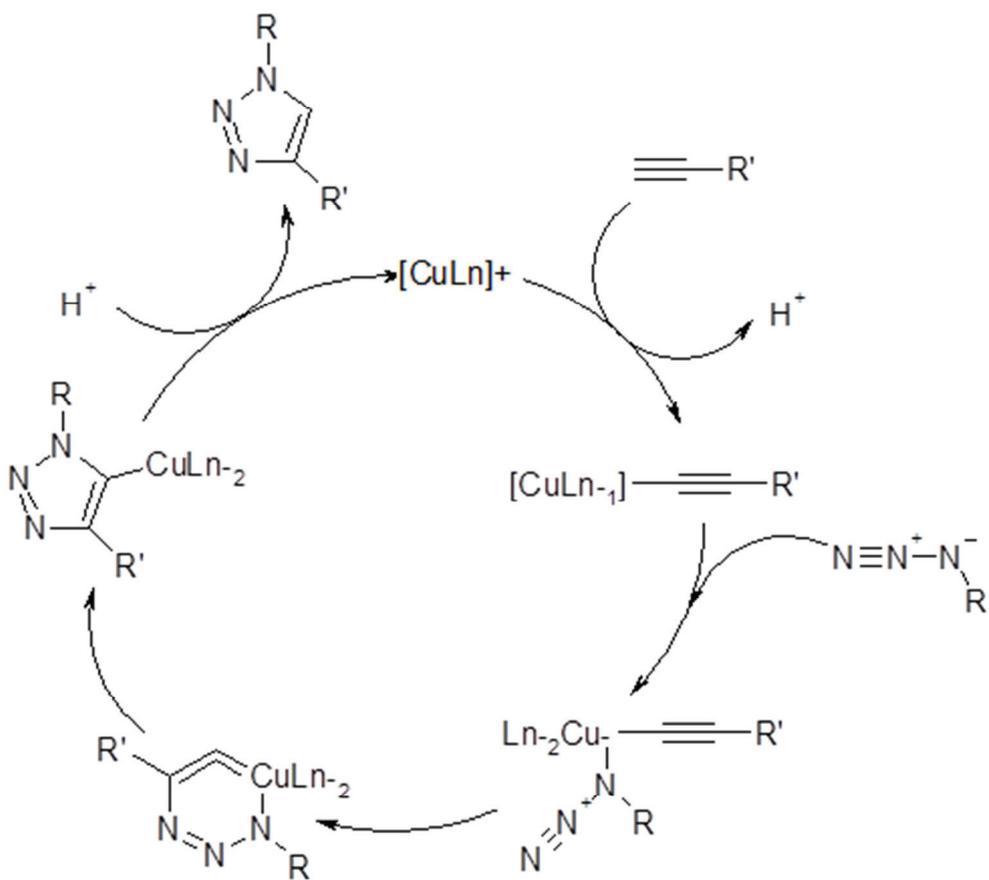


Figure III-19 : réaction de *click chemistry*.

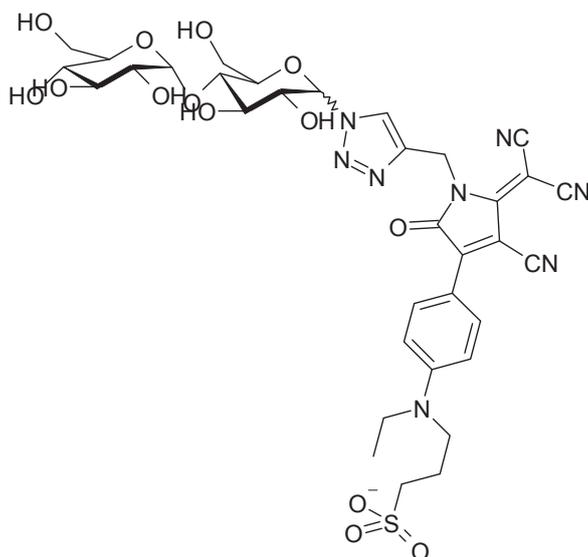


Figure III-20 : structure chimique du maltose greffé avec le chromophore ENS007.

III.4.1.2 Instrumentation

Pour l'analyse du spectre optique en phase liquide du produit, un spectromètre JASCO V550 a été utilisé.

Pour l'analyse en phase gazeuse, le montage expérimental utilisé est celui décrit dans la partie III.2.5. L'ion précurseur d'intérêt est dans un premier temps isolé dans le piège puis irradié 500 ms à la longueur d'onde d'intérêt. Suite à l'enregistrement du spectre de masse correspondant à la longueur d'onde associée, un spectre d'action est obtenu en mesurant le taux de fragmentation en fonction de la longueur d'onde ; ($\sigma = \ln((parent + \Sigma frag) / parent) / (\lambda * P)$) avec λ correspondant à la longueur d'onde de travail, P à la puissance mesurée à la longueur d'onde de travail, *parent* l'intensité du pic de l'ion précurseur, $\Sigma frag$ la somme des intensités des pics des ions. 50 scans ont été enregistrés afin d'obtenir un signal moyen pour chaque longueur d'onde.

III.4.2 Résultats et discussion

III.4.2.1 Comparaison de l'absorbance du couple oligosaccharide-chromophore en phase liquide vis-à-vis de la phase gazeuse.

III.4.2.1.1 Partie expérimentale

Dans un premier temps, il semble important de confirmer l'influence de l'analyte, ici le maltose, sur les propriétés optiques du chromophore en solution. Pour cela, des premières expériences réalisées par l'ENS consistent à enregistrer les spectres en solutions du chromophore seul ainsi que celui de maltose dérivé par le chromophore. L'influence du solvant en milieu liquide sur l'absorbance du chromophore ENS007 et du couplage chromophore-maltose a également été étudiée.

En comparant, dans un même solvant, le maximum d'absorbance du chromophore seul et du couple chromophore-maltose, nous pouvons voir qu'il n'y a pas de différence importante entre les valeurs le λ_{max} . En effet, pour l'eau par exemple, nous voyons que les valeurs sont très proches, suite au greffage sur le maltose, l'absorbance est décalée de quelques nanomètres vers les hautes longueurs d'onde. Le maltose n'a que peu d'influence sur les propriétés optiques en phase liquide.

Par ailleurs, si l'on s'intéresse à l'influence du solvant sur les propriétés optiques du chromophore ou du couple chromophore-maltose, nous pouvons noter que lorsque l'on augmente la polarité du solvant, du dioxane à l'eau, il y a un décalage de l'absorbance vers les hautes longueurs d'onde (*red shift*). Ce solvatochromisme peut être attribué à une meilleure stabilisation de la molécule lorsque la polarité du solvant augmente. On peut aussi noter que dans l'eau et le méthanol, les bandes d'absorptions des deux molécules (maltose dérivé et chromophore ENS007 seul) sont très proches.

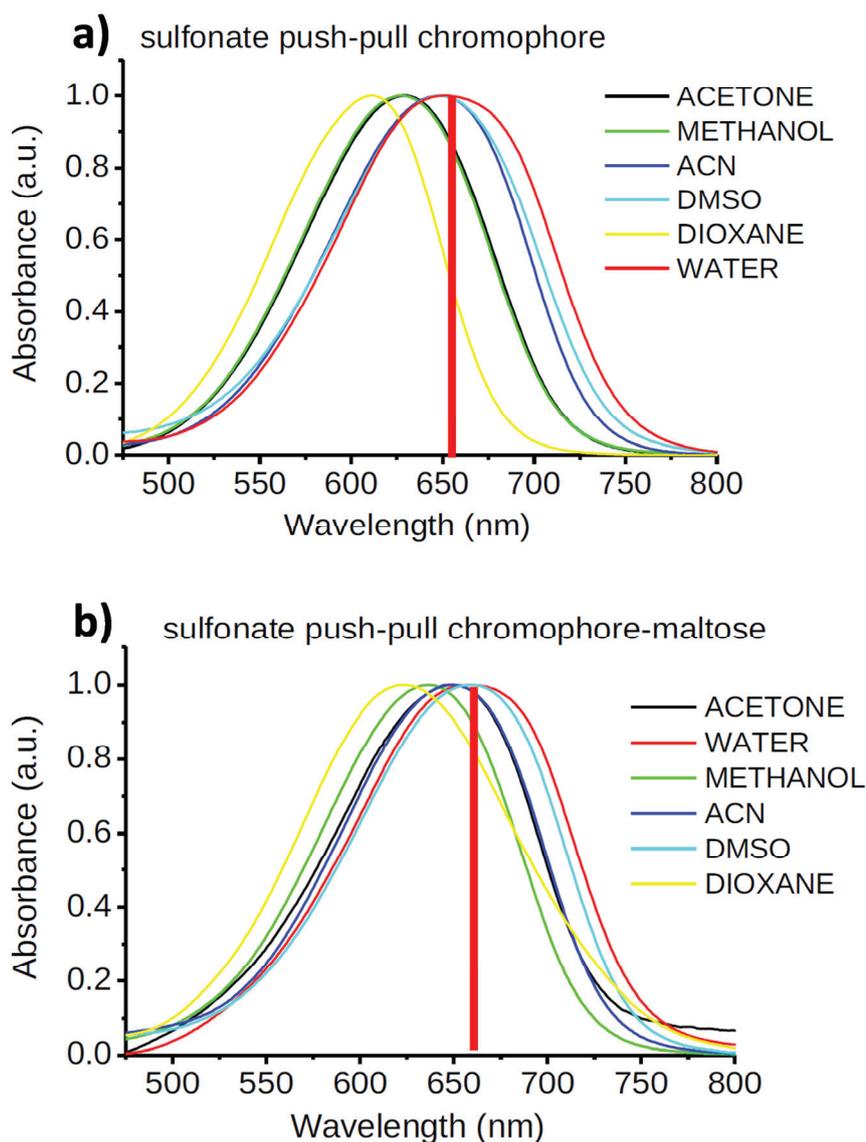


Figure III-21 : spectres en solution dans différents solvants du chromophore seul (a) et du maltose dérivé avec le chromophore (b). Les lignes rouges correspondent aux λ_{\max} d'absorption dans l'eau.

Afin de comprendre un peu mieux les phénomènes de solvatochromisme et surtout, de vérifier si en phase gazeuse, le maltose influence sur les propriétés optiques du chromophore, les spectres optiques en phase gazeuse du carbohydrate dérivé et du chromophore seul sont enregistrés. En effet, l'analyse d'un spectre d'action en phase gazeuse permet de s'affranchir de tout solvatochromisme.

Pour l'enregistrement des spectres optiques d'action en phase gazeuse, nous avons irradié à différentes longueurs d'onde le chromophore seul puis le chromophore greffé sur le maltose. L'ensemble des fragments du chromophore a été suivi pour le spectre d'action de celui-ci. La Figure III-22 montre un spectre de masse du chromophore seul enregistré suite à l'irradiation laser à 610

nm. En ce qui concerne le maltose dérivé, un spectre de masse sera présenté Figure III-26b. Dans ce cas aussi, l'ensemble des fragments a été suivi pour l'enregistrement du spectre d'action.

La première information que l'on peut tirer des deux spectres d'action du chromophore seul et du chromophore greffé sur le maltose, Figure III-23, est que le greffage du chromophore sur le maltose induit un décalage important, de plus de 60 nm, de son absorbance vers les basses longueurs d'ondes (*blue shift*). L'influence du maltose est donc bien plus importante en phase gazeuse qu'en phase liquide. Par rapport aux spectres en solution, nous pouvons noter que le spectre d'action en phase gazeuse du chromophore seul se rapproche plus des spectres enregistrés dans les solvants les plus apolaires comme le dioxane.

Afin de comprendre ces différents phénomènes, des calculs théoriques sur les excitations optiques, en TD-DFT, réalisés par Claire Loison ont permis d'explorer les différents effets obtenus suite aux expériences¹⁸⁶.

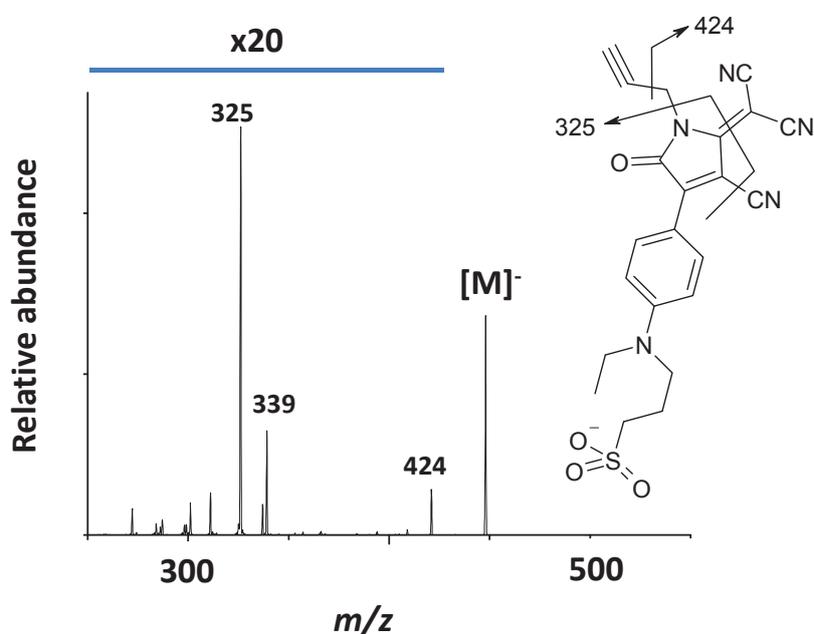


Figure III-22 : spectre MS/MS du chromophore seul suite à l'irradiation laser à 610 nm. La structure chimique montre les fragments majoritaires.

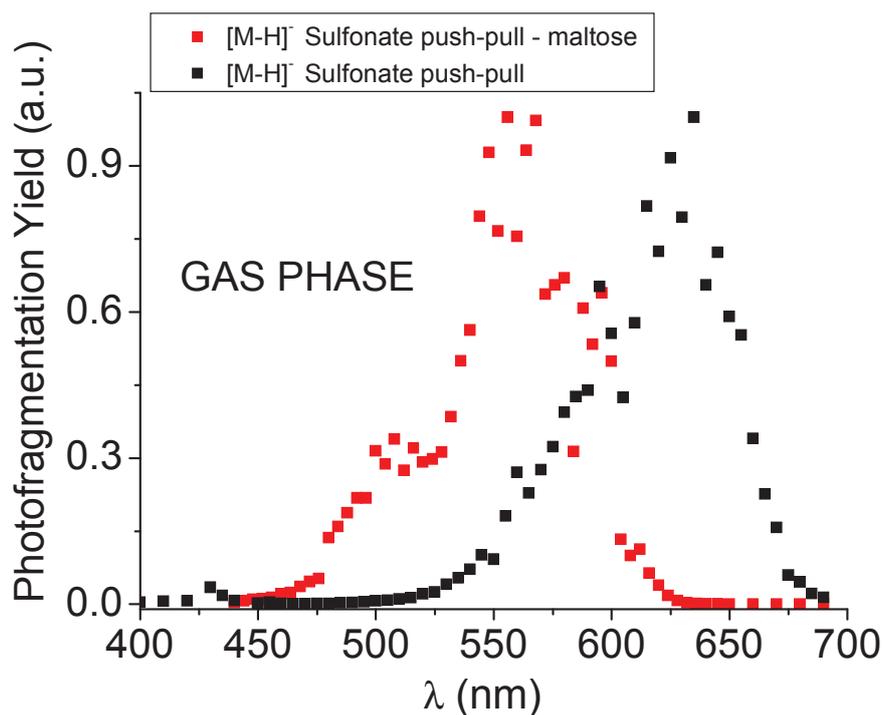


Figure III-23 : spectres d'actions du chromophore ENS 007 (■) et du maltose dérivé (■) en fonction de la longueur d'onde.

III.4.2.1.2 Partie calculs théoriques

Les calculs théoriques ont été réalisés avec les programmes ADF¹⁹² et Gaussian. Les formes géométriques ont été obtenues par optimisation DFT en utilisant les fonctionnelles BP86^{193, 194} et M062X, développées par Zhao et Truhlar pour décrire avec précision les interactions intramoléculaires faibles¹⁹⁵.

Tout d'abord, le groupe aromatique 4-cyano-5-dicyanomethylene-2-oxo-3-pyrroline forme un ensemble de cycles aromatiques conjugués plan. Cette forme plane provient à la fois de la délocalisation des électrons π sur l'ensemble du groupement conjugué, aniline et pyrroline et des répulsions électroniques générées par l'ensemble des substituants. D'après les optimisations géométriques réalisées en DFT, en phase gazeuse, l'angle optimal entre les deux cycles (θ_2 dans la Figure III-24) est de 20°. Suite à l'ajout du maltose, deux effets contraires apparaissent. D'un côté, le maltose apporte une grande flexibilité au système, mais d'un autre, une forte interaction entre le chaîne sulfonate et le groupe terminal hydroxyle du maltose apparaît. Ces calculs montrent donc qu'en phase gazeuse, le greffage du chromophore sur le maltose entraîne une contrainte forte au niveau de la structure tridimensionnelle de la molécule de par une interaction entre le groupement sulfonate du chromophore et les groupements alcools du sucre. Ces interactions n'existent pas en

phase liquide car la charge du chromophore interagit préférentiellement avec le solvant (Figure III-25).

Ainsi, en phase gazeuse, le greffage du maltose impose une contrainte forte au chromophore, cette contrainte influence grandement la conformation du chromophore et affecte directement les propriétés optiques différentes du chromophore en phase gazeuse vis-à-vis de la phase liquide mais surtout, plus important pour nous, les propriétés du chromophore avec ou sans molécule greffée.

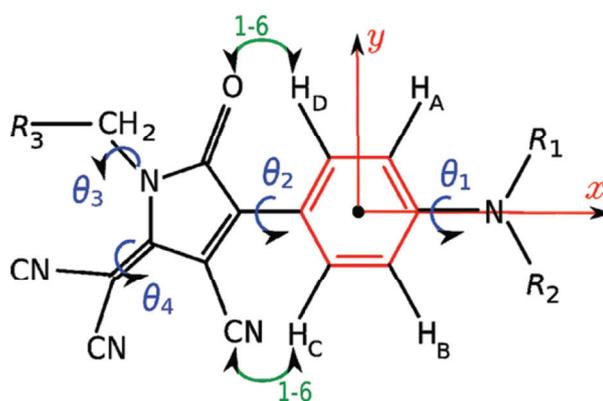


Figure III-24 : molécule modèle utilisée pour les calculs théoriques. Les substituants R_1 et R_2 sont respectivement un méthyl et un éthynylsulfonate, R_3 un méthyl, éthyne ou un triazole greffé au maltose. Les axes sont définis par rapport au cycle phenyl (en rouge).

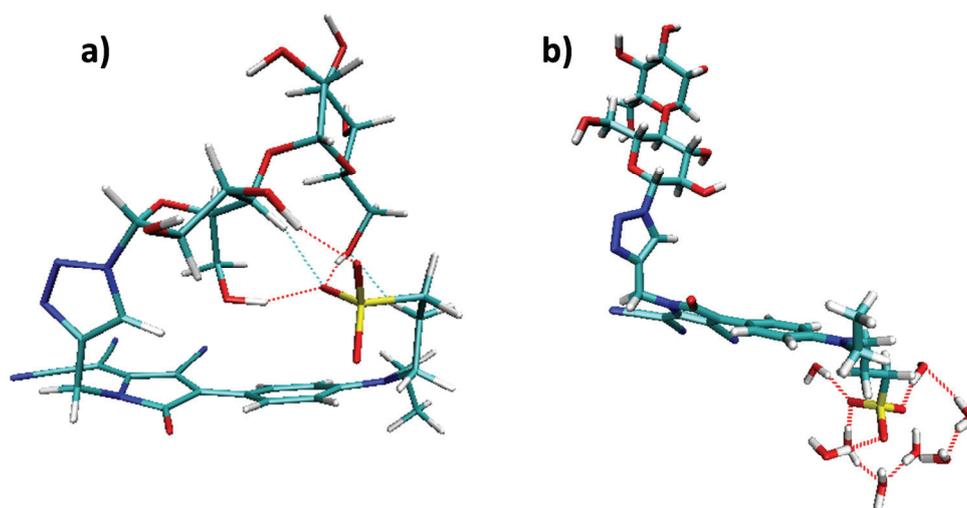


Figure III-25 : conformation de plus basse énergie pour le maltose dérivé en a) phase gazeuse, b) en phase liquide (ici dans l'eau)¹⁸⁶.

III.4.2.2 Utilisation de la dérivation par chromophore pour la photo-fragmentation dans le domaine du visible.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, la dérivation par chromophore de biomolécule permet principalement de réaliser des analyses de fluorescence dans le domaine médical. De plus, le groupe de Brodbelt ¹⁷³ a démontré que ce couplage pouvait être utilisé pour des analyses structurales d'oligosaccharides. Nous nous sommes donc intéressés aux différents canaux de fragmentation ouverts suite à l'irradiation du couple chromophore-maltose à 560 nm.

La Figure III-26a montre le spectre MS/MS obtenu suite à la fragmentation par CID de la molécule dérivée. Très peu de fragments sont visibles, au niveau du maltose, un fragment provenant de la rupture de la liaison glycosidique, Y_1 et un seul fragment intra-cyclique, $^{0,3}X_1$, sont détectés. Deux fragments provenant du chromophore, à m/z 409 et m/z 490 sont également détectés. La même molécule a été analysée suite à l'irradiation laser à 560 nm et la Figure III-26b montre également des ions fragments provenant du chromophore à m/z 409 et m/z 490. De plus, un plus grand nombre de fragments intra-cycliques est détecté, $^{0,2}X_1-H_2O$, $^{0,3}X_1-H_2O$, $^{3,4}X_1-N_2$. Ainsi, l'ensemble de ces fragments permet donc une meilleure identification de l'oligosaccharide, ici le maltose. Plusieurs canaux de fragmentations non visibles en CID sont ouverts en dissociation induite par laser (LID).

L'ouverture de ces différents canaux de fragmentation peut s'expliquer par le processus de fragmentation de la LID. En LID, le chromophore va capter l'énergie émise par le laser. Cette énergie peut être réémise sous forme de lumière, il s'agit de la fluorescence, ou bien redistribuée à l'ensemble de la molécule par transfert d'énergie. Grâce aux calculs réalisés par Claire Loison, nous avons vu que la conformation la plus stable en phase gazeuse du couple maltose-chromophore est la formation d'un cycle fermé (Figure III-25a). Dans cette conformation, le maltose est très proche du chromophore ce qui facilite très certainement ce transfert d'énergie du chromophore vers le maltose.

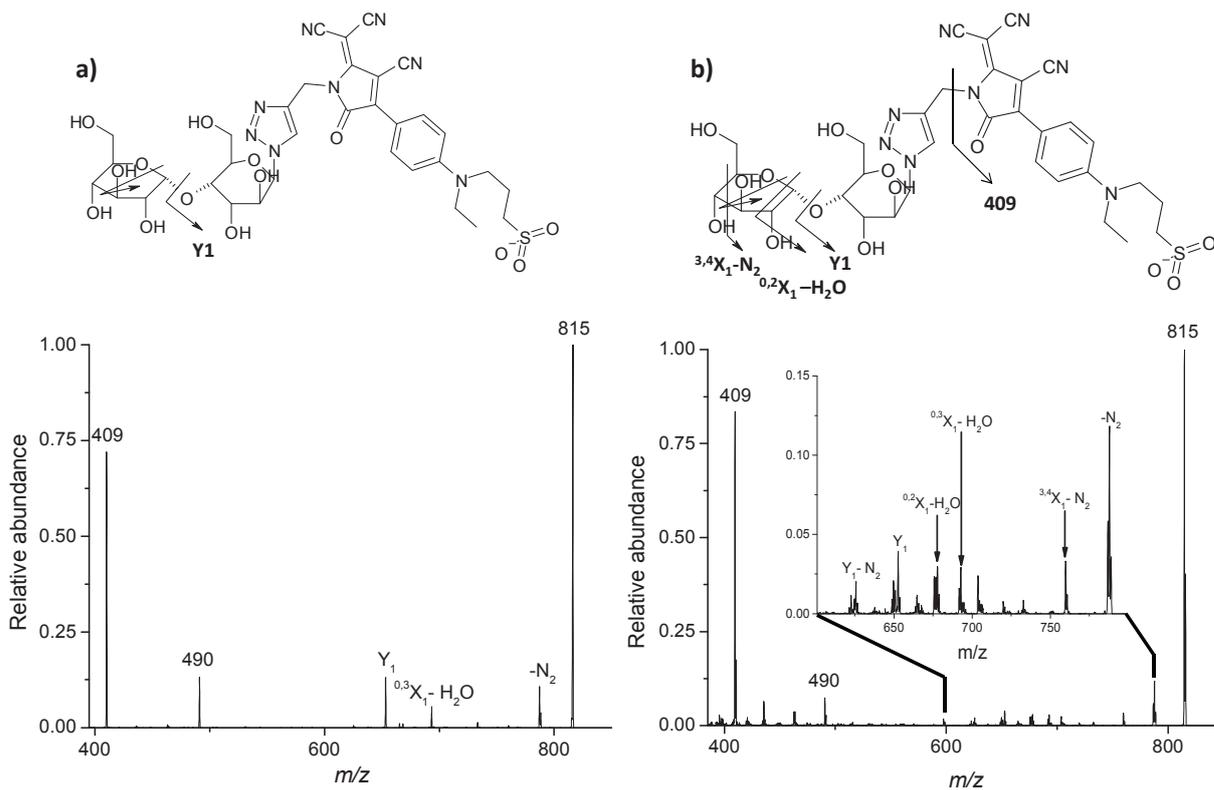


Figure III-26 : spectres MSMS du maltose dérivé avec le chromophore ENS007 suite à la fragmentation CID a) ou photo-fragmentation laser à 560 nm b). Les fragmentations principales sont présentées respectivement sur chaque structure.

III.4.3 Conclusion

Dans cette partie, un polysaccharide, le maltose, a été dérivé avec un chromophore *push-pull* présentant une forte absorbance dans le domaine du visible. L'impact sur les propriétés optiques du greffage du maltose sur le chromophore a été étudié en phase liquide et en phase gazeuse et explicité par des calculs théoriques.

L'étude en solution a montré que le maltose n'a que peu d'influence sur l'absorbance du chromophore contrairement au solvant de la solution. En phase gazeuse, le maltose affecte grandement les propriétés optiques du chromophore avec un décalage du maximum d'absorbance vers les plus basses longueurs d'onde (*blue shift* d'environ 70 nm). Les calculs théoriques ont permis de mettre en évidence l'apparition d'une forte interaction intramoléculaire entre le groupement sulfonate et les fonctions hydroxyle du maltose. Cette contrainte stérique n'est pas visible au niveau des simulations de conformation en solution.

Par ailleurs, grâce à l'ajout de chromophore, il est possible de réaliser des spectres MS/MS en dissociation induite par laser dans le domaine du visible. L'analyse LID montre que différents canaux de fragmentation non visibles en dissociation par collision (CID) sont ouverts. Ces fragmentations sont intra-cycliques et sont donc spécifiques de la molécule étudiée.

La dérivation par chromophore est donc une voix d'analyse prometteuse dans l'optique de ne fragmenter sélectivement que les ions d'intérêts.

De plus, lors de l'utilisation de chromophore pour une dérivation chimique, il apparaît important d'étudier les propriétés optiques du chromophore mais aussi de la molécule dérivée même si celle-ci n'absorbe pas dans le domaine de longueur d'onde de travail.

III.5 Conclusion générale

Dans ce chapitre, nous avons exploré différentes méthodes permettant de fragmenter suite à l'irradiation laser, des molécules n'absorbant pas dans le domaine de l'ultraviolet.

Les travaux réalisés sur le VUV mettent en évidence la grande influence du degré de polymérisation et de la charge présente sur l'ion pour la photodissociation des oligosaccharides. Ces travaux peuvent servir de référence lors de prochaines études de VUV sur les sucres. Un des avantages de cette gamme de longueur d'onde est donc la possibilité d'exciter toutes les liaisons chimiques des biomolécules et donc d'étudier leurs fragmentations et propriétés optiques.

Cependant, il semble difficile d'utiliser en routine analytique les longueurs d'onde du VUV. En effet, l'accès à un synchrotron tel que celui de SOLEIL est limité. De plus, cette utilisation est lourde et coûteuse, elle ne peut pas s'appliquer à grande échelle. Bien qu'il existe des lasers de paillasse émettant des photons dans le VUV, leur utilisation reste compliquée (difficulté de focalisation du faisceau laser notamment) et nécessite un matériel optique adapté et dédié. Par ailleurs, parce qu'elle permet d'exciter toutes les liaisons chimiques, la photodissociation VUV n'est pas spécifique, toutes les molécules peuvent absorber et donc fragmenter. De plus, l'irradiation VUV engendre un très grand nombre de fragments et dilue donc le signal sur un très grand nombre de canaux de fragmentation. Ceci n'est pas compatible avec une analyse SRM pour laquelle il est préférable, dans l'absolu, de n'avoir que très peu de fragments mais des fragments spécifiques.

Dans cette optique, la dérivation par chromophore de molécule d'intérêt devient donc un axe d'étude très intéressant. Comme nous l'avons vu, la plupart des biomolécules n'absorbent pas dans le visible, il est donc nécessaire de les dériver avec un chromophore afin de leur induire des propriétés optiques. L'avantage d'une telle dérivation est la possibilité de travailler à n'importe quelle longueur d'onde, dans la mesure où le chromophore choisi absorbe. Par ailleurs, il est possible de choisir des dérivations chimiques spécifiques permettant de dériver seulement les molécules d'intérêts et non toutes les molécules présentes dans un milieu complexe.

Cependant, en vue d'utiliser la dérivation chimique pour travailler dans le domaine du visible et fragmenter les molécules d'intérêts comme les biomarqueurs, il est indispensable de travailler avec un greffage de chromophore quantitatif, répétable et spécifique. Par ailleurs, comme nous l'avons vu dans ce chapitre, toute dérivation de molécules par un chromophore devra être suivi par un spectre d'action en phase gazeuse afin de vérifier que les propriétés du chromophore choisi ne soit pas impactées par l'analyte ainsi que de vérifier si oui ou non, des fragments spécifiques de la photofragmentation sont détectés.

Dans les chapitres suivants, nous allons donc nous intéresser au couplage de la spectroscopie optique dans le domaine du visible avec la spectrométrie de masse pour la quantification de biomarqueurs et nous verrons en quoi la dérivation chimique s'avère importante.

Chapitre IV. Preuve de principe de la Photo-SRM

IV.1 Introduction

Comme décrit dans le premier chapitre, le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en tandem, LC-MS/MS, est devenu une des méthodes les plus développées pour la quantification de molécules chimiques et biologiques grâce au mode SRM et sa double sélectivité en masse^{196, 197}. Cependant, dans le cas de matrices complexes, la spécificité de détection, en SRM, n'est pas suffisante et il est difficile d'obtenir des limites de détection inférieures au ng/mL⁵⁹. Deux axes de recherche sont généralement étudiés pour améliorer cette spécificité et abaisser les limites de quantification. Le premier axe est celui de la préparation d'échantillons, mettant en jeu différentes méthodes vues dans le premier chapitre. Le deuxième axe est celui du développement instrumental.

A la fin du premier chapitre, la MRM³ a été présentée^{10, 177}. Cette technique permet d'ajouter une étape de fragmentation supplémentaire afin de générer des ions fragments de deuxième génération et ainsi, d'être plus spécifique lors de la détection finale. Au lieu d'ajouter une étape de fragmentation supplémentaire, nous avons décidé de changer le processus de fragmentation du mode SRM pour un mode de fragmentation plus spécifique. L'axe de recherche principal de ma thèse est donc de coupler la spécificité de la spectroscopie optique avec la sélectivité de la spectrométrie de masse pour la quantification de biomarqueurs. En effet, aucune spécificité n'est apportée lors de la fragmentation par dissociation induite par collision (CID), toutes les molécules présentes dans la cellule de collision fragmentent suite à une collision avec un gaz. Le mode CID n'est pas discriminant.

Pour remplacer le processus de fragmentation CID, nous avons choisi la photodissociation. En spectroscopie optique, la fragmentation des molécules, suite à l'irradiation laser, dépend de leurs propriétés optiques (chapitre II). Seules les molécules absorbant la lumière d'excitation pourront être excitées, fragmentées et détectées. Pour cela, il est nécessaire d'implémenter un laser au sein d'un spectromètre de masse. Différents lasers sont disponibles et émettent dans des gammes de longueurs d'ondes variées. Dans le domaine de l'Ultra-violet du vide (VUV) toutes les liaisons absorbent, ces longueurs d'onde ne sont donc pas spécifiques, elles ne permettent pas de fragmenter spécifiquement une molécule cible^{149, 198}. Dans le domaine de l'UV, tous les acides aminés absorbent en dessous de 240 nm¹². Entre 250 et 350 nm, seuls les chromophores aromatiques des chaînes latérales des acides aminés, tels que le tryptophane, la tyrosine ou la phénylalanine, peuvent absorber¹⁴⁴. Dans le domaine du visible, il est nécessaire d'induire des propriétés optiques à la molécule d'intérêt par l'intermédiaire d'un chromophore différent. Ce chromophore peut être natif, comme pour le cytochrome C¹⁴⁷ ou alors greffé suite à une dérivation chimique^{199, 200}. Ainsi, seuls les ions ayant été greffés avec le chromophore et absorbant à la longueur d'onde d'excitation peuvent fragmenter.

Ainsi, en couplant la spécificité de la spectroscopie optique et la sélectivité de la spectrométrie de masse, une nouvelle dimension sélective est ajoutée pour la quantification. Ce nouvel outil est appelé la Photo-SRM²⁰¹, la Figure IV-1 présente son principe.

En mode SRM, les molécules sont dans un premier temps séparées par chromatographie liquide suivant leurs affinités avec la phase stationnaire. Une fois les molécules séparées, elles sont ionisées en source, source électrospray dans notre cas, afin d'être injectées sous forme d'ions dans le spectromètre de masse de type triple quadripôle. Ensuite, une première sélection en masse (m/z) de l'ion précurseur a lieu dans le premier quadripôle Q1. Puis les ions sont fragmentés par dissociation induite par collision (CID) dans la cellule de collision q2. Aucune sélectivité de fragmentation n'est appliquée, tous les ions de même m/z quelle que soit leur nature sont fragmentés. Suite à cette fragmentation, une deuxième sélection en masse (m/z) est réalisée dans le troisième quadripôle Q3 afin de ne laisser passer que les ions fragments spécifiques de la molécule cible. Le couple ion parent/ion fragment s'appelle une transition SRM. Le signal détecté est alors un chromatogramme reconstitué retraçant l'intensité des ions ayant la bonne transition SRM au cours du temps. L'intégration du pic chromatographique de la molécule d'intérêt est directement proportionnelle à la concentration de l'analyte.

En Photo-SRM, le principe général est le même, seul le mode CID est remplacé par la photo-fragmentation. Seules les molécules absorbant à la longueur d'onde d'excitation peuvent fragmenter dans q2 suite à l'irradiation laser. Comme nous pouvons le voir sur les chromatogrammes reconstitués Figure IV-1, cette technique permet d'apporter une meilleure spécificité de détection en abaissant le bruit de fond, le rapport signal sur bruit sera alors meilleur et les limites de détection (LDD) et de quantification (LDQ) seront alors diminuées.

Dans ce chapitre, nous allons donc détailler le principe de la Photo-SRM pour la quantification de protéines. Cette approche passe par le couplage de lasers avec un spectromètre de masse de type triple quadripôle afin de substituer la dissociation induite par collision (CID) non discriminante par la fragmentation induite par laser (LID) plus spécifique, car conditionnée par les propriétés optiques de la molécule cible. Afin de conférer des propriétés optiques spécifiques, les molécules cibles seront alors dérivées avec un chromophore absorbant à la longueur d'onde du laser. Le choix du chromophore sera alors partie intégrante du développement de la Photo-SRM tout au long des chapitres suivants.

Premièrement, nous discuterons de la modification instrumentale nécessaire à l'injection d'un laser au sein d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle. Puis nous étudierons les réglages optiques à réaliser afin de pouvoir optimiser la fragmentation. Enfin, un premier dosage de protéines sera effectué dans une matrice complexe telle que le plasma afin de démontrer le gain de sensibilité obtenu suite à l'analyse Photo-SRM comparée à une analyse SRM classique.

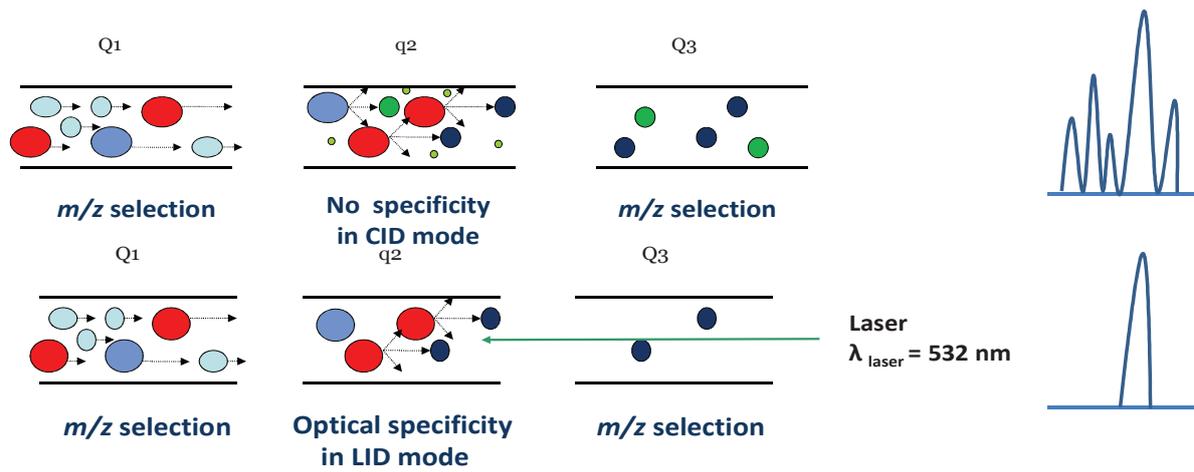


Figure IV-1 : principe de la Photo-SRM (en bas) vis-à-vis de la SRM (en haut) pour une situation hypothétique de deux ions précurseurs isobariques ayant des propriétés optiques différentes.

IV.2 Implémentation d'un laser continu dans un spectromètre de masse de type triple quadripôle.

IV.2.1 Modification du triple quadripôle

Dès les années 1970, Vestal et al. ont implémenté des lasers dans des spectromètres de masse de type triple quadripôle pour l'étude de la photodissociation d'ions tels que CO_3^- et CO_4^- ^{202, 203}. De même, le groupe de Woste a utilisé ce couplage pour l'étude de clusters métalliques en phase gazeuse ²⁰⁴. Cependant, malgré l'utilisation croissante de ce type de spectromètre de masse pour la quantification, aucune application de quantification par SRM n'a été développée en utilisant ce couplage.

Afin de réaliser la preuve de principe, un spectromètre de masse API 300, de chez AB Sciex, a été choisi. Le but d'une telle modification est de pouvoir utiliser l'appareil à la fois en mode SRM et en mode Photo-SRM. Il est alors indispensable de vérifier le bon fonctionnement du spectromètre de masse suite à la modification de cet appareil d'ancienne génération avant d'envisager l'implémentation laser au sein d'un instrument de dernière génération.

Bien que la grande majorité des premiers triples quadripôles soient linéaires, c'est-à-dire que les trois quadripôles sont alignés suivant un même axe, les constructeurs développent depuis quelques années des spectromètres de masse de type triple quadripôle de géométries différentes afin d'améliorer le transfert des ions et surtout la suppression des neutres. Par exemple, les derniers triples quadripôles de chez AB Sciex ont une forme de U (Figure IV-2) alors que ceux développés par ThermoFisher sont en forme de L. Dans notre cas, l'API 300 est linéaire (Figure IV-3). L'implémentation du laser va alors dépendre de la géométrie du spectromètre de masse.

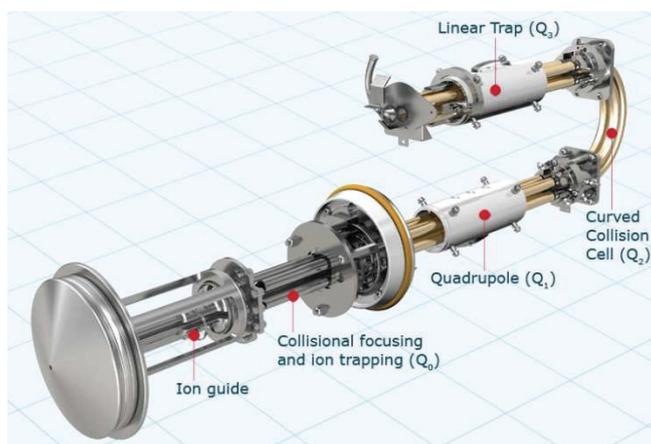


Figure IV-2 : schéma d'un triple quadripôle de type 5 500 de chez ABSciex.

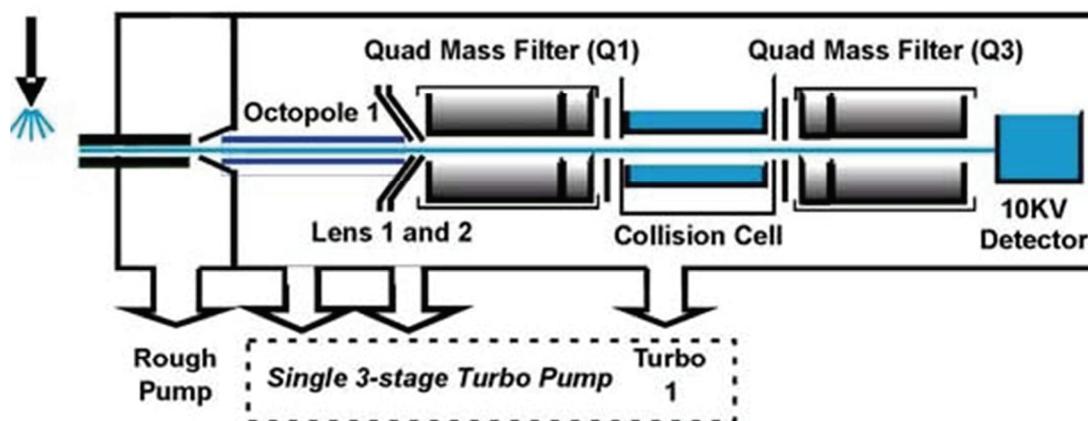


Figure IV-3 : schéma d'un triple quadripôle linéaire.

Avant de réaliser toute modification, il est important de réfléchir à la meilleure implémentation du laser au sein du triple quadripôle. Comme nous l'avons dit précédemment, nous souhaitons pouvoir toujours utiliser l'instrument en mode SRM classique. Par ailleurs, le but de la Photo-SRM étant de substituer la CID par la LID tout en gardant la double sélection en masse au niveau de Q1 et de Q3, il est indispensable de ne photo-fragmenter que dans q2. Plusieurs possibilités sont envisageables afin d'introduire le faisceau laser dans q2. La première est d'introduire le laser par la source, la seconde est d'introduire le laser perpendiculairement à q2, la troisième est d'introduire le laser par l'arrière du spectromètre de masse.

Pour l'introduction du laser par la source, la source de l'API 300 se trouvant dans l'axe des quadripôles, il semble difficile de faire passer un laser par cette entrée sans une modification complète de celle-ci.

Ensuite, l'idée d'introduire le laser perpendiculairement au quadripôle q2 (cellule de fragmentation) semble tout à fait envisageable. Pour cela, il faudrait percer l'enceinte extérieure de l'appareil, puis percer la coque qui entoure le q2 (Figure IV-4) afin que le laser puisse croiser le trajet des ions dans q2.

Deux modifications instrumentales sont donc nécessaires pour réaliser l'introduction du laser perpendiculairement à l'axe des quadripôles. Cependant, la zone de recouvrement entre les photons émis et le nuage d'ions présent dans la cellule de fragmentation q2 serait alors très faible et la fragmentation ne serait pas optimale. Il serait néanmoins possible de placer des miroirs de chaque côté de la cellule de collision afin de réfléchir le faisceau laser et d'augmenter cette zone de recouvrement (Figure IV-5). Une telle modification est envisageable mais semble lourde et demanderait un travail mécanique et optique important.



Figure IV-4 : photo d'un quadripôle q2.

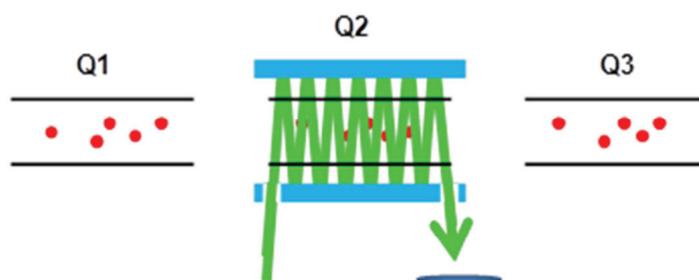


Figure IV-5 : insertion perpendiculaire d'un faisceau laser dans une cellule de collision.

L'implémentation du laser par l'arrière du spectromètre de masse est donc la solution la plus simple à réaliser. Pour que l'introduction du laser par l'arrière de l'appareil puisse se faire, il est indispensable qu'aucun composé électronique ou mécanique ne soit sur le trajet potentiel du laser. Une nouvelle plaque arrière a été usinée afin d'ajouter un hublot en quartz dans l'axe des quadripôles. Le hublot va permettre de laisser entrer le laser dans la cellule de collision (Figure IV-6). La fenêtre en quartz a été choisie afin de pouvoir injecter un laser UV ou un laser visible au sein de l'instrument.

Les spécificités du spectromètre de masse sont obtenues suite à la calibration, ceci démontre que la modification instrumentale n'a eu aucune répercussion sur les performances de l'instrument. L'appareil peut donc être utilisé dans les conditions initiales. Une fois la modification instrumentale réalisée, le choix du laser pour l'application de la Photo-SRM est primordial. Le montage expérimental de la Photo-SRM est présenté Figure IV-7.

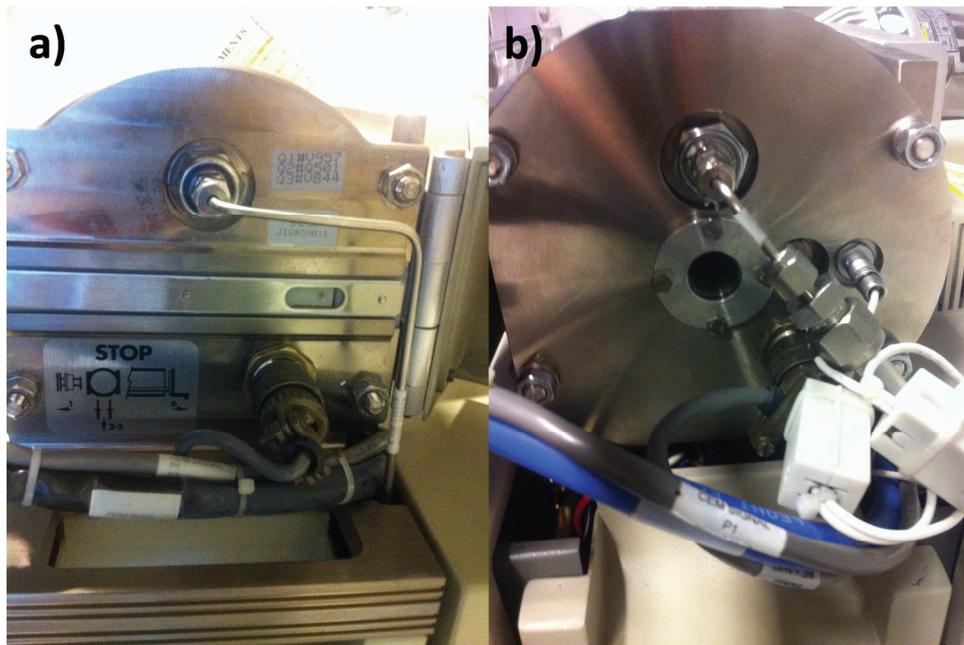


Figure IV-6 : a) plaque arrière non modifiée et b) plaque arrière modifiée avec une fenêtre en quartz d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle.

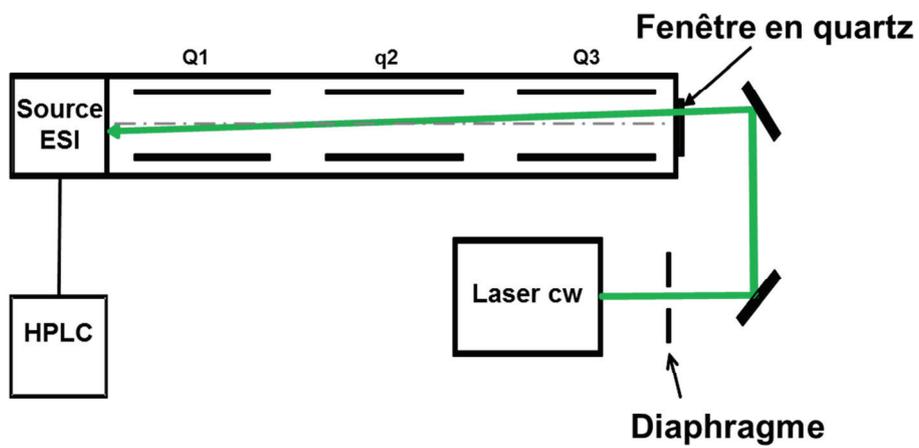


Figure IV-7 : montage expérimental de la Photo-SRM dans un triple quadripôle.

IV.2.2 Choix du laser

Les principaux critères de sélection du laser sont la longueur d'onde, une émission continue, la stabilité de pointage, la puissance, le diamètre et la divergence du laser.

Pour le choix de la longueur d'onde de travail, la spécificité de la méthode Photo-SRM est apportée par la fragmentation induite par laser. Cette fragmentation peut être obtenue suite à l'irradiation de chromophore des chaînes latérales des acides aminés, entre 250 et 300nm, ou via une dérivation par un chromophore absorbant dans une gamme de longueur d'onde spécifique. Il est indispensable de choisir une longueur d'onde à laquelle les biomolécules présentes dans le plasma, ou autre matrice biologique, n'absorbent pas naturellement ou très peu.

Deux solutions apparaissent, soit travailler dans l'UV vers 280-300 nm et cibler les peptides à Tryptophane¹⁴⁴, soit travailler dans le domaine du visible et dériver sélectivement certains acides aminés avec un chromophore absorbant dans le domaine du visible à la longueur d'onde choisie. Cependant, il existe très peu de lasers continus et compacts émettant des photons à 280 nm commercialement disponibles, alors qu'un grand choix de lasers continus émettant dans le domaine du visible existe.

D'un point de vue de l'émission des photons, il est indispensable de travailler avec une émission continue. En effet, en quantification de molécule, les échantillons sont injectés dans le spectromètre de masse par chromatographie liquide. Le débit d'une chromatographie est continu. L'irradiation laser doit se faire au sein du spectromètre de masse de manière continue et stable afin d'irradier de manière répétable et homogène, à tout moment, tous les ions présents dans la cellule de fragmentation. Un laser pulsé émet, par définition, des photons sous forme de paquets, le flux de photons n'est donc pas stable et équivalent à tout instant. Un laser continu est donc idéal pour un couplage LC-MS/MS.

Enfin, en ce qui concerne le diamètre et la divergence du laser, il est important de travailler avec un laser très peu divergeant ayant un diamètre le plus fin possible. Un diamètre faible permet un réglage précis du faisceau optique et dans notre cas, une injection fine du laser au sein du triple quadripôle. Dans la même optique, une faible divergence permet de ne pas perdre de puissance tout au long du trajet optique et donc d'être très homogène au niveau de la zone de recouvrement entre les ions et les photons.

Au laboratoire, nous disposons de trois lasers monochromatiques continus. Le premier est un laser à diode continu émettant des photons à 532 nm avec une puissance non ajustable de 300 mW. Le deuxième est un laser à diode continu émettant des photons à 473 nm avec une puissance ajustable de 500 mW. Enfin, le troisième est un laser à diode émettant des photons à 375 nm avec une puissance ajustable de 150 mW. Les lasers à diode sont en effet des lasers continus avec une bonne stabilité de pointage et une faible divergence. Par ailleurs, ils sont très compacts et peu coûteux par rapport au prix d'un spectromètre de masse, ces lasers semblent donc adaptés au développement de la Photo-SRM. Ces caractéristiques sont détaillées dans le Tableau 3.

Caractéristiques des lasers	Oxxius 532 nm slim	ACAL BFI Low Noise 473nm DPSS	Oxxius LBX-375
longueur d'onde (nm)	532	473	375
Puissance (mW)	300	500 (ajustable)	150 (ajustable)
divergence (mrad)	1.2	1.5	0.6
diamètre du faisceau (mm)	0.6	2	1.3
stabilité du pointage ($\mu\text{rad}/^\circ\text{C}$)	5	50	5

Tableau 3 : caractéristiques des lasers utilisés en Photo-SRM.

IV.2.3 Réglage du trajet optique du laser

Pour la preuve de concept, le laser à 532 nm a été utilisé, nous ne disposions pas à cette époque des deux autres lasers. Du choix d'un laser à 532 nm découle donc une stratégie de dérivation des molécules cibles par un chromophore absorbant à 532 nm. Une fois le choix du laser effectué, le montage optique permettant l'introduction du laser au sein du spectromètre de masse peut être réalisé. Une table optique est fixée à l'arrière de l'instrument, puis un jeu de deux miroirs permet de régler le trajet optique du laser pour que celui-ci entre dans le spectromètre de masse et ressorte au niveau de la source. Cela permet de s'assurer que le faisceau laser est parfaitement aligné avec le trajet des ions dans le triple quadripôle. Un détecteur de puissance permet de mesurer la puissance laser en sortie de l'appareil. Cette puissance étant proche de celle émise par le laser, nous pouvons en conclure que l'alignement est optimal.

Ensuite, pour vérifier le fonctionnement du montage expérimental, une molécule modèle, un disaccharide dérivé avec un chromophore *push-pull* similaire à celui étudié dans le chapitre Chapitre III, a été choisie. Un spectre optique d'action de cette molécule (Figure IV-8a) est réalisé en suivant le taux de fragmentation de celle-ci en fonction de la longueur d'onde d'excitation. La Figure IV-8b montre le spectre optique d'action en phase gazeuse enregistré sur le couplage LTQ-OPO décrit dans le chapitre Chapitre III¹⁹⁹.

Suite à l'infusion et à l'ionisation de la molécule au sein du spectromètre de masse triple quadripôle modifié, l'ion d'intérêt est détecté au rapport m/z 745, ce qui correspond à la molécule cible avec un adduit de sodium, $[M+Na]^+$. L'ion est ensuite analysé en mode « *product ion* » afin de ne laisser passer dans Q1 que les ions ayant un rapport m/z de 745 ± 1.1 et donc d'observer, après fragmentation, les ions fragments propres à cette molécule. Pour n'observer que les ions provenant d'une fragmentation laser et donc d'éviter toute fragmentation induite par CID, l'énergie de collision a été réduite au minimum (5 eV). Une fois le laser allumé, un ion fragment à m/z 583 est détecté comme le montre le spectre de masse (Figure IV-9a). Il est par ailleurs important de noter que la photo-fragmentation induite suite à l'irradiation laser engendre le même canal de fragmentation que

la CID, Figure IV-9b. Le même ion fragment est donc détecté en LID et en CID. Cependant, la sensibilité de détection est légèrement supérieure en CID.

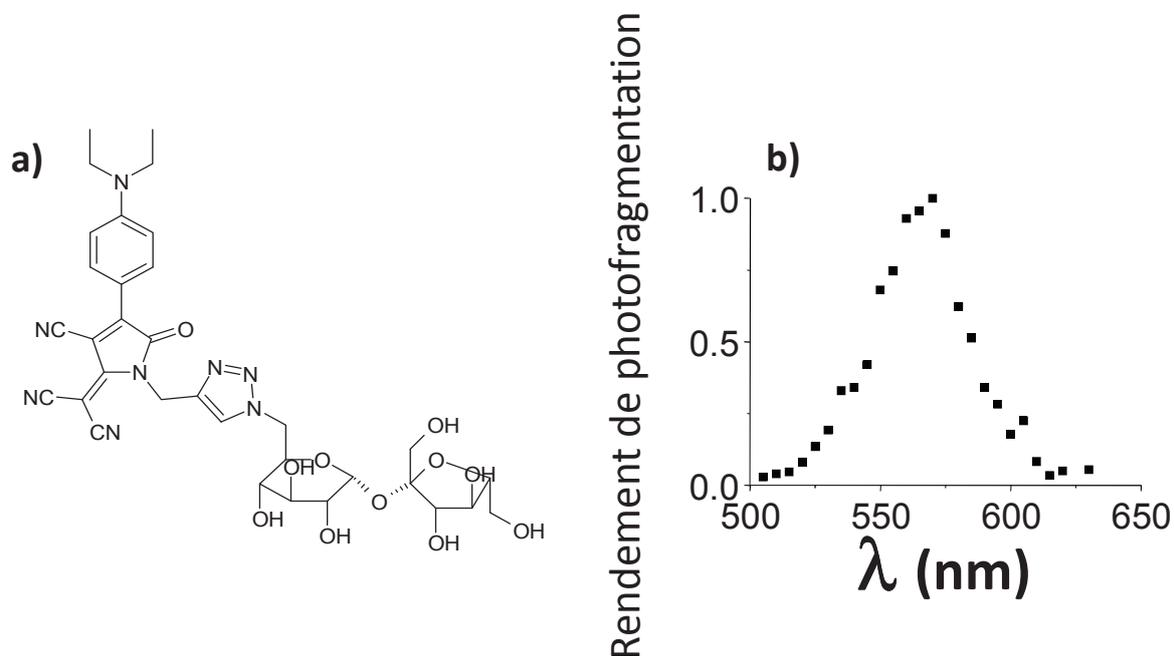


Figure IV-8 : disaccharide dérivé avec un chromophore push-pull a) et son spectre optique en phase gazeuse b).

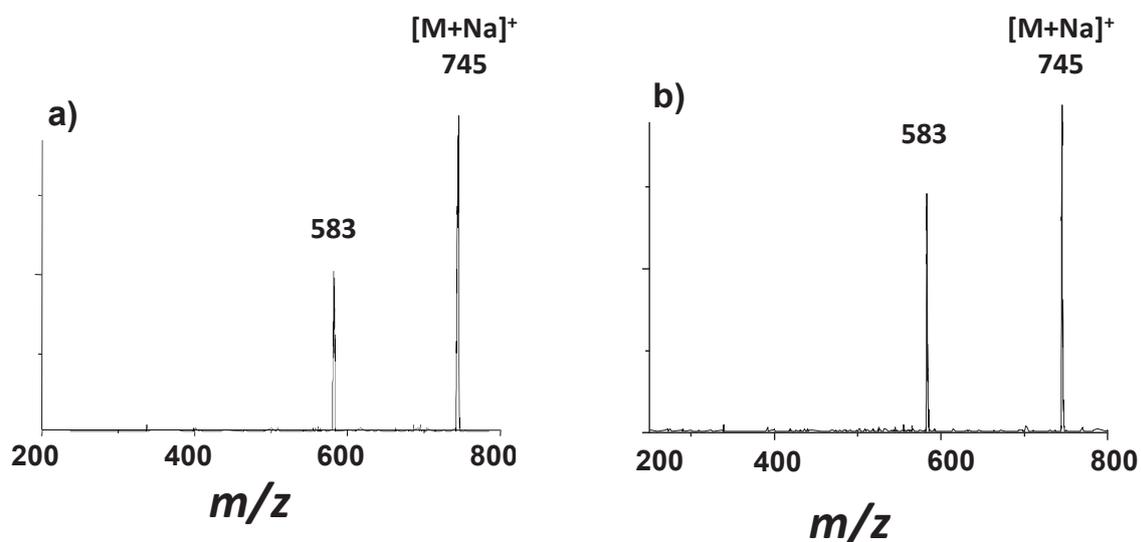


Figure IV-9 : spectres de masse en "product ion" dans le spectromètre de masse dérivé du disaccharide dérivé obtenus suite à la photo-fragmentation, à 532 nm a) et suite à la fragmentation par CID b).

Une fois la photo-fragmentation détectée, il est nécessaire de l'optimiser. Dans un piège ionique, il est possible de faire varier le temps d'irradiation des ions dans le piège. Cela n'est pas envisageable dans un triple quadripôle car les ions parcourent de manière continue l'ensemble de l'instrument. Leur temps d'irradiation va donc dépendre de la vitesse de transfert au sein du spectromètre de masse et de la zone de recouvrement entre les deux faisceaux (faisceau de photons et faisceau d'ions). Ainsi, la zone de recouvrement entre les ions et les photons dans q2 doit être optimisée. Par ailleurs, toute photo-fragmentation en source ou dans Q1 doit être évitée pour ne pas avoir de perte de signal. Ainsi, le laser est légèrement désaxé au niveau de son introduction à l'arrière du spectromètre de masse. Ce décalage d'environ 0,2 ° par rapport à l'axe des ions ne doit cependant pas diminuer le rendement de photo-fragmentation. Pour optimiser cette photo-fragmentation, la transition SRM de la molécule cible (ion précurseur/ion fragment, 745/583) est suivie en mode SRM avec une valeur de CID minimale (5eV) puis grâce au jeu de miroirs, le signal de la transition est optimisé jusqu'à obtenir un signal au moins aussi bon que celui obtenu en SRM classique. Une fois ce signal optimisé, il est important de vérifier qu'aucune fragmentation n'est réalisée en amont de la cellule de fragmentation q2. Pour cela, le signal, en mode SIM, de l'ion d'intérêt $m/z = 745$ est suivi lorsque le laser est éteint puis au bout de 30 secondes, le laser est allumé afin de vérifier s'il y a ou non une perte de signal induite par le laser. Aucune chute de signal n'est observée sur la Figure IV-10a, cela signifie qu'aucune photo-fragmentation en amont de q2 n'est engendrée. La Figure IV-10b montre l'influence du laser sur le courant ionique détecté pour les transitions ion précurseur/ion précurseur (745/745) et ion précurseur/ion fragment (745/583). Dans un premier temps, le laser est éteint et seule la transition 745/745 est détectée. Puis, au bout de 20 secondes, le laser est allumé. Une chute de signal d'environ 50 % est détectée sur cette même transition alors qu'une augmentation de 30 % est visible sur la transition 745/583. Une fois le laser éteint, le courant ionique se stabilise dans les conditions initiales. Ainsi, cette figure présente l'effet du laser sur la molécule d'intérêt. La majeure partie de la fragmentation de l'ion précurseur produit l'ion fragment à m/z 583. Les 20 % du signal non détectés sont très certainement dilués dans d'autres canaux de fragmentation de l'ion précurseur ou une refragmentation des ions fragments en ions fragments de deuxième génération.

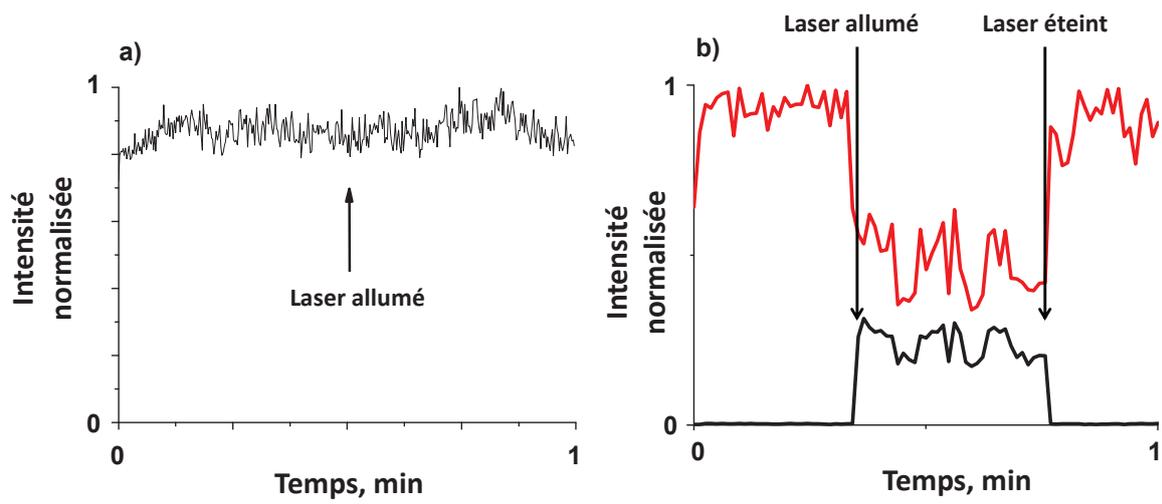


Figure IV-10 : courant ionique en mode Single Ion Monitoring suivant l'ion précurseur du dissaccharide dérivé. Le laser est allumé au bout de 30 secondes a). Courant ionique en mode SRM suivant la transtion ion précurseur/ion précurseur (rouge) et suivant la transition ion précurseur/ion fragment (noir) b).

IV.3 Stratégie de dosage par Photo-SRM

IV.3.1.1 Choix des acides aminés à marquer

En choisissant un laser à 532 nm, nous avons décidé de travailler avec la dérivation chimique²⁰⁰ afin d'induire des propriétés optiques spécifiques aux molécules cibles. Le but de la Photo-SRM étant de ne photo-fragmenter que les molécules cibles et non toutes les molécules présentes dans la matrice, il est important de définir une stratégie bien précise. La dérivation chimique doit être spécifique, c'est-à-dire que le chromophore doit être greffé seulement sur la molécule cible. Elle doit être également quantitative et reproductible pour pouvoir être utilisée en quantification. Pour cela, il est indispensable de travailler sur une fonction chimique très peu présente dans les acides aminés. En effet, si la dérivation chimique, aussi spécifique soit-elle, est réalisée sur une amine primaire, présente en N terminal dans tous les peptides, tous les peptides seront dérivés et fragmenteront.

Nous nous sommes donc intéressés à la fonction thiol, présente sur les résidus cystéines. Cette fonction possède une réactivité spécifique envers les composés iodés de type iodoacétamide (IAM) ou les composés maléimides. La Figure IV-11 présente le mécanisme réactionnel chimique d'un couplage entre une fonction maléimide et une fonction thiol.

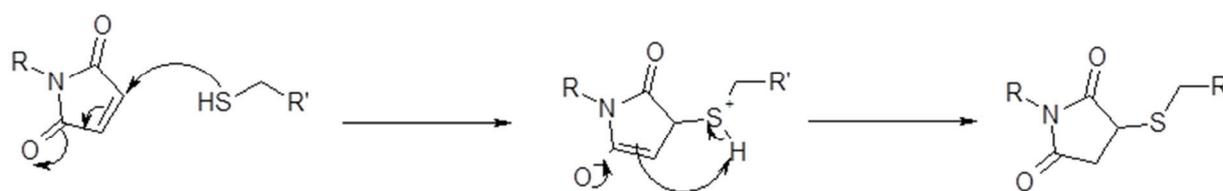


Figure IV-11 : mécanisme réactionnel du couplage maléimide - fonction thiol.

Par ailleurs, les cystéines sont des acides aminés rares. En effet, présents dans 89.3 % des protéines humaines mais seulement dans 17.2 % des peptides tryptiques²⁰⁵. Ce paramètre en fait un acide aminé cible pour de nombreuses applications comme l'enrichissement par immuno-capture²⁰⁶⁻²⁰⁸. La plupart des protéines pourront donc être dosées, car elles possèdent des cystéines, mais la quantité de molécules pouvant fragmenter suite à l'irradiation laser sera nettement inférieure à celle fragmentant par collision avec un gaz.

De plus, si nous revenons à la comparaison faite dans le premier chapitre sur l'amélioration de la sélectivité obtenue par le mode SRM vis-à-vis du mode SIM, le fait de fragmenter uniquement des peptides à cystéines permet d'abaisser considérablement le nombre d'interférents potentiels.

En effet, si l'on garde l'exemple pris dans le premier chapitre, le Prostate Specific Antigen (PSA) et son peptide protéotypique IVGGWECEK contenant une cystéine, seuls 13 peptides tryptiques du protéome humain (celui du PSA compris) ont des transitions communes à $\pm 0,7$ uma et possèdent une cystéine.

Le Tableau 4 permet de résumer la comparaison entre les trois modes de balayage SIM, SRM et SRM ciblés sur les peptides à cystéine. Le nombre potentiel d'interférents au peptide d'intérêt est répertorié en fonction du mode de balayage et de la résolution des quadripôles au moment de l'analyse. Ainsi, en SRM avec une résolution de 0.7 Th, 39 autres peptides ont une transition proche du peptide cible. Parmi eux, seulement 12 peptides contiennent une cystéine. Ainsi, si seuls les peptides à cystéines sont ciblés et détectés, le nombre d'interférents va fortement diminuer. Une fois l'acide aminé à dériver choisi, il est important de sélectionner le chromophore idéal pour réaliser la preuve de principe.

Mode	SIM	SRM	SRM avec cystéine
résolution (0.7 Th)	1078	39	12
résolution (1.1 Th)	1480	87	22

Tableau 4 : comparaison du nombre d'interférents potentiels lors de l'utilisation des différents modes de balayages en fonction de la résolution appliquée aux quadripôles.

IV.3.2 Modification chimique, choix du chromophore

Pour que les expériences puissent être facilement reproductibles, nous souhaitons développer la preuve de principe avec un chromophore commercial. Le chromophore doit posséder quelques propriétés physico-chimiques indispensables. Tout d'abord, il doit être soluble dans l'eau ou en matrice organique/eau pour pouvoir être greffé facilement sur un peptide et il doit surtout absorber à 532 nm. Ensuite, il doit comporter un groupement chimique fonctionnel, comme la fonction maléimide, capable de se greffer spécifiquement sur les cystéines.

Suite à une recherche préliminaire, deux chromophores absorbant à 532 nm semblent intéressants. Il s'agit du QSY7 et du BODIPY²⁰⁹. Le premier étant un chromophore *quencher*, c'est-à-dire qui n'émet pas de signal de fluorescence, alors que le deuxième est vendu comme chromophore fluorescent, c'est-à-dire qu'il réémet l'énergie absorbée sous forme de lumière à une longueur d'onde différente.

Le protocole de dérivation chimique pour un couplage thiol-maléimide est décrit dans différentes publications référencées par le revendeur²¹⁰⁻²¹³, *Invitrogen*. Ce protocole a été modifié afin d'être adapté pour le dosage de peptide en spectrométrie de masse. Une description détaillée du protocole se trouve dans la partie Dosage de l'Ocytocine de ce même chapitre.

Afin d'étudier les deux chromophores, il est nécessaire de dériver un peptide témoin avec ces chromophores puis de vérifier si l'irradiation laser à 532 nm engendre ou non une photo-fragmentation. Comme peptide modèle, nous avons choisi l'Ocytocine, une hormone sexuelle possédant 2 cystéines et se trouvant dans le sang. Le choix de ce peptide découle d'une précédente étude réalisée au laboratoire. En effet, durant sa thèse, Laure Joly a étudié les propriétés optiques de

l'Ocytocine seule ou complexée avec un ion cuivre ²¹⁴ et sa publication démontre qu'un tel peptide n'absorbe pas dans le domaine du visible mais seulement dans le domaine de l'UV comme le montre la Figure IV-12 avec une chute du rendement de photo-fragmentation après 280 nm.

Ainsi, l'Ocytocine est dérivée avec le chromophore QSY 7 ou avec le chromophore BODIPY puis analysée en spectrométrie de masse sur le montage Photo-SRM. La Figure IV-13 montre que seul l'ion [Ocytocine+QSY7]²⁺ photo-fragmente suite à l'irradiation laser à 532 nm. L'irradiation à 532 nm de l'ion [Ocytocine+BODIPY]²⁺ n'induit aucune fragmentation.

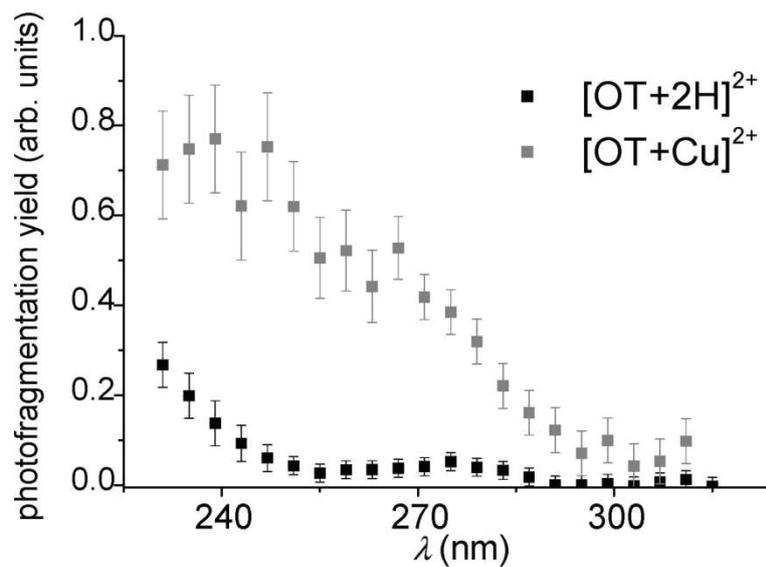


Figure IV-12 : Spectre optique en phase gazeuse de l'Ocytocine native ou complexée à un atome de cuivre ²¹⁴

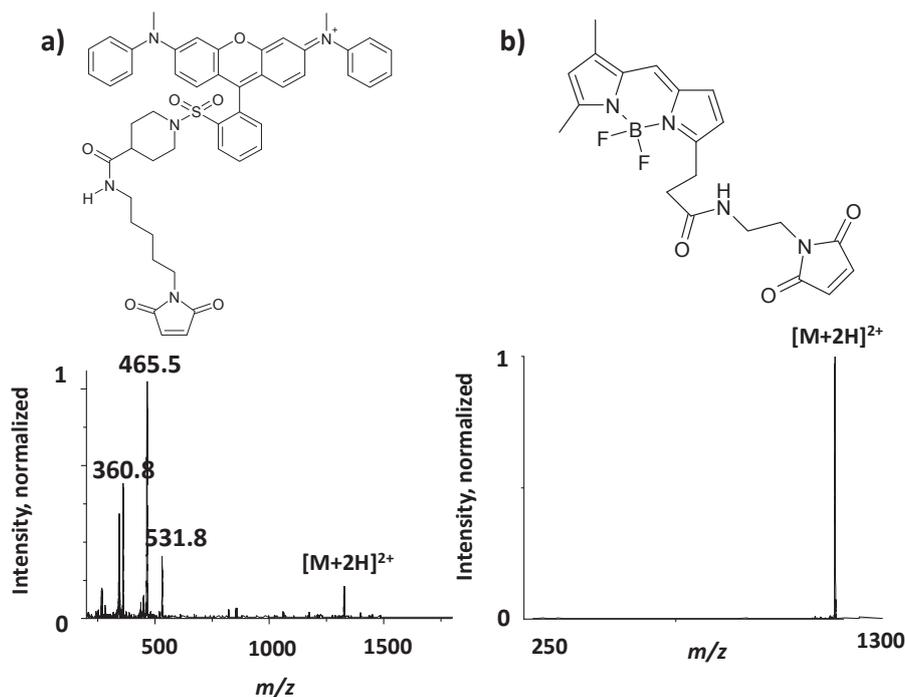


Figure IV-13 : a) formule chimique du chromophore QSY 7 et le spectre de photo-fragmentation à 532 nm de l'ion [Ocytocine+QSY7]²⁺. b) formule chimique du chromophore BODIPY et le spectre de photo-fragmentation à 532 nm de l'ion [Ocytocine+BODIPY]²⁺.

Suite à cette expérience, il est possible d'envisager la nécessité d'avoir un chromophore *quencher* plutôt qu'un chromophore qui fluoresce. En effet, un chromophore fluorescent va transformer son énergie emmagasinée sous forme d'émission de photons, alors qu'un chromophore *quencher* va redistribuer cette énergie à l'ensemble de la molécule. C'est cette énergie qui permet la fragmentation de la molécule.

Afin d'évaluer l'intérêt de la Photo-SRM, il est important de comparer cette nouvelle méthode à la méthode de référence, la SRM. Dans un premier temps, l'ocytocine (OT) est alors soit dérivée par le chromophore QSY7 soit par l'iodoacétamide (IAM). L'IAM est généralement utilisé pour bloquer les ponts disulfures d'une protéine suite à leur réduction, ceci permet d'éviter qu'ils ne se reforment après la préparation d'échantillon.

IV.4 Dosage de l'Ocytocine

Pour réaliser la première étude par Photo-SRM, les modes Photo-SRM et SRM sont alors comparés pour le dosage de l'Ocytocine en matrice complexe²⁰¹. Pour cela, l'OT est dérivée avec le chromophore QSY7 choisi, puis une gamme d'étalonnage avec différentes concentrations en OT est réalisée dans une matrice complexe, un digeste de sérum humain. L'analyse est effectuée par Photo-SRM mais aussi par SRM afin de pouvoir déterminer un gain éventuel engendré par la photo-fragmentation. Par ailleurs, pour une étude plus complète, il est aussi important de comparer ces résultats avec ceux obtenus suite à l'analyse d'une gamme d'étalonnage réalisée avec une dérivation classique du peptide par l'Iodoacétamide (IAM).

IV.4.1 Préparation des échantillons

Pour ces premières expériences Photo-SRM, l'OT est donc dérivée soit par le chromophore QSY7 soit par l'iodoacétamide (IAM).

Pour la dérivation par QSY7, 120 µg de peptide sont solubilisés dans 500 µL d'une solution tampon d'Acétate d'Ammonium à 6mM. Un excès de 40 équivalents molaires de tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), soit 250 µL d'une solution à 1mg/mL dans de l'acétate d'ammonium à 6mM, sont ajoutés à l'ensemble de la solution afin de réduire les ponts disulfures de l'OT. Puis, un excès de 10 équivalents molaires de Chromophore QSY7 (250 µL d'une solution à 200 µg/mL dans le méthanol) est ajouté pour réaliser le couplage thiol-maléimide. Le milieu réactionnel est placé dans le noir à température ambiante durant 4 heures puis conservé à -18 °C avant utilisation. La solution ainsi obtenue a une concentration de 120 µg/mL d'Ocytocine dérivée.

Pour la dérivation standard avec l'iodoacétamide (IAM), 120 µg d'OT sont dissouts dans 500 µL d'une solution tampon de bicarbonate d'ammonium (AMBIC) à 50 mM. 200 µL d'une solution de dithiothréitol (DTT) à 150 mM dans l'AMBIC à 50 mM sont ajouté. Le DTT est un agent réducteur utilisé à la place du TCEP. Le mélange est placé à 60°C durant 40 minutes. Puis après retour à température ambiante, 200 µL d'IAM à 150 mM dans l'AMBIC à 50 mM sont ajoutés. La solution réactionnelle est placée dans le noir à température ambiante pendant 40 minutes puis conservée à -18°C avant utilisation. La solution ainsi obtenue a une concentration de 120 µg/mL d'OT non-dérivée.

Afin de réaliser une gamme d'étalonnage en milieu complexe, chaque solution mère est diluée dans un digeste de sérum humain pour obtenir des concentrations égales à 205, 82, 41, 20.5, 8.2, 4.1, 2.05, 0.820 and 0.41 µg/mL de sérum.

IV.4.2 Paramètres expérimentaux

IV.4.2.1 Paramètres chromatographiques

Pour toutes les analyses (SRM Ocytocine non-dérivée, SRM Ocytocine dérivée, Photo-SRM Ocytocine dérivée) les paramètres chromatographiques suivants sont conservés. Une colonne Xselect C₁₈ (100 X 2.1 mm, 3.5 µm) de chez Waters est utilisée. Les éluants de la phase mobile sont l'eau contenant 0.5 % d'acide formique (v / v) comme phase mobile A et du méthanol contenant également 0.5 % d'acide formique (v / v) comme phase mobile B. Le débit d'analyse est fixé à 300 µL/min.

L'élution de l'OT dérivée (DABCYL) commence par un plateau de 2 minutes avec 60 % de l'éluant A, suivi d'un gradient linéaire de 60 à 0 % de A en 3 minutes. Ensuite, la colonne est lavée pendant 4 minutes avec 100 % de B puis rééquilibrée pendant 4 minutes.

Pour l'analyse chromatographique de l'OT non dérivée (IAM), l'élution commence par un plateau de 2 minutes avec 90 % de A, suivi d'un gradient linéaire de 90 à 0 % de A en 4.5 minutes. Ensuite, la colonne est lavée pendant 3.5 minutes avec 100 % de B puis rééquilibrée pendant 4 minutes.

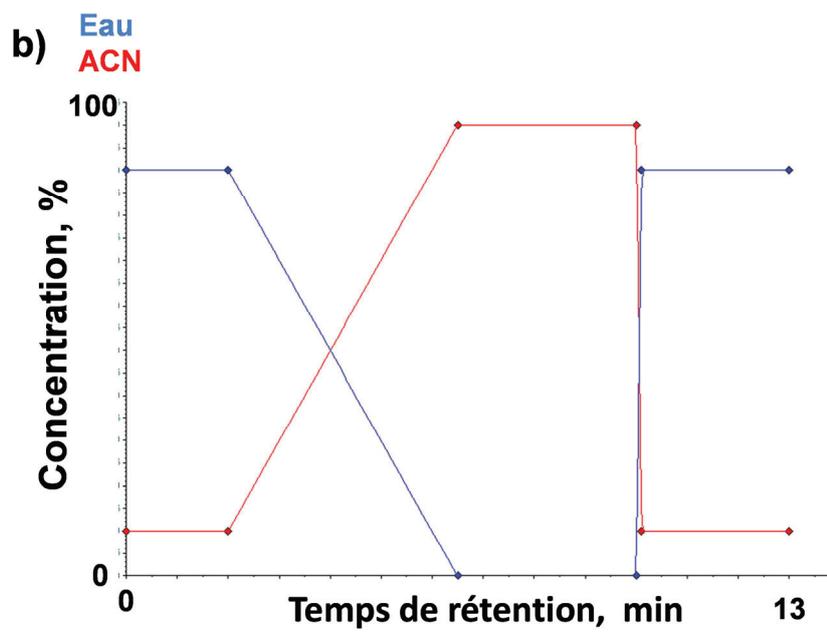
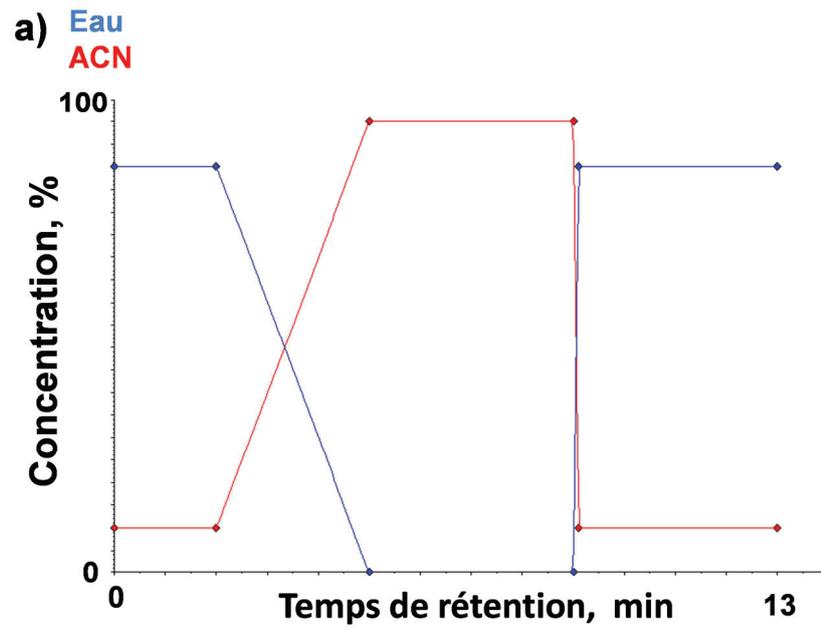


Figure IV-14 : gradients chromatographiques pour l'analyse de l'Oxytocine dérivée a) et de l'Oxytocine non dérivé b).

IV.4.2.2 Paramètres du spectromètre de masse

L'ionisation des analytes est réalisée par électrospray en mode positif. Pour toutes les analyses, 5 000 V sont appliqués au niveau du spray afin d'aider l'ionisation des molécules.

Les paramètres suivants sont définis afin que cette fois-ci l'analyse de l'OT non dérivée soit optimale. Au niveau de la source, les gaz nébuliseur (air) et rideau (azote) sont respectivement réglés à 8 et 12 unités arbitraires et la température d'ionisation est ajustée à 450 °C. Les transitions (couple ion précurseur/ion fragment) 1124/839, 1124/559 et 563 (Figure IV-15 a)) sont suivies avec un « *dwell time* » de 300 ms. L'énergie de collision est réglée à 100 eV dans q2 afin d'obtenir le meilleur signal possible. Ces transitions ont été choisies car ce sont celles qui permettent d'obtenir la meilleure sensibilité d'analyse avec le meilleur signal de détection. En effet, il s'agit des ions fragments les plus intenses détectés sur les spectres de masse représentés dans la Figure IV-15.

Les paramètres suivants sont définis de manière à avoir un signal optimal pour l'Ocytocine dérivée. Au niveau de la source, les gaz nébuliseur (air) et rideau (azote) sont respectivement réglés à 10 et 6 unités arbitraires et la température d'ionisation est ajustée à 450 °C. Les transitions (couple ion précurseur/ion fragment) 1327.5/465.5, 1327.5/360.8 et 1327.5/531.8, correspondant aux ions fragments les plus intenses détectés après CID ou LID (Figure IV-15 b) et c)), sont suivies avec un « *dwell time* » de 300 ms. Pour les analyses en CID, l'énergie de collision est réglée à 100 eV dans q2 alors que pour les analyses Photo-SRM, elle est réglée à 5 eV afin d'éviter toute fragmentation par CID. La puissance laser est mesurée à l'entrée du spectromètre de masse à 274 mW.

Les transitions sont répertoriées dans le Tableau 5.

Transitions de l'Ocytocine		
SRM Ocytocine non dérivée	SRM Ocytocine dérivée	Photo-SRM Ocytocine dérivée
1124/839	1327.5/465.5	1327.5/465.5
1124/559	1327.5/360.8	1327.5/360.8
1124/563	1327.5/531.8	1327.5/531.8

Tableau 5 : transitions SRM. Les transitions en gras et en italiques sont les meilleures transitions de chaque méthode.

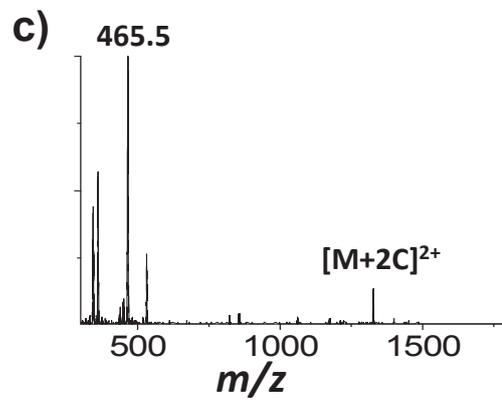
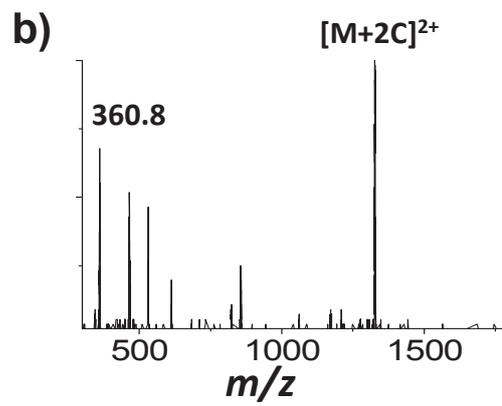
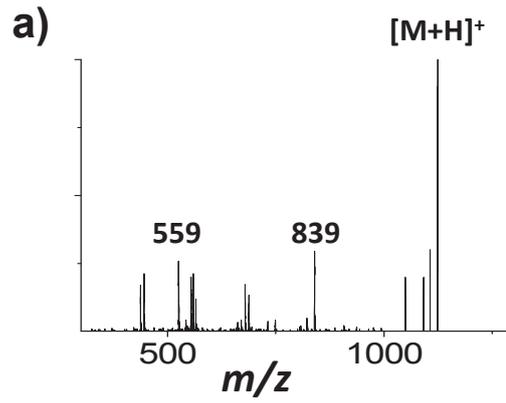


Figure IV-15 : Spectres de masse obtenus en mode "product ion" suite à la fragmentation CID de l'Oxytocine non-dérivée a) et de l'Oxytocine dérivée b) et la fragmentation LID de l'Oxytocine dérivée c).

IV.4.3 Comparaison SRM, SRM avec protéine dérivée, Photo-SRM

Afin de comparer les avantages de la Photo-SRM vis-à-vis de la SRM, trois différentes gammes de concentration (SRM OT non-dérivée, SRM OT dérivée et Photo-SRM OT dérivée) en OT allant de 0.41 à 20.5 µg/mL sont réalisées.

Dans un premier temps, la matrice blanche (sans OT ajoutée) a été analysée en SRM, avec les transitions de l'OT non-dérivée et celles de l'OT dérivée (SRM et Photo-SRM). Bien que l'OT soit présente de manière endogène dans le plasma, sa concentration endogène est de l'ordre du ng/mL²¹⁵. La méthode développée pour la preuve de principe ne permet pas de descendre aussi bas, nous ne sommes donc pas gênés par la présence endogène de ce peptide. La Figure IV-16 montre les chromatogrammes, retraçant respectivement la transition la plus intense pour chaque méthode, enregistrés suite aux analyses SRM (a) OT non-dérivée, b) OT dérivée) et à l'analyse Photo-SRM (c) OT dérivée) de la matrice blanche. De nombreux interférents provenant de la matrice sont détectés en SRM (chromatogrammes a) et b)) alors que très peu le sont en Photo-SRM (chromatogramme c)). Une interférence majeure est ainsi détectée à 6.2 minutes dans le chromatogramme b).

La Figure IV-16 d), e), f) montre les chromatogrammes enregistrés pour la plus faible concentration de la gamme, 0.41 µg/mL. Premièrement, l'OT non-dérivée n'est pas du tout détectée en SRM, son pic chromatographique étant espéré à 6,5 minutes (Figure IV-16d). En ce qui concerne l'OT dérivée analysée en SRM, le pic de celle-ci est détecté mais les interférents ayant des temps de rétentions proches ne permettent pas sa quantification (Figure IV-16e). Au contraire, l'analyse Photo-SRM, ayant très peu d'interférent, permet de détecter clairement la molécule cible à la plus faible concentration (Figure IV-16f).

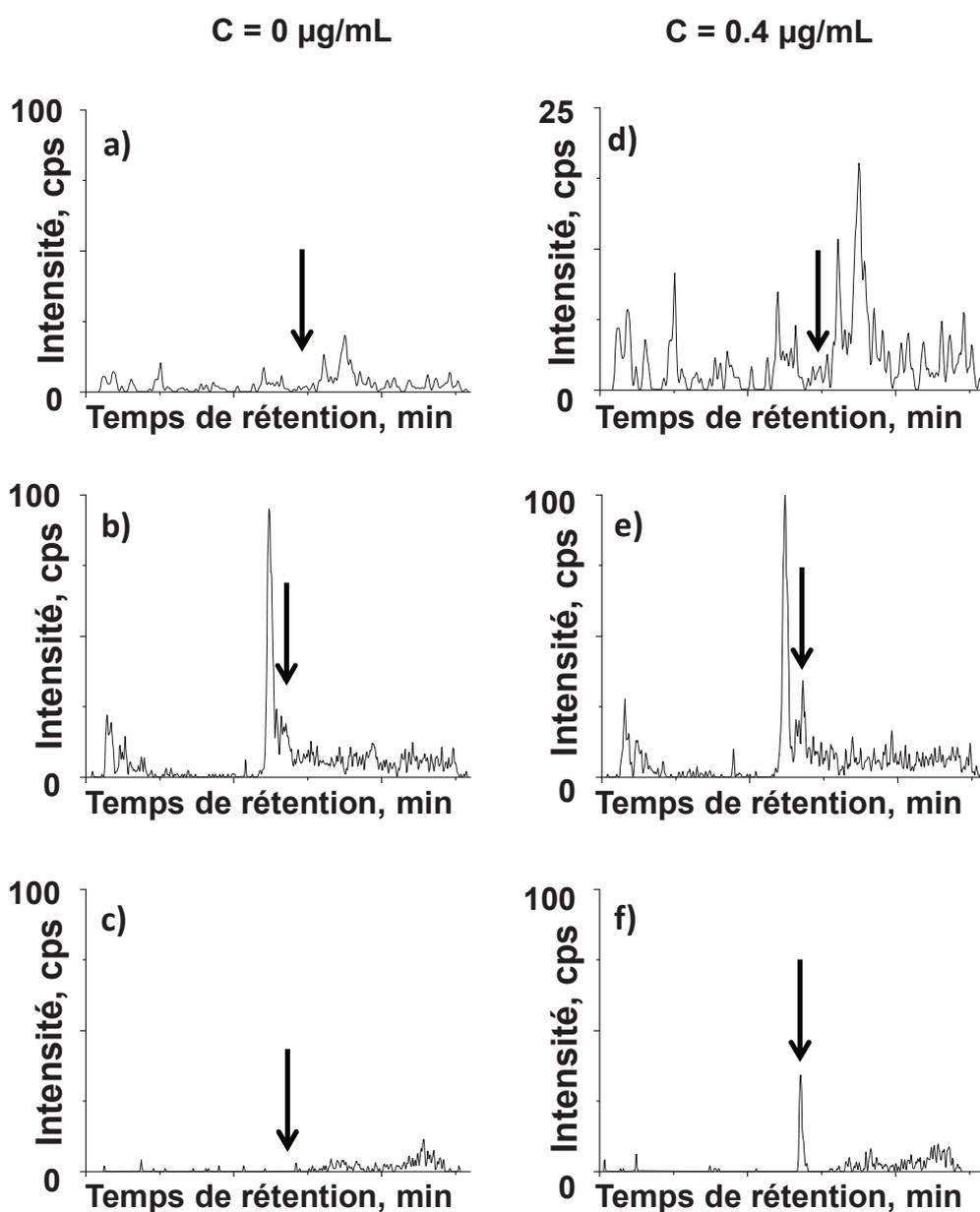


Figure IV-16 : Chromatogrammes LC-MS/MS de digestes de sérum humain obtenus (sans OT ajouté) suite à l'analyse SRM de la transition la plus intense (m/z 1124/839) de l'Ocytocine non-dérivée, a), l'analyse SRM de la transition la plus intense (m/z 1327/360) de l'Ocytocine dérivée, b) et de l'analyse Photo-SRM de la transition la plus intense (m/z 1327/465) de l'Ocytocine dérivée, c). Chromatogrammes LC-MS/MS de l'Ocytocine ajoutée à une faible concentration (0.41 µg/mL) dans des digestes de sérum humain obtenus suite à l'analyse SRM de la transition la plus intense (m/z 1124/839) de l'Ocytocine non-dérivée, d), l'analyse SRM de la transition la plus intense (m/z 1327/360) de l'Ocytocine dérivée, e) et de l'analyse Photo-SRM de la transition la plus intense (m/z 1327/465) de l'Ocytocine dérivée, f). Les flèches désignent les pics chromatogrammes correspondant aux molécules d'intérêts.

La Figure IV-17 présente les courbes de calibration en mode SRM de l'OT non-dérivée et dérivée ainsi que celle en mode Photo-SRM de l'OT dérivée.

Tout d'abord, le gain de signal obtenu suite à la dérivation chimique de l'Ocytocine est un phénomène bien connu. En effet, la charge permanente se trouvant sur le chromophore facilite l'ionisation de la molécule lors de l'électrospray ce qui engendre un meilleur signal lors de la détection^{216, 217}. Ce phénomène est visible sur l'ensemble de la gamme de concentration avec un coefficient directeur de la pente de la droite de calibration inférieur à ceux obtenus en SRM et Photo-SRM pour la molécule dérivée. Ensuite, à cause des interférents co-élus systématiquement détectés en SRM au niveau de l'Ocytocine dérivée, l'ordonnée à l'origine de la droite de calibration n'est pas nulle alors qu'elle s'approche de 0 en Photo-SRM. Ceci démontre l'impossibilité de travailler à de faibles concentrations en mode SRM alors qu'il est toujours possible de quantifier et de détecter la molécule cible grâce à la Photo-SRM. La linéarité est étendue sur toute la gamme de concentration. Le Tableau 6 présente les limites de quantification pour l'ensemble des trois méthodes d'analyses. Ces limites de quantifications sont nettement supérieures à la concentration endogène de l'Ocytocine dans le sérum humain (quelques ng/mL). Il sera donc indispensable de travailler avec un spectromètre de masse plus sensible afin de doser l'Ocytocine à des concentrations endogènes en matrice réelle.

Limites de quantification (LDQ)			
	Ocytocine non dérivée	Ocytocine dérivée SRM	Ocytocine dérivée Photo-SRM
ng/mL	8200	2050	410

Tableau 6 : limites de quantifications (LDQ) de l'Ocytocine en fonction de la méthode d'analyse.

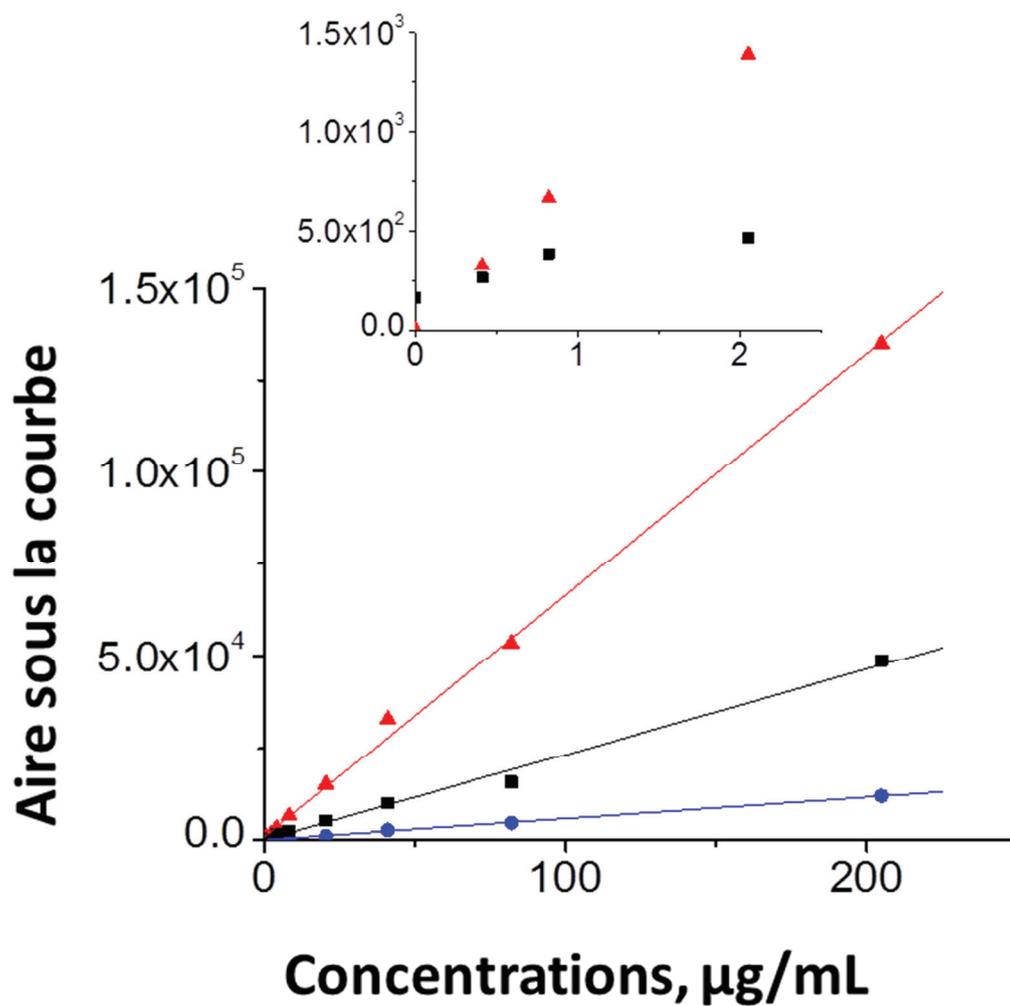


Figure IV-17 : Courbes de calibration de la transition la plus intense suite à l'analyse soit en mode SRM de l'Oxytocine non-dérivée (●) et de l'Oxytocine dérivée (■) soit en mode Photo-SRM de l'Oxytocine dérivée (▲). L'insert montre les plus faibles concentrations de la gamme pour l'Oxytocine dérivée analysée en SRM et Photo-SRM.

IV.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté la première preuve de concept couplant la fragmentation laser à la SRM réalisée dans un spectromètre de masse de type triple quadripôle commercial pour la quantification de biomolécules. Nous avons vu que la sensibilité et la spécificité de détection sont grandement améliorées, dans cet exemple-ci, lors de la substitution de la CID par la LID pour le dosage d'une petite protéine. L'absence, en Photo-SRM, de molécule co-éluée ayant la même transition SRM que la molécule d'intérêt, due à la spécificité de la LID, permet d'obtenir une limite de détection 20 fois inférieure à celle obtenue suite à l'analyse SRM de l'Ocytocine non dérivée.

Une des questions soulevée par ces travaux est de savoir si la Photo-SRM permettra ou non d'améliorer systématiquement la limite de détection lors d'analyses de biomolécules en matrice complexe. Il est également important de noter qu'afin de développer un vrai dosage par Photo-SRM, il sera indispensable de travailler sur des protéines endogènes, se trouvant directement dans la matrice, et donc la dérivation chimique va devoir être optimisée afin de se faire *in situ* lors de la préparation de l'échantillon. Dans ce cas-là, toutes les molécules ayant la même fonction chimique seront alors dérivées, en plus de la molécule cible. Par ailleurs, maintenant que la preuve de principe a été réalisée et afin de travailler sur des protéines avec des concentrations endogènes assez faibles et se rapprocher des concentrations des biomarqueurs (autour du ng/mL), il est indispensable de travailler sur un spectromètre de masse ayant une meilleure sensibilité que l'API 300.

De plus, le chromophore QSY7 ne semble pas être le chromophore idéal pour la Photo-SRM. En effet, nous avons vu que très peu de fragments provenant de la chaîne peptidique ont été détectés. Le transfert d'énergie entre le chromophore et la chaîne peptidique n'est peut-être pas optimal. Une étude approfondie de différents chromophores semble indispensable afin de dégager des règles générales de fragmentation.

Le chapitre suivant va donc présenter l'implémentation de la Photo-SRM sur un triple quadripôle plus récent, un 4 000 Q-trap. Ensuite, une étude de la fragmentation de différents chromophores greffés sur un même peptide va être réalisée. Enfin, nous verrons une application de la Photo-SRM à des échantillons réels pour le dosage de protéines endogènes du plasma humain.

Par ailleurs, la spécificité de fragmentation obtenue grâce à la photo-fragmentation et les propriétés optiques des biomolécules ne se limite pas seulement à la quantification des protéines. Ce filtre par photo-fragmentation peut être généralisé à de nombreuses applications comme la découverte de biomarqueurs en *discovery proteomics*. Un second montage expérimental couplant la haute résolution d'un instrument hybride Q-Orbitrap, le Q-exactive, avec la photo-fragmentation sera détaillé dans le dernier chapitre en tant que perspective d'étude.

Chapitre V. Applications de la Photo-SRM pour le dosage de protéines endogènes

V.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté un nouvel outil de quantification couplant la spécificité de la spectroscopie optique avec la sélectivité de la spectrométrie de masse mis en place sur un spectromètre de masse d'ancienne génération, l'API 300²⁰¹. Nous avons décidé de travailler dans un premier temps sur un appareil d'ancienne génération afin de vérifier que la modification instrumentale n'allait pas altérer les performances de l'instrument. Afin de réaliser des dosages cliniques^{218,219} et atteindre des limites de détection de l'ordre du ng/mL, il est nécessaire d'implémenter la méthode sur un spectromètre de masse plus sensible, donc plus récent que l'API 300. Dans un premier temps, nous discuterons de cette implémentation sur un spectromètre de masse de type Q-trap 4 000 de chez AB Sciex. Ce spectromètre de masse a déjà permis la détection de biomarqueurs à des concentrations de l'ordre du ng/mL^{220,221}.

Comme nous allons le voir, le choix du chromophore est également très important. Il est indispensable de posséder un chromophore qui suite à son excitation laser, puisse retransmettre son énergie à l'ensemble de la molécule pour que celle-ci fragmente. Ainsi, dans le cadre d'un financement ANR (Agence Nationale de la Recherche) en partenariat avec le laboratoire de chimie de l'ENS Lyon, différents chromophores ont été synthétisés sur la base d'un chromophore ayant un fort taux de photo-fragmentation, le dabcyI. Nous allons donc discuter des différences entre ces chromophores qui ont été testés pour la dérivation de peptide et nous allons essayer de comprendre quelles sont les caractéristiques nécessaires pour qu'un chromophore soit utilisé en Photo-SRM.

Enfin, pour réaliser une étude en condition réelle, nous allons dériver l'ensemble d'une matrice complexe, un sérum humain, pour détecter et doser des peptides rapporteurs de protéines endogènes, peptides protéotypiques. Une comparaison SRM/Photo-SRM sera présentée. Par ailleurs, la sensibilité absolue obtenue suite à la détection Photo-SRM des peptides à cystéines sera comparée à la sensibilité absolue obtenue après détection des meilleurs peptides protéotypiques habituellement choisis pour le dosage des protéines cibles^{222,223}.

V.2 Implémentation de la Photo-SRM sur un 4 000 Q-trap.

Lors de la preuve de concept, nous avons utilisé un spectromètre de masse d'ancienne génération afin de vérifier que les modifications instrumentales engendrées par l'injection d'un laser dans la cellule de collision ne dégradait pas les performances de l'instrument. Pour le dosage par Photo-SRM de protéines endogènes il est nécessaire de travailler avec un instrument ayant une sensibilité suffisante pour détecter des molécules cibles à des concentrations de l'ordre du ng/mL. Un spectromètre de masse de type 4 000 Q-trap va donc être modifié pour les études suivantes.

V.2.1 Modifications instrumentales du 4 000 Q-trap et choix du laser

L'introduction d'un laser au sein d'un 4 000 Q-trap se fait de la même manière que celle réalisée pour l'implémentation dans l'API 300. La plaque arrière du spectromètre de masse est modifiée afin de rajouter un hublot en quartz dans l'axe des quadripôles. Un montage optique avec 2 miroirs permet d'introduire le faisceau laser au sein de l'instrument. Cependant, lors des expériences réalisées pour ce chapitre, nous avons le choix entre les trois lasers présentés dans le chapitre précédent et ayant les caractéristiques techniques indispensables, Tableau 7. Le premier laser est celui utilisé dans le chapitre précédent, émettant des photons à 532 nm et d'une puissance maximale de 300mW. Le deuxième est un laser continu émettant des photons à 473 nm et d'une puissance maximale de 500 mW. Le troisième est aussi un laser continu émettant des photons à 375 nm avec une puissance maximale de 150 mW. A 375 nm l'énergie est de 3.3eV, à 473 nm de 2.6 eV et à 532 nm de 2.3 eV. Une plus forte énergie devrait engendrer une meilleure photo-fragmentation. A 473 nm et à 375 nm, les biomolécules n'absorbent toujours pas donc le principe de la Photo-SRM est conservé. Cependant, le choix du laser va forcément découler du choix du chromophore et vice-versa.

La Figure V-1 montre le montage expérimental utilisé dans ce chapitre.

Caractéristiques des lasers	Oxxius 532 nm slim	ACAL BFI Low Noise 473nm DPSS	Oxxius LBX-375
longueur d'onde (nm)	532	473	375
Puissance (mW)	300	500 (ajustable)	150 (ajustable)
divergence (mrad)	1.2	1.5	0.6
diamètre du faisceau (mm)	0.6	2	1.3
stabilité du pointage (μ rad/°C)	5	50	5

Tableau 7 : caractéristiques techniques des lasers continus disponibles au laboratoire.

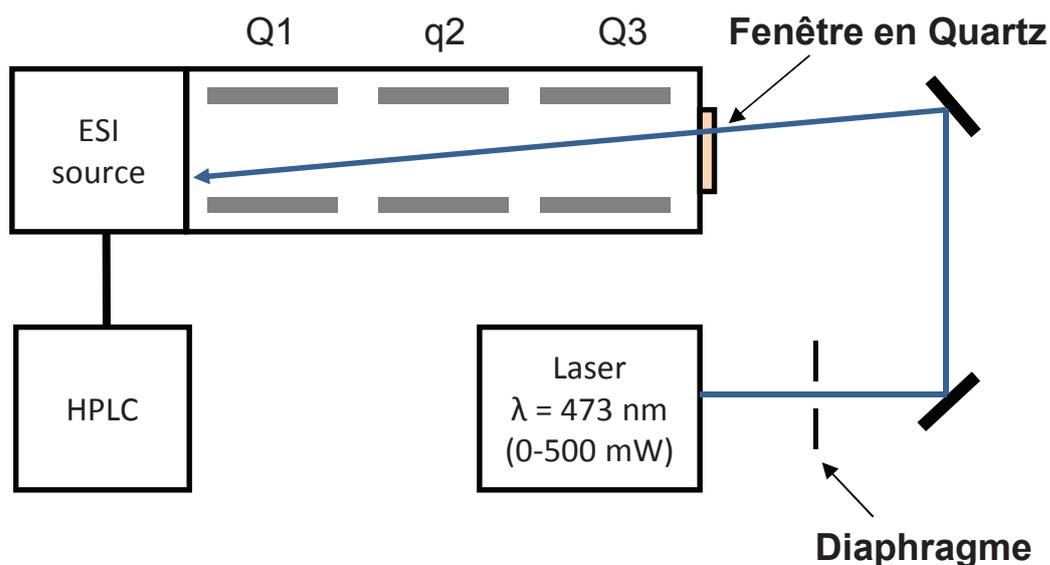


Figure V-1 : montage expérimental de la Photo-SRM dans un triple quadripôle.

V.2.2 Choix du chromophore à partir des chromophores à thiol commerciaux

Lors du choix du chromophore, il est indispensable de sélectionner un chromophore qui puisse transférer l'énergie absorbée suite à l'excitation laser au reste de la molécule afin que celle-ci fragmente. Le chromophore QSY7 possède un λ_{\max} d'absorption en phase gazeuse aux environs de 532 nm et il n'absorbe pas à 473 nm. Nous avons donc étudié d'autres chromophores commerciaux pouvant se greffer sur les thiols et absorbant en solution aux longueurs d'ondes souhaitées, 473 et 375 nm.

Parmi les trois chromophores utilisés dans les chapitres précédents, le chromophore ENS 007, le QSY7 et le BODIPY, deux d'entre eux photo-fragmentaient suite à l'irradiation laser ; le chromophore ENS 007 et le QSY7. Ces deux chromophores sont des *quencher*s et ne fluorescent pas suite à leurs excitations laser contrairement au BODIPY qui lui est fluorescent en solution. La première propriété essentielle pour qu'un chromophore transfère son énergie en fragmentant est d'être *quencher*. Les rendements quantiques de fluorescence des principaux chromophores sont connus en solution mais il n'existe pas de telle base de données pour la phase gazeuse. Nous avons donc utilisé les données en solution comme première indication pour les rendements quantiques et les zones d'absorption. Comme discuté précédemment, il sera nécessaire de vérifier la photo-fragmentation de ces chromophores en phase gazeuse.

Très peu de chromophores *quencher* commerciaux absorbent à 375 et à 473 nm. Aucun chromophore commercial absorbant à 370 nm et pouvant être greffé sur des cystéines n'a été trouvé. Parmi ceux disponibles et absorbant à 473 nm, le DABCYL maléimide se présente comme un

candidat intéressant. Son λ_{\max} en solution est aux environs de 430 nm et il est un *quencher*. La Figure V-2 montre son spectre d'action en phase gazeuse et on peut observer une bonne absorbance du chromophore à 473 nm suite à la dérivation du peptide IVGGWECEK par le chromophore DABCYL-maléimide.

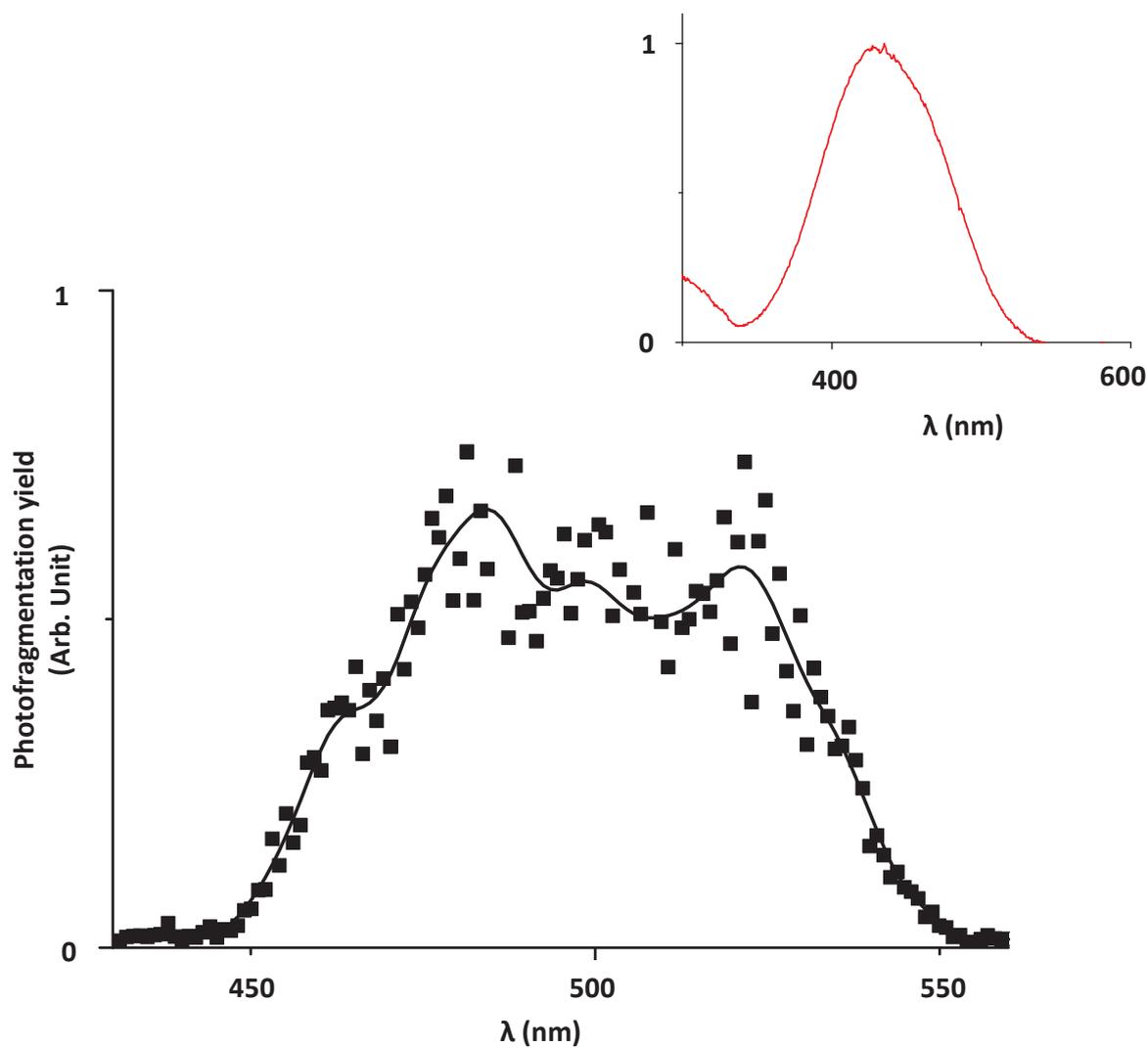


Figure V-2 : spectre d'action en phase gazeuse du chromophore DABCYL-maléimide greffé sur le peptide IVGGWECEK en fonction de la longueur d'onde²²⁴. L'insert montre le spectre d'absorption en solution du DABCYL-maléimide.

Cependant, pour valider l'utilisation de ce couple « chromophore dabcyll/laser 473 nm », il est important de vérifier si celui-ci apporte une meilleure fragmentation que le couple « QSY 7/laser à 532 nm » utilisé dans le chapitre précédent. Pour cela, nous avons greffé ces deux chromophores sur un peptide modèle, le peptide IVGGWECEK, protéotypique du PSA (*Prostate Specific Antigen*). Ainsi, lorsque l'on compare le spectre de masse en MS/MS obtenu suite à l'irradiation laser à 473 nm de l'ion dichargé du peptide IVGGWECEK dérivé avec le DABCYL (Figure V-3a) et celui obtenu suite à l'irradiation laser à 532 nm de ce même peptide dérivé avec le chromophore QSY 7 (Figure V-3b), on remarque qu'un plus grand nombre de fragments intra-peptidiques sont détectés, fragments de série y spécifiques de la séquence peptidique. Deux types de fragments y sont détectés, des fragments possédant à la fois le chromophore intact (ions 2y7, 2y8 par exemple) et des fragments n'ayant plus qu'une partie du chromophore (ion $[M+H-252]^+$). L'ion spécifique du chromophore détecté à m/z 252 est le fragment complémentaire des ions ayant gardé seulement une partie du chromophore. De plus, lors de cette comparaison, la puissance laser a été maximale dans les deux cas, 500 mW à 473 nm et 300 mW à 532 nm, les intensités détectées des ions fragments sont plus grandes avec l'utilisation du DABCYL. Le chromophore DABCYL-maléimide semble être un bon candidat pour les analyses Photo-SRM sur un digeste entier de plasma.

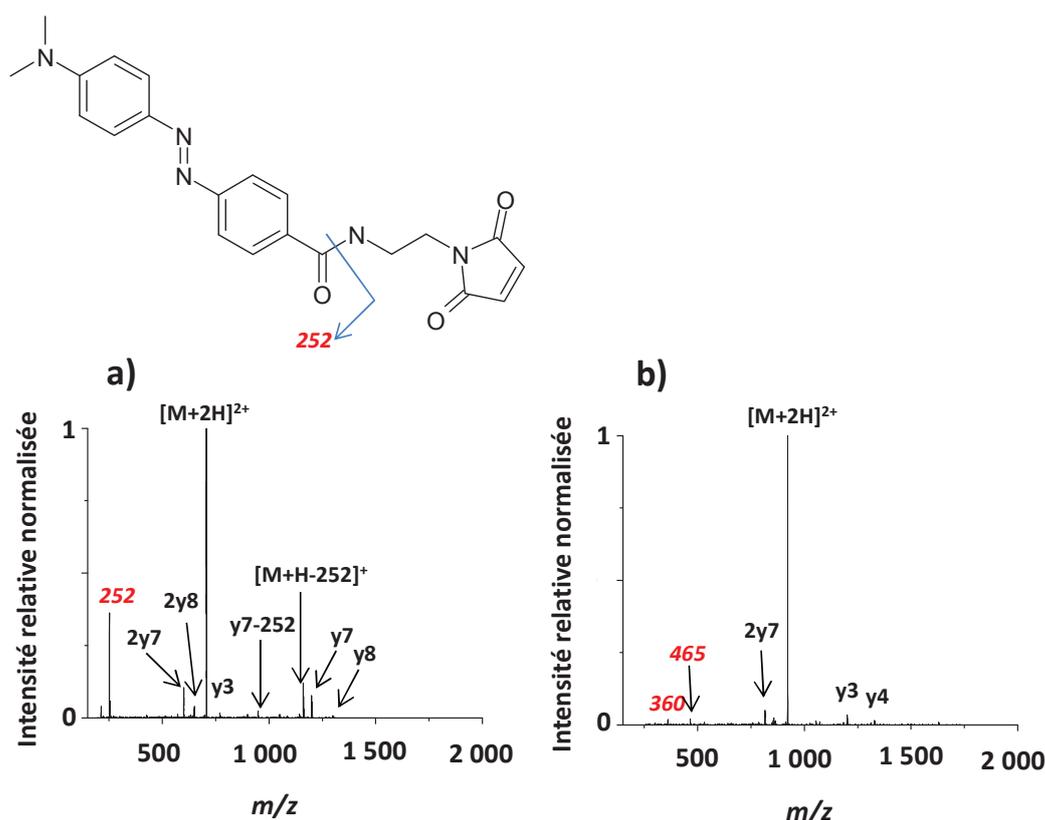


Figure V-3 : spectre de masse MS/MS de l'ion dichargé $[M+2H]^{2+}$ IVGGWECEK dérivé avec le DABCYL et irradié à 473 nm (a). Spectre de masse MS/MS de l'ion dichargé $[M+2H]^{2+}$ IVGGWECEK dérivé avec le QSY 7 et irradié à 532 nm (b). Les ions en rouges sont ceux provenant de la fragmentation intra-chromophore. La structure chimique du DABCYL-maléimide est présentée au-dessus des spectres de masse.

Ainsi, pour l'étude suivante, le chromophore DABCYL-maléimide est choisi. Dans cette étude, du plasma pur est dérivé avec le chromophore afin de détecter spécifiquement les peptides à cystéines rapporteurs de protéines du plasma.

Cependant, le DABCYL-maléimide est relativement peu soluble dans l'eau et dans le méthanol (limite de solubilité dans le MeOH à 1.33 mg/mL). Il semble donc difficile d'utiliser ce chromophore pour des dosages de plasma en routines. Il est donc nécessaire de mettre au point, à partir de cette base de chromophore DABCYL, un chromophore pouvant à la fois avoir un bon rendement de photo-fragmentation mais qui soit aussi, idéalement, soluble dans l'eau.

V.2.3 Synthèse de chromophores spécifiques pour la Photo-SRM

Confidentiel

Confidentiel

Confidentiel

Confidentiel

Confidentiel

Confidentiel

V.2.4 Stabilité du couplage Chromophore-peptide

Pour pouvoir utiliser le chromophore DABCYL-maléimide pour les expériences de Photo-SRM, il est important de vérifier dans un premier temps, que le couplage cystéine-DABCYL est répétable et proche des 100% de rendement.

Pour cela, le peptide protéotypique du PSA contenant une cystéine, IVGGWECEK, a été dérivé suivant les conditions suivantes. Le peptide est placé dans une solution d'AA à 60 mM composé d'un excès molaire X 3 de TCEP. Le TCEP est un agent réducteur permettant de réduire les ponts disulfures d'une protéine. Un excès molaire X 5 de DABCYL-C2 maléimide est ensuite ajouté pour réaliser le couplage chromophore-peptide. Cet excès a été défini de manière à obtenir un rendement de couplage optimal. Le mélange est placé à température ambiante et dans le noir pendant 4h.

Les transitions SRM du peptide dérivé et du peptide non dérivé ont été suivies et aucun signal provenant du peptide non dérivé n'a été détecté contrairement au peptide dérivé (Figure V-9). La réaction est donc complète.

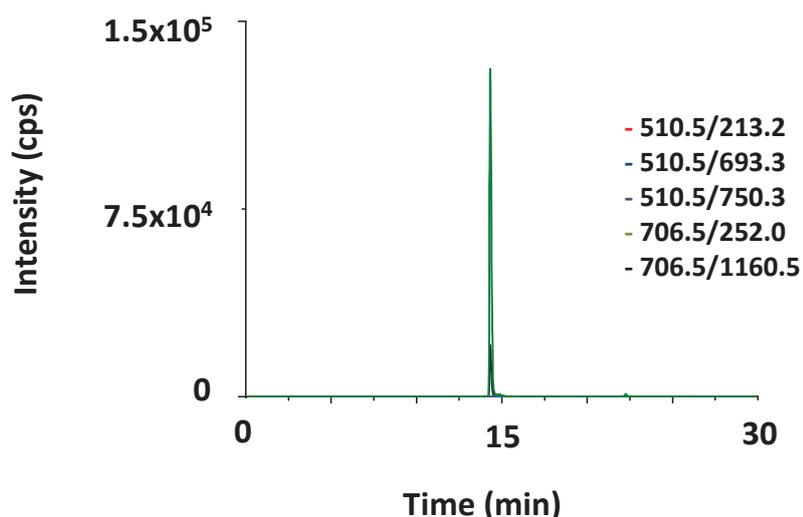


Figure V-9 : chromatogramme retraçant l'analyse du peptide IVGGWECEK natif (transition SRM 510.5/213.2, 510.5/693.3, 510.5/750.3) et de ce même peptide dérivé (transitions SRM 706.5/252.0, 706.5/1160.5).

Lors de l'analyse d'une gamme d'étalonnage, il est important de vérifier que l'échantillon ne se dégrade pas au cours du temps afin de pouvoir comparer un échantillon A analysé quelques heures avant un échantillon B. Pour cela, nous avons choisi d'injecter toutes les 30 minutes un même échantillon du même peptide protéotypique à cystéine du PSA dérivé. Cette analyse a été réalisée sur 12h dans trois conditions différentes. Pour la première analyse, le passeur d'échantillon se trouvait dans le noir à 4°C afin d'éviter toute hausse de température ou toute variation de lumière qui pourrait dégrader l'échantillon. Pour les deuxièmes conditions expérimentales, la température

est maintenue à 4°C mais le passeur d'échantillon se trouve à la lumière ambiante. Enfin, pour les troisièmes conditions, le passeur d'échantillon est à température et lumière ambiante. La Figure V-10 montre qu'après 6h d'analyse le signal détecté baisse seulement de 5 % puis de 15 % après 12h, peu importe les conditions expérimentales. Le couplage semble donc stable et aucune contrainte particulière ne semble indispensable afin de garder un signal stable et répétable.

Par ailleurs, dans le cas d'un dosage d'une protéine en particulier, il est possible de rajouter un étalon interne afin de corriger la réponse en fonction du temps, de la température ou toutes autres variables expérimentales. Dans notre cas, nous souhaitons réaliser une analyse multiplexée (de plusieurs dizaines de protéines) et l'ajout d'étalon interne propre à chaque protéine coûterait extrêmement cher pour une preuve de principe comme celle-ci.

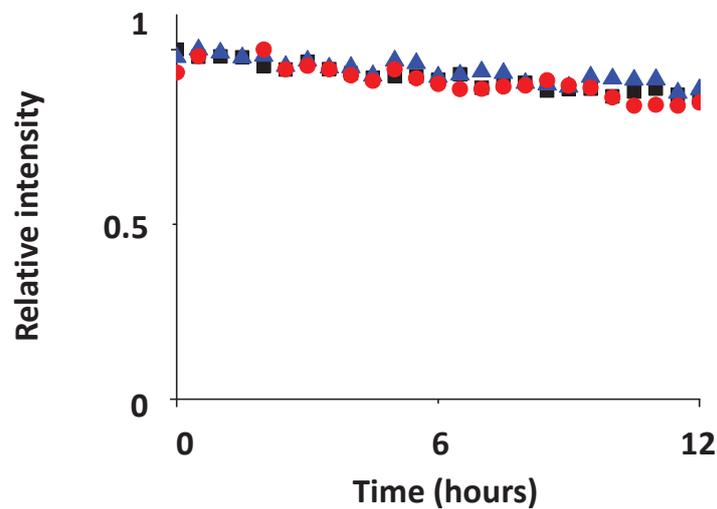


Figure V-10 : étude de la stabilité du couplage peptide-DABSYL sur 12h avec trois conditions différentes ((▲) passeur d'échantillon à 4°C et dans l'obscurité, (■) passeur d'échantillon à 4°C avec lumière ambiante et (●) passeur d'échantillon à température et lumière ambiante).

V.3 Amélioration de la détection et de la quantification de protéines plasmatiques par Photo-SRM

V.3.1 Introduction

La quantification de protéines et de peptides dans les matrices complexes comme le plasma et l'urine est une étape majeure des essais cliniques lors de la découverte de biomarqueurs²¹⁸. La spectrométrie de masse se pose comme une méthode alternative crédible aux tests immunologiques lors de cette étape de quantification^{197, 201, 220, 222}. Cependant, la grande gamme dynamique de concentration des protéines dans le plasma pose des problèmes de sensibilités en engendrant un grand nombre d'interférents. De nombreuses méthodes de préparation d'échantillons, comme l'immuno-enrichissement en molécule cible, sont donc développées afin de simplifier la matrice et d'atteindre de très faibles concentrations (de l'ordre du ng/mL)^{225, 226}. Une alternative consiste à cibler seulement une partie de l'échantillon et donc de s'affranchir d'un grand nombre d'interférents. Nous nous sommes donc intéressés à ne cibler que les peptides contenant des cystéines. En effet, les cystéines sont des acides aminés rares présents dans 89.3% des protéines mais sur seulement 17.2% des peptides tryptiques²⁰⁵. La méthode ICAT (*Isotope Coded Affinity Tag*) utilise déjà la dérivation de cystéines pour faciliter l'enrichissement en molécule cible²⁰⁸. Afin, d'appliquer la Photo-SRM aux peptides à cystéines, il est nécessaire de dériver ces peptides avec un chromophore absorbant à la longueur d'onde désirée²⁰⁰. Dans notre cas nous avons choisi le DABCYL-maléimide pour les raisons présentées précédemment.

Ainsi, dans cette étude, nous utilisons la Photo-SRM pour la détection spécifique de peptides protéotypiques contenant des cystéines. La Photo-SRM a dans un premier temps été comparée à la SRM effectuée sur les mêmes peptides dérivés puis dans un deuxième temps, comparée à la SRM réalisée sur les peptides protéotypiques ayant la meilleure réponse en spectrométrie de masse. Ces deux comparaisons permettront d'évaluer la sensibilité absolue obtenue par Photo-SRM vis-à-vis de la SRM. Suite à ces expériences de détection, un dosage multiplexé de protéines humaines sera réalisé suite à des dilutions de sérum humain dans du plasma de rat. Ceci permettra de mettre en évidence le gain de spécificité obtenu en matrice complexe par Photo-SRM. Des triplicats et une gamme de concentrations seront réalisés pour évaluer la répétabilité de l'ensemble de la méthode d'analyse.

V.3.2 Expériences

V.3.2.1 Produits chimiques et biologiques

L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH) et l'eau (tous qualité LC-MS) ont été achetés chez Fisher Scientific (Strasbourg, France). Dithiothreitol (DTT), iodoacétamide (IAM), acide formique (AF), trypsine (type IX-S provenant du pancréas du porc), bicarbonate d'ammonium (AMBIC), tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), acétate d'ammonium (AA) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Le DABCYL-C2 maléimide a été acheté chez Anaspec (Fremont, CA). Le sérum humain a été obtenu chez l'établissement Français du sang. Le plasma de rat a été obtenu chez Charles River Laboratoire (L'Arbresle, France). Le peptide protéotypique du Prostate Specific Antigen (PSA) IVGGWECEK a été synthétisé par Millegen (Labège, France).

V.3.2.2 Préparation des échantillons

Pour les analyses SRM et Photo-SRM des peptides endogènes contenant des cystéines provenant d'un digeste de sérum, 10 µL de sérum humain sont dilués par 10 dans une solution d'AA à 60mM contenant un excès molaire X 3 de TCEP et d'un excès molaire X 5 de DABCYL-C2 maléimide. La solution est placée à température ambiante dans le noir pendant 4h. L'échantillon est ensuite redilué par 10 dans une solution d'AA à 60 mM avant d'être digéré par trypsine à 37°C durant toute une nuit. L'échantillon est ensuite dessalé et reconcentré sur cartouche SPE (Waters Oasis, Hlb 3cc). Avant le dépôt de l'échantillon, la cartouche est conditionnée avec 1 mL de MeOH et 1 mL d'eau acidifiée avec 0.5% d'AF. L'élution est réalisée avec 2 mL d'ACN acidifiée avec 0.5% d'AF. Pour finir, l'échantillon est reconcentré sous azote et repris dans 100 µL d'eau/MeOH (2/1 ; v/v) acidifiée avec 0.5% d'AF.

Des courbes de calibrations sont réalisées par dilutions de sérum humain dans du plasma de rat. Avant toute dérivation, la gamme d'étalonnage a été effectuée afin d'obtenir des ratios de 0, 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.5 et 1 de sérum humain dans le plasma de rat. Chaque échantillon est dérivé de manière indépendante, digéré à la trypsine puis reconcentré comme décrit dans le paragraphe précédent. Des triplicatas de chaque échantillon sont effectués.

Pour les analyses SRM de peptides protéotypiques usuels, 100 µL de sérum humain sont dénaturés dans une solution d'urée à 8 mM contenant un excès molaire X 3 de DTT. Le DTT est un agent réducteur permettant de réduire les ponts disulfures d'une protéine. La solution est placée 40 min à 60 °C. Après un retour à température ambiante, un excès molaire X 5 d'IAM est ajouté à la solution. L'IAM est un agent alkylant permettant de bloquer les ponts disulfures pour que ceux-ci ne se reforment pas. La solution est placée à température ambiante dans le noir pendant 40 min. L'échantillon est ensuite dilué 5 fois dans une solution d'AMBIC à 50 mM avant d'être digéré par trypsine à 37°C durant toute une nuit. Puis, l'échantillon est dessalé et reconcentré sur cartouche SPE (Waters Oasis, Hlb 3CC). Avant tout dépôt de l'échantillon sur la cartouche, celle-ci est conditionnée avec 1 mL de MeOH et 1 mL d'eau acidifiée avec 0.5% d'AF. L'élution est réalisée avec 1 mL de MeOH acidifiée avec 0.5% d'AF. L'échantillon est enfin reconcentré sous azote et repris dans 100 µL d'eau acidifiée avec 0.5% d'AF.

V.3.2.3 Séparation HPLC

Lors de ces expériences, deux types de méthodes chromatographiques ont été développés. La première méthode permet d'analyser les peptides dérivés par le chromophore en mode SRM ou Photo-SRM. La deuxième méthode permet d'analyser les peptides protéotypiques de protéines cibles non dérivés. Dans les deux cas, la phase mobile est composée d'eau acidifiée à 0,1 % avec de l'AF pour l'éluant A et d'ACN acidifié avec de l'AF pour l'éluant B.

Pour la première méthode, une colonne X-Bridge C₈ (100 X 2.1 mm, 3.5µm) de chez Waters est utilisée. L'élution est réalisée avec un débit de 300 µL/min sur un temps d'analyse de 65 min. L'élution débute par un plateau de 87 % d'éluant A pendant 2 min suivi d'un gradient linéaire allant de 87 % à 62 % en éluant A sur 45 min. Un plateau de lavage à 0 % d'éluant A est réalisé sur 8 min avant un retour aux conditions initiales pour 10 min (Figure V-11a). 20 microlitres de chaque échantillon sont injectés afin d'injecter l'équivalent de 2 microlitres de sérum (d'après les conditions de la préparation d'échantillon). La même méthode chromatographique est utilisée au niveau du couplage 5 500 Q-trap HPLC Agilent pour les analyses MS/MS.

Pour la deuxième méthode et l'analyse des peptides protéotypiques, une colonne Symmetry C₁₈ (100 X 2.1 mm, 3.5 µm) de chez Waters est utilisée. L'élution débute par un plateau de 95 % d'éluant A pendant 3 min suivi d'un gradient linéaire allant de 95 % à 74 % en éluant A sur 15 min. Un plateau de lavage à 0 % d'éluant A est réalisé sur 4 min avant un retour aux conditions initiales durant 7 min (Figure V-11b). 2 microlitres de chaque échantillon sont injectés afin d'injecter l'équivalent de 2 microlitres de sérum (d'après les conditions de la préparation d'échantillon).

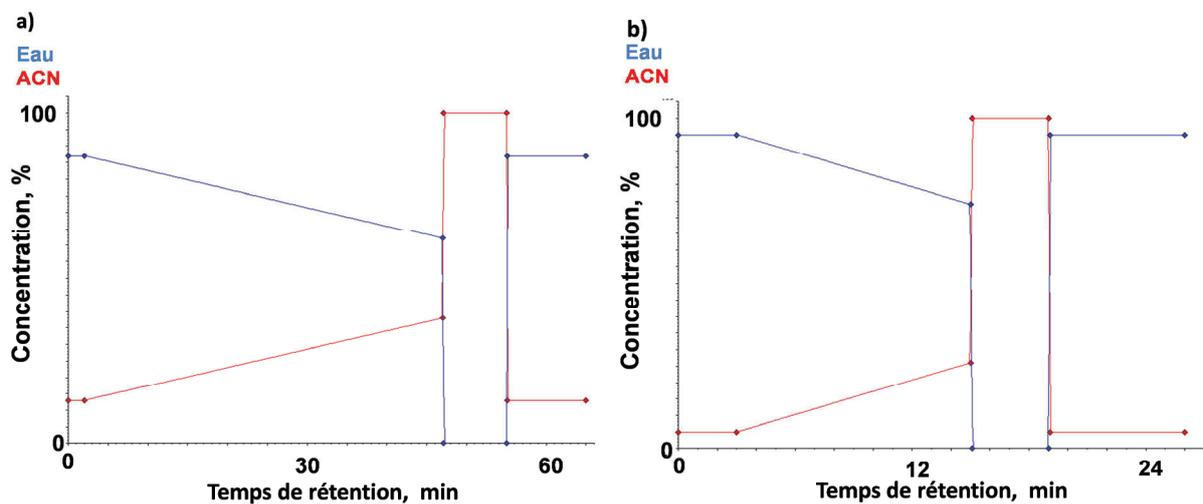


Figure V-11 : gradients chromatographiques pour l'analyse des peptides protéotypiques à cystéine dérivés a) et des meilleurs peptides protéotypiques b).

V.3.2.4 Instrumentation et paramètres de source et d'analyse sur le spectromètre de masse.

Les analyses SRM et Photo-SRM sont réalisées sur l'API 4 000 Q-trap (ABSciex, Foster City, CA) équipé d'une source électrospray. Le spectromètre de masse était couplé à une chromatographie liquide (HPLC) Agilent série 1290 (Agilent technologies, Waldbronn, Germany). Comme décrit précédemment, le spectromètre de masse est couplé avec le laser continu monochromatique émettant des photons à 473nm, Figure V-1.

Les expériences MS/MS réalisées en data-dependent scan ont été enregistrées sur un spectromètre de masse de type 5 500 Q-trap (ABSciex, Foster City, CA) équipé d'une source électrospray. Le spectromètre de masse est couplé à une chromatographie liquide (HPLC) Agilent série 1290 (Agilent technologies, Waldbronn, Germany).

Pour les analyses SRM et Photo-SRM des peptides dérivés, les conditions suivantes sont choisies comme compromis pour détecter le plus grand nombre possible de peptides provenant du sérum humain. L'ionisation des molécules par électrospray est réalisée en mode positif avec une tension de spray de 5 500 volts. Les débits des gaz rideau (azote), gaz sources 1 et 2 (air) sont respectivement réglés à 10, 30 et 20 unités arbitraires. La température de la source est ajustée à 250 °C. Comme discuté dans le premier chapitre la résolution des quadripôles Q1 et Q3 a été réglée à 1.1 ± 0.1 uma, la résolution a donc été abaissée. Pour les analyses par CID, l'énergie du gaz de collision est réglée à 40 eV pour les ions doublement chargés et à 20 eV pour les ions triplement chargés. Afin d'éviter toute fragmentation par gaz, en mode Photo-SRM, l'énergie de collision est abaissée au maximum, 5 eV. La puissance du laser (500 mW) est ajustée de manière à obtenir le meilleur rendement de fragmentation possible.

Enfin, pour l'analyse des peptides protéotypiques usuels, l'ionisation des molécules par électrospray est réalisée en mode positif avec une tension de spray de 5 500 volts. Les débits des gaz rideau (azote), gaz sources 1 et 2 (air) ont été respectivement réglés à 50, 50 et 40 unités arbitraires. La température de la source est ajustée à 450°C. La résolution des quadripôles Q1 et Q3 est ajustée à 0.7 ± 0.1 uma.

V.3.3 Choix des transitions SRM

V.3.3.1 Choix des transitions à partir de base de données

A partir d'une base de données, tous les peptides protéotypiques, contenant une cystéine, des 30 protéines les plus concentrées ont été extraits. 70 peptides différents sont obtenus. En extrapolant les canaux de fragmentation observés lors de l'analyse du peptide IVGGWECEK dérivé avec le chromophore (Figure V-3), une liste de transitions SRM potentielles a été générée. Cette liste comprend comme ions précurseurs, des ions doublement et triplement chargés, et comme ions fragments l'ion fragment à m/z 252, signature du chromophore, ainsi que son ion complémentaire (peptide entier avec la partie du chromophore restante). Pour les analyses de découvertes, 140 transitions SRM sont simultanément suivies en mode SRM et Photo-SRM avec un temps « de puits »

ou « *dwell time* » de 20 ms. Un échantillon de sérum humain dérivé suivant le protocole décrit dans la partie Préparation des échantillons est analysé à la fois par SRM et Photo-SRM en suivant l'ensemble des 140 transitions SRM potentielles.

V.3.3.2 Performance relative de la Photo-SRM vis-à-vis de la SRM

Suite à cette analyse, 23 peptides sont détectés grâce à la superposition des deux transitions SRM suivies à la fois en SRM et en Photo-SRM. Pour les autres, les deux transitions suivies n'ont pas été détectés au même temps de rétention. L'extrapolation de la fragmentation du peptide IVGGWECEK n'est pas à généraliser sur l'ensemble des peptides à cystéines.

La Figure V-12a montre un chromatogramme reconstitué retraçant les 12 transitions les plus intenses détectées par Photo-SRM. Très peu d'interférents sont détectés contrairement au chromatogramme reconstitué retraçant les 12 mêmes transitions SRM détectées en SRM classique (Figure V-12b). Nous pouvons remarquer que la plupart des interférents ont des temps de rétentions inférieurs aux peptides cibles. Ceci provient très certainement de la dérivation chimique par le chromophore qui induit des propriétés hydrophobes aux peptides. Ce résultat démontre clairement une amélioration de la spécificité de détection obtenue par Photo-SRM vis-à-vis de la SRM.

Afin de valider l'identification des peptides, il est nécessaire de réaliser des expériences MS/MS pour obtenir la séquence de la molécule détectée. Pour ces analyses MS/MS en « *data-dependent scan* » sur le 5 500 Q-trap, la résolution des quadripôles est ajustée à 0.7 ± 0.1 uma afin d'avoir une meilleure sélectivité dans les quadripôles lors de la fragmentation pour la confirmation des peptides. Le principe de ces expériences est de fragmenter tous les ions ayant un signal supérieur à un seuil donné. Ainsi, pour un pic chromatographique correspond un spectre de masse. Ce type d'expérience peut être réalisé sur un 4 000 Q-trap mais le 5 500 Q-trap a une meilleure sensibilité ce qui permet d'obtenir des spectres MS/MS de meilleure qualité.

Parmi les 23 peptides détectés précédemment, 7 sont identifiés de manière exacte grâce à leurs spectres MS/MS respectifs. La Figure V-13 montre les 7 spectres de masse MS/MS enregistrés en *data-dependent scan*. En plus de l'ion m/z 252 traduisant la présence du chromophore sur la molécule fragmentée, les ions fragments annotés sur les spectres de masse correspondent à des ions de séries b ou y permettant de retracer la séquence peptidique. Il est intéressant de noter que les ions précurseurs triplement chargés $[M+3H]^{3+}$ offrent une meilleure couverture de séquence que les ions doublement chargés. Ceci provient de la présence supplémentaire d'un proton labile sur la chaîne peptide. Les spectres présentés ici sont tous issus d'ions précurseurs triplement chargés.

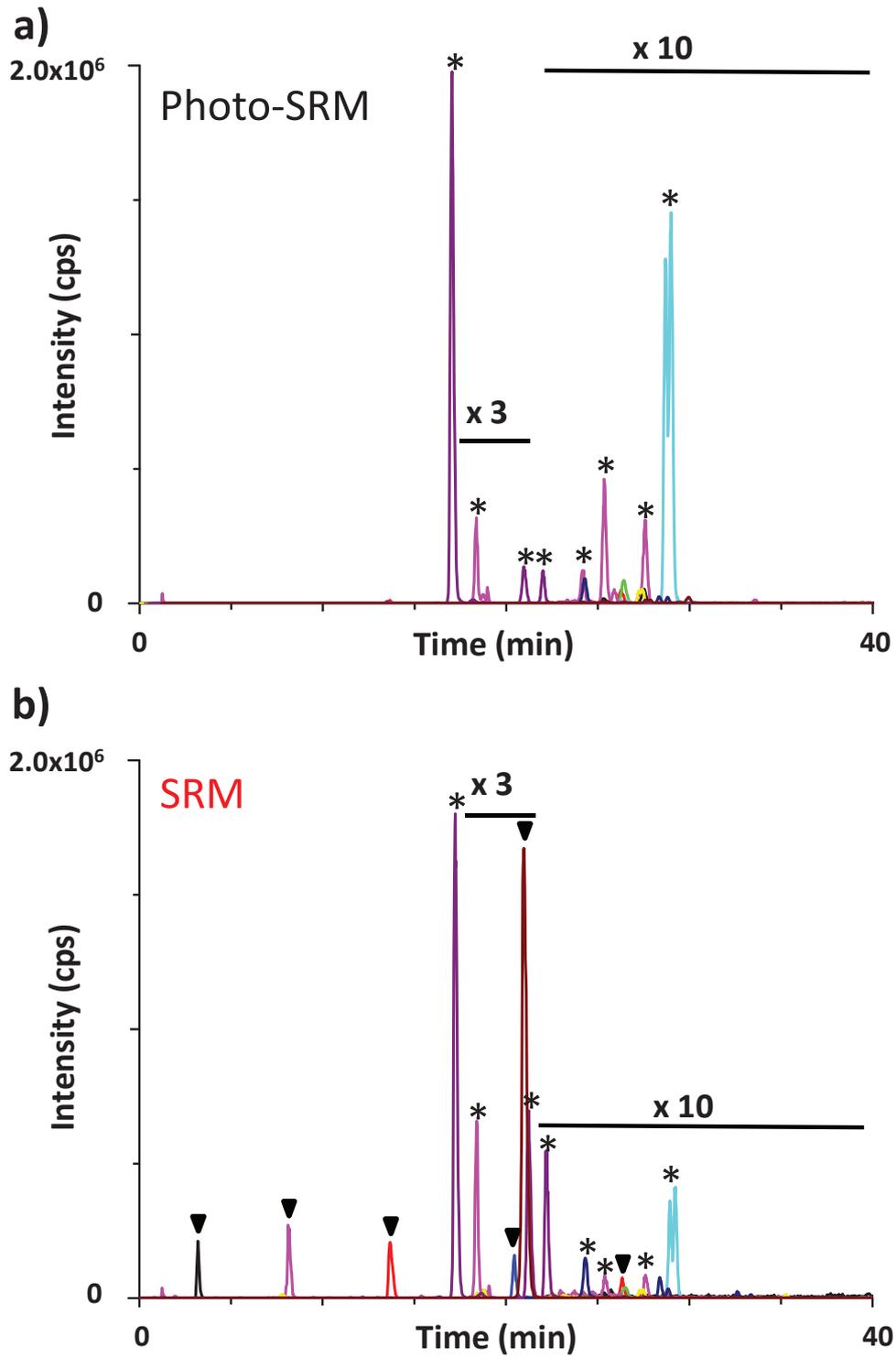


Figure V-12 : chromatogrammes reconstitués des 12 transitions les plus intenses détectées soit par Photo-SRM a) soit par SRM b). Les ▼ représentent les interférents alors que les * représentent les molécules d'intérêts.

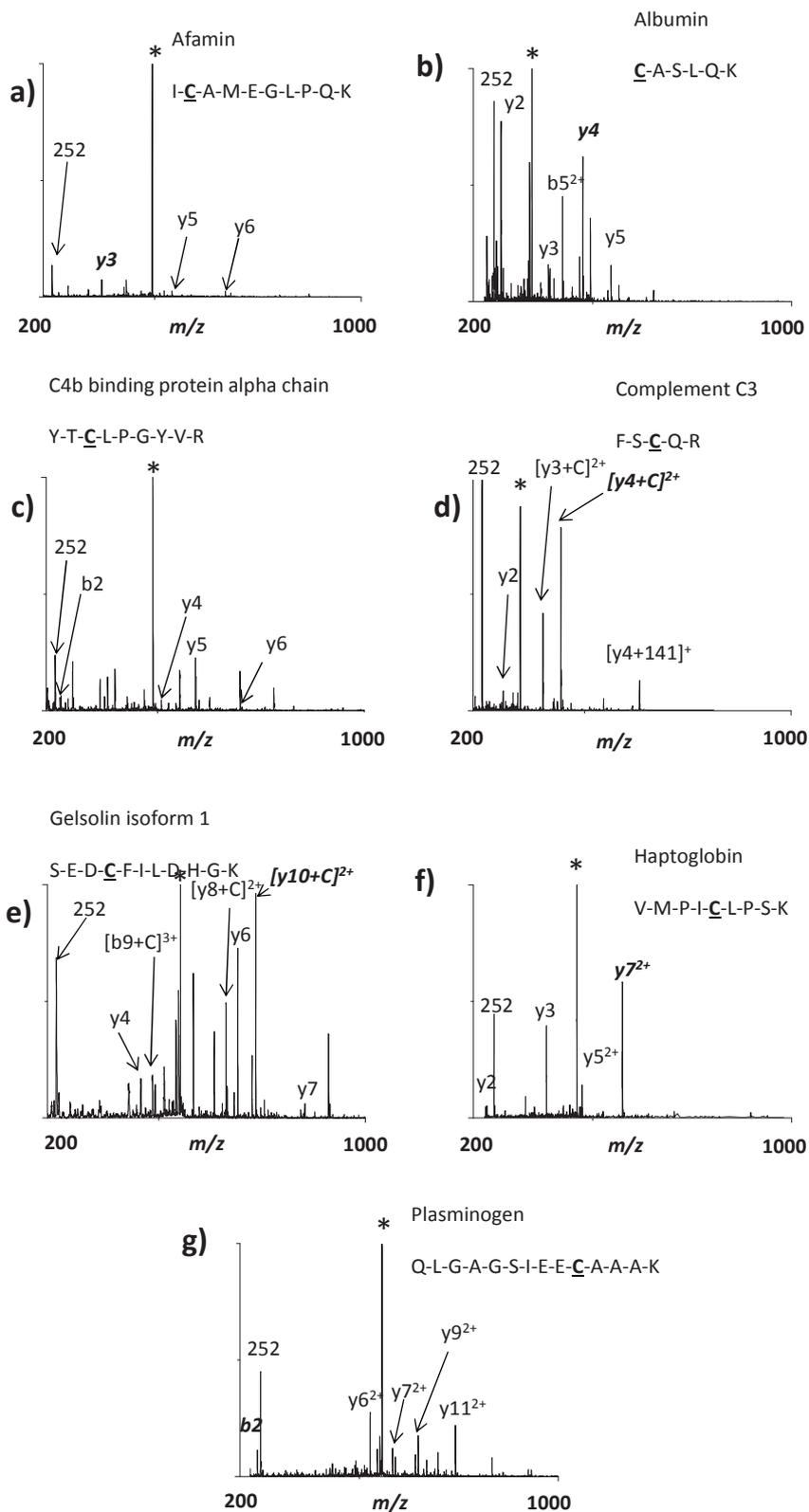


Figure V-13 : spectres MS/MS en CID enregistrés en *data dependant scan* pour la validation de peptides : a) Afamine, b) Albumine, c) C4b binding protein alpha chain, d) Complément C3, e) Gelsolin isoforme 1, f) Haptoglobine et g) Plasminogène. Les astérisques (*) montrent les ions précurseurs.

Grâce à ces spectres de masse, nous avons pu définir les transitions SRM et Photo-SRM que nous allons utiliser pour la détection et la quantification des 7 protéines dans le sérum humain. Les 14 transitions SRM sont suivies avec un *dwell time* de 50 ms et sont présentées dans le Tableau 8.

Nom de la protéine	Peptide dérivé Photo-SRM	Transition Photo-SRM	Transition Photo-SRM
Afamine	ICAMEGLPQK	494/372	494/252
Albumine	CASLQK	347/475	347/252
C4b Binding Protein Chaîne Alpha	YTCLPGYVR	732/1212	732/252
Complement C3	FSCQR	344/443	344/252
Haptoglobine chaîne beta	VMPICLPSK	460/575	460/252
Gelsoline. isoforme 1	SEDCFILDHGK	552/784	552/252
Plasminogène	QLGAGSIEECAAK	557/242	557/252

Tableau 8 : transitions SRM suivies pour les peptides dérivés par le DABCYL-maléimide.

V.3.4 Comparaison SRM/Photo-SRM pour les peptides à cystéines dérivés

Maintenant que 7 peptides ont été identifiés et validés, nous pouvons comparer la SRM et la Photo-SRM pour l'analyse de ces peptides une fois dérivés. Il est très compliqué d'optimiser l'énergie CID pour chaque transition sachant que nous ne disposons pas des peptides purs. Ainsi, une valeur moyenne de 20 eV est choisie pour les ions triplement chargés alors qu'une valeur de 40 eV est choisie pour les doublements chargés. De même en Photo-SRM, il est impossible de faire varier la puissance laser au cours d'une même analyse pour optimiser celle-ci, la puissance laser est donc ajustée à 500 mW pour toutes les analyses Photo-SRM.

La Figure V-14 représente les chromatogrammes reconstitués de 4 des 7 peptides suivis en SRM et en Photo-SRM pour la transition SRM la plus intense. Mis à part pour le C4b binding protein alpha chain, les chromatogrammes Photo-SRM montrent de bien meilleures spécificités de détection que ceux enregistrés en SRM. Par exemple, pour l'Afamine (Figure V-14a), le pic d'intérêt se trouve sous la limite de détection (rapport signal sur bruit < 3/1) alors qu'il se trouve au-dessus de la limite de quantification (rapport signal sur bruit > 10/1) en Photo-SRM. De même pour le peptide rapporteur de la Gelsoline (Figure V-14d), un seul pic est détecté en Photo-SRM alors que plusieurs pics, dont certains avec un signal plus intense, le sont en SRM. Ces expériences montrent l'apport de la photo-

fragmentation au travers de la Photo-SRM pour la détection de peptides au sein de matrices complexes.

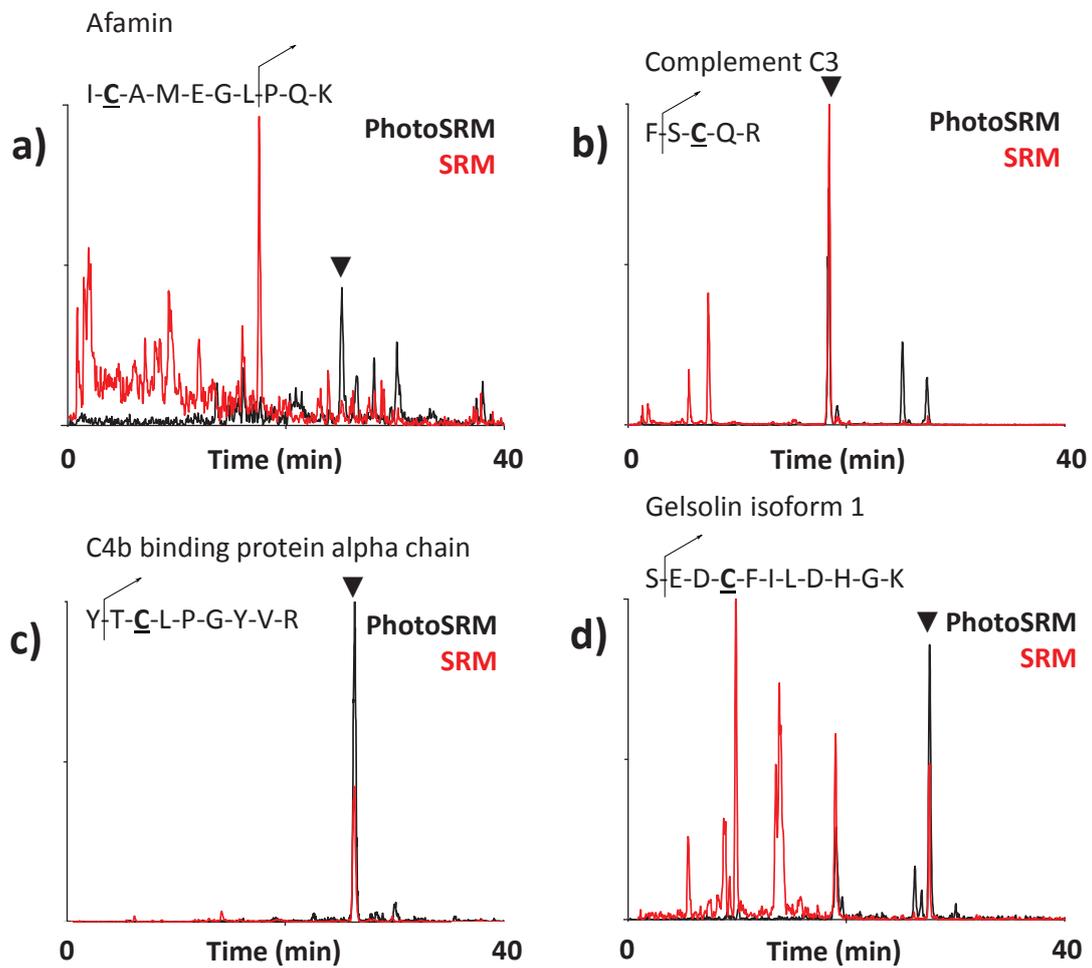


Figure V-14 : chromatogrammes reconstitués des peptides protéotypiques contenant des cystéines de a) l'Afamine, b) le Complement C3, c) la C4b binding protéine chaîne alpha et d) la Gelsoline. Les chromatogrammes en trait noir représentent l'analyse Photo-SRM et les chromatogrammes en trait rouge représentent les analyses SRM.

V.3.5 Comparaison SRM/Photo-SRM vis-à-vis des meilleurs peptides protéotypiques

Une fois démontré l'apport de la Photo-SRM vis-à-vis de la SRM pour la détection spécifique de peptides à cystéines, il nous semblait important de comparer la sensibilité du signal obtenu avec la sensibilité du signal détecté lors de l'analyse SRM des meilleurs peptides protéotypiques. En effet, lors des analyses des protéines telles que l'Albumine, l'Afamine ou encore la C4b binding protéine chaîne alpha, les peptides suivis habituellement ne contiennent pas de cystéines ²²³. Ainsi, les meilleurs peptides protéotypiques sont suivis grâce à leurs transitions les plus intenses générées par le logiciel MRM pilot et en accord avec la littérature ²²⁷. Une telle comparaison est difficile à réaliser car beaucoup de paramètres, tels que le gradient chromatographique ou la préparation d'échantillon, varient entre la méthode globale SRM des peptides usuels et la méthode globale Photo-SRM. Nous nous sommes donc attachés à injecter 1 µL d'équivalent sérum lors de l'analyse SRM des peptides usuels afin d'injecter la même quantité de sérum que lors de l'analyse Photo-SRM.

Le Tableau 9 montre les données comparatives entre les peptides usuels analysés en SRM et les peptides à cystéine dérivés analysés en Photo-SRM. Bien qu'il y ait une baisse de signal visible pour l'Afamine, l'Albumine, la Gelsoline et la Plasminogène, le signal est amélioré pour la C4b binding protéine, l'Haptoglobine et le Complement C3. Le gain de signal est à mettre au crédit de l'ensemble de la méthode et non pas seulement de la photo-fragmentation car comme décrit précédemment, le gradient chromatographique n'est pas le même. Il a été démontré qu'un fort taux de phase organique lors de l'ionisation des molécules améliorerait le signal et la sensibilité ^{201, 228, 229}. En Photo-SRM de par le caractère hydrophobe du chromophore, les peptides dérivés sont ionisés avec un taux d'acétonitrile d'environ 30 % alors que ce taux n'est que de 15 à 20 % pour les peptides usuels non dérivés.

Ces résultats montrent que la quantification de protéines ciblées par Photo-SRM peut être une alternative dans certains cas à la SRM classique afin d'obtenir une meilleure sensibilité grâce à la dérivation par chromophore et la fragmentation laser.

Protéine	Peptide SRM	Peptide Photo-SRM	Energie de collision (SRM/Photo-SRM)	Aire du pic SRM (coups)	Aire du pic Photo-SRM (coups)	Hauteur du pic SRM (coups par secondes)	Hauteur du pic Photo-SRM (coups par secondes)	Temps de rétention SRM (min)	Temps de rétention Photo-SRM (min)	Transitions SRM	Transitions Photo-SRM
Afamine	DADPDTFFAK	ICAMEGLPQK	24/5+LID	1.80E+04	1.16E+04	1.08E+03	1.10E+03	7.44	25.04	564/825	494/372
Albumine	LVNEVTEFAK	CASLQK	35/5+LID	3.97E+07	5.60E+06	2.41E+06	2.00E+06	5.94	17.26	575/937	347/475
C4b Binding Protein Alpha Chain	GYILVGQAK	YTCLPGYVR	29/5+LID	1.39E+05	2.60E+05	1.05E+04	1.20E+04	5.03	26.4	629/1015	732/1212
Complément C3	TGLQEVEVK	FSCQR	25/5+LID	2.63E+05	1.60E+06	2.42E+04	1.20E+05	4.69	18.38	502/731	344/443
Gelsoline isoform 1	TGAQELLR	SEDCFILDHGK	25/5+LID	6.51E+04	2.50E+04	5.12E+03	1.60E+03	4.7	27.6	444/530	552/784
Haptoglobine chaîne beta	VGYVSGWGR	VMPICLPSK	25/5+LID	1.38E+06	2.20E+06	1.01E+05	1.1E+05	5.48	28.68	491/562	460/575
Plasminogène	LFLEPTR	QLGAGSIEECAAK	18/5+LID	5.78E+05	3.50E+05	4.00E+04	2.50E+04	5.86	24.05	438/615	557/242

Tableau 9 : données de comparaison entre les peptides protéotypiques usuels analysés par SRM et les peptides à cystéines dérivés analysés par Photo-SRM. Les valeurs en gras et en italiques sont celles pour lesquelles la Photo-SRM est plus sensible.

V.3.6 Linéarité et répétabilité de la réponse

Afin de démontrer la linéarité et donc la répétabilité de l'ensemble du dosage Photo-SRM (préparation d'échantillon et analyse LC-MS/MS), nous avons décidé de diluer du sérum humain dans du plasma de rat afin de créer une gamme de concentration allant de 0 ng/mL à la concentration endogène de la protéine dans le sérum humain. En effet, des dilutions successives ont permis d'obtenir différents ratios sérum humain/plasma de rat (H/R) allant de 0 à 1 (0 ; 0.01 ; 0.02 ; 0.1 ; 0.2 ; 0.5 et 1). Pour réaliser ce dosage il est important de vérifier que les peptides suivis soient protéotypiques du protéome humain. Parmi les 7 peptides identifiés précédemment, 6 d'entre eux n'appartiennent qu'au protéome de l'homme alors que le peptide de l'Haptoglobine est commun aux deux protéomes. La spécificité de détection est dans un premier temps analysée grâce aux échantillons blancs, ceux ayant un ratio de 0, ne contenant que du plasma de rat. La Figure V-15a montre que lors de l'analyse Photo-SRM du plasma de rat aucun interférent n'est détecté au temps de rétention de la molécule d'intérêt alors que lors de l'analyse SRM, Figure V-15b, un interférent est détecté. Ainsi, la Photo-SRM permettra de quantifier la molécule avec une meilleure sensibilité due à une diminution du bruit et à l'augmentation du rapport signal/bruit.

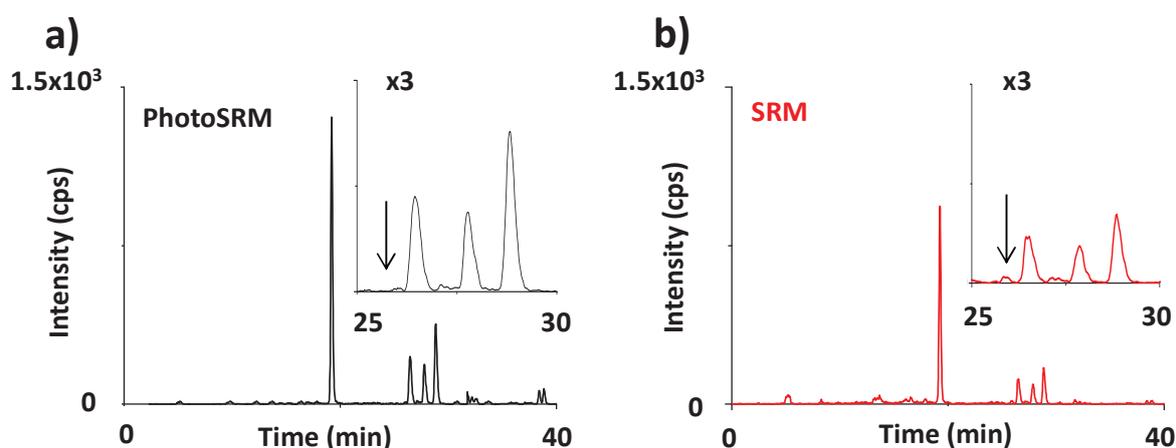


Figure V-15 : chromatogrammes reconstitués de la transitions la plus intense du peptide protéotypique dérivé de la C4b binding protéine utilisée pour l'analyse SRM a) et Photo-SRM b) dans les échantillons blancs (ratio H/R = 0). Les flèches montrent le temps de rétention de la molécule d'intérêt.

Lors de l'analyse de l'échantillon ayant le ratio H/R = 0.02, le peptide est détecté en Photo-SRM au temps de rétention désiré (Figure V-16a) alors que l'analyse SRM ne permet pas la détection de cette molécule (Figure V-16b). Nous voyons donc que la Photo-SRM permet une détection plus spécifique et plus sensible que la SRM classique dans ce cas-ci. L'interférent détecté en SRM lors de l'analyse du ratio H/R = 0.02 a une influence directe sur la droite de calibration du dosage (Figure V-17). En effet, la courbe de calibration obtenue suite à l'analyse SRM de la gamme complète ne passe pas par 0 en ordonnée. Ceci provient de l'interférent détecté dans le blanc (H/R = 0). Contrairement à la SRM, aucun interférent n'a été détecté en Photo-SRM et la droite de calibration passe par 0, la linéarité est donc conservée même pour les plus basses concentrations. Le coefficient directeur de la droite Photo-SRM est donc bien meilleur que celui de la droite SRM. Par ailleurs, dans le cas de la C4b binding protéine, la sensibilité de l'analyse est aussi meilleure en Photo-SRM qu'en SRM, le coefficient directeur de la droite Photo-SRM est supérieur à celui de la droite SRM.

L'étude des données analytiques que sont l'exactitude (concentration expérimentale – concentration théorique/concentration théorique) x100) et les coefficients de variation (CV) calculés suite à l'analyse des triplicats permet de conclure que la méthode dans sa globalité (dérivation, digestion, SPE et analyse LC-MS/MS) est robuste et reproductible (Tableau 10). En effet, les CVs, inférieurs à 20% dans la majorité des cas, et les valeurs d'exactitudes comprises entre 115 et 85 %, sont acceptables si l'on se réfère à la littérature^{221, 230, 231}. A noter aussi que nous n'avons pas utilisé de standards internes permettant d'ajuster les variations dues à la préparation d'échantillon.

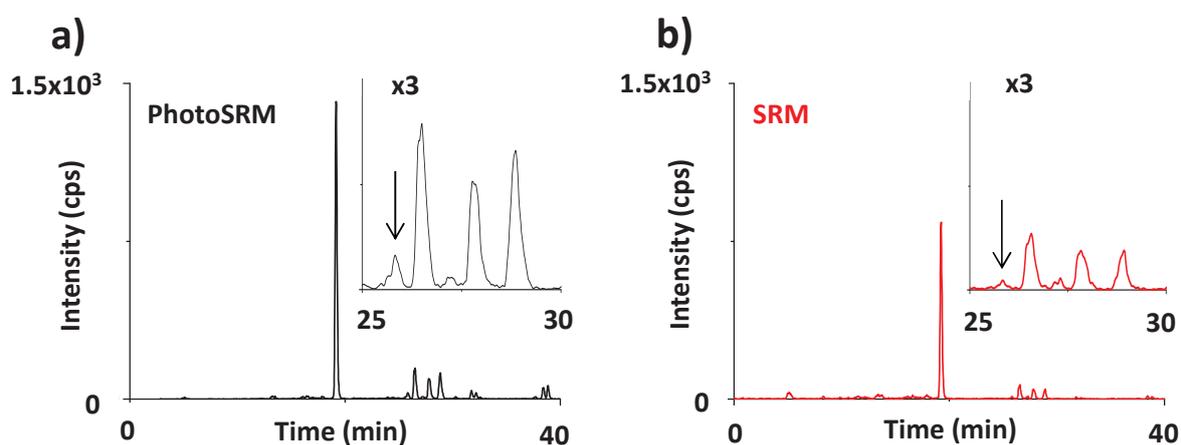


Figure V-16 : chromatogrammes reconstitués de la transition la plus intense du peptide protéotypique dérivé de la C4b binding protéine utilisée pour l'analyse SRM a) et Photo-SRM b) dans les échantillons de plus basse concentration (ratio H/R = 0.02). Les flèches montrent le temps de rétention de la molécule d'intérêt.

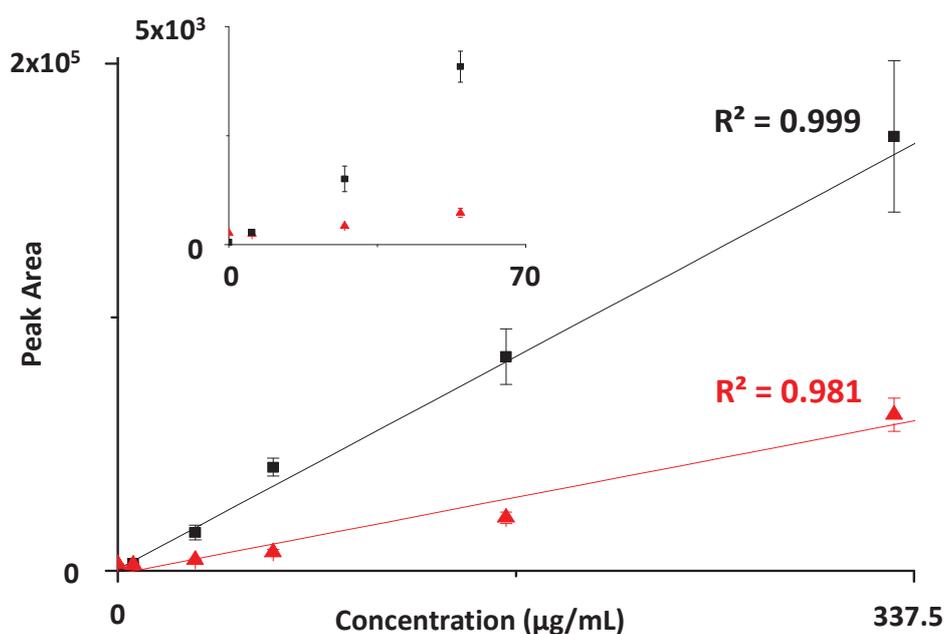


Figure V-17 : droites de calibration obtenues suite à l'analyse complète de la gamme d'étalonnage et de ces triplicats en Photo-SRM (■) et en SRM (▲). L'insert montre les plus faibles concentrations de la gamme.

Afamine			Albumine			C4b binding protéine chaîne alpha		
µg/mL	exactitude	CV	µg/mL	exactitude	CV	µg/mL	exactitude	CV
0	NA	NA	0	NA	NA	0	NA	NA
1.13	NA	NA	410	107	21	3.38	NA	NA
2.25	NA	NA	820	118	6	6.75	82.1	17
11.25	NA	NA	4100	109	6	33.75	95	19
22.5	104	16	8200	112	5	67.5	113	9
56.25	89	13	20500	101	4	168.75	101	14
112.5	102	10	41000	96	12	337.5	105	16
Complément C3			Gelsoline			Plasminogène		
µg/mL	exactitude	CV	µg/mL	exactitude	CV	µg/mL	exactitude	CV
0	NA	NA	0	NA	NA	0	NA	NA
8.25	104	9	32	NA	NA	2.7	NA	NA
16.5	94.5	18	6.4	NA	NA	13.5	NA	NA
82.5	90.4	14	32	NA	NA	27	109	8
165	88.1	10	64	102	15	54	85	21
412.5	110	4	160	99	10	135	107	6
825	113	13	320	100	20	270	98.4	15

Tableau 10 : données analytiques calculées (exactitude : (concentration trouvée/calculée – concentration théorique/concentration théorique) x100 et répétabilité CV) de l'analyse Photo-SRM de la gamme d'étalonnage (ratio H/R) et de ses triplicats pour les peptides à cystéines protéotypiques dérivés.

V.3.7 Conclusion

Durant ces travaux, nous avons étudié la possibilité d'utiliser la Photo-SRM pour la détection spécifique de peptides protéotypiques contenant des cystéines suite au greffage du chromophore DABCYL-maléimide. Cette étude nous a permis de démontrer, que dans certains cas, la Photo-SRM peut être une méthode alternative à la SRM et permet d'améliorer les limites de quantifications et de détections, lors de l'analyse des mêmes peptides dérivés. Cette amélioration provient majoritairement de la diminution générale du nombre d'interférents détectés suite à la dérivation par chromophore et la photo-fragmentation. En effet, la dérivation par chromophore est spécifique des peptides à cystéine, et suite à l'irradiation laser à 473 nm, seuls les peptides dérivés photo-fragmentent. Nous avons également comparé cette technique à la technique de référence, la SRM, appliquée sur les meilleures peptides protéotypiques, c'est-à-dire les peptides ayant les meilleures réponses en spectrométrie de masse (meilleure ionisation, fragmentation ...). Dans ce cas-ci, la Photo-SRM est au moins aussi sensible que la SRM pour la plupart des protéines. Elle permet également d'obtenir une meilleure sensibilité dans certains cas.

Cependant, cette méthode ne permet pas d'améliorer la spécificité et la sensibilité d'analyse de tous les peptides vis-à-vis de la SRM classique comme nous avons pu le voir. La Photo-SRM reste donc une méthode alternative et il semble indispensable de continuer à développer son application pour la quantification de protéines.

V.4 Conclusion générale

Dans ce chapitre, nous avons décrit dans un premier temps la modification d'un nouvel instrument ayant des performances analytiques plus intéressantes que l'instrument utilisé dans le chapitre précédent. Suite à cette modification, nous avons utilisé un nouveau laser, émettant des photons à 473 nm au lieu de 532 nm. Ce nouveau laser possède une énergie supérieure à celui présenté dans la preuve de principe, à 473 nm l'énergie des photons est plus importante qu'à 532 nm. Grâce à cette énergie plus élevée, le rendement de fragmentations obtenu suite à l'irradiation laser du peptide modèle, le peptide IVGGWCECK, est meilleur.

Dans un premier temps, pour pouvoir travailler à 473 nm, nous avons dû changer de chromophore, le chromophore QSY7 a été abandonné au profit du DABCYL-maléimide. Ce chromophore possède un très bon taux de fragmentation suite à l'excitation laser mais n'est pas soluble dans l'eau et très peu soluble dans le méthanol (1.33 mg/mL). Une collaboration avec des chimistes organiciens de l'ENS Lyon a permis la synthèse de différents chromophores ayant pour base le DABCYL. Ces chromophores ont une meilleure solubilité dans l'eau grâce aux différents substituants ajoutés sur le squelette du chromophore. Cependant, suite à la dérivation d'un peptide modèle, tous les chromophores ne permettaient pas d'obtenir de photo-fragmentation après irradiation laser. Un seul chromophore, l'ENS346, photo-fragmente. Ces résultats démontrent, comme dans le chapitre 3, que les propriétés optiques d'un chromophore peuvent être grandement modifiées suite au greffage de celui-ci sur un analyte. Il semble difficile de prévoir, sans analyse au préalable, quel chromophore permettra ou non la photo-fragmentation après irradiation laser. Cette collaboration est actuellement toujours en cours et nous espérons pouvoir développer une large palette de chromophores ayant de forte propriété de transfert d'énergie vers les peptides ainsi qu'une bonne solubilité dans l'eau pour faciliter le greffage et la préparation d'échantillon.

Ensuite, une étude plus poussée que la preuve de concept a permis de mettre en évidence l'apport de la Photo-SRM vis-à-vis de la SRM pour la détection et le dosage de protéine en matrice complexe au travers leurs peptides protéotypiques contenant des cystéines. Dans cette étude-ci, les protéines endogènes ont été dérivées au sein même de l'échantillon puis une comparaison de l'analyse des peptides dérivés par SRM et Photo-SRM a montré que la Photo-SRM permet de diminuer drastiquement le nombre d'interférents détectés grâce à sa spécificité de détection. De plus, une comparaison de la sensibilité absolue de l'analyse Photo-SRM avec l'analyse SRM des meilleurs peptides protéotypiques des mêmes protéines cibles démontre que, dans la majorité des cas, la Photo-SRM donne une sensibilité équivalente ou meilleure.

Ainsi, la Photo-SRM apparaît clairement comme une alternative crédible à la méthode de choix qu'est la SRM. Dans certains cas spécifiques, elle permet d'améliorer considérablement la sensibilité de détection. Par ailleurs, dans la majorité des cas, grâce à sa spécificité de détection, elle diminue fortement le nombre d'interférents détectés. Cela permet donc, dans les matrices très complexes, d'améliorer les limites de détection.

La Photo-SRM, de par sa spécificité de détection peut ouvrir de nouvelles routes d'analyses notamment pour les analyses multiplexées de molécules cibles. Ces analyses multiplexées ne devraient pas se limiter au dosage de biomolécules provenant de la même famille. En effet, de nombreux systèmes biologiques mettent en jeu à la fois des protéines et des métabolites, petites molécules organiques. Bien que le développement d'analyses métabolomiques soit, comme celui des analyses protéomiques, en plein essor, très peu d'analyses multiplexées permettent de détecter et de doser simultanément ces deux grandes familles de biomolécules à intérêt clinique.

Dans le chapitre suivant, nous discuterons de différentes ouvertures et perspectives envisagées pour l'application de la Photo-SRM comme la détection simultanée de métabolites et de protéines dans un même échantillon lors d'une même analyse.

Par ailleurs, afin d'éliminer les interférents lors d'analyses quantitatives en milieu complexe, les constructeurs de spectromètres de masse ont développé des instruments hybrides couplant la sensibilité d'un quadripôle avec la sélectivité en masse d'analyseur à haute résolution tels que les temps de vol (TOF) et les Orbitraps. Il semble donc très intéressant de coupler la haute résolution et la photo-fragmentation pour l'identification et la quantification de biomolécules. Nous allons également discuter d'une modification instrumentale proposant ce couplage dans le chapitre suivant.

**Chapitre VI. Détection simultanée
d'œstrogènes et de
protéines de coagulation
par la combinaison de la
SRM et de la Photo-SRM.**

VI.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons appliqué la Photo-SRM à la détection et au dosage de protéines endogènes²⁴. Cependant, les protéines et les peptides ne sont pas les seuls acteurs du domaine du vivant, d'autres biomolécules, tels que les métabolites, sont aussi impliquées dans ces systèmes biologiques²³²⁻²³⁵. En effet, depuis quelques années de nombreux groupes de recherche se penchent sur la place des métabolites en tant que biomarqueurs. Récemment, une étude montre que la Sarcosine semblerait avoir un rôle prépondérant dans l'évolution du cancer de la prostate²³⁶. Il apparaît donc très intéressant de pouvoir détecter et doser en parallèle des métabolites et des protéines interagissant sur une même pathologie.

Depuis fin 2012-début 2013, un problème de santé publique a éclaté en France soulignant le lien entre les pilules de troisième génération et des maladies cardiovasculaires. Les contraceptifs par prise orale, comme les pilules, sont apparus dans les années 1950 et sont depuis, devenues les contraceptifs hormonaux les plus répandus. Cependant, de nombreux problèmes sont constatés depuis quelques années et un lien étroit entre l'utilisation de pilules contraceptives et l'augmentation des thromboses a été souligné^{27, 237, 238}. Les pilules mises en avant sont celles de troisième génération et sont composées d'œstrogènes de type éthinyl œstradiol. Plusieurs études démontrent que la prise d'œstrogènes en tant que contraceptifs augmente le risque, chez la patiente, de faire une thrombose de par son impact direct sur la variation de concentration de protéines étant des facteurs coagulants^{25, 26}. Il paraîtrait donc intéressant de pouvoir doser lors d'une même méthode analytique les métabolites que sont les œstrogènes ainsi que les protéines responsables de la coagulation.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) est depuis de nombreuses années une méthode de choix pour le dosage d'hormone dans les matrices simples, comme l'eau²³⁹⁻²⁴¹, ou les matrices complexes que sont l'urine²⁴² et le plasma²⁴³⁻²⁴⁵. Ces méthodes utilisent généralement le mode SRM d'un triple quadripôle ainsi que la dérivation chimique afin d'améliorer l'ionisation et la sensibilité de détection de ces composés^{240, 246}. Par ailleurs, les œstrogènes, sous forme native, ne se fragmentent pas facilement à cause de leur structure rigide, la dérivation chimique permet d'ouvrir de nouveaux canaux de fragmentation et donc de faciliter l'approche SRM. Cependant, afin d'atteindre de très faibles limites de détection (LDD) dans le plasma, de l'ordre de 10 pg/mL, il est indispensable de développer une préparation d'échantillon permettant de simplifier la matrice. L'extraction liquide/liquide, l'extraction solide/liquide (SPE) et la précipitation de protéines sont les méthodes de choix lors de cette étape de purification^{247, 248}. Cette préparation d'échantillon n'est donc pas en accord avec un dosage simultané de métabolites et de protéines. Pour réaliser un tel dosage, il semble donc indispensable d'avoir une méthode LC-MS/MS assez spécifique pour séparer et détecter ces deux types de biomolécules provenant du même échantillon mais ayant des propriétés physico-chimiques très différentes.

Nous nous sommes donc intéressés à l'utilisation de la Photo-SRM pour réaliser cette détection simultanée. Les œstrogènes étant déjà dérivés lors des dosages usuels, cette dérivation va permettre d'induire les propriétés optiques suffisantes à ces métabolites pour être fragmentés suite à l'irradiation laser. Cette dérivation va permettre d'augmenter l'hydrophobicité des molécules et donc de les séparer des peptides par chromatographie. Afin de ne pas augmenter l'hydrophobicité des peptides protéotypiques, ceux-ci seront détectés de manière classique en SRM.

Dans un premier temps, nous allons montrer que la Photo-SRM peut être utilisée pour le dosage de métabolite au même titre que la SRM lors d'une préparation classique d'échantillon par précipitation de protéines. Puis, dans un second temps, nous étudierons la possibilité de coupler la SRM et la Photo-SRM pour la détection simultanée d'œstrogènes et de peptides protéotypiques des protéines de coagulation que sont l'Héparine cofacteur B et le facteur de coagulation XIIa HC.

VI.2 Expériences

VI.2.1 Produits chimiques et biologiques

L'acétonitrile (ACN), le méthanol (MeOH) et l'eau (tous qualité LC-MS) ont été achetés chez Fisher Scientific (Strasbourg, France). Le dithiothreitol (DTT), l'iodoacétamide (IAM), l'acide formique (AF), la trypsine (type IX-S provenant du pancréas du porc), le bicarbonate d'ammonium (AMBIC), le tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), le bicarbonate de sodium (NaHCO_3) et l'hydroxyde de sodium (NaOH) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Le chlorure de DABSYL a été acheté chez Anaspec (Fremont, CA). Le plasma humain a été obtenu chez l'établissement Français du sang. Les standards marqués œstradiol-d2 (E2D2) et éthinyl œstradiol-d4 (EE2D4) ont été achetés chez CDN isotopes (Pointe-Claire, Canada).

VI.2.2 Préparation des échantillons

Avant toute préparation d'échantillon, une gamme de concentration allant de 0 à 20 000 pg/mL (0, 200, 500, 2 000, 5 000, 10 000 et 20 000) d'œstrogènes standards marqués est réalisée dans une solution tamponnée au bicarbonate de sodium (pH = 10, ajusté avec NaOH).

Pour l'analyse des œstrogènes suite à la précipitation des protéines, 10 μL de chaque solution de standard sont ajoutés dans 90 μL de plasma humain afin d'obtenir des concentrations de 0, 20, 50, 200, 500 et 2 000 pg/mL d'œstrogènes dans du plasma. 900 μL d'ACN sont ajoutés pour faire précipiter les protéines. Les échantillons sont centrifugés (10 min, 15 000 tours/min à température ambiante) puis 900 μL de la phase liquide supérieure sont prélevés et concentrés à sec sous flux gazeux d'azote. Le résidu de chaque tube est repris dans 70 μL de tampon bicarbonate de sodium (pH = 10, ajusté avec NaOH). La mixture est homogénéisée par agitation. Enfin, 30 μL de dansyl chloride (1mg/mL dans l'acétone) sont ajoutés. La solution est homogénéisée sous agitation puis placée à 60 °C durant 10 min. Les échantillons sont conservés à 4°C avant toute analyse. Des triplicats de chaque échantillon ont été réalisés suivant le même protocole.

Pour l'analyse simultanée, 10 μL de chaque solution standard sont ajoutés à 90 μL de plasma pour obtenir des concentrations de 0, 20, 50, 200, 500, 1 000 et 2 000 pg/mL d'œstrogènes dans du plasma. Afin de réduire/alkyler les protéines ainsi que dériver les œstrogènes, les échantillons sont dénaturés avec de l'urée 8 M (pH = 10). 55 μL de DTT (150 mM) et 100 μL de chlorure de dansyl (1 mg/mL dans l'acétone) sont ajoutés à chaque échantillon, puis les solutions sont placées à 60 °C durant 40 min. Les échantillons sont ensuite refroidis jusqu'à température ambiante puis 170 μL d'IAM (150 mM) sont ajoutés, les échantillons sont placés dans le noir à température ambiante durant 40 min. Pour réduire la concentration d'urée et éviter la dénaturation de la trypsine, chaque solution est diluée dans de l'AMBIC (50 mM) avant l'ajout de trypsine (ratio poids enzyme/substrat ; 1 : 30). Les échantillons sont placés à 37 °C durant la nuit. Chaque échantillon est ensuite dessalé et

reconcentré sur cartouche HLB 3 cc phase inverse (60 mg, Waters). Avant l'ajout de l'échantillon sur la cartouche, chaque cartouche est conditionnée avec 1 mL de MeOH puis 1 mL d'eau acidifiée (0.5% AF). Une fois l'échantillon chargé sur la colonne, celle-ci est lavée avec 1 mL d'eau/MeOH (95/5 ; v/v +0.5% AF) puis éluée avec 2 mL d'ACN acidifié (0.5 % AF). Les échantillons collectés sont ensuite reconcentrés sous azote puis repris dans 100 µL de tampon bicarbonate de sodium (pH = 10, ajusté avec NaOH). Les échantillons sont conservés à 4°C avant toute analyse.

VI.2.3 Séparation HPLC

Lors de ces expériences, toutes les séparations chromatographiques ont été réalisées avec une colonne X-Bridge C₈ (100 X 2.1 mm, 3.5µm) de chez Waters et la phase mobile était composée d'eau acidifiée à 0,1 % avec de l'AF pour l'éluant A et d'ACN acidifié avec de l'AF pour l'éluant B. Lors de l'analyse des œstrogènes dans le plasma précipité, l'éluant isocratique (5 % de A) a été réalisée avec un débit de 300 µL/min sur un temps d'analyse de 5 min (Figure VI-1a).

Lors de l'analyse simultanée des œstrogènes et des protéines, l'éluant a été réalisée avec un débit de 300 µL/min sur un temps de 16 min. L'éluant débute par un plateau de 95 % d'éluant A pendant 2 min suivi d'un gradient linéaire allant de 95 % à 70 % en éluant A sur 6 min. Un plateau de lavage à 0 % d'éluant A est réalisé sur 4 min avant un retour aux conditions initiales pour 4 min (Figure VI-1b).

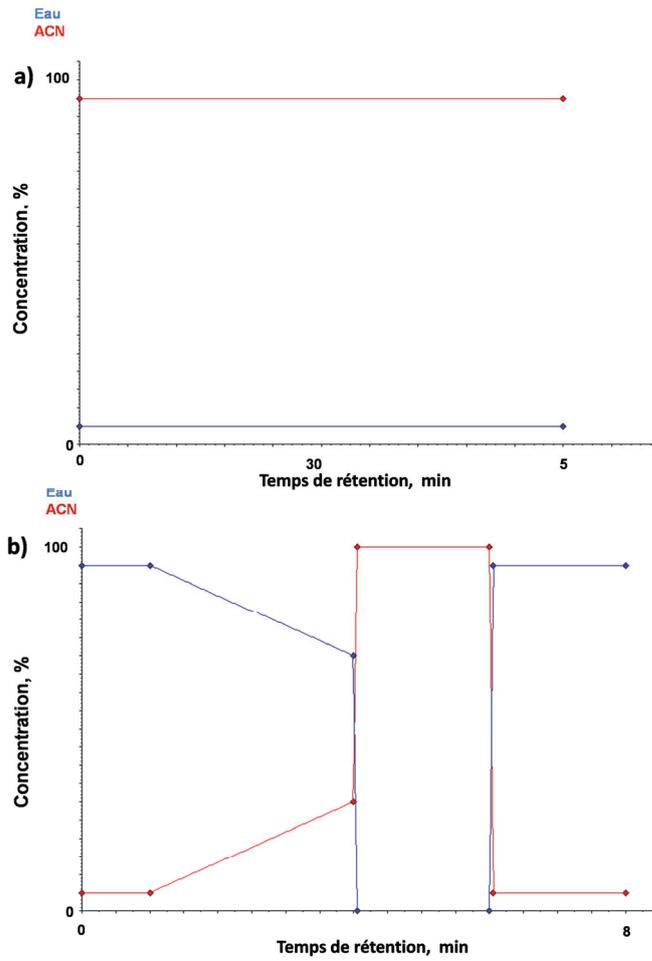


Figure VI-1 : gradients chromatographiques pour l'analyse des œstrogènes seuls après déplétion du plasma a) et pour l'analyse simultanée des peptides protéotypiques de protéines de coagulation avec les œstrogènes b).

VI.2.4 Paramètres de source et d'analyse sur le spectromètre de masse.

Les analyses SRM et Photo-SRM ont été réalisées sur l'API 4 000 Q-trap couplé au laser continu monochromatique émettant des photons à 473nm présenté dans le chapitre précédent.

Pour les analyses SRM et Photo-SRM des œstrogènes suite à la précipitation des protéines, les conditions d'ionisations ont été optimisées afin d'avoir le meilleur signal possible. L'ionisation des molécules par électrospray est réalisée en mode positif avec une tension de spray de 5 500 volts. Les débits des gaz rideau (azote), gaz sources 1 et 2 (air) ont été respectivement réglés à 15, 50 et 20 unités arbitraires. La température de la source a été ajustée à 450°C. La résolution des quadripôles Q1 et Q3 a été réglée à 1.1 ± 0.1 uma. Pour les analyses par CID, l'énergie du gaz de collision a été réglée à 40 eV. Afin d'éviter toute fragmentation par gaz, en mode Photo-SRM, l'énergie de collision a été baissée au minimum, 5 eV. La puissance du laser (500 mW) a été ajustée à 450 mW de manière à obtenir le meilleur rendement de fragmentation possible.

Lors de l'analyse simultanée des œstrogènes et des protéines, deux périodes distinctes ont été réalisées. La première période de 0 à 8 min est développée pour analyser les protéines par leurs peptides protéotypiques. Les conditions suivantes ont été choisies de manière à obtenir un signal maximal. L'ionisation des molécules par électrospray est réalisée en mode positif avec une tension de spray de 5 500 volts. Les débits des gaz rideau (azote), gaz sources 1 et 2 (air) ont été respectivement réglés à 50, 50 et 40 unités arbitraires. La température de la source a été ajustée à 450°C. La résolution des quadripôles Q1 et Q3 a été ajustée à 0.7 ± 0.1 uma. La seconde période d'analyse allant de 8 à 16 min, permet l'analyse SRM ou Photo-SRM des œstrogènes dérivés. Pour cette période, les mêmes paramètres de spectrométrie de masse que ceux décrits précédemment pour l'analyse des œstrogènes suite à la précipitation des protéines sont utilisés.

VI.3 Résultats

VI.3.1 Comparaison SRM/Photo-SRM pour le dosage d'œstrogènes après précipitation des protéines.

Afin de doser les œstrogènes par Photo-SRM, il est indispensable de travailler avec un chromophore qui photo-fragmente après irradiation laser à 473 nm. Un dérivé du DABCYL maléimide précédemment utilisé, le chlorure de dabsyl, a déjà été utilisé pour la dérivation des œstrogènes en tant que substitut du chlorure de dansyl²⁴⁹. La réaction chimique permettant de coupler un composé chloré, tel que le chlorure de dabsyl, avec une fonction phénol, présente sur les œstrogènes d'intérêt, est une substitution nucléophile. Dans certaines conditions de pH particulières, cette réaction est spécifique des fonctions phénols vis-à-vis des fonctions hydroxyles, fonction alcool, non aromatique. En effet, le pKa d'un phénol est de l'ordre de 8-10 alors que celui d'un alcool non aromatique est de 15-16.

Après dérivation, l'irradiation laser à 473 nm d'un œstrogène, ici l'œstradiol, engendre un ion fragment majoritaire à m/z 225, résultant d'une fragmentation intra-chromophore (Figure VI-2).

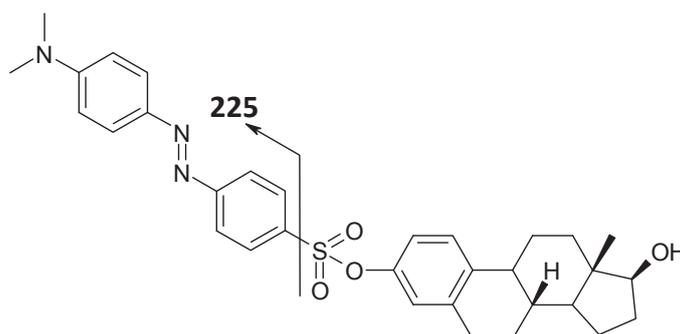


Figure VI-2 : structure chimique de l'œstradiol dérivé avec le chromophore dabsyl. L'ion fragment majoritaire à m/z 225 résultant de la photo-fragmentation à 473 nm est présenté.

Ainsi, avant de réaliser une détection simultanée d'œstrogènes et de peptides protéotypiques des protéines de coagulation, il est essentiel de montrer que la Photo-SRM peut s'appliquer à un dosage classique de d'œstrogènes. Une gamme de concentration en œstrogènes ajoutés dans du plasma allant de 0 à 2 000 pg/mL est donc analysée à la fois en SRM et en Photo-SRM.

Afin d'obtenir des valeurs de limites de détection (LDD) et de quantification (LDQ) faibles, il est nécessaire de purifier l'échantillon et de supprimer les protéines du plasma. Les protéines n'étant pas solubles dans l'ACN, un ajout de ce solvant engendre la précipitation des biomolécules non

solubles. Suite à cette précipitation et à la dérivation chimique avec le chromophore, les analyses SRM et Photo-SRM sont réalisées.

La Figure VI-3 présente les chromatogrammes enregistrés suite aux analyses SRM et Photo-SRM de l'œstradiol (Figure VI-3a)) et de l'éthinyl œstradiol (Figure VI-3b)) après précipitation des protéines du plasma. Nous pouvons noter qu'il n'y a que très peu d'interférents présents dans chaque analyse, la précipitation des protéines permet donc de purifier l'échantillon et de descendre à des LDQ de 20 pg/mL pour l'œstradiol et 50 pg/mL pour l'éthinyl œstradiol. Dans ce cas-ci, la Photo-SRM n'apporte pas un gain vis-à-vis de la SRM. Seul le signal détecté pour l'éthinyl œstradiol est sensiblement supérieur en Photo-SRM comparé à celui détecté en SRM.

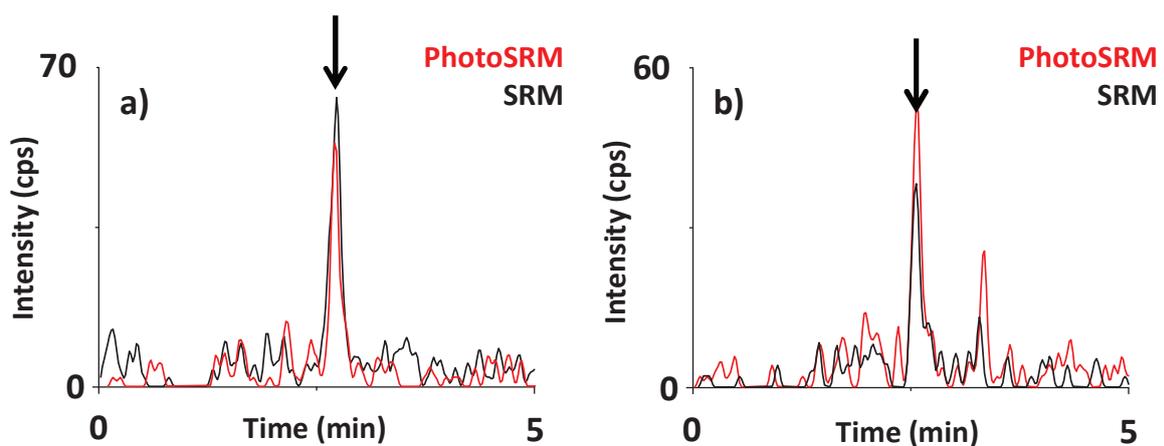


Figure VI-3 : chromatogrammes reconstitués LC-MS/MS suivant la meilleure transition SRM de chaque œstrogène (E2D2 562.5/225.0, a) et EE2D4 588.5/225.0, b)) en SRM (noir) et Photo-SRM (rouge).

Par ailleurs, lors du développement de la méthode, il est important de vérifier que la précipitation des protéines n'induit pas l'élimination fortuite d'une quantité non négligeable d'œstrogènes. Pour cela, trois échantillons sont préparés en ajoutant les œstrogènes dans le plasma avant précipitation et trois autres le sont en ajoutant les œstrogènes après précipitation. Comme le montre la Figure VI-4, les ratios du signal moyen détecté *ajout avant précipitation/ajout après précipitation* sont supérieurs à 92 % pour les deux œstrogènes. La quantification ne sera donc pas biaisée par la précipitation des protéines.

Afin de valider le protocole de précipitation, des triplicats de chaque concentration sont réalisés sur l'ensemble de la gamme d'étalonnage. Les droites de calibrations obtenues suite aux analyses SRM et Photo-SRM montrent que la méthode est robuste et répétable (Figure VI-5). La linéarité est maintenue même pour les plus faibles concentrations pour les deux méthodes.

L'analyse des triplicats donne des valeurs de coefficients de variation (CV) acceptables pour l'ensemble de la gamme de concentration (Tableau 11). Ces CVs montrent que l'ensemble de l'analyse (protocole de précipitation, dérivation et analyse LC-MS/MS) est répétable et robuste.

Ainsi, en matrice simple, comme un surnageant de plasma suite à la précipitation de protéine, la Photo-SRM n'apporte pas de réelle amélioration comparée à la SRM. Nous souhaitons discuter maintenant, de son apport potentiel pour la détection simultanée de peptides et de métabolites lors de l'analyse d'un digeste de plasma.

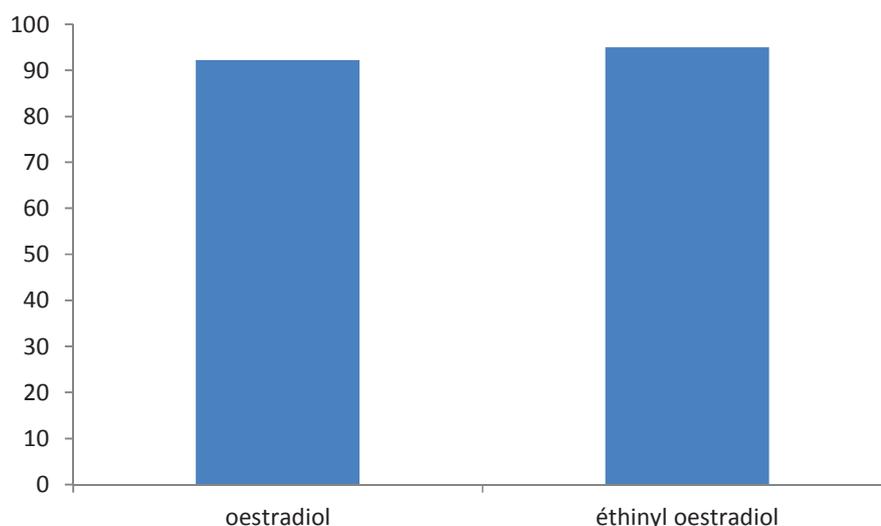


Figure VI-4 : ratios, en pourcentage, du signal détecté *ajout avant précipitation/ajout après précipitation* pour les deux œstrogènes.

Photo-SRM				SRM			
œstradiol		éthinyloestradiol		œstradiol		éthinyloestradiol	
Concentrations pg/mL	CV	Concentrations pg/mL	CV	Concentrations pg/mL	CV	Concentrations pg/mL	CV
0	25	0	32	0	24	0	32
20	16	20	22	20	14	20	10
50	5	50	11	50	11	50	15
200	10	200	13	200	13	200	14
500	10	500	2	500	5	500	6
2000	4	2000	3	2000	8	2000	9

Tableau 11 : coefficients de variations calculés suite aux analyses Photo-SRM et SRM des triplicats.

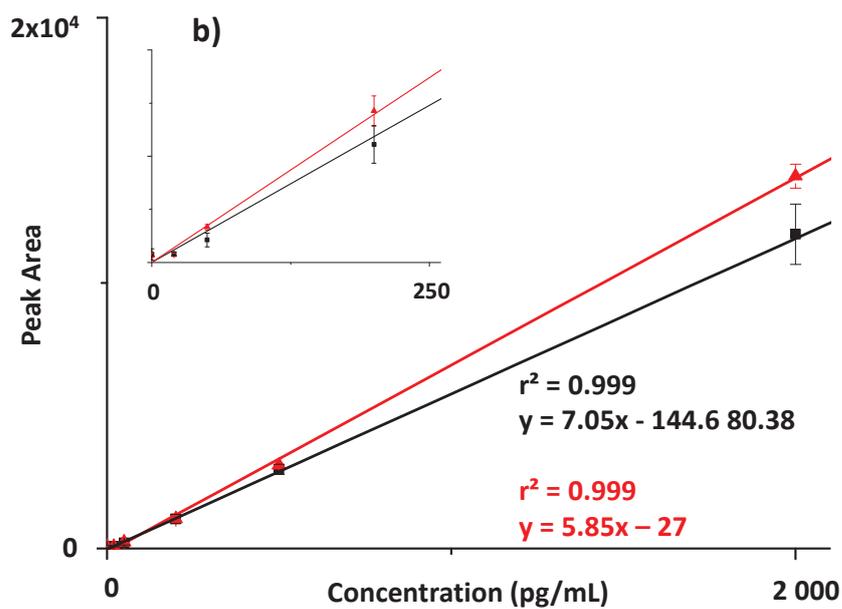
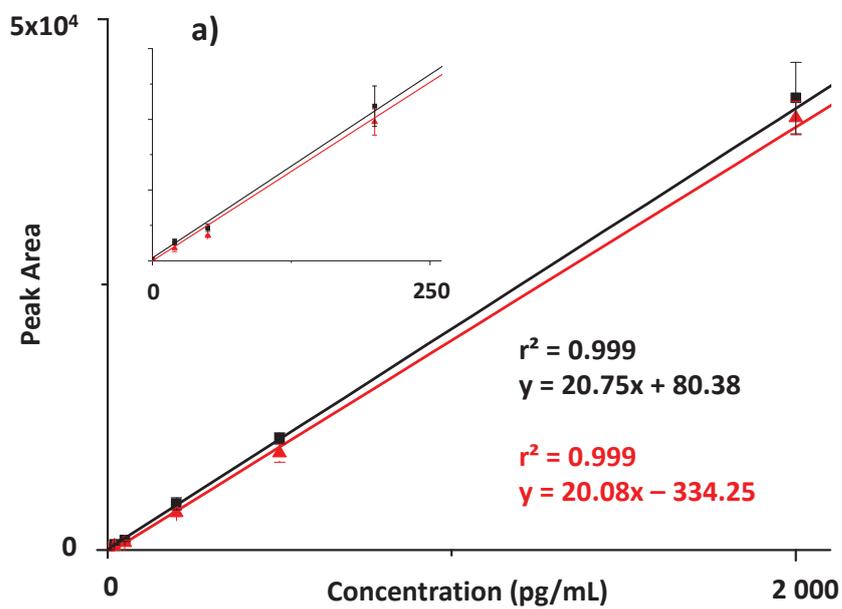


Figure VI-5 : droites de calibrations SRM (■) et Photo-SRM (▲) obtenues suite à l'analyse de l'œstradiol et de l'éthinyl œstradiol. Les inserts montrent les faibles concentrations (0-250 pg/mL).

VI.3.2 Analyse simultanée de métabolites et de peptides.

Après avoir montré que la Photo-SRM pouvait s'appliquer au dosage de métabolite, nous souhaitons étudier l'apport de la Photo-SRM pour la détection simultanée de métabolites et de peptides protéotypiques. Pour que toutes les molécules cibles soient détectées lors de la même analyse, il est nécessaire de réaliser une préparation d'échantillon spécifique. Premièrement, la précipitation des protéines est remplacée par une digestion enzymatique. Puis, parce que les œstrogènes non dérivés ne sont pas retenus sur cartouche HLB, la dérivation chimique est réalisée en même temps que la digestion avant purification. Suite à la purification par HLB, les peptides et les œstrogènes dérivés se retrouvent donc tous dans le même échantillon.

Pour cette analyse simultanée, la méthode LC-MS/MS est segmentée en deux périodes de temps identiques. La première période permet l'analyse SRM des peptides protéotypiques des protéines coagulantes. La méthode SRM s'appuie très largement sur les données décrites dans la publication de Hortin et al. pour la détection des protéines majoritaires du plasma dont font parties de l'héparine cofacteur et du facteur de coagulation XIIa HC ²²³. Les deux peptides cibles (protéotypiques de l'héparine cofacteur B et du facteur de coagulation XIIa HC) sont détectés dans une gamme de gradient chromatographique à faible taux d'ACN (moins de 30 %).

Protéine	Séquence	Q1	Q3	Energie de collision (Volts)	Aire du pic (coups)	Hauteur du pic (coups par seconde)	Temps de rétention (min)
Facteur de coagulation XIIa HC	VVGGLVALR	442,3	685,4	21	6.69E+04	6.12E+03	7.1
Héparine cofacteur B	TLEAQLTPR	514,8	814,4	25	4.35E+03	4.50E+02	6.5

Tableau 12 présente les données SRM de l'analyse des peptides protéotypiques alors que la Figure VI-6 montre les spectres de masse MS/MS permettant l'identification de ces mêmes peptides protéotypiques.

Protéine	Séquence	Q1	Q3	Energie de collision (Volts)	Aire du pic (coups)	Hauteur du pic (coups par seconde)	Temps de rétention (min)
Facteur de coagulation XIIa HC	VVGGLVALR	442,3	685,4	21	6.69E+04	6.12E+03	7.1
Héparine cofacteur B	TLEAQLTPR	514,8	814,4	25	4.35E+03	4.50E+02	6.5

Tableau 12 : données d'analyses SRM pour les protéines impliquées dans la coagulation analysées.

La deuxième période de la méthode correspond à l'analyse SRM ou Photo-SRM des œstrogènes. Dans ce cas-ci, nous allons discuter de l'analyse de l'éthinyl œstradiol seulement. En effet, il s'agit du composé chimique présent dans les pilules de troisième génération ayant un lien direct avec la coagulation. La Figure VI-7 montre les chromatogrammes reconstitués des analyses simultanées SRM/SRM et SRM/Photo-SRM des peptides et des métabolites. Comme nous pouvons le remarquer, lors de l'analyse SRM/SRM, d'importants interférents sont détectés entre 8 et 12 min et ne permettent pas une identification claire de la molécule cible qu'est l'éthinyl œstradiol. Ces interférents sont très certainement des peptides, provenant des protéines majoritaires du plasma, toujours présents dans l'échantillon contrairement à l'analyse précédente des œstrogènes pour laquelle les protéines avaient été précipitées. En SRM/Photo-SRM, nous voyons que ces interférents sont moindres, il est donc plus facile de détecter et d'identifier l'éthinyl œstradiol. On retrouve donc une meilleure spécificité de détection apportée par la photo-fragmentation vis-à-vis de la fragmentation par CID.

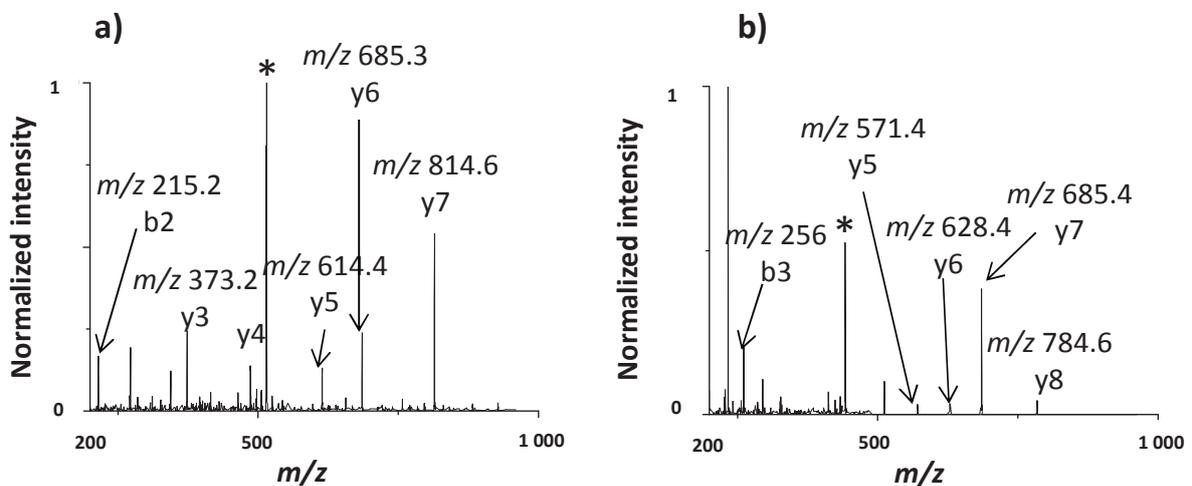


Figure VI-6 : spectres de masse MS/MS pour l'identification des peptides protéotypiques de Héparine cofacteur B, TLEAQLTPR a) et du facteur de coagulation XIIIa HC, VVGGLVALR b).

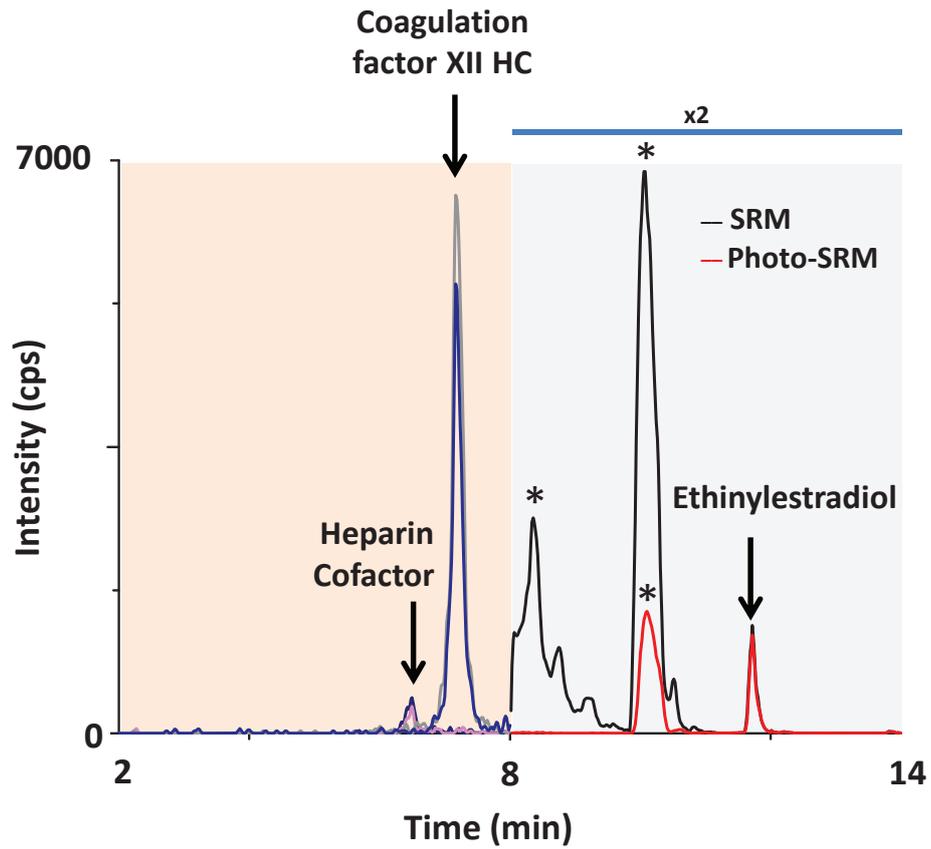


Figure VI-7 : chromatogrammes LC-MS/MS reconstitués des transitions les plus intenses des peptides protéotypiques des protéines d'intérêts et de l'éthinyl œstradiol. De 0 à 8 min, analyse SRM des peptides de l'Héparine cofacteur (temps de rétention 6.5 min) et du facteur de coagulation XIIa HC (temps de rétention 7.1 min). De 8 à 16 min, analyse SRM (noir) et Photo-SRM (rouge) de l'éthinyl œstradiol ajouté dans le plasma à 500 pg/mL. Les astérisques montrent les interférents détectés.

VI.4 Conclusion et perspectives

Lors de ce chapitre, nous avons montré que la Photo-SRM pouvait être appliquée au dosage de métabolites tels que les oestrogènes dans des matrices purifiées. Dans ce cas-ci, la Photo-SRM n'apporte aucune augmentation de sensibilité notable mais aucune perte n'est non plus observée. En matrice simplifiée, très peu d'interférents sont détectés, dans notre cas aucun, donc le filtre apporté par la photo-fragmentation n'est pas utile.

Cependant, dans l'optique de réaliser une détection ou un dosage simultané de biomolécules de familles différentes tels que les oestrogènes et les protéines, la combinaison de la Photo-SRM et de la SRM peut ouvrir de nouvelles perspectives. Ces deux familles de biomolécules interagissent toutes les deux dans les systèmes biologiques et sont reconnues comme des biomarqueurs. Actuellement, aucune technique ne permet d'être assez sensible pour détecter à la fois ces deux types de molécules. Dans le cas présenté ici, la dérivation d'un seul type de composé permet une très bonne séparation chromatographique des deux familles de biomolécules. Les métabolites dérivés possèdent une hydrophobicité telle que leur affinité avec une colonne C_{18} est importante. Ainsi, les deux familles de biomolécules sortent dans des plages de temps bien distinctes. L'effet matrice généré par les peptides et problématique pour le dosage simultané est alors diminué. De plus, dans le cas où certaines biomolécules de l'échantillon seraient elles aussi hydrophobes, la Photo-SRM va ajouter une dimension de sélectivité supplémentaire en ne fragmentant que les composés dérivés. La photo-fragmentation permet donc de diminuer le nombre d'interférents détectés lors de l'analyse.

Les perspectives de cette étude préliminaires sont donc de réaliser un dosage réel de ces deux types de biomolécules chez des patients sains et malades. Pour cela, il est tout à fait envisageable de dériver sélectivement soit les métabolites, soit les protéines, ou soit les deux avec deux chromophores différents, et du coup séparer ces composés lors de l'élution chromatographique. La photo-fragmentation permettra alors de ne fragmenter que les molécules cibles, aussi faiblement concentrées soient-elles, afin de ne détecter que celles-ci.

**Chapitre VII. Perspectives : couplage
haute
résolution/fragmentation
laser.**

VII.1 Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons appliqué la Photo-SRM à la détection et au dosage de protéines endogènes²⁴ et à la détection simultanée de protéines et de métabolites dans un même échantillon. Toutes ces expériences ont été réalisées sur un triple quadripôle.

Cependant, bien que les triples quadripôles soient les instruments de prédilection pour le dosage de protéines et de métabolites,^{208, 250}, d'autres instruments peuvent être utilisés pour de telles applications. Ces instruments sont généralement hybrides et combinent différents types d'analyseurs comme un analyseur à quadripôle (Q) avec un piège à ion, un analyseur à temps de vol (TOF) ou un Orbitrap. Le but de ces spectromètres de masse est de combiner les forces de chacun des analyseurs en évitant leurs faiblesses respectives. Le nom résultant de l'instrument hybride traduit généralement l'ordre dans lequel les ions parcourent les analyseurs; exemple, un Q-TOF est constitué d'un premier analyseur quadripolaire suivi d'un analyseur à temps de vol⁶¹.

Depuis l'avènement de nouveaux instruments hybrides couplant la sélection d'un analyseur quadripolaire avec la haute résolution d'analyseurs tels que les temps de vol (TOF), avec le triple TOF d'ABSciex, ou les Orbitrap, avec le Q-exactive de Thermo, la quantification de protéines ciblées en spectrométrie de masse ne semble plus être réservée à la seule utilisation des triples quadripôles.

Par ailleurs, bien que la quantification de protéines par *shotgun*, sur les instruments de type quadripôle-temps de vol (Q-TOF) soit déjà très utilisée^{5, 251-253} grâce à sa capacité à analyser beaucoup de protéines dans la même analyse, cette méthode souffre de problèmes de sensibilité et de spécificité pour la quantification en matrice très complexe. Pour pallier ces limites, de nouveaux outils analytiques sont développés sur les dernières générations d'instruments hybrides avec par exemple l'analyse SWATH sur le 5600 triple-TOF de chez AB Sciex développée en partenariat avec le groupe d'Aebersold²⁵⁴ ou le mode PRM (*Parallel Reaction Monitoring*) développé sur le Q-exactive de chez Thermo par les équipes de Coon²⁸ et de Domon²⁹. Ces deux modes d'analyses se rapprochent fortement des performances de sensibilités obtenues suite aux analyses quantitatives avec un triple quadripôle de dernière génération.

Par ailleurs, ces instruments sont également développés pour travailler en découverte protéomique^{208, 250, 255, 256}. La découverte protéomique est l'identification de protéines d'intérêts en amont du dosage. Classiquement, des échantillons de patients malades et de patients sains sont analysés. Un très grand nombre de protéines sont alors détectées et identifiées, grâce aux bases de données, puis quantifiées de manière relative vis-à-vis de l'autre échantillon. Les protéines ayant des concentrations très différentes chez les patients malades par rapport aux concentrations détectées chez les patients sains sont définies comme potentiels biomarqueurs. Bien que ce type d'approche soit extrêmement développé depuis plusieurs années, aucun nouveau biomarqueur approuvé par la

FDA n'a été découvert grâce à cette technique. Les différentes techniques souffrent encore d'un manque de sensibilité des instruments.

Ainsi, l'idée de coupler la haute résolution et la spécificité de fragmentation par LID (*Laser Induced Dissociation*) pour l'analyse protéomique apparaît comme un nouvel axe de recherche. L'implémentation de laser dans un spectromètre de masse ayant un analyseur Orbitrap a déjà été réalisé dans un Orbitrap de type LTQ-Velos/Orbitrap par le groupe de Jennifer Brodbelt²⁵⁷. Le laser de type infra-rouge (IRMPD) est injecté dans la cellule de collision à haute énergie (*HCD cell*). Ce couplage a permis la caractérisation de phosphopeptides et de modifications post-traductionnelles.

Dans ce chapitre, nous nous sommes donc intéressés à l'implémentation de la photo-fragmentation dans l'instrument hybride qu'est le Q-exactive.

Dans un premier temps, nous discuterons de la modification instrumentale, puis nous verrons en quoi la haute résolution, grâce à la mesure de la masse exacte, peut apporter des réponses en découverte ou quantification protéomique au travers de premières expériences.

VII.2 Fonctionnement d'un Q-exactive.

VII.2.1 Fonctionnement d'une Orbitrap.

Cet analyseur, aussi appelé piège électrostatique, est basé sur un concept développé par Alexander Makarov et décrit dès le début des années 2000^{258, 259}.

La Figure VII-1 montre une vue coupée de l'Orbitrap. La partie extérieure est une électrode en forme de fuseau creux coupé en deux parties égales séparées par un interstice. Une deuxième électrode, en forme de fuseau, se trouve à l'intérieur. Les ions sont injectés tangentiellement à l'électrode interne, l'électrode interne étant sur l'axe z. Une fois les ions injectés dans le piège, des tensions continues sont appliquées aux deux électrodes et les ions se mettent à osciller suivant des spirales entremêlées autour de l'électrode centrale sous l'effet de ces tensions continues et de la géométrie particulière de ce piège⁶¹. Les oscillations axiales des ions dans la direction Z se font à une fréquence définie par l'équation suivante :

$$\omega = \sqrt{(z/m)k} \quad \text{Équation 19}$$

Avec ω la fréquence d'oscillation, z la charge, m la masse de l'ion et k une constante dont la valeur reflète la courbure du champ. Cette équation montre que la fréquence est liée uniquement au rapport m/z .

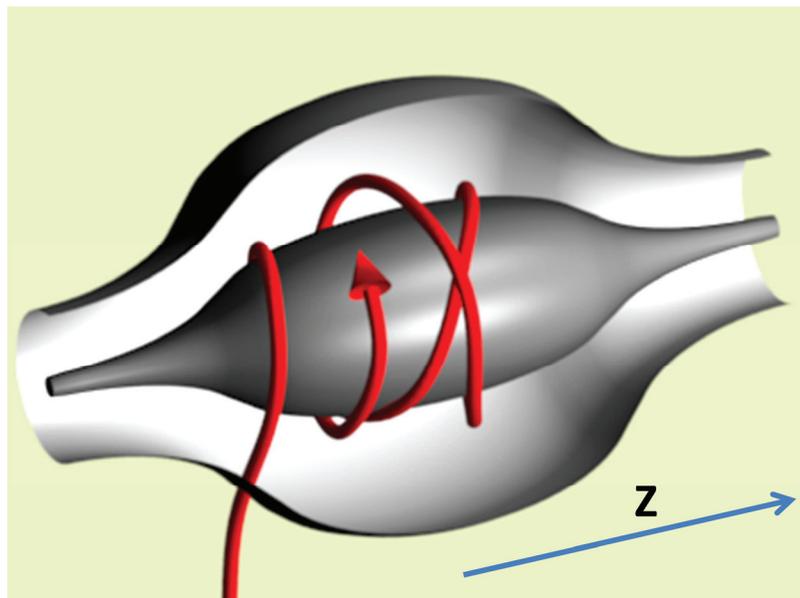


Figure VII-1 : schéma d'une orbitrap. Une électrode extérieure en forme de tonneau est coupé en deux parties égales séparées par un interstice. A l'intérieur se trouve une deuxième électrode en forme de fuseau.

La mesure m/z des ions présents dans le piège est donc directement reliée à la fréquence des oscillations axiales des ions et ne dépend pas de l'énergie cinétique d'injection des ions. Ceci est une particularité importante de l'Orbitrap. Le courant induit par les oscillations est mesuré de manière différentielle entre les deux moitiés de l'électrode externe, amplifié et converti par transformée de Fourier en fréquence. Les masses et les intensités des ions en découlent, produisant ainsi le spectre de masse de la solution analysée. Ce piège électrostatique est peu sensible aux effets de charge dans l'espace, ce qui permet d'analyser une grande quantité d'ions en même temps. Ainsi, plus les ions sont piégés longtemps dans l'Orbitrap, plus la mesure de la fréquence des oscillations est précise, ceci engendre donc une meilleure mesure du rapport m/z des ions, une mesure à très haute résolution.

Ce type d'analyseur est commercialisé chez Thermo depuis le milieu des années 2000 et est très utilisé pour l'analyse protéomique. Afin d'implanter cet analyseur dans le domaine de la quantification de protéine, il est nécessaire de réaliser une première sélection en masse avant de fragmenter les ions et enfin analyser les fragments avec une haute résolution. Un instrument hybride couplant un quadripôle et une orbitrap a donc été développé, il s'agit du Q-exactive.

VII.2.2 Principe du Q-exactive.

Le Q-exactive est un instrument hybride associant une sélection en amont de l'ion précurseur grâce à un quadripôle avec la détection Orbitrap à haute résolution. La Figure VII-2 présente un schéma de l'instrument. Lors d'une analyse, les molécules sont ionisées par une source électrospray puis guidées par un système de lentilles et d'optique, dont le *bent flatapole*, quadripôle de guidage coudé permettant la suppression des molécules neutres. Une sélection en masse est réalisée grâce au quadripôle en ne laissant passer que les ions d'intérêts. Ils sont ensuite transférés dans la *C-trap*. La *C-trap* a deux grandes fonctions, la première est de réaliser des paquets d'ions suite à la sélection du quadripôle, la deuxième est de servir de plate-forme afin d'envoyer les ions soit dans la cellule HCD (*high collision dissociation*) soit dans l'Orbitrap. Si les ions sont envoyés directement dans l'Orbitrap, ils ne sont pas fragmentés et le spectre de masse résultant présentera les rapports m/z des ions précurseurs. Si maintenant, les ions sont envoyés dans la cellule HCD, ils vont être fragmentés par CID puis transférés à nouveau dans la *C-trap* avant d'être analysés et détectés dans l'Orbitrap.

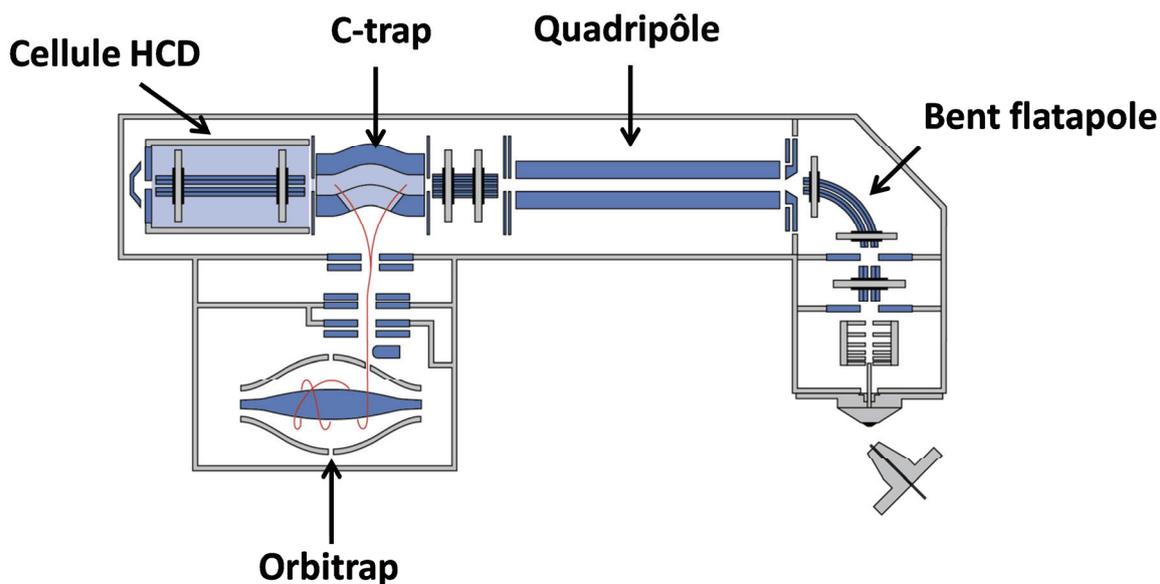


Figure VII-2 : schéma d'un Q-exactive.

Les caractéristiques données par le constructeur Thermo du Q-exactive ont été comparées à celle du 4000 Q-trap données par AB Sciex Tableau 13. Globalement, un des avantages principal du Q-exactive est la haute résolution apportée par l'Orbitrap. Les sensibilités données par les constructeurs sont équivalentes et des tests réalisés au laboratoire ont montré que ces deux instruments permettaient de quantifier des molécules au même ordre de grandeur de limite de détection, quelques centaines de pg/mL pour un peptide en solution. Un des avantages du Q-trap est sa vitesse de balayage qui va jusqu'à 24 000 Da par seconde. Une telle vitesse de balayage n'est pas calculable pour un Q-exactive, sa vitesse d'analyse dépendant principalement de la quantité des ions analysés, du temps de remplissage de la *C-trap* en amont de la détection et de la résolution d'analyse. Une publication du groupe de Coon montre que la sensibilité d'un Q-exactive est comparable à celle d'un triple quadripôle de chez Thermo²⁸.

	caractéristique technique du Q-exactive	caractéristique technique du 4000 Q-trap
gamme de masse (m/z)	50-6000	5-2800
Résolution maximale	140 000 pour un ion m/z = 200	7070 pour un ion m/z = 2022 en mode piège linéaire
changement de polarité (s)	<1	0.7
gamme dynamique	5x10 ⁴	10 ⁵
Sensibilité	500 fentogrammes de Buspirone injecté, S/N > 100	200 fentogrammes de Reserpine injecté, S/N > 1200

Tableau 13 : caractéristiques techniques du Q-exactive et du 4 000 Q-trap.

Ainsi, grâce à sa haute résolution, le Q-exactive est devenu un instrument de choix pour l'identification de protéines. En effet, l'analyse de la masse exacte d'une molécule couplée au spectre de fragmentation MS/MS de celle-ci va permettre une identification précise de l'analyte.

VII.2.3 Couplage Q-exactive/Laser

VII.2.3.1 Modification de l'instrument

Afin d'implémenter l'IRMPD dans un velos-Orbitrap, le groupe de Jennifer Brodbelt a ajouté une fenêtre en ZnSe sur l'enceinte dans laquelle se trouve la cellule HCD²⁵⁷. L'irradiation IRMPD est donc réalisée dans cette même cellule HCD.

Nous nous sommes inspirés de cette modification instrumentale pour l'implémentation du laser dans le Q-exactive. Cependant, dans un velos-Orbitrap, la cellule HCD se trouve directement derrière l'enceinte en Inox alors que sur le Q-exactive, il y a un détecteur entre l'enceinte et la cellule HCD.

Pour injecter le laser dans la cellule HCD, il est alors nécessaire de modifier l'enceinte de l'instrument mais aussi de percer ou d'enlever ce détecteur. Celui-ci sert pour les tests instrumentaux réalisés par ThermoFisher lors des maintenances et d'après le service recherche et développement de Brème de ThermoFisher, ce détecteur n'est pas nécessaire pour le bon fonctionnement en routine du Q-exactive. Nous avons fait le choix de percer ce détecteur et donc, de ne pas l'enlever, afin de ne pas modifier la pression du vide se trouvant dans la cellule HCD. La Figure VII-3 représente le couplage d'un laser avec le Q-exactive. Une fenêtre en quartz a été placée à l'arrière du spectromètre de masse afin de pouvoir injecter différents types de lasers allant du domaine du visible à l'ultra-violet. Le laser est introduit par un jeu de miroir permettant de régler avec une grande précision son trajet optique au sein de la cellule HCD.

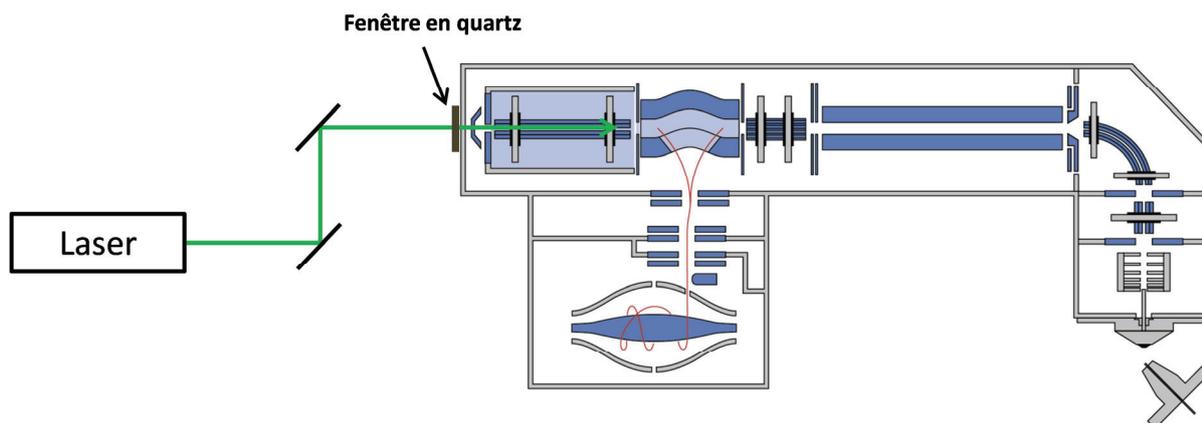


Figure VII-3 : schéma du montage expérimental couplant un laser avec un Q-exactive.

VII.2.3.2 Réglage du laser à 473 nm et des paramètres de la cellule HCD

Une fois la modification instrumentale réalisée, il est essentiel de régler la trajectoire du faisceau laser au sein de la cellule HCD pour optimiser la photo-fragmentation. Pour cela, nous avons gardé comme molécule modèle le peptide IVGGWECEK dérivé avec le chromophore DABCYL maléimide. Nous savons que ce couple possède un très bon rendement de fragmentation suite à l'excitation laser. Pour avoir un bon taux de fragmentation au sein de l'instrument, il faut que le recouvrement du faisceau laser et celui du faisceau d'ions soit optimal. Par ailleurs, le temps d'irradiation est également important. Dans un triple quadripôle, les temps d'irradiation sont très faibles, de l'ordre de quelques centaines de microsecondes. En fonctionnement classique, les ions sont piégés 3 millisecondes dans la cellule HCD afin de fragmenter. Ce temps devrait donc être suffisant pour fragmenter la molécule cible. Cependant, il semble important de pouvoir faire varier le temps de piégeage des ions dans la cellule HCD afin d'augmenter les rendements de photodissociation, chose impossible avec la version commerciale du logiciel Xcalibur. Pour cela, un partenariat a été signé avec Thermo et nous disposons maintenant au laboratoire d'une version améliorée du logiciel permettant d'ajuster le temps de piégeage. De plus, comme nous l'avons vu avec l'implémentation de laser dans le triple quadripôle, il est indispensable de pouvoir appliquer une énergie de collision (CE) faible pour que les ions ne soient pas fragmentés suite à leur injection dans la cellule HCD. La fragmentation observée en photo-fragmentation ne doit être induite que par l'irradiation laser et non pas par une association LID/CID. Or, la valeur minimale initiale du NCE (*normalized collision energy*) pouvant être appliquée avec le logiciel d'origine est de $NCE = 10$. Cette tension reste trop élevée car les peptides subissent de la fragmentation. La nouvelle version d'Xcalibur permet également, en infusion, d'abaisser la valeur minimale d'énergie de fragmentation et d'empêcher la fragmentation CID.

Ainsi, le peptide IVGGWECEK dérivé avec le DABCYL-maléimide est injecté en infusion puis ionisé par source électrospray. L'ion précurseur est sélectionné au niveau du quadripôle puis est analysé en mode MS^2 . La Figure VII-4 montre le spectre de masse obtenu suite à l'analyse MS/MS de l'ion

précurseur avec un NCE de 1 et un temps de piégeage de 3 ms. Le laser n'étant pas allumé, aucun fragment n'est détecté. Si la valeur du NCE est augmentée à 30, la Figure VII-4b montre des ions fragments provenant de la fragmentation du chromophore, m/z 252, mais également des fragments provenant de la fragmentation de la chaîne peptidique. Ensuite, lorsque le laser à 473 nm est allumé, la Figure VII-4c montre de nombreux ions fragments détectés identiques à ceux détectés suite à la fragmentation par CID. Ces fragments et leurs intensités relatives sont identiques et comparables à ceux obtenus suite à l'irradiation de cette même molécule dans le triple quadripôle, résultats présentés dans le chapitre précédent. Lorsque le temps de piégeage est augmenté à 300 ms, Figure VII-4d montre que l'ion précurseur n'est presque plus détecté, il y a une saturation au niveau du signal. Grâce à ces premiers spectres de masse, nous pouvons donc conclure que le montage expérimental fonctionne correctement et que le trajet optique au sein de l'instrument est optimal.

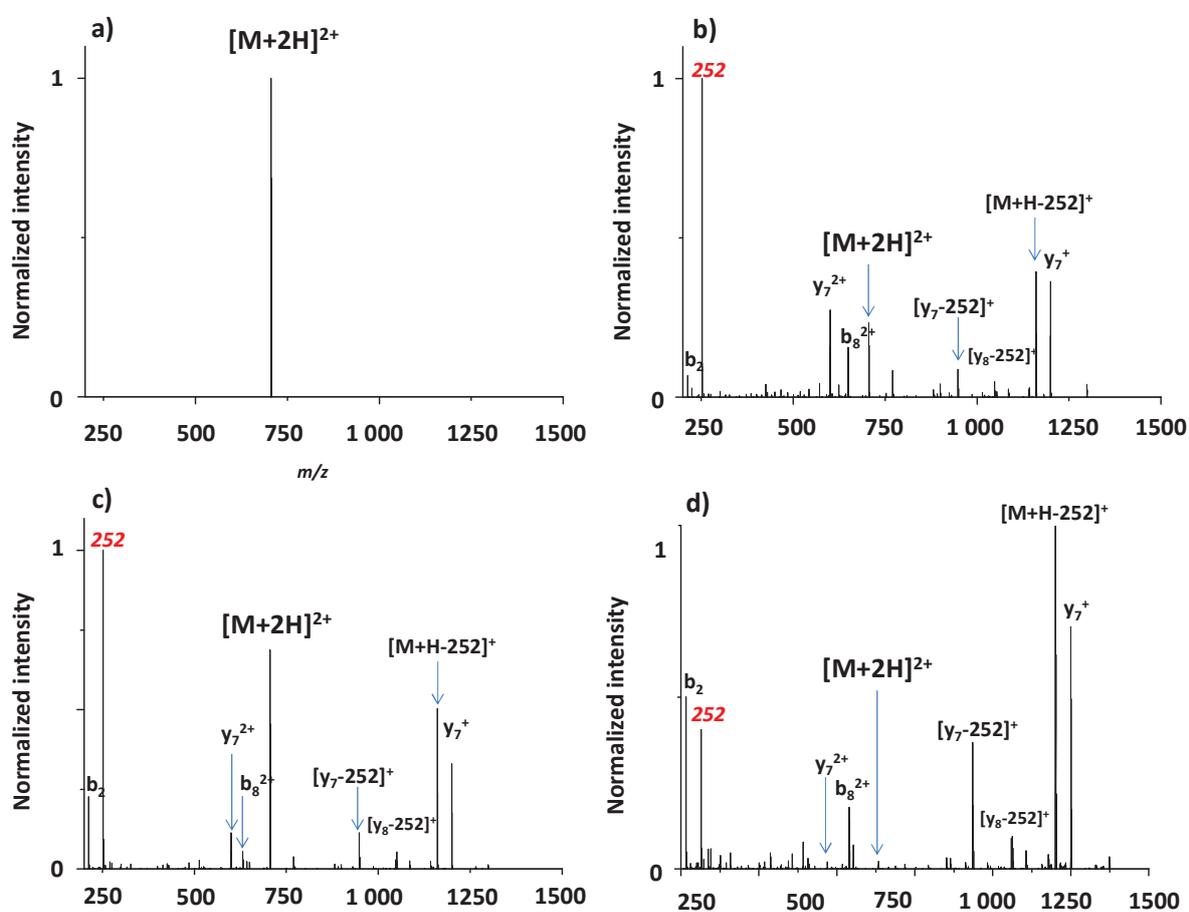


Figure VII-4 : spectres de masse MS/MS de l'ion précurseur dichargé du peptide IWGGWCEK dérivé avec le DABCYL-maléimide. Temps de piégeage 3 ms à NCE = 1 laser OFF a), temps de piégeage 3 ms à NCE = 30 laser OFF b), temps de piégeage 3 ms à NCE = 1 laser ON à 473 nm, 500 mW c), temps de piégeage 300 ms à NCE = 1 laser ON à 473 nm, 500 mW d).

Suite à ces premiers spectres de masse, nous souhaitons définir la valeur de NCE à appliquer pour que la fragmentation détectée ne soit due qu'à la photo-fragmentation et non à une combinaison de CID et de LID. Pour cela, nous avons fait varier la valeur de NCE lors de l'analyse des fragments de l'ion précurseur dichargé du peptide IVGGWECEK dérivé. La valeur NCE correspond à une valeur normalisée de la tension appliquée au niveau de la cellule HCD afin de faire entrer les ions dans la cellule et de les fragmenter avec un gaz inerte. Plus la tension appliquée sera élevée, plus les ions seront accélérés au sein de la cellule, ceci entraînant une plus forte fragmentation. Il est donc essentiel de définir une valeur de NCE suffisamment haute permettant d'injecter les ions dans la cellule mais suffisamment basse pour que les ions ne soient pas fragmentés suite à leur injection dans la cellule HCD. Le taux de fragmentation détecté en fonction du NCE est tracé avec :

$$\tau = \ln\left(\frac{\text{parent} + \text{fragments}}{\text{parent}}\right) \quad \text{Équation 20}$$

Avec τ le taux de fragmentation, *parent* l'intensité de l'ion précurseur, *fragments* la somme des intensités des ions fragments. La Figure VII-5 montre qu'à partir d'une valeur de 30 NCE le taux de fragmentation sature, l'ion précurseur n'est presque plus détecté. Pour ne pas détecter de fragmentation, il est alors indispensable de travailler avec la valeur la plus faible possible, suite à ces expériences, une valeur de NCE = 1 est alors choisie.

Une fois la valeur de NCE choisie pour l'utilisation de la photo-fragmentation, il est nécessaire de réaliser la même expérience afin d'optimiser la valeur du temps de piégeage dans la cellule HCD.

La Figure VII-6 montre le taux de photo-fragmentation de l'ion dichargé du peptide IVGGWECEK dérivé avec le DABCYL-maléimide en fonction du temps de piégeage dans la cellule HCD avec une valeur de NCE = 1. Nous pouvons observer que le signal augmente jusqu'à 150 ms avant de saturer. Ainsi, pour de futures expériences de photo-fragmentation de peptides avec dérivation, il ne semble pas nécessaire de piéger et d'irradier les ions plus de 150 ms pour obtenir de fortes intensités de fragmentation.

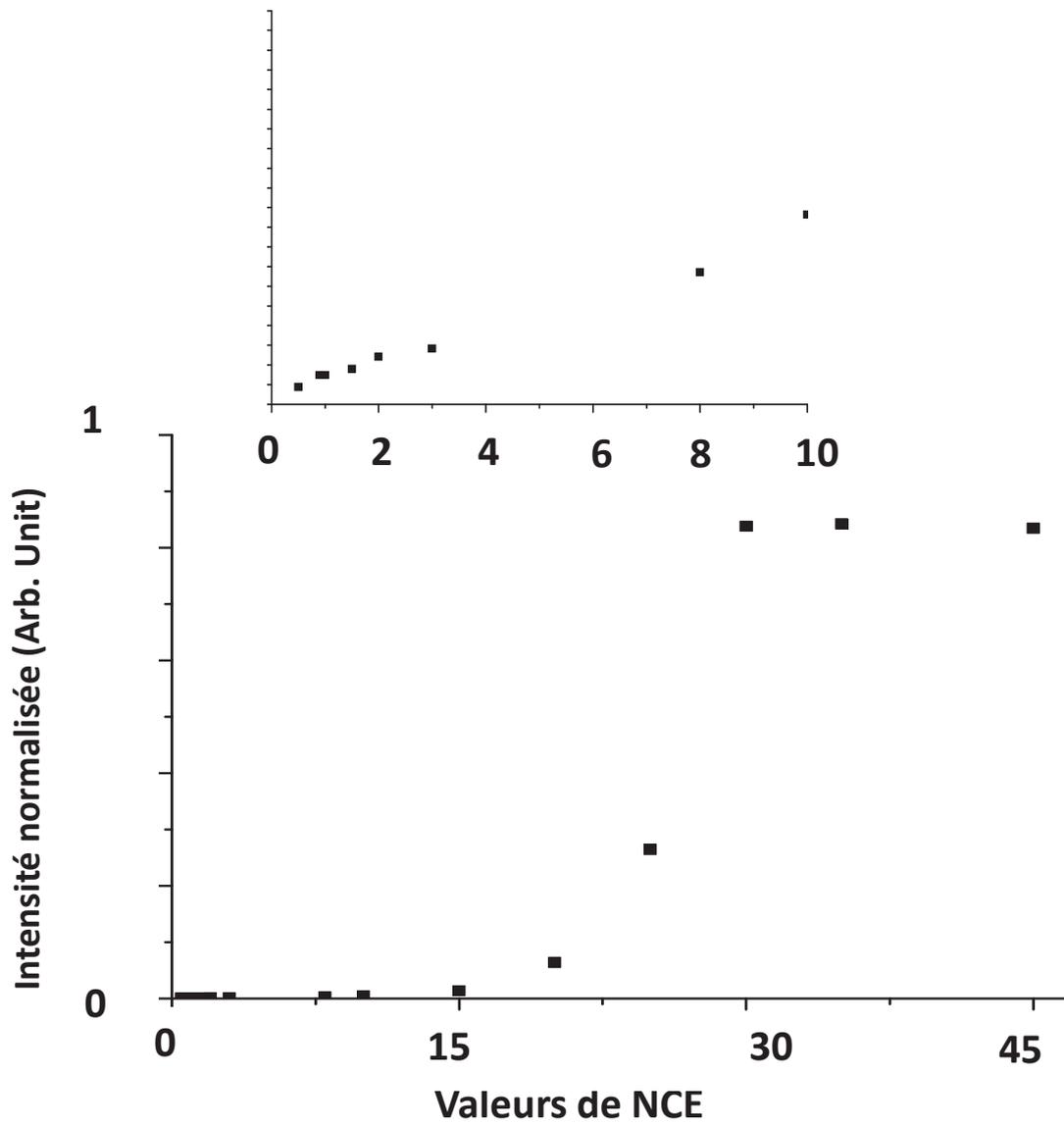


Figure VII-5 : taux de fragmentation de l'ion dichargé $[M+2H]^{2+}$ du peptide IVGGWECEK en fonction du NCE. L'insert montre les faibles valeurs de NCE.

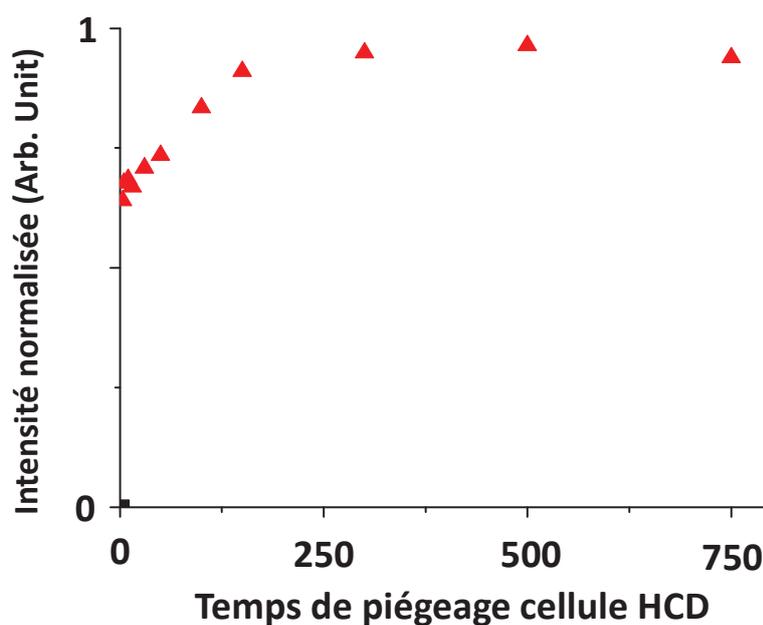


Figure VII-6 : taux de photo-fragmentation de l'ion dichargé $[M+2H]^{2+}$ du peptide IVGGWECEK en fonction du temps de piégeage HCD pour un NCE = 1.

VII.2.4 Couplage LC-MS/photo-fragmentation

Au moment de la rédaction de cette thèse, le logiciel ne permet pas encore de travailler avec des valeurs de NCE inférieures à 10 et en même temps de réaliser des expériences *Top N* ou *Targeted MS²* (principes décrits dans les perspectives). Nous avons donc réalisé des premières expériences simples sur un seul peptide dérivé, IVGGWECEK, à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solution. L'échantillon a été injecté par chromatographie liquide puis l'ensemble de l'échantillon a été fragmenté par LID avec un NCE de 1 sans aucune pré-sélection. Nous avons extrait, avec une résolution en masse de l'ordre du ppm, les chromatogrammes respectifs de l'ion précurseur d'intérêt $[M+2H]^{2+}$ m/z 706.3256 ± 0.0005 , du fragment signature du chromophore m/z 252.1124 ± 0.0005 et d'un fragment de la chaîne peptidique $[\gamma_7-252]^+$ m/z 948.3868 ± 0.0005 . La Figure VII-7a) montre le chromatogramme reconstitué de l'ion précurseur suite à l'irradiation laser de la molécule avec une valeur de NCE = 1 et un temps de piégeage de 3 ms. Si l'on compare ce chromatogramme à celui présenté Figure VII-7d, pour lequel le laser était éteint, nous pouvons remarquer qu'environ 10 % du signal de l'ion précurseur est conservé suite à la photo-fragmentation. Maintenant, si l'on compare les chromatogrammes Figure VII-7b et Figure VII-7e retraçant l'intensité du fragment signature du chromophore, nous observons que lorsque le laser est éteint aucun signal n'est détecté. Il en est de même pour le fragment intra-peptidique $[\gamma_7-252]^+$ (Figure VII-7c et Figure VII-7f). Les conditions d'analyse avec une valeur de NCE = 1 et un temps d'irradiation de 3 ms ne sont donc pas suffisants pour induire une fragmentation par collisions mais permettent, après injection du laser, de réaliser

de la photo-fragmentation. Le montage expérimental fonctionne correctement. Ainsi, pour les expériences futures en Photo-SRM, la fragmentation observée ne sera due qu'à la photodissociation spécifique des molécules marquées par un chromophore, permettant un gain de spécificité.

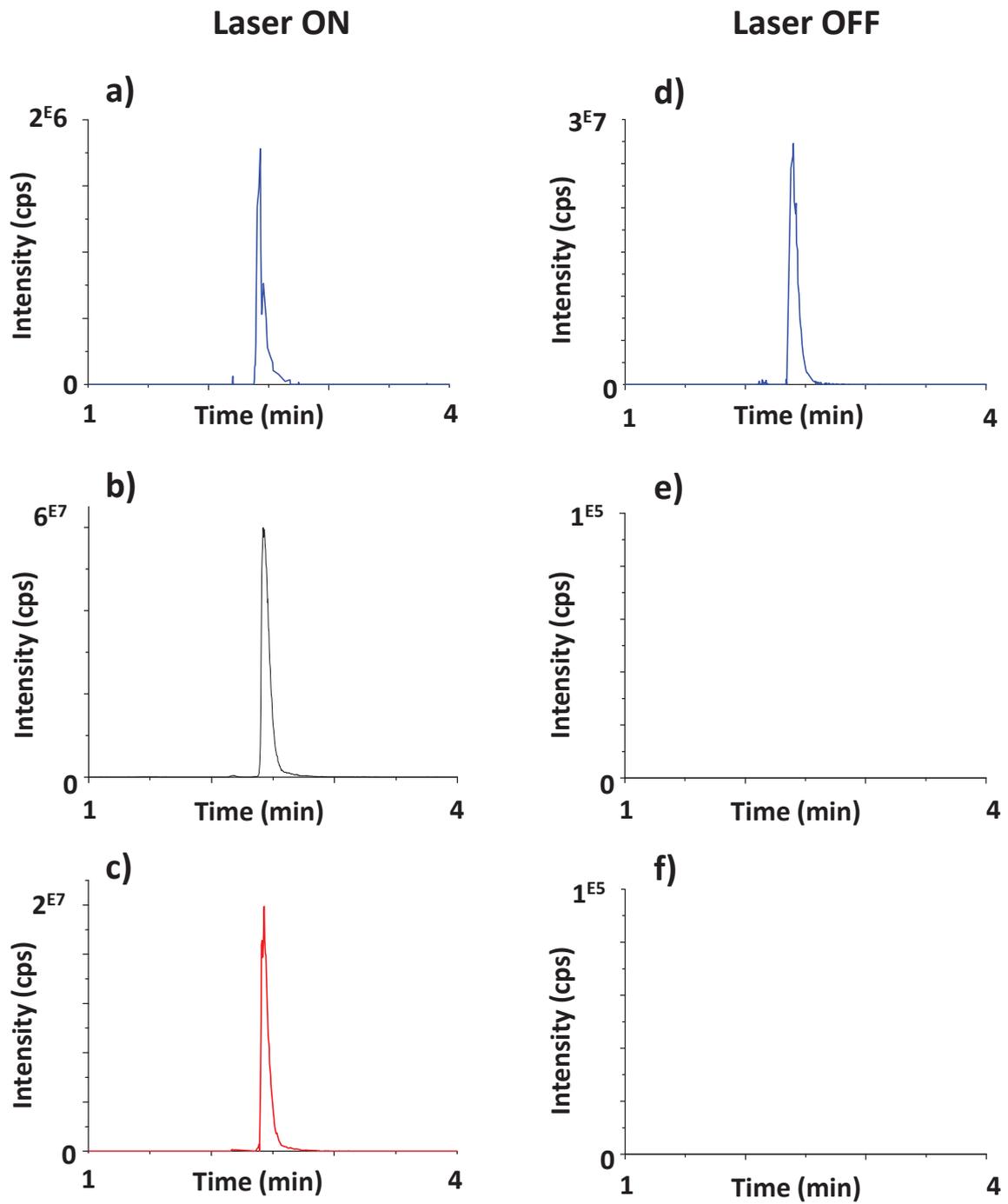


Figure VII-7 : chromatogrammes LC-MS reconstitués de l'ion précurseur d'intérêt $[M+2H]^{2+}$ m/z 706.3256 ± 0.0005 a), du fragment signature du chromophore m/z 252.1124 ± 0.0005 b) et d'un fragment de la chaîne peptidique $[\gamma_7-252]^+$ m/z 948.3868 ± 0.0005 c) suite à l'irradiation laser à 473 nm de l'ion précurseur $[M+2H]^{2+}$ du peptide IVGGWECEK dérivé avec le DABCYL-maléimide (temps de piégeage 3 ms, NCE = 1). Les chromatogrammes d), e) et f) ont été enregistrés dans les mêmes conditions que les a), b) et c) mais sans irradiation laser.

VII.3 Conclusion générale

Dans ce chapitre, nous avons discuté des perspectives sur les nouveaux instruments hybrides, couplant la sensibilité et haute résolution, qui permettent à la fois de quantifier mais aussi d'identifier avec précision les analytes. Grâce à ces instruments, de nouvelles méthodes de quantification autre que la SRM voient le jour et ouvrent de nouvelles perspectives. Cependant, le problème de la spécificité de détection reste d'actualité. Malgré la haute résolution, le très grand nombre de molécules présentes dans les matrices telles que le plasma et l'urine engendre des interférents. Nous avons présenté un des premiers couplages expérimentaux faisant intervenir la spécificité de la spectroscopie optique et la sélectivité de la haute résolution en spectrométrie de masse. Des premières expériences ont été réalisées afin de vérifier la faisabilité d'un tel couplage.

L'implémentation de la photo-fragmentation dans ces instruments hybrides permettra d'ajouter une nouvelle dimension de sélectivité en quantification comme en découverte protéomique. On peut alors imaginer une variante de la technologie ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tags*)^{208, 260-262} dans laquelle les protéines de deux échantillons, sain et malade en général, sont dérivées séparément avec deux molécules identiques mais différentes isotopiquement parlant. La variante pouvait être basée sur la dérivation de deux échantillons, le premier avec un chromophore ^{12}C et le deuxième avec un chromophore marqué ^{13}C . L'analyse multiplexée des deux échantillons mélangés permettrait alors une quantification relative directe des protéines d'intérêts.

Chapitre VIII. Conclusion générale et perspectives

La SRM (*Selected Reaction Monitoring*) est, de par sa double sélectivité en masse, le mode de choix pour la quantification de molécules, protéines et métabolites, par spectrométrie de masse. Cependant, le couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS/MS) en mode SRM ne permet pas de doser les analytes à des concentrations aussi basses que les tests immuno-enzymatiques. Deux axes de recherche sont alors privilégiés pour améliorer la sensibilité de la méthode. Le premier est la préparation d'échantillon avec le fractionnement de l'échantillon, le deuxième est le développement instrumental avec l'amélioration de la spécificité de détection des spectromètres de masse.

Nous nous sommes intéressés au deuxième axe et plus particulièrement au processus de fragmentation utilisé dans les triple-quadripôles, instruments de référence en quantification. La CID (*Collision Induced Dissociation*), processus de fragmentation appliqué en SRM, est un processus non-discriminant, tous les ions présents dans la cellule de fragmentation fragmentent suite à la collision avec le gaz. En remplaçant la CID par la LID (*Laser Induced Dissociation*), nous avons implanté un mode de fragmentation spécifique dans les triple-quadripôles. En LID, seules les molécules absorbant à la longueur d'onde émise par le laser peuvent fragmentées suite à l'absorption de l'énergie des photons et à la redistribution de cette énergie à une partie ou l'ensemble de la molécule. La spécificité de fragmentation apportée par la photo-fragmentation permet donc de s'affranchir d'un bon nombre d'interférents ayant la même transition SRM (ion précurseur/ion fragment) que la molécule cible. Au travers des différentes expériences présentées dans cette thèse, nous avons donc démontré que le couplage spectroscopie optique/spectrométrie de masse, au travers de la Photo-SRM^{23, 24}, permet d'abaisser les limites de détection (LDD) de biomolécules dans les matrices complexes telles que le plasma et le sérum.

Afin d'appliquer la photo-fragmentation, il est indispensable que les molécules cibles, et non toutes les molécules, absorbent à la longueur d'onde de travail. Pour cela, nous avons choisi de travailler avec des longueurs d'ondes du domaine du visible. En effet, les biomolécules des matrices biologiques telles que le plasma, le sérum ou encore l'urine, n'absorbent pas dans cette gamme de longueur d'ondes. Il est alors nécessaire de dériver les molécules d'intérêt avec un chromophore absorbant dans le visible et pouvant se greffer sélectivement sur les molécules cibles. Lors des expériences réalisées durant cette thèse, nous avons choisi de dériver spécifiquement les cystéines, acides aminés rares ayant une fonction chimique thiol dont la réactivité chimie est spécifique. De même, des expériences similaires ont été réalisées sur les œstrogènes possédant des fonctions

phénols, la fonction phénol ayant également une réactivité chimique spécifique dans certaines conditions.

Pour développer la Photo-SRM, un important travail instrumental a été réalisé et la modification de différents instruments tels qu'un triple quadripôle, un Q-trap et un Q-exactive montre les grandes possibilités d'études ouvertes par ce couplage spectroscopie optique/spectrométrie de masse. La première modification sur le triple quadripôle API 300 a permis de montrer la faisabilité de la technique, la deuxième a permis de réaliser des dosages de protéines endogènes dans du sérum humain. La troisième modification est en plein développement analytique et différentes applications que nous décrirons en perspectives vont être étudiées.

Les futures expériences pourraient être axées sur le dosage multiplexé de métabolites et de protéines ainsi que sur la réalisation d'un dosage de biomarqueur avéré tel que le PSA (*Prostate Specific Antigen*). Ce dosage permettrait alors d'utiliser la Photo-SRM pour une étude clinique concrète.

Ce dosage devait être réalisé durant cette thèse mais les difficultés rencontrées durant le développement analytique ont reporté cette étude. Les principales difficultés rencontrées pour le développement de la Photo-SRM, et de la photo-fragmentation en général durant ma thèse, sont les modifications instrumentales et la dérivation et la dérivation spécifique des biomolécules par chromophore.

Lors des modifications instrumentales, l'expertise des deux laboratoires dans lesquels j'ai effectué ma thèse a été indispensable. En effet, de nombreux instruments ont déjà été modifiés ou entièrement construits suite à la collaboration des équipes de Philippe Dugourd et de Jérôme Lemoine. Cette expertise nous a donc permis de réaliser les modifications instrumentales assez rapidement sur les triple quadripôles. La modification du Q-exactive a été plus compliquée car aucun instrument de ce type n'avait été modifié auparavant. De plus, le concept même de cet instrument est de laisser peu de paramètres libres aux utilisateurs afin de simplifier au maximum son utilisation. Les modifications instrumentales ont donc été suivies par des modifications au niveau du logiciel de pilotage de l'instrument en collaboration avec ThermoFisher.

La difficulté principale de cette thèse reste le choix du chromophore utilisé pour la dérivation des molécules cibles, approche sur laquelle j'ai travaillé en collaboration avec l'ENS Lyon. Très peu de données sont disponibles sur les propriétés des chromophores en phase gazeuse. Pour qu'un chromophore soit un bon candidat il doit être *quencher* et donc faiblement fluorescer. Il doit également avoir un fort taux de fragmentation et induire la fragmentation à l'ensemble de la molécule, pour cela le chromophore doit pouvoir redistribuer l'énergie absorbée au reste de la molécule. Il est très difficile de prédire quel chromophore permettra cette redistribution et seules les expériences permettent d'étudier cette propriété. La collaboration entre notre laboratoire et le laboratoire de chimie de l'ENS Lyon et l'équipe de Yann Bretonnière reste l'axe indispensable pour réaliser des progrès dans ce domaine, le chromophore « parfait » ayant une très bonne solubilité en

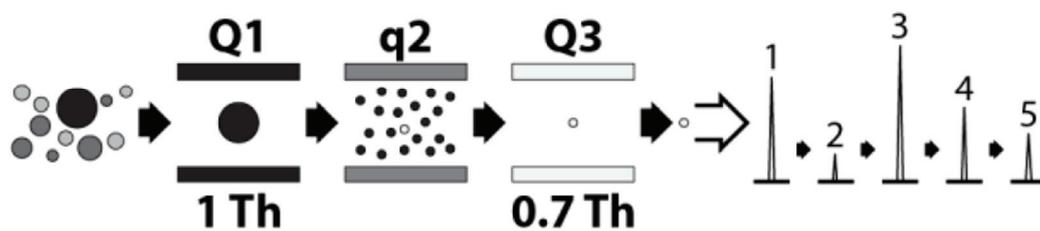
milieu aqueux et un taux de fragmentation élevé n'existant pas encore. Par ailleurs, pour le moment, le chromophore est ajouté et couplé en solution, d'où la nécessité de posséder un chromophore soluble en milieu aqueux. Une perspective intéressante serait d'introduire le chromophore lors de l'ionisation des molécules grâce à la source d'ionisation DESI (*Desorption Electrospray Ionisation*), le couplage serait alors réalisé durant la désorption de l'analyte ⁸⁵.

D'un point de vue des perspectives expérimentales, le couplage entre le Q-exactive et la spectroscopie optique ouvre de nouvelles possibilités. De par la grande versatilité d'utilisation du Q-exactive, ce nouveau couplage Laser/Q-exactive pourra être utilisé pour différents axes de recherche et notamment, la quantification et l'identification de nouveaux biomarqueurs. Le premier axe est donc la continuité des expériences de cette thèse et la quantification de biomolécules. Le Q-exactive n'étant pas un triple quadripôle, la technique permettant de doser les analytes ne sera pas la Photo-SRM, car un Q-exactive ne travaille pas en SRM à proprement parler, mais une technique qui peut s'apparenter à de la Photo-PRM, dérivée de la PRM développée par les groupes de Coon ²⁸ et de Domon ²⁵⁴. Le deuxième axe sera une nouvelle application du filtre de photo-fragmentation pour la découverte de nouveaux biomarqueurs.

Quantification par Photo-PRM

Le mode PRM (*Parallel Reaction Monitoring*) est une variante de la SRM appliquée aux instruments hybrides comme le Q-exactive. Le principe est de sélectionner l'ion précurseur au niveau du quadripôle, puis de fragmenter cet ion dans la cellule HCD et enfin, suivre différents fragments spécifiques lors d'une même analyse Orbitrap. Une reconstitution chromatographique permet de retracer l'apparition des fragments spécifiques en fonction du temps de rétention. C'est ce chromatogramme reconstitué qui servira alors pour la quantification. Le principe est décrit dans la Figure VIII-1.

A SRM



B PRM

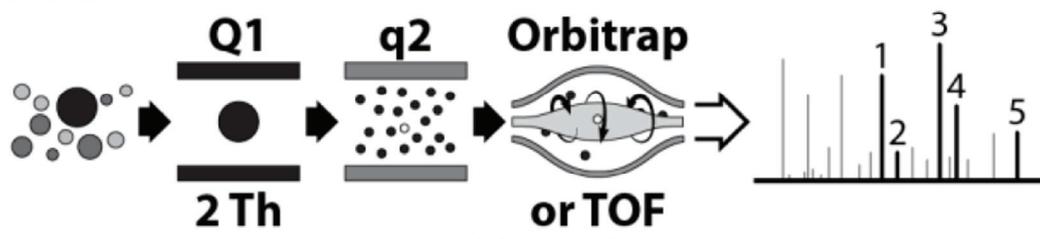


Figure VIII-1 : comparaison des principes des modes SRM (A) et PRM (B) (Parallel Reaction Monitoring)²⁸.

L'avantage de cette technique est de pouvoir mesurer avec une grande précision les masses des ions fragments et donc de s'affranchir de nombreux interférents. Cependant, de par le fonctionnement même de l'Orbitrap, pour avoir une mesure en masse précise, il est indispensable de faire résonner les ions un certain temps. Ce temps d'analyse, pouvant aller jusqu'à quelques centaines de millisecondes pour une résolution en masse de l'ordre de 140 000, n'est pas compatible avec un dosage multiplexé de centaines d'analytes. A titre de comparaison, en SRM, le temps de balayage d'une transition est généralement de 10 ms. Ainsi, pour des dosages multiplexés de centaines d'analytes, il n'est pas envisageable de travailler avec une très haute résolution pour des questions de temps d'analyse. Sans cette haute résolution, le nombre d'interférents peut être conséquent et l'ajout d'un filtre optique par photo-fragmentation peut alors permettre, comme en SRM, de gagner en sensibilité de détection.

Il serait alors très intéressant de réaliser un véritable dosage comme celui du PSA par exemple, en comparant les limites de détection (LDD) obtenues par PRM vis-à-vis de celles obtenues par Photo-PRM.

Découverte

En découverte protéomique, les techniques actuelles permettent d'identifier un grand nombre de protéines contenues dans un échantillon mais les protéines identifiées sont généralement présentes dans le plasma à des concentrations globalement élevées, de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$. En gardant toujours l'exemple du PSA, la gamme de concentration d'intérêt clinique est de l'ordre de la dizaine

de ng/mL⁵⁹. Il est donc essentiel d'améliorer les performances d'analyses afin de pouvoir identifier des protéines aux concentrations cliniques. Le problème majeur du manque de sensibilité provient de la grande complexité d'une matrice telle que le plasma. En effet, en découverte protéomique, le but est d'identifier un maximum de protéines. Généralement, la méthode d'analyse utilisée est le Top N, avec N un nombre entier ou également appelé « *data-dependant acquisition* ». Le principe de cette technique est de réaliser un premier spectre de masse *Full scan* afin d'obtenir le rapport masse sur charge des ions précurseurs présents dans le milieu. Une fois ce spectre de masse enregistré, les N ions les plus intenses, avec une intensité supérieure à un seuil défini, sont alors sélectionnés successivement par le quadripôle avant d'être fragmentés et analysés. Ainsi, un spectre de masse MS/MS propre à chaque ion précurseur est obtenu²⁶³. Cette technique permet donc d'enregistrer un très grand nombre de spectres MS/MS de peptides inconnus. Le principe est décrit dans la Figure VIII-2.

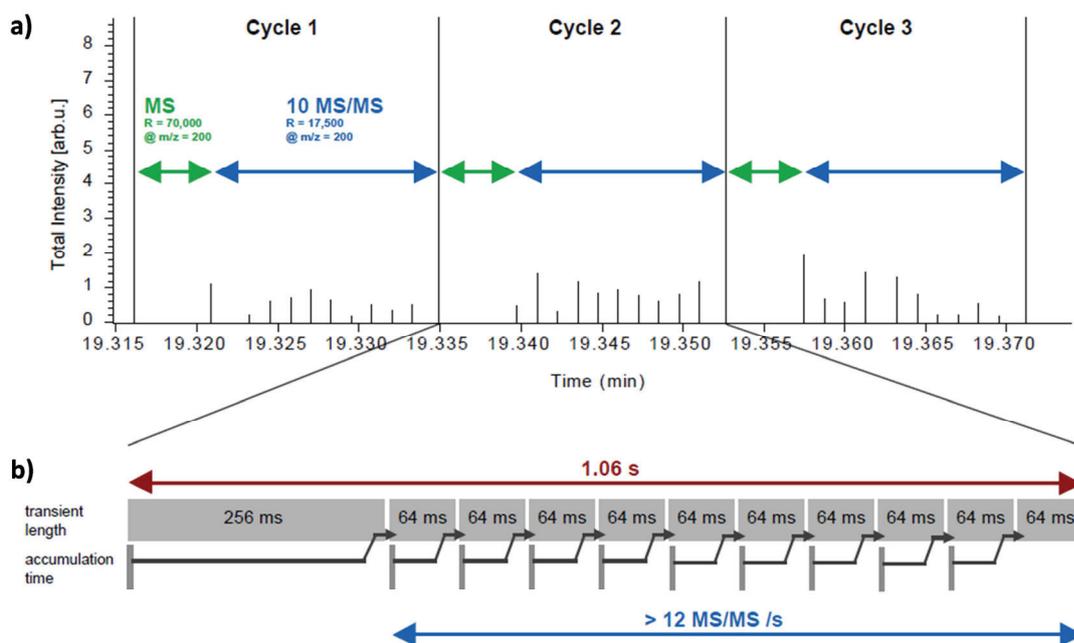


Figure VIII-2 : principe d'une analyse Top N. Temps de 3 cycles pour une analyse Top N (avec N = 10), avec une première analyse MS (70 000 de résolution, flèche verte) suivie d'analyses MS/MS (17 500 de résolution à m/z 200 ou 12 500 à m/z 200, flèche bleue), a). Temps total pour un cycle Top 10, b)²⁶³.

Cependant, les ions précurseurs les moins intenses, sous le seuil défini par la méthode, ne sont jamais fragmentés et donc jamais identifiés. Pour pallier ce problème, il existe la méthode MS^E développée par Waters²⁶⁴ qui permet de fragmenter tous les ions détectés après le *full MS*. Il s'agit d'une méthode *data-independent scan*. Un important travail informatique permet de corréler les ions fragments avec les ions précurseurs correspondants. Cependant, un très grand nombre d'ions

fragments est détecté et les ions fragments provenant des protéines minoritaires sont difficilement extraits des spectres de masse.

Dans l'optique de simplifier au maximum les spectres de masse MS/MS, l'ajout d'une spécificité de fragmentation peut permettre de ne fragmenter que les ions dérivés et ainsi de faciliter le retraitement de l'information et donc la rapidité de celui-ci. Il est envisageable de dériver différentes molécules, pas seulement les peptides contenant des cystéines, avec des chromophores possédant des fonctions de dérivations spécifiques. Suite à la dérivaison de ces composés, nous serions alors capables de doser et détecter toutes les biomolécules ayant la même fonction chimique. Il est alors envisageable de dériver deux échantillons différents avec le même chromophore, dans l'échantillon A le chromophore sera entièrement constitué de carbone 12 alors que dans l'échantillon B, il ne sera formé que de carbone 13. Suite au mélange de ces échantillons, une quantification relative pourra être directement appliquée. Ainsi, au moment de la rédaction de cette thèse, nous avons débuté des expériences couplant la photo-fragmentation avec la haute résolution en Top 10 ainsi qu'en *data-independent scantype* MS^E afin d'explorer toutes améliorations potentielles obtenues grâce à la photo-fragmentation.

D'autres couplages plus complexes mettant en jeu deux lasers sont aussi envisageables. En effet, la spectroscopie des ions radicaux provenant de l'oxydation des chaînes latérales des peptides comme le tryptophane montre que ceux-ci absorbent dans le domaine du visible²⁶⁵. Un autre montage expérimental avec deux lasers, un émettant dans le proche UV et l'autre dans le domaine du visible, permettrait d'analyser spécifiquement les polyanions peptidiques contenant des chaînes latérales aromatiques. En effet, le premier laser aurait pour rôle de détacher un électron d'un polyanion pour former un radical anion. Ce détachement d'électron pourrait être réalisé en source ou avant le premier quadripôle. Puis, un deuxième laser émettant des photons dans le visible, permettrait lui de venir exciter spécifiquement l'ion radicalaire pour ne photo-fragmenter que ces ions-là. L'avantage de cette technique est de s'affranchir de toute dérivaison chimique en amont de l'analyse par spectrométrie de masse.

Enfin, une expérience ambitieuse serait d'utiliser deux lasers femtosecondes pour la fragmentation spécifique de chromophore de chaîne latérale de peptide. Cette approche serait de type pompe-sonde. De façon traditionnelle, un laser ultrabref unique génère une impulsion lumineuse, séparée en deux pour constituer un faisceau pompe et un faisceau sonde. Une ligne à retard mécanique décale temporellement les deux impulsions. Avec deux lasers, le principe pompe-sonde reste le même. Ainsi, on peut imaginer que suite à l'excitation d'un état fondamental du chromophore vers un état excité grâce à la première impulsion, l'état excité serait alors lui-même excité vers un deuxième état excité d'énergie supérieure grâce au deuxième laser avant même que la relaxation ne se fasse sous forme de fluorescence, Figure VIII-3. Le temps de relaxation est spécifique de l'environnement du chromophore et donc de la molécule. L'équipe de Jean-Pierre Wolf a démontré récemment que deux molécules possédant le même chromophore, la flavine et la riboflavine, absorbent et fluorescent à la même longueur d'onde mais leurs dynamiques de relaxation sont très différentes et spécifiques^{266, 267}. Il est alors possible de les discriminer par ODD (*Optical Dynamique*

Discrimination). Une telle application permettrait elle aussi de s'affranchir de la dérivation par chromophore mais également de ne sélectionner spécifiquement qu'une seule molécule et non toutes les molécules possédant le même chromophore.

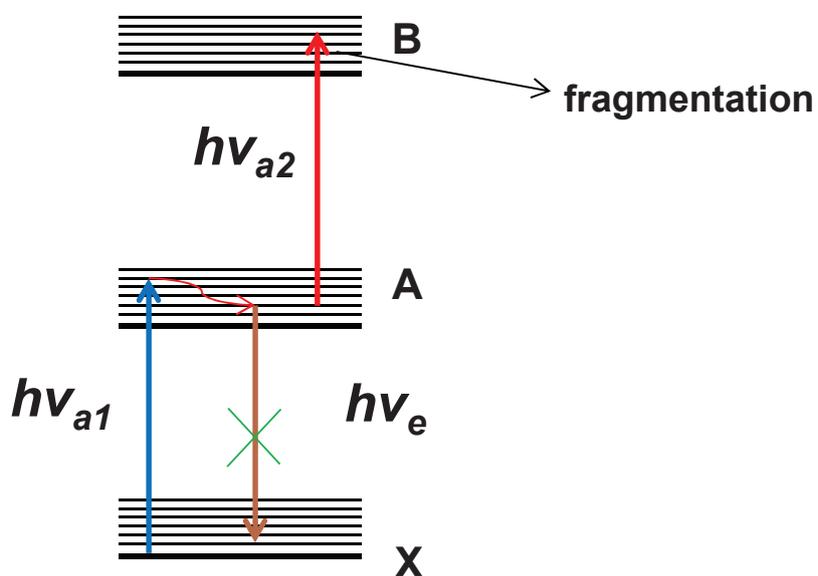


Figure VIII-3 : principe de la fragmentation de type pompe-sonde avec deux lasers.

Ainsi, l'ensemble des études déjà réalisées a montré que la photo-fragmentation était une technique de fragmentation crédible pouvant substituer, dans certain cas, la fragmentation par collision. De nombreuses perspectives d'études sont ouvertes et les futures expériences permettront très certainement d'asseoir cette technique au centre du développement analytique.

Références bibliographiques

- (1) V. Kulasingam, E. P. Diamandis, *Nature Clinical Practice Oncology* **2008**, *5*, 588-599.
- (2) R. Frank, R. Hargreaves, *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 566-580.
- (3) K. Blennow, H. Hampel, M. Weiner, H. Zetterberg, *Nature Reviews Neurology* **2010**, *6*, 131-144.
- (4) N. Rifai, M. A. Gillette, S. A. Carr, *Nature Biotechnology* **2006**, *24*, 971-983.
- (5) J. R. Yates, C. I. Ruse, A. Nakorchevsky, in *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2009, vol. 11, pp 49-79.
- (6) E. Boja, T. Hiltke, R. Rivers, C. Kinsinger, A. Rahbar, M. Mesri, H. Rodriguez, *Journal of Proteome Research* **2010**, *10*, 66-84.
- (7) A. Prakash, T. Rezaï, B. Krastins, D. Sarracino, M. Athanas, P. Russo, M. M. Ross, H. Zhang, Y. Tian, V. Kulasingam, A. P. Drabovich, C. Smith, I. Batruch, L. Liotta, E. Petricoin, E. P. Diamandis, D. W. Chan, M. F. Lopez, *Journal of Proteome Research* **2010**, *9*, 6678-6688.
- (8) A. N. Hoofnagle, J. O. Becker, M. H. Wener, J. W. Heinecke, *Clinical Chemistry* **2008**, *54*, 1796-1804.
- (9) E. Kuhn, T. Addona, H. Keshishian, M. Burgess, D. R. Mani, R. T. Lee, M. S. Sabatine, R. E. Gerszten, S. A. Carr, *Clinical Chemistry* **2009**, *55*, 1108-1117.
- (10) T. Fortin, A. Salvador, J. P. Charrier, C. Lenz, F. Bettsworth, X. Lacoux, G. Choquet-Kastylevsky, J. Lemoine, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 9343-9352.
- (11) H. Oh, K. Breuker, S. K. Sze, Y. Ge, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 15863-15868.
- (12) R. Antoine, P. Dugourd, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2011**, *13*, 16494-16509.
- (13) J. P. Reilly, *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*, 425-447.
- (14) E. R. Williams, J. J. P. Furlong, F. W. McLafferty, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1990**, *1*, 288-294.
- (15) W. Gabryelski, L. Li, *Rev. Sci. Instrum.* **1999**, *70*, 4192-4199.
- (16) T. Yalcin, W. Gabryelski, L. Li, *Journal of Mass Spectrometry* **1998**, *33*, 543-553.
- (17) L. Joly, R. Antoine, A.-R. Allouche, M. Broyer, J. Lemoine, P. Dugourd, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 8428-+.
- (18) R. Antoine, L. Joly, T. Tabarin, M. Broyer, P. Dugourd, J. Lemoine, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 265-268.
- (19) T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 2883-2892.
- (20) R. E. Tecklenburg, M. N. Miller, D. H. Russell, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 1161-1171.
- (21) J. J. Wilson, J. S. Brodbelt, *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 5186-5196.
- (22) J. J. Wilson, J. S. Brodbelt, *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 7883-7892.
- (23) Q. Enjalbert, R. Simon, A. Salvador, R. Antoine, S. Redon, M. M. Ayhan, F. Darbour, S. Chambert, Y. Bretonniere, P. Dugourd, J. Lemoine, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2011**, *25*, 3375-3381.
- (24) Q. Enjalbert, M. Girod, R. Simon, J. Jeudy, F. Chirot, A. Salvador, R. Antoine, P. Dugourd, J. Lemoine, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 2321-2331.
- (25) A. C. A. Cleuren, I. K. Van der Linden, Y. P. De Visser, G. T. M. Wagenaar, P. H. Reitsma, B. J. M. Van Vlijmen, *J Thromb Haemost* **2010**, *8*, 1838-1846.
- (26) J. L. Ockrim, E. N. Lalani, A. K. Kakkar, P. D. Abel, *J Urology* **2005**, *174*, 527-532.

- (27) F. R. Rosendaal, *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* **2005**, 1-12.
- (28) A. C. Peterson, J. D. Russell, D. J. Bailey, M. S. Westphall, J. J. Coon, *Molecular & Cellular Proteomics* **2012**, *11*, 1475-1488.
- (29) S. Gallien, E. Duriez, C. Crone, M. Kellmann, T. Moehring, B. Domon, *Molecular & Cellular Proteomics* **2012**, *11*, 1709-1723.
- (30) L. Sun, G. Zhu, N. J. Dovichi, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2013**, *27*, 157-162.
- (31) A. J. Atkinson, W. A. Colburn, V. G. DeGruttola, D. L. DeMets, G. J. Downing, D. F. Hoth, J. A. Oates, C. C. Peck, R. T. Schooley, B. A. Spilker, J. Woodcock, S. L. Zeger, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2001**, *69*, 89-95.
- (32) V. G. De Gruttola, P. Clax, D. L. DeMets, G. J. Downing, S. S. Ellenberg, L. Friedman, M. H. Gail, R. Prentice, J. Wittes, S. L. Zeger, *Controlled Clinical Trials* **2001**, *22*, 485-502.
- (33) J. Mishra, C. Dent, R. Tarabishi, M. M. Mitsnefes, Q. Ma, C. Kelly, S. M. Ruff, K. Zahedi, M. Shao, J. Bean, K. Mori, J. Borasch, P. Devarajan, *Lancet* **2005**, *365*, 1231-1238.
- (34) X. Chen, Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang, C.-Y. Zhang, *Cell Research* **2008**, *18*, 997-1006.
- (35) J. C. Amiard, C. Amiard-Triquet, *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. 2008.
- (36) O. Duriez, B. Leclercq, N. Lefranc, E. Ménoni, C. Nappée, F. Preiss, *Le Grand Tétraz Tetrao urogallus en France : biologie, écologie et systématique ; statut actuel de l'espèce dans les Vosges, le Jura et les Pyrénées ; disparition dans les Alpes ; réintroduction dans les Cévennes*. Ornithos: 2008; Vol. 15.
- (37) D. M. P. Thomson, J. Krupcey, S. O. Freedman, P. Gold, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1969**, *64*, 161-&.
- (38) G. I. Abelev, S. D. Perova, N. I. Khramkova, Z. A. Postnikova, I. S. Irlin, *Transplantation* **1963**, *1*, 174-180.
- (39) P. Gold, S. O. Freedman, *Journal of Experimental Medicine* **1965**, *122*, 467-&.
- (40) M. C. Wang, L. D. Papsidore, M. Kuriyama, L. A. Valenzuela, G. P. Murphy, T. M. Chu, *Prostate* **1981**, *2*, 89-96.
- (41) L. D. Papsidero, M. C. Wang, L. A. Valenzuela, G. P. Murphy, T. M. Chu, *Cancer Research* **1980**, *40*, 2428-2432.
- (42) H. Zhu, M. Snyder, *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, *7*, 55-63.
- (43) G. MacBeath, *Nature Genetics* **2002**, *32*, 526-532.
- (44) A. P. Feinberg, B. Vogelstein, *Analytical Biochemistry* **1983**, *132*, 6-13.
- (45) E. M. Southern, *Journal of Molecular Biology* **1975**, *98*, 503-&.
- (46) P. H. Ofarrell, *Journal of Biological Chemistry* **1975**, *250*, 4007-4021.
- (47) H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1979**, *76*, 4350-4354.
- (48) J. J. Sedmak, S. E. Grossberg, *Analytical Biochemistry* **1977**, *79*, 544-552.
- (49) S. P. Gygi, D. K. M. Han, A. C. Gingras, N. Sonenberg, R. Aebersold, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 310-319.
- (50) S. A. Gerber, J. Rush, O. Stemman, M. W. Kirschner, S. P. Gygi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 6940-6945.
- (51) G. Zhou, H. M. Li, D. DeCamp, S. Chen, H. J. Shu, Y. Gong, M. Flaig, J. W. Gillespie, N. Hu, P. R. Taylor, M. R. Emmert-Buck, L. A. Liotta, E. F. Petricoin, Y. M. Zhao, *Molecular & Cellular Proteomics* **2002**, *1*, 117-124.
- (52) A. Thompson, J. Schafer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, T. Neumann, C. Hamon, *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 1895-1904.
- (53) E. Engvall, P. Perlmann, *Immunochemistry* **1971**, *8*, 871-&.

- (54) R. Cheingsongpopov, S. Lister, D. Callow, P. Kaleebu, S. Beddows, J. Weber, S. Osmanov, E. M. Belsey, W. Heyward, J. Esparza, B. Galvaocastro, P. Vandeperre, E. Karita, C. Wasi, S. Sempala, B. Tugume, B. Biryahwaho, H. Rubsamenwaigmann, H. Vonbriesen, R. Esser, M. Grez, H. Holmes, A. Newberry, S. Ranjbar, P. Tomlinson, J. Bradac, F. McCutchan, J. Louwagie, P. Hegerich, C. Lopezgalindez, I. Olivares, J. Dopazo, J. I. Mullins, E. L. Delwart, H. M. Bachmann, J. Goudsmit, F. Dewolf, B. H. Hahn, F. Gao, L. Yue, S. Saragosti, G. Schochetman, M. Kalish, C. C. Luo, R. George, C. P. Pau, P. Nara, E. M. Fenyo, J. Albert, G. Myers, B. Korber, *Aids Research and Human Retroviruses* **1994**, *10*. 1379-1386.
- (55) H. Tamashiro, W. Maskill, J. Emmanuel, A. Fauquex, P. Sato, D. Heymann, *Lancet* **1993**, *342*. 87-90.
- (56) R. Huettnerhain, J. Malmstroem, P. Picotti, R. Aebersold, *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, *13*. 518-525.
- (57) S. Makawita, E. P. Diamandis, *Clinical Chemistry* **2010**, *56*. 212-222.
- (58) A. L. Barkan, W. F. Chandler, *Neurosurgery* **1998**, *42*. 913-915.
- (59) T. Fortin, A. Salvador, J. P. Charrier, C. Lenz, X. Lacoux, A. Morla, G. Choquet-Kastylevsky, J. Lemoine, *Molecular & Cellular Proteomics* **2009**, *8*. 1006-1015.
- (60) K. Shimoi, H. Kasai, N. Yokota, S. Toyokuni, N. Kinae, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **2002**, *11*. 767-770.
- (61) E. de Hoffman, V. Stroobant, *Spectrométrie de masse*. 3ème édition ed.; DUNOD: 2005.
- (62) R. G. Cooks, Z. Ouyang, Z. Takats, J. M. Wiseman, *Science* **2006**, *311*. 1566-1570.
- (63) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*. 64-71.
- (64) D. C. Taflin, T. L. Ward, E. J. Davis, *Langmuir* **1989**, *5*. 376-384.
- (65) J. V. Iribarne, B. A. Thomson, *Journal of Chemical Physics* **1976**, *64*. 2287-2294.
- (66) B. A. Thomson, J. V. Iribarne, *Journal of Chemical Physics* **1979**, *71*. 4451-4463.
- (67) V. Brun, C. Masselon, J. Garin, A. Dupuis, *Journal of Proteomics* **2009**, *72*. 740-749.
- (68) G. Picard, D. Lebert, M. Louwagie, A. Adrait, C. Huillet, F. Vandenesch, C. Bruley, J. Garin, M. Jaquinod, V. Brun, *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *47*. 1353-1363.
- (69) R. Kostianen, T. Kotiaho, T. Kuuranne, S. Auriola, *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38*. 357-372.
- (70) E. Gelpi, *Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *37*. 241-253.
- (71) R. Simon, Q. Enjalbert, J. Biarc, J. Lemoine, A. Salvador, *Journal of chromatography. A* **2012**, *1264*. 31-9.
- (72) J. M. Peng, J. E. Elias, C. C. Thoreen, L. J. Licklider, S. P. Gygi, *Journal of Proteome Research* **2003**, *2*. 43-50.
- (73) W. Paul, H. Steinwedel, *Z. Naturforsch. Sect. A-J. Phys. Sci.* **1953**, *8*. 448-450.
- (74) R. E. March, *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*. 961-989.
- (75) Y. Y. Chen, S. Y. Lin, Y. Y. Yeh, H. H. Hsiao, C. Y. Wu, S. T. Chen, A. H. J. Wang, *Electrophoresis* **2005**, *26*. 2117-2127.
- (76) M. J. McKay, J. Sherman, M. T. Laver, M. S. Baker, S. J. Clarke, M. P. Molloy, *Proteomics Clinical Applications* **2007**, *1*. 1570-1581.
- (77) S. Lin, T. A. Shaler, C. H. Becker, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*. 5762-5767.
- (78) K. Bjorhall, T. Miliotis, P. Davidsson, *Proteomics* **2005**, *5*. 307-317.
- (79) G. J. Opiteck, J. W. Jorgenson, R. J. Anderegg, *Analytical Chemistry* **1997**, *69*. 2283-2291.
- (80) L. Anderson, C. L. Hunter, *Molecular & Cellular Proteomics* **2006**, *5*. 573-588.
- (81) N. L. Anderson, N. G. Anderson, L. R. Haines, D. B. Hardie, R. W. Olafson, T. W. Pearson, *J. Proteome Res.* **2004**, *3*. 235-244.
- (82) S. Pan, R. Aebersold, R. Chen, J. Rush, D. R. Goodlett, M. W. McIntosh, J. Zhang, T. A. Brentnall, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*. 787-797.
- (83) S. L. Zhou, A. G. Edwards, K. D. Cook, G. J. Van Berkel, *Analytical Chemistry* **1999**, *71*. 769-776.

- (84) K. Chingin, V. Frankevich, R. M. Balabin, K. Barylyuk, H. Chen, R. Wang, R. Zenobi, *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49*. 2358-2361.
- (85) M. Girod, X. Dagany, R. Antoine, P. Dugourd, *International Journal of Mass Spectrometry* **2011**, *308*. 41-48.
- (86) J. S. Page, K. Tang, R. T. Kelly, R. D. Smith, *Analytical Chemistry* **2008**, *80*. 1800-1805.
- (87) L. J. Brown, R. W. Smith, D. E. Toutoungi, J. C. Reynolds, A. W. T. Bristow, A. Ray, A. Sage, I. D. Wilson, D. J. Weston, B. Boyle, C. S. Creaser, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*. 4095-4103.
- (88) M. Jemal, Z. Ouyang, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*. 24-38.
- (89) P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, *11*. 601-601.
- (90) K. Biemann, *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* **1988**, *16*. 99-111.
- (91) J. H. Bowie, C. S. Brinkworth, S. Dua, *Mass Spectrometry Reviews* **2002**, *21*. 87-107.
- (92) R. J. Waugh, J. H. Bowie, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1994**, *8*. 169-173.
- (93) R. G. Cooks, *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, *30*. 1215-1221.
- (94) D. J. Douglas, *Journal of Physical Chemistry* **1982**, *86*. 185-191.
- (95) A. K. Shukla, J. H. Futrell, *Mass Spectrometry Reviews* **1993**, *12*. 211-255.
- (96) K. Biemann, *Methods in Enzymology* **1990**, *193*. 455-479.
- (97) D. P. Little, J. P. Speir, M. W. Senko, P. B. Oconnor, F. W. McLafferty, *Analytical Chemistry* **1994**, *66*. 2809-2815.
- (98) J. S. Brodbelt, J. J. Wilson, *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, *28*. 390-424.
- (99) Y. O. Tsybin, M. Witt, G. Baykut, F. Kjeldsen, P. Hakansson, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*. 1759-1768.
- (100) Y. O. Tsybin, J. P. Quinn, O. Y. Tsybin, C. L. Hendrickson, A. G. Marshall, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, *19*. 762-771.
- (101) R. A. Zubarev, N. L. Kelleher, F. W. McLafferty, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*. 3265-3266.
- (102) N. L. Kelleher, R. A. Zubarev, K. Bush, B. Furie, B. C. Furie, F. W. McLafferty, C. T. Walsh, *Analytical chemistry* **1999**, *71*. 4250-3.
- (103) N. A. Kruger, R. A. Zubarev, D. M. Horn, F. W. McLafferty, *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *185*. 787-793.
- (104) J. E. P. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*. 9528-9533.
- (105) L. M. Mikesch, B. Ueberheide, A. Chi, J. J. Coon, J. E. P. Syka, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **2006**, *1764*. 1811-1822.
- (106) B. A. Budnik, K. F. Haselmann, R. A. Zubarev, *Chemical Physics Letters* **2001**, *342*. 299-302.
- (107) W. D. Bowers, S. S. Delbert, R. L. Hunter, R. T. Mclver, *Journal of the American Chemical Society* **1984**, *106*. 7288-7289.
- (108) M. S. Thompson, W. D. Cui, J. P. Reilly, *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*. 4791-4794.
- (109) T. Y. Kim, M. S. Thompson, J. P. Reilly, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*. 1657-1665.
- (110) M. S. Thompson, W. Cui, J. P. Reilly, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18*. 1439-1452.
- (111) L. Zhang, J. P. Reilly, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*. 7829-7838.
- (112) R. Parthasarathi, Y. He, J. P. Reilly, K. Raghavachari, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*. 1606-1610.
- (113) J. A. Madsen, D. R. Boutz, J. S. Brodbelt, *Journal of Proteome Research* **2010**, *9*. 4205-4214.
- (114) J. A. Madsen, T. S. Kaoud, K. N. Dalby, J. S. Brodbelt, *Proteomics* **2011**, *11*. 1329-1334.
- (115) S. Lee, R. R. Julian, S. J. Valentine, J. P. Reilly, D. E. Clemmer, *International Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *316*. 6-11.
- (116) V. Larraillet, R. Antoine, P. Dugourd, J. Lemoine, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*. 8410-8416.

- (117) M. Perot-Taillandier, S. Zirah, Q. Enjalbert, R. Antoine, J. Lemoine, P. Dugourd, S. Rebuffat, J.-C. Tabet, C. Afonso, *Chemistry-a European Journal* **2013**, *19*. 350-357.
- (118) I. N. Levine, *Molecular Spectroscopy*. 1975.
- (119) P. W. Atkins, R. S. Friedman, *Molecular Quantum Mechanics Third edition*. 1997.
- (120) C. N. Banwell, E. M. McCash, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*. Mcgraw-Hill College: 1994
- (121) J. M. Hollas, *Spectroscopie : Cours et exercices*. Dunod: 1998.
- (122) N. Y. Dodonova, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **1993**, *18*. 111-121.
- (123) B. J. Ko, J. S. Brodbelt, *Analytical Chemistry* **2011**, *83*. 8192-8200.
- (124) B. Bellina, I. Compagnon, L. Joly, F. Albrieux, A. R. Allouche, F. Bertorelle, J. Lemoine, R. Antoine, P. Dugourd, *International Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *297*. 36-40.
- (125) S. I. Smith, J. S. Brodbelt, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*. 7218-7226.
- (126) A. Devakumar, M. S. Thompson, J. P. Reilly, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*. 2313-2320.
- (127) A. Devakumar, Y. Mechref, P. Kang, M. V. Novotny, J. P. Reilly, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, *19*. 1027-1040.
- (128) A. Devakumar, Y. Mechref, P. Kang, M. V. Novotny, J. P. Reilly, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*. 1452-1460.
- (129) J. Y. Oh, J. H. Moon, M. S. Kim, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*. 2706-2712.
- (130) R. B. Cody, I. J. Amster, F. W. McLafferty, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, *82*. 6367-6370.
- (131) X. J. Tang, P. Thibault, R. K. Boyd, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1992**, *122*. 153-179.
- (132) F. Rosu, V. Gabelica, E. De Pauw, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, *Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *116*. 5383-5391.
- (133) V. Gabelica, F. Rosu, T. Tabarin, C. Kinet, R. Antoine, M. Broyer, E. De Pauw, P. Dugourd, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*. 4706-4713.
- (134) A. Racaud, R. Antoine, L. Joly, N. Mesplet, P. Dugourd, J. Lemoine, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20*. 1645-1651.
- (135) A. Racaud, R. Antoine, P. Dugourd, J. Lemoine, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, *21*. 2077-2084.
- (136) M. Girod, R. Antoine, J. Lemoine, P. Dugourd, L. Charles, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2011**, *25*. 3259-3266.
- (137) M. Girod, R. Antoine, J. Lemoine, P. Dugourd, L. Charles, *International Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *333*. 27-33.
- (138) T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*. 2nd Edition: 1993.
- (139) T. R. Rizzo, Y. D. Park, L. Peteanu, D. H. Levy, *Journal of Chemical Physics* **1985**, *83*. 4819-4820.
- (140) E. W. Schlag, H. L. Selzle, P. Schanen, R. Weinkauff, R. D. Levine, *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*. 8497-8500.
- (141) H. B. Oh, C. Lin, H. Y. Hwang, H. L. Zhai, K. Breuker, V. Zabrouskov, B. K. Carpenter, F. W. McLafferty, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*. 4076-4083.
- (142) D. Nolting, C. Marian, R. Weinkauff, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*. 2633-2640.
- (143) O. V. Boyarkin, S. R. Mercier, A. Kamariotis, T. R. Rizzo, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*. 2816-2817.
- (144) F. O. Talbot, T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, P. Dugourd, *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*.
- (145) J. A. Stearns, C. Seaiby, O. V. Boyarkin, T. R. Rizzo, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, *11*. 125-132.
- (146) L. Joly, R. Antoine, A.-R. Allouche, M. Broyer, J. Lemoine, P. Dugourd, *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*. 6607-6611.

- (147) C. Brunet, R. Antoine, J. Lemoine, P. Dugourd, *Journal of Physical Chemistry Letters* **2012**, *3*, 698-702.
- (148) N. P. Lockyer, J. C. Vickerman, *Laser Chemistry* **1997**, *17*, 139-159.
- (149) C. Brunet, R. Antoine, A.-R. Allouche, P. Dugourd, F. Canon, A. Giuliani, L. Nahon, *Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *115*, 8933-8939.
- (150) C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, F. Canon, A. Giuliani, L. Nahon, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2012**, *23*, 274-281.
- (151) N. C. Polfer, J. J. Valle, D. T. Moore, J. Oomens, J. R. Eyler, B. Bendiak, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 670-679.
- (152) E. J. Cocinero, E. C. Stanca-Kaposta, E. M. Scanlan, D. P. Gamblin, B. G. Davis, J. P. Simons, *Chemistry-a European Journal* **2008**, *14*, 8947-8955.
- (153) Z. Su, E. J. Cocinero, E. C. Stanca-Kaposta, B. G. Davis, J. P. Simons, *Chemical Physics Letters* **2009**, *471*, 17-21.
- (154) E. J. Cocinero, E. C. Stanca-Kaposta, M. Dethlefsen, B. Liu, D. P. Gamblin, B. G. Davis, J. P. Simons, *Chemistry-a European Journal* **2009**, *15*, 13427-13434.
- (155) F. N. Lamari, R. Kuhn, N. K. Karamanos, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2003**, *793*, 15-36.
- (156) D. T. Li, J. F. Sheen, G. R. Her, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, *11*, 292-300.
- (157) R. Jelinek, S. Kolusheva, *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 5987-6015.
- (158) D. Ropartz, P. E. Bodet, C. Przybylski, F. Gonnet, R. Daniel, M. Fer, W. Helbert, D. Bertrand, H. Rogniaux, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 2059-2070.
- (159) R. L. Jackson, S. J. Busch, A. D. Cardin, *Physiological Reviews* **1991**, *71*, 481-539.
- (160) H. Lis, N. Sharon, *European Journal of Biochemistry* **1993**, *218*, 1-27.
- (161) I. Brockhausen, J. Schutzbach, W. Kuhns, *Acta Anatomica* **1998**, *161*, 36-78.
- (162) J. Zaia, *Mass Spectrometry Reviews* **2004**, *23*, 161-227.
- (163) T. Krusius, J. Finne, R. K. Margolis, R. U. Margolis, *Journal of Biological Chemistry* **1986**, *261*, 8237-8242.
- (164) Y. Mechref, M. V. Novotny, C. Krishnan, *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 4895-4903.
- (165) A. S. Weiskopf, P. Vouros, D. J. Harvey, *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 4441-4447.
- (166) A. S. Weiskopf, P. Vouros, D. J. Harvey, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 1493-1504.
- (167) B. Domon, C. E. Costello, *Glycoconjugate Journal* **1988**, *5*, 397-409.
- (168) S. M. Zucker, S. Lee, N. Webber, S. J. Valentine, J. P. Reilly, D. E. Clemmer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, *22*, 1477-1485.
- (169) H. S. Cao, M. D. Heagy, *Journal of Fluorescence* **2004**, *14*, 569-584.
- (170) T. D. James, K. Sandanayake, S. Shinkai, *Nature* **1995**, *374*, 345-347.
- (171) K. R. Anumula, *Analytical Biochemistry* **1994**, *220*, 275-283.
- (172) K. R. Anumula, S. T. Dhume, *Glycobiology* **1998**, *8*, 685-694.
- (173) B. J. Ko, J. S. Brodbelt, *Journal of Mass Spectrometry* **2011**, *46*, 359-366.
- (174) D. J. Douglas, A. J. Frank, D. M. Mao, *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24*, 1-29.
- (175) J. W. Hager, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 512-526.
- (176) J. C. Schwartz, M. W. Senko, J. E. P. Syka, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13*, 659-669.
- (177) J. Lemoine, T. Fortin, A. Salvador, A. Jaffuel, J.-P. Charrier, G. Choquet-Kastylevsky, *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2012**, *12*, 333-342.
- (178) <http://www.synchrotron-soleil.fr/Recherche/LignesLumiere/DESIRS>.
- (179) N. de Oliveira, D. Joyeux, D. Phalippou, J. C. Rodier, F. Polack, M. Vervloet, L. Nahon, *Review of Scientific Instruments* **2009**, *80*.

- (180) A. R. Milosavljevic, C. Nicolas, J. F. Gil, F. Canon, M. Refregiers, L. Nahon, A. Giuliani, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* **2012**, 279. 34-36.
- (181) M. Richter, J. Hollandt, U. Kroth, W. Paustian, H. Rabus, R. Thornagel, G. Ulm, *Metrologia* **2003**, 40. S107-S110.
- (182) Dickinso.Hr, W. C. Johnson, *Journal of the American Chemical Society* **1974**, 96. 5050-5054.
- (183) D. J. Harvey, *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35. 1178-1190.
- (184) K. R. Anumula, *Analytical Biochemistry* **2006**, 350. 1-23.
- (185) B. Milian, E. Orti, V. Hernandez, J. T. L. Navarrete, T. Otsubo, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107. 12175-12183.
- (186) Q. Enjalbert, A. Racaud, J. Lemoine, S. Redon, M. M. Ayhan, C. Andraud, S. Chambert, Y. Bretonniere, C. Loison, R. Antoine, P. Dugourd, *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, 116. 841-851.
- (187) H. Matsumoto, H. T. S. Imai, *Ger. Offen.* **1987.**, 3716840 A1.
- (188) S. H. Jang, J. D. Luo, N. M. Tucker, A. Leclercq, E. Zojer, M. A. Haller, T. D. Kim, J. W. Kang, K. Firestone, D. Bale, D. Lao, J. B. Benedict, D. Cohen, W. Kaminsky, B. Kahr, J. L. Bredas, P. Reid, L. R. Dalton, A. K. Y. Jen, *Chem. Mat.* **2006**, 18. 2982-2988.
- (189) T. Tanaka, H. Nagai, M. Noguchi, A. Kobayashi, S.-i. Shoda, *Chemical Communications* **2009**. 3378-3379.
- (190) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40. 2004-+.
- (191) S. Cecioni, R. Lalor, B. Blanchard, J. P. Praly, A. Imbert, S. E. Matthews, S. Vidal, *Chemistry* **2009**, 15. 13232-40.
- (192) G. te Velde, F. M. Bickelhaupt, E. J. Baerends, C. F. Guerra, S. J. A. Van Gisbergen, J. G. Snijders, T. Ziegler, *Journal of Computational Chemistry* **2001**, 22. 931-967.
- (193) A. D. Becke, *Physical Review A* **1988**, 38. 3098-3100.
- (194) J. P. Perdew, *Physical Review B* **1986**, 33. 8822-8824.
- (195) Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Accounts of Chemical Research* **2008**, 41. 157-167.
- (196) V. Lange, P. Picotti, B. Domon, R. Aebersold, *Molecular Systems Biology* **2008**, 4.
- (197) H. Keshishian, T. Addona, M. Burgess, E. Kuhn, S. A. Carr, *Molecular & Cellular Proteomics* **2007**, 6. 2212-2229.
- (198) C. Brunet, R. Antoine, P. Dugourd, F. Canon, A. Giuliani, L. Nahon, *Journal of Chemical Physics* **2013**, 138.
- (199) Q. Enjalbert, A. Racaud, J. Lemoine, S. Redon, M. M. Ayhan, C. Andraud, S. Chambert, Y. Bretonniere, C. Loison, R. Antoine, P. Dugourd, *J Phys Chem B* **2012**, 116. 841-51.
- (200) J. J. Wilson, J. S. Brodbelt, *Anal Chem* **2007**, 79. 7883-92.
- (201) Q. Enjalbert, R. Simon, A. Salvador, R. Antoine, S. Redon, M. M. Ayhan, F. Darbour, S. Chambert, Y. Bretonniere, P. Dugourd, J. Lemoine, *Rapid Commun Mass Spectrom* **2011**, 25. 3375-81.
- (202) M. L. Vestal, G. H. Mauclaire, *Journal of Chemical Physics* **1977**, 67. 3758-3766.
- (203) J. F. Hiller, M. L. Vestal, *Journal of Chemical Physics* **1981**, 74. 6096-6105.
- (204) P. Fayet, L. Woste, *Z. Phys. D-Atoms Mol. Clusters* **1986**, 3. 177-182.
- (205) S. H. Wang, X. Zhang, F. E. Regnier, *Journal of Chromatography A* **2002**, 949. 153-162.
- (206) P. Giron, L. Dayon, N. Mihala, J. C. Sanchez, K. Rose, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, 23. 3377-3386.
- (207) P. Giron, L. Dayon, J.-C. Sanchez, *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, 30. 366-395.
- (208) S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nature Biotechnology* **1999**, 17. 994-999.
- (209) www.invitrogen.com. 2010.
- (210) D. E. Graham, K. C. Harich, R. H. White, *Analytical Biochemistry* **2003**, 318. 325-328.
- (211) G. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. Academic Press: 1996.

- (212) X.-F. Guo, J.-B. Chen, H. Wang, H.-S. Zhang, W.-H. Huang, J. Guo, *Talanta* **2012**, *99*. 1046-1050.
- (213) S. S. Rosenfeld, J. Xing, G. M. Jefferson, P. H. King, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*. 35684-35695.
- (214) L. Joly, R. Antoine, F. Albrieux, R. Ballivian, M. Broyer, F. Chirot, J. Lemoine, P. Dugourd, C. Greco, R. Mitric, V. Bonacic-Koutecky, *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*. 11293-11300.
- (215) G. D. Zhang, Y. Z. Zhang, D. M. Fast, Z. S. Lin, R. Steenwyk, *Analytical Biochemistry* **2011**, *416*. 45-52.
- (216) K. D. W. Roth, Z. H. Huang, N. Sadagopan, J. T. Watson, *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*. 255-274.
- (217) X. A. Zhou, Y. L. Lu, W. J. Wang, B. Borhan, G. E. Reid, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*. 1339-1351.
- (218) N. L. Anderson, N. G. Anderson, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*. 845-867.
- (219) S. A. Carr, L. Anderson, *Clin. Chem.* **2008**, *54*. 1749-1752.
- (220) T. Fortin, A. Salvador, J. P. Charrier, C. Lenz, X. Lacoux, A. Morla, G. Choquet-Kastylevsky, J. Lemoine, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*. 1006-1015.
- (221) H. Keshishian, T. Addona, M. Burgess, D. R. Mani, X. Shi, E. Kuhn, M. S. Sabatine, R. E. Gerszten, S. A. Carr, *Molecular & Cellular Proteomics* **2009**, *8*. 2339-2349.
- (222) L. Anderson, C. L. Hunter, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*. 573-588.
- (223) G. L. Hortin, D. Sviridov, N. L. Anderson, *Clin. Chem.* **2008**, *54*. 1608-1616.
- (224) Q. Enjalbert, M. Girod, R. Simon, J. Jeudy, F. Chirot, A. Salvador, R. Antoine, P. Dugourd, J. Lemoine, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, *405*. 2321-31.
- (225) L. Callipo, G. Caruso, P. Foglia, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Lagana, *Anal. Biochem.* **2010**, *400*. 195-202.
- (226) B. Winther, M. Nordlund, E. Paus, L. Reubsæet, T. G. Halvorsen, *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*. 2937-2943.
- (227) M. A. Kuzyk, D. Smith, J. Yang, T. J. Cross, A. M. Jackson, D. B. Hardie, N. L. Anderson, C. H. Borchers, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*. 1860-1877.
- (228) B. Buszewski, S. Kowalska, T. Kowalkowski, K. Rozpedowska, M. Michel, T. Jonsson, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, *845*. 253-260.
- (229) A. Mihailova, H. Malerod, S. R. Wilson, B. Karaszewski, R. Hauser, E. Lundanes, T. Greibrokk, *Journal of Separation Science* **2008**, *31*. 459-467.
- (230) A. G. Paulovich, D. Billheimer, A.-J. L. Ham, L. Vega-Montoto, P. A. Rudnick, D. L. Tabb, P. Wang, R. K. Blackman, D. M. Bunk, H. L. Cardasis, K. R. Clauser, C. R. Kinsinger, B. Schilling, T. J. Tegeler, A. M. Variyath, M. Wang, J. R. Whiteaker, L. J. Zimmerman, D. Fenyo, S. A. Carr, S. J. Fisher, B. W. Gibson, M. Mesri, T. A. Neubert, F. E. Regnier, H. Rodriguez, C. Spiegelman, S. E. Stein, P. Tempst, D. C. Liebler, *Mol. Cell. Proteomics* **2010**, *9*. 242-254.
- (231) A. Prakash, T. Rezai, B. Krastins, D. Sarracino, M. Athanas, P. Russo, M. M. Ross, H. Zhang, Y. Tian, V. Kulasingam, A. P. Drabovich, C. Smith, I. Batruch, L. Liotta, E. Petricoin, E. P. Diamandis, D. W. Chan, M. F. Lopez, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*. 6678-6688.
- (232) A. Sreekumar, L. M. Poisson, T. M. Rajendiran, A. P. Khan, Q. Cao, J. Yu, B. Laxman, R. Mehra, R. J. Lonigro, Y. Li, M. K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Cao, J. Byun, G. S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D. C. Alexander, A. Berger, J. R. Shuster, J. T. Wei, S. Varambally, C. Beecher, A. M. Chinnaiyan, *Nature* **2009**, *457*. 910-914.
- (233) D. S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A. C. Guo, N. Young, D. Cheng, K. Jewell, D. Arndt, S. Sawhney, C. Fung, L. Nikolai, M. Lewis, M.-A. Coutouly, I. Forsythe, P. Tang, S. Shrivastava, K. Jeroncic, P. Stothard, G. Amegbey, D. Block, D. D. Hau, J. Wagner, J. Miniaci, M. Clements, M. Gebremedhin, N. Guo, Y. Zhang, G. E. Duggan, G. D. MacInnis, A. M. Weljie, R. Dowlatabadi, F. Bamforth, D. Clive, R. Greiner, L. Li, T. Marrie, B. D. Sykes, H. J. Vogel, L. Querengesser, *Nucleic Acids Research* **2007**, *35*. D521-D526.

- (234) D. I. Ellis, R. Goodacre, *Analyst* **2006**, *131*. 875-885.
- (235) E. C. Y. Chan, P. K. Koh, M. Mal, P. Y. Cheah, K. W. Eu, A. Backshall, R. Cavill, J. K. Nicholson, H. C. Keun, *Journal of Proteome Research* **2009**, *8*. 352-361.
- (236) A. Hirayama, K. Kami, M. Sugimoto, M. Sugawara, N. Toki, H. Onozuka, T. Kinoshita, N. Saito, A. Ochiai, M. Tomita, H. Esumi, T. Soga, *Cancer Research* **2009**, *69*. 4918-4925.
- (237) G. Tans, J. Curvers, S. Middeldorp, M. Thomassen, J. C. M. Meijers, M. H. Prins, B. N. Bouma, H. R. Buller, J. Rosing, *Thromb. Haemostasis* **2000**, *84*. 15-21.
- (238) J. P. Vandenbroucke, J. Rosing, K. W. M. Bloemenkamp, S. Middeldorp, F. M. Helmerhorst, B. N. Bouma, F. R. Rosendaal, *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*. 1527-1535.
- (239) V. Gabet-Giraud, C. Miege, B. Herbreteau, G. Hernandez-Raquet, M. Coquery, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*. 1841-1851.
- (240) A. Salvador, C. Moretton, A. Piram, R. Faure, *J Chromatogr A* **2007**, *1145*. 102-109.
- (241) T. Vega-Morales, Z. Sosa-Ferrera, J. J. Santana-Rodriguez, *Talanta* **2011**, *85*. 1825-1834.
- (242) C. H. Huang, D. L. Sedlak, *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, *20*. 133-139.
- (243) R. W. Giese, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*. 401-412.
- (244) R. E. Nelson, S. K. Grebe, D. J. O'Kane, R. J. Singh, *Clin. Chem.* **2004**, *50*. 373-384.
- (245) K. Rangiah, S. J. Shah, A. Vachani, E. Ciccimaro, I. A. Blair, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*. 1297-1307.
- (246) M. R. Anari, R. Bakhtiar, B. Zhu, S. Huskey, R. B. Franklin, D. C. Evans, *Anal. Chem.* **2002**, *74*. 4136-4144.
- (247) C. Fernandez, H. M. Santos, C. Ruiz-Romero, F. J. Blanco, J.-L. Capelo-Martinez, *Electrophoresis* **2011**, *32*. 2966-2974.
- (248) S. E. Warder, L. A. Tucker, T. J. Strelitzer, E. M. McKeegan, J. L. Meuth, P. M. Jung, A. Saraf, B. Singh, J. Lai-Zhang, G. Gagne, J. C. Rogers, *Analyt. Biochem.* **2009**, *387*. 184-193.
- (249) E. De Mey, G. Drabik-Markiewicz, H. De Maere, M. C. Peeters, G. Derdelinckx, H. Paelinck, T. Kowalska, *Food Chem.* **2012**, *130*. 1017-1023.
- (250) R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, *422*. 198-207.
- (251) M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, B. Kuster, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*. 1017-1031.
- (252) H.-J. Huang, M.-L. Tsai, Y.-W. Chen, S.-H. Chen, *Journal of Proteomics* **2011**, *74*. 2734-2744.
- (253) H. B. Liu, R. G. Sadygov, J. R. Yates, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*. 4193-4201.
- (254) L. C. Gillet, P. Navarro, S. Tate, H. Roest, N. Selevsek, L. Reiter, R. Bonner, R. Aebersold, *Molecular & Cellular Proteomics* **2012**, *11*.
- (255) R. Chen, S. Pan, T. A. Brentnall, R. Aebersold, *Molecular & Cellular Proteomics* **2005**, *4*. 523-533.
- (256) S. Zanivan, F. Gnad, S. A. Wickstroem, T. Geiger, B. Macek, J. Cox, R. Faessler, M. Mann, *Journal of Proteome Research* **2008**, *7*. 5314-5326.
- (257) L. A. Vasicek, A. R. Ledvina, J. Shaw, J. Griep-Raming, M. S. Westphall, J. J. Coon, J. S. Brodbelt, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, *22*. 1105-1108.
- (258) Q. Z. Hu, R. J. Noll, H. Y. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. G. Cooks, *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40*. 430-443.
- (259) A. Makarov, *Analytical Chemistry* **2000**, *72*. 1156-1162.
- (260) R. Chen, T. A. Brentnall, S. Pan, K. Cooke, K. W. Moyes, Z. Lane, D. A. Crispin, D. R. Goodlett, R. Aebersold, M. P. Bronner, *Molecular & Cellular Proteomics* **2007**, *6*. 1331-1342.
- (261) M. Toigo, S. Donohoe, G. Sperrazzo, B. Jarrold, F. Wang, R. Hinkle, E. Dolan, R. J. Isfort, R. Aebersold, *Molecular Biosystems* **2005**, *1*. 229-241.
- (262) J. Zhang, D. R. Goodlett, J. F. Quinn, E. Peskind, J. A. Kaye, Y. Zhou, C. Pan, E. Yi, J. Eng, Q. Wang, R. H. Aebersold, T. J. Montine, *Journal of Alzheimers Disease* **2005**, *7*. 125-133.
- (263) A. Michalski, E. Damoc, J.-P. Hauschild, O. Lange, A. Wiegand, A. Makarov, N. Nagaraj, J. Cox, M. Mann, S. Horning, *Molecular & Cellular Proteomics* **2011**, *10*.

- (264) Y. Levin, E. Hradetzky, S. Bahn, *Proteomics* **2011**, *11*. 3273-3287.
- (265) B. Bellina, I. Compagnon, S. Houver, P. Maitre, A.-R. Allouche, R. Antoine, P. Dugourd, *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50*. 11430-11432.
- (266) A. Rondi, L. Bonacina, A. Trisorio, C. Hauri, J. P. Wolf, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*. 9317-9322.
- (267) J. Roslund, M. Roth, L. Guyon, V. Boutou, F. Courvoisier, J.-P. Wolf, H. Rabitz, *Journal of Chemical Physics* **2011**, *134*.

Annexes

Cette thèse a donné lieu à différentes publications scientifiques et communications orales.

Publications scientifiques :

- Q. Enjalbert, R. Simon, A. Salvador, R. Antoine, S. Redon, M. M. Ayhan, F. Darbour, S. Chambert, Y. Bretonniere, P. Dugourd, J. Lemoine, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2011**, 25. 3375-3381.
- Q. Enjalbert, A. Racaud, J. Lemoine, S. Redon, M. M. Ayhan, C. Andraud, S. Chambert, Y. Bretonniere, C. Loison, R. Antoine, P. Dugourd, *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, 116. 841-851.
- R. Simon, Q. Enjalbert, J. Biarc, J. Lemoine, A. Salvador, *Journal of chromatography. A* **2012**, 1264. 31-9.
- M. Perot-Taillandier, S. Zirah, Q. Enjalbert, R. Antoine, J. Lemoine, P. Dugourd, S. Rebuffat, J.-C. Tabet, C. Afonso, *Chemistry-a European Journal* **2013**, 19. 350-357.
- Q. Enjalbert, M. Girod, R. Simon, J. Jeudy, F. Chiro, A. Salvador, R. Antoine, P. Dugourd, J. Lemoine, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, 405. 2321-31.
- Q. Enjalbert, C. Brunet, A. Vernier, A. Allouche, R. Antoine, P. Dugourd, J. Lemoine, A. Giuliani, L. Nahon, *Journal of American Society for Mass Spectrometry* **in press**.

Communications orales :

- Oral Journée des biomolécules 2011, Lyon, France.
- Oral ASMS 2011, Denver, USA.
- Oral SMAP 2011, Avignon, France.

Nouvel outil de quantification de biomarqueurs couplant la spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse, la Photo-SRM.

La spectrométrie de masse apparait depuis plusieurs années, au travers de la technologie SRM (*Selected Reaction Monitoring*) comme une alternative crédible aux tests immunologiques pour la quantification de biomarqueurs. Cependant, les limites de quantifications et de détections attendent ne sont pas suffisantes pour réaliser des dosages cliniques. Afin d'améliorer les limites de détections nous nous sommes intéressés au couplage de la spectroscopie optique avec la spectrométrie de masse pour le dosage de biomarqueurs. Ce couplage s'appelle la Photo-SRM.

Durant cette thèse, je me suis donc appliqué, dans un premier temps, à étudier les propriétés optiques de biomolécules dans des domaines de longueurs d'ondes différents allant du VUV au visible.

Par la suite, la preuve de concept de l'outil Photo-SRM a été réalisée. Suite à une modification instrumentale réalisée sur un spectromètre de masse de type triple quadripôle, un laser continu émettant des photons dans le domaine du visible, 532 nm, a été implémenté dans cet instrument.

Cet outil a ensuite été appliqué pour un dosage multiplexé des protéines endogènes majoritaires du sérum humain. Ces protéines ont été dosées via des peptides protéotypiques contenant des cystéines. L'ensemble du sérum a donc été dérivé en amont de l'analyse.

Afin d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche, nous avons souhaité appliquer la Photo-SRM au dosage de métabolites. En effet, dans de nombreuses pathologies, les métabolites et les protéines jouent un rôle important. Par exemple, les œstrogènes utilisés comme contraceptif ont un impact sur les concentrations des protéines de coagulation. Il semble donc intéressant de pouvoir étudier ces deux familles de biomolécules lors d'une même analyse.

Enfin, avec l'avènement des instruments hybrides, tels que les Q-TOF et le Q-exactive, la quantification n'est plus réservée qu'à l'usage des instruments de type triple quadripôle. Ces instruments permettent de doser des biomolécules aux mêmes ordres de grandeur que les triples quadripôles en mode SRM. Ces instruments permettent également de réaliser des expériences de découvertes en protéomiques. Nous nous sommes donc intéressés au couplage de la spectroscopie optique avec la spectrométrie de masse à haute résolution pour la quantification et la découverte de protéines. La modification instrumentale d'un Q-exactive, hybride quadripôle-Orbitrap, est présentée suivi d'expériences préliminaires. Ce couplage ouvre donc de nouvelles perspectives d'étude en quantification mais également en découverte protéomique.