UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE
SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Institut de Chimie Organique et Analytique

THÈSE présentée par :

Justine FEREY

soutenue le : **24 novembre 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie analytique

Développement d'outils analytiques basés sur la spectrométrie de masse pour le suivi d'interactions enzyme-ligand dans le domaine de la Santé

THÈSE dirigée par :

Benoit MAUNIT	Professeur - Université d'Orléans
David DA SILVA	Maître de conférence - Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Patrick EMOND	Professeur - Université François-Rabelais Tours
Olivier LAPRÉVOTE	Professeur - Université Paris Descartes

JURY

Carlos AFONSO	Professeur - Université de Rouen
David DA SILVA	Maître de conférence - Université d'Orléans
Patrick EMOND	Professeur - Université François-Rabelais Tours
Christine ENJALBAL	Professeur - Université de Montpellier
Olivier LAPRÉVOTE	Président du jury, Professeur - Université Paris Descartes
Benoit MAUNIT	Professeur - Université d'Orléans

Remerciements

Ces travaux de recherche ont été menés à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) d'Orléans au sein de l'équipe « Stratégies Analytiques, Affinités et Bioactifs ». Je remercie le Professeur Pascal BONNET, directeur de l'ICOA, pour m'avoir permis d'intégrer son laboratoire.

Je remercie le Professeur Benoit MAUNIT, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance en me permettant de mener ce projet de thèse et pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je lui suis tout particulièrement reconnaissante pour son écoute, sa compréhension et ses conseils avisés tout au long de ces trois années.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur David DA SILVA, encadrant de mes travaux de thèse, pour sa disponibilité et son aide quotidienne sans faille. Je le remercie vivement pour ses idées et conseils pertinents ainsi que pour toutes nos discussions (et négociations) qui ont enrichi ces travaux de thèse tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Merci également pour son soutien, sa motivation et sa gentillesse. J'ai été ravie de travailler à ses côtés. Je lui adresse ma profonde reconnaissance ainsi que mon amitié.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude au Docteur Cyril COLAS pour sa patience, son aide et ses précieux conseils dans le cadre des développements en spectrométrie de masse. Nos échanges divers et variés ont égayé les moments passés en manipulation. Je le remercie pour toute l'aide et les connaissances qu'il m'a m'apportées.

Je remercie très sincèrement le Professeur Richard DANIELLOU ainsi que le Docteur Pierre LAFITE, de l'équipe « GlycoBio&Chimie » de m'avoir ouvert les portes de leur laboratoire (pour leur aide à la production et la purification d'enzymes) mais aussi pour les différentes collaborations et l'attention toute particulière qu'ils ont apportées à ce travail. Un grand merci à Philippe MOREAU pour son accueil ainsi que son aide apportée dans le cadre de la production enzymatique.

J'adresse mes remerciements au Professeur Philippe MORIN et au Docteur Reine NEHME pour leur aide et leurs précieux conseils lors de la mise en place de l'approche d'électrophorèse capillaire.

Je n'oublierai pas de remercier le Professeur Luigi AGROFOGLIO et le Docteur Vincent ROY pour leur collaboration.

Je souhaite également sincèrement remercier Florian COUDRAY pour son aide précieuse lors des enseignements de Travaux Pratiques réalisés ces trois dernières années dans le cadre des missions complémentaires. Sa gentillesse ainsi que nos discussions ont contribué à me faire goûter aux joies de l'enseignement.

Je remercie tout particulièrement les Professeurs Patrick EMOND et Olivier LAPREVOTE pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail en qualité de rapporteur. Je tiens également à remercier les Professeurs Christine ENJALBAL et Carlos AFONSO d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse et de contribuer à l'évaluation de ces travaux en qualité d'examinateur.

Je tenais également à remercier l'ensemble des permanents, des post-doctorants, des doctorants et stagiaires qui composent l'équipe « Stratégies Analytiques, Affinités et Bioactifs ».

Enfin, un grand merci à tous mes proches et particulièrement à ma famille. Merci à mes parents, ma sœur et mon beau-frère pour leur soutien, leurs encouragements et pour avoir été particulièrement à mon écoute durant ces trois dernières années. Pour finir, je tiens à adresser ma profonde affection et reconnaissance à mon conjoint pour son aide et son soutien tout au long de ces trois années. Sans ses encouragements, sa présence dans les moments les plus difficiles et ses conseils, malgré la distance, ce projet n'aurait pu être mené à bien. Merci de m'avoir soutenue dans ce projet professionnel !

Liste des publications et des communications

Publications :

"Validation of a thin-layer chromatography/densitometry method for the characterization of invertase activity"

Justine Ferey, David Da Silva, Sophie Bravo-Veyrat, Pierre Lafite, Richard Daniellou, Benoit Maunit, *Journal of Chromatography A*, 1477 (2016) 108-113.

"TLC-UV hyphenated with MALDI-TOFMS for the screening of invertase substrates in plant extracts"

Justine Ferey, David Da Silva, Pierre Lafite, Richard Daniellou, Benoit Maunit, *Talanta*, 170 (2017) 419-424.

"Evaluation of the phosphorylation of thymidine from immobilized human nucleoside/nucleotide kinases by FIA-HRMS"

Justine Ferey, David Da Silva, Cyril Colas, Pierre Lafite, Vincent Roy, Luigi A. Agrofoglio, Richard Daniellou, Benoît Maunit, en phase de soumission, *Journal of The American Mass Spectrometry*.

"Two-enzyme cascade bioreactors for antiviral molecule phosphorylation monitoring by Frontal Affinity Chromatography hyphenated with High Resolution Mass Spectrometry"

Justine Ferey, David Da Silva, Cyril Colas, Pierre Lafite, Vincent Roy, Luigi A. Agrofoglio, Richard Daniellou, Benoît Maunit, en phase de soumission, *Journal of Chromatography A*.

Communications orales :

Congrès internationaux

"How the mass spectrometry can be revealed as an innovative and powerful technique in the study of promising antiretroviral activity molecules"

Justine Ferey, David Da Silva, Cyril Colas, Benoit Maunit, International Symposium on Chromatography "ISC", Cork, Ireland, 28 août-1 septembre 2016.

"Exploration by UHPLC-HRMS of the enzymatic phosphorylation of pyrimidine nucleosides"

Justine Ferey, David Da Silva, Cyril Colas, Pierre Lafite, Vincent Roy, Luigi A. Agrofoglio, Richard Daniellou, Benoît Maunit, 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques « HPLC », Prague, République Tchèque, 18-22 juin 2017.

"TLC-UV and TLC-MALDI-TOFMS: an efficient tool for enzyme characterization and screening of bioactive substrates"

Justine Ferey, David Da Silva, Pierre Lafite, Richard Daniellou, Benoit Maunit, International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography "HPTLC", Berlin, Allemagne, 4-8 juillet 2017.

Congrès nationaux

"Development of a TLC-UV@MALDI-TOF MS approaches for the screening of substrates and/or inhibitors in plant extracts"

Justine Ferey, David Da Silva, Pierre Lafite, Richard Daniellou, Benoit Maunit, 21èmes rencontres du club jeune de la SFSM, Moustiers-Sainte-Marie, 21-25 mars 2016.

"Développement de méthodologies pour le criblage d'interactions enzyme-ligand"

Justine Ferey, David Da Silva, Pierre Lafite, Richard Daniellou, Benoit Maunit, sessions jeunes SEP, Orléans, 16-17 juin 2016.

"Etude par UHPLC-HRMS de la phosphorylation enzymatique de nucléosides pyrimidiques"

Justine Ferey, David Da Silva, Cyril Colas, Pierre Lafite, Vincent Roy, Luigi A. Agrofoglio, Richard Daniellou, Benoît Maunit, 12ème Congrès de l'Association Francophone des Sciences Séparatives, Paris, 28-30 mars 2017.

Communications par affiche :

"What is the interest of a TLC@MALDI-TOFMS coupling for the characterization of carbohydrates in plant extracts ?"

Justine Ferey, David Da Silva, Pierre Lafite, Richard Daniellou, Benoit Maunit, Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique « SMAP », Ajaccio, 15-18 septembre 2015.

"How the mass spectrometry can be revealed as a powerful technique in the study of promising antiretroviral molecules"

Justine Ferey, David Da Silva, Cyril Colas, Pierre Lafite, Vincent Roy, Luigi A. Agrofoglio, Richard Daniellou, Benoît Maunit, 33èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Bordeaux, 27-30 septembre 2016.

"Exploration by UHPLC-HRMS of the enzymatic phosphorylation of pyrimidine nucleotides"

Justine Ferey, David Da Silva, Cyril Colas, Pierre Lafite, Vincent Roy, Luigi A. Agrofoglio, Richard Daniellou, Benoît Maunit, 12ème Congrès de l'Association Francophone des Sciences Séparatives, Paris, 28-30 mars 2017.

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

APTES : (3-aminopropyl)triethoxysilane

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

CBH II : cellobiohydrolase

CID : Collision-Induced Dissociation

CV : Coefficient de Variation

dNKs : Déoxynucleoside Kinase

dT : 2′-Deoxythymidine

dTDP : désoxythymidine diphosphate

dTMP : Désoxythymidine Monophosphate

dTTP : Désoxythymidine Triphosphate

DHB : acide 2,5-Dihydroxybenzoïque

DIOS : Desorption/Ionization On Silicon

DNS : acide 3,5-dinitrosalicylique

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EIC : extracted Ion Chromatogramm

ENALDI : Enzyme-Coupled Nanoparticles-Assisted Laser Desorption/Ionization

ESI : Electrospray Ionization

FAC : Frontal Affinity Chromatography

FIA : Flow Injection Analysis

FID : Flame Ionization Detector

GLA : glutaraldehyde ; 1,5-pentanedial

HPTLC : High Performance Thin-Layer Chromatography

hTK1 : Thymidine Kinase 1 Humaine

hTMPK : Thymidylate Monophosphate Kinase Humaine

hNDPK : Nucleoside Diphosphate Kinase Humaine

HRMS : High Resolution Mass Spectrometry

IF/IH : Ion Fading/Ion Hunting

IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

L-DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine

LD : Limite de Détection

LQ : Limite de Quantification

MALDI : Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization Mass Spectroemtry

MPs : Magnetic Nanoparticles

MS : Mass Spectrometry

m/z : ration masse/charge

NADH : Nicotinamide Adenine Dinucléotide

NDPK : Nucléoside Diphosphate Kinase

NMPK : Nucléoside Monophosphate Kinase

NU-DP : Nucléotide Diphosphate

NU-MP : Nucléotide Monophosphate

NU-TP : Nucléotide Triphosphate

RMN : Resonnance Magnetique Nucleaire

TLC : Thin-Layer Chromatography

TOF : Time Of Flight

SALDI : Surface Assisted Laser Desorption/Ionization

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

UTLC : Ultra-High Performance Thin-Layer Chromatography

vvTMPK : Thymidylate Monophosphate Kinase du Virus de la Vaccine

Sommaire général

INTRODUCTION GENERALE **1**

CHAPITRE I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE **7**

1. Description des interactions enzymes-ligands *11*

1.1. Interactions enzymes-inhibiteurs 11

1.2. Interactions enzymes-substrats 13

2. Etudes de caractérisations enzymatiques *14*

2.1. Description des cinétiques enzymatiques 14

2.2. Différents modes de représentation pour la détermination des paramètres cinétiques (K_M, V_{max}, k_{cat}) 15

2.3. Détermination des vitesses initiales : exemple de cas de courbes de Michaelis-Menten 16

3. Techniques de criblage d'interactions enzymes-ligands par spectrométrie de masse *18*

3.1. Réaction in-situ par Chromatography sur Couche Mince ou "Thin-Layer Chromatography" : TLC-Bioautography 19

3.2. Détection d'agents antimicrobiens 20

3.3. Etude d'interactions par infusion directe 26

3.4. Etude d'interactions par infusion continue 27

3.5. Etude des interactions par le suivi des intensités d'ions par MALDI-TOFMS 30

3.6. Etude d'interactions on-line par Chromatographie d'Affinité Frontale (FAC) 35

4. Les stratégies d'immobilisations enzymatiques *39*

4.1. Immobilisation par adsorption 40

4.2. Immobilisation par piégeage 44

4.3. Immobilisation par réticulation intra-moléculaire 46

4.4. Immobilisation par liaison covalente 47

5. Description des techniques utilisées *51*

5.1. Chromatographie sur Couche Mince ou Thin-Layer Chromatography 51

5.2. Concepts généraux 51

5.3. Principe de la Thin-Layer Chromatography 52

5.4. Etude de séparation des sucres par Thin-Layer Chromatography 58

6. Références *79*

7. Table des figures *85*

8. Table des tableaux *87*

CHAPITRE II. CRIBLAGE DE SUBSTRATS PRESENTS DANS DES EXTRAITS DE PLANTES **89**

PARTIE I. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE **93**

1. Contexte de l'étude *93*

1.1. Objectifs de l'étude 93

1.2. Description de l'enzyme invertase 95

1.3. Test d'activité colorimétrique par détection indirecte à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) 97

1.4. Analyses des sucres 99

1.5. Introduction aux couplages TLC-MS pour l'analyse des sucres 101

1.6. Validation de méthode de séparation et de quantification du saccharose, du glucose et du fructose 102

1.7. Analyse de sucres par TLC-MALDI-TOFMS 112

2. Mise en place d'une étude de caractérisation d'activité de l'invertase par TLC-UV *116*

2.1. Principe de l'étude 116

2.2. Méthode TLC 117
2.3. Courbes d'étalonnages 117
2.4. Essais enzymatiques : linéarité 118
2.5. Essais enzymatiques : la détermination des paramètres cinétiques 120
2.6. Hydrolyse de substrats alternatifs 123
PARTIE II. DEVELOPPEMENT D'UNE PREUVE DE CONCEPT DE SUIVI DE CONVERSION ENZYMATIQUE : LE CRIBLAGE DE SUBSTRATS DE L'INVERTASE AU SEIN D'EXTRAITS DE PLANTES PAR TLC-MALDI TOFMS 127
1. Préparation des extraits de plantes 129
2. Protocole des essais enzymatiques 129
3. Méthode de TLC-(UV)-MALDI TOFMS 129
4. Résultats et discussions 129
PARTIE III. OUVERTURE A L'APPLICATION DE LA PREUVE DE CONCEPT : ETUDE DE L'ENZYME CELLOBIOHYDROLASE II 139
1. Détection de l'inhibition du D-cellobiose par les méthodologies d'Ion Fading et d'Ion Hunting par MALDI-TOFMS 140
1.1. Synthèse des nanoparticules magnétiques 140
1.2. Fonctionnalisation des nanoparticules 140
1.3. Immobilisation de l'enzyme CBH II sur billes magnétiques 141
1.4. Expériences d'Ion Fading et d'Ion Hunting 141
2. Etude simultanée des interactions enzyme-substrat et enzyme-inhibiteur du maltohexaose et du D-cellobiose par TLC-ENALDI 144
CONCLUSIONS 148
REFERENCES 151
TABLE DES FIGURES 153
TABLE DES TABLEAUX 155

CHAPITRE III. ÉTUDE DE PHOSPHORYLATION DE NUCLEOSIDES PYRIMIDIQUES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION 157

PARTIE I. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE 161
1. Contexte de l'étude 161
1.1. Objectifs de l'étude 161
1.2. Analogues de nucléosides comme agents antiviraux 162
1.3. Voie d'activation des analogues de nucléosides 163
1.4. Test d'activité des kinases par spectrophotométrie : « détection indirecte » 173
1.5. Exemples d'autres méthodologies de mesure d'activité : « détection directe » 174
1.6. Description des enzymes étudiées dans ce travail 176
1.7. La production et la purification de l'enzyme hTMPK 181
2. Mise en place d'une étude de caractérisation d'activité des kinases par FIA-HRMS 185
2.1. Optimisation des conditions opératoires 187
3. Etude de la faisabilité de la caractérisation de l'activité de l'enzyme hTMPK par FIA-HRMS 193
3.1. Caractérisation par FIA-HRMS 194
3.2. Droite d'étalonnage 194
3.3. Test d'activité enzymatique- linéarité 195
3.4. Détermination des paramètres cinétiques : étude de Michaelis-Menten 196

3.5. Caractérisation par spectrophotométrie UV 199
3.6. Caractérisation par électrophorèse capillaire-UV (EC-UV) 201
3.7. Caractérisation des enzymes libres hTK1 et hNDPK 202
3.8. Etude d'activité des lots d'enzymes immobilisées par FIA-HRMS 207
4. Conclusion 210
PARTIE II. DEVELOPPEMENT DE PREUVES DE CONCEPTS DU SUIVI DE CASCADES DE CONVERSIONS ENZYMATIQUES 213
1. Etude off-line de la cascade de phosphorylation par Injection en Flux continu couplé à la Spectrométrie de Masse Haute résolution (FIA-HRMS) 213
1.1. Etude des réactions individuelles 214
1.2. Etude de la cascade de phosphorylation 219
1.3. Conclusion 222
2. Etude on-line de la cascade enzymatique par Chromatographie d'Affinité Frontale couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution (FAC-HRMS). 223
2.1. Principe de la méthodologie FAC-HRMS pour le suivi de cascade de phosphorylation 224
2.2. Optimisations du système FAC 225
2.3. Etude d'activité, d'efficacité de conversion et de stabilité des bioréacteurs hTMPK et hNDPK 231
2.4. Etude de la cascade on-line de phosphorylation 238
PARTIE III. APPLICATION DES PREUVES DE CONCEPT DE FIA-HRMS ET FAC-HRMS POUR L'ETUDE DE SPECIFICITE DE CONVERSION DE NUCLEOTIDES PHOSPHONATES ACYCLIQUES AU REGARD DE L'ENZYME TMPK DE SOUCHES HUMAINE ET VIRALE 241
1. Contexte de l'étude : l'importance de la spécificité pour la recherche de nouveaux agents antiviraux . 241
1.1. Virus de la vaccine 242
1.2. Molécules actives spécifiquement à l'enzyme hTMPK 242
1.3. Production et la caractérisation de l'enzyme TMPK virale (vvTMPK) 243
2. Etude de la spécificité par analyse en mode off-line par FIA-HRMS 245
3. Etude de la spécificité par analyse on-line par FAC-HRMS 249
4. Etudes complémentaires : analyse d'un mélange de substrat en FAC-HRMS 255
CONCLUSIONS 257
REFERENCES 259
TABLE DES FIGURES 262
TABLE DES TABLEAUX 266
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 269
ANNEXES 275

Introduction générale

Les enzymes sont largement utilisées dans de nombreuses applications industrielles, allant du blanchiment biologique du papier, à la fabrication de bio-fuels ou bioplastiques, en passant par la chimie fine pour les réactions de synthèse. Celles-ci, de par leur interaction spécifique au regard d'un ligand, régissent entre autre du fonctionnement de toutes cellules et organismes vivants qui requièrent des réactions chimiques multiples et coordonnées. Les réactions chimiques ou biologiques, au plan industriel, catalysées par voies enzymatiques, présentent de nombreux avantages comme une réduction du temps de production, une diminution de déchets ainsi qu'une réduction du nombre d'étapes de synthèse. Une meilleure compréhension mécanistique de ces réactions permet d'en faire des procédés très compétitifs. Ces interactions assurent une multitude de fonctions au sein des cellules et des tissus biologiques, agissant comme par exemple de catalyseurs, de transporteurs, de récepteurs membranaires, ou encore d'initiateurs de la réplication de l'ADN. Leur diversité d'actions en fait des cibles biologiques de recherche privilégiées dans les domaines d'applications variés tels que la cosmétique, l'agroalimentaire, l'énergie et la thérapie. Dans ce contexte, ces enzymes peuvent intervenir dans le blocage de radicaux libres et protègent donc contre le vieillissement de la peau, ou jouer un rôle majeur dans la signalisation cellulaire en aval des facteurs de croissance telles que les tyrosines kinases.

Par conséquent, certaines enzymes font l'objet d'études approfondies dans le cadre de la recherche de candidats médicamenteux.

De nombreuses approches méthodologiques ont été développées ces dernières années afin d'étudier les interactions enzymes-ligands. Ces dernières peuvent être classées selon deux catégories : les méthodes séparatives et non séparatives. Elles présentent une grande diversité en termes de techniques et de méthodologies employées.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la démarche de proposer des développements méthodologiques basés sur une détection par spectrométrie de masse, permettant l'étude rapide et sensible d'interactions enzymes-ligands. Ces développements méthodologiques seront ici illustrés autour de différents domaines d'applications et d'enzymes cibles. Ce manuscrit s'articulera autour de trois chapitres dont deux chapitres résultats qui seront décomposés en trois parties, de la manière suivante :

- présentation d'un développement méthodologique de caractérisation, par une approche directe, des constantes enzymatiques des enzymes étudiées,
- présentation de ce développement pour la mesure directe d'interactions enzymes-ligands,
- l'application de cette méthodologie afin de répondre à une problématique actuelle.

Le chapitre I de ce manuscrit est consacré à l'étude bibliographique, réalisée dans le domaine de suivi d'interactions enzymes-ligands par spectrométrie de masse. Une première partie abordera les notions d'interactions enzymes-inhibiteurs et enzymes-substrats ainsi que la détermination des paramètres cinétiques enzymatiques (K_M, V_{max} et k_{cat}). Nous proposerons alors une description bibliographique non exhaustive des approches, basées en spectrométrie de masse, présentées dans la littérature pour le suivi de ces interactions. Ces méthodologies étant, pour certaines d'entre elles, basées sur l'utilisation d'enzymes immobilisées, nous aborderons ensuite les différents types d'immobilisations d'enzymes

décrits dans la littérature. Enfin, nous présenterons les différentes techniques TLC-MALDI TOFMS et FIA/FAC-ESI-QTOF-MS (Flow Injection Analysis/Frontal Affinity Chromatography-Electrospray Ionization- Quadrupole Time Of Flight-Mass Spectrometry) utilisées dans le cadre de nos travaux.

Le chapitre II de ce manuscrit, réalisé en collaboration avec l'équipe « GlycoBio&Chimie », est axé sur la mise en place d'une méthode de criblage de substrats de l'invertase par un couplage de la Chromatographie sur Couche Mince (Thin-Layer Chromatography, TLC) à une détection par Désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à un temps de vol (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight, MALDI-TOF).

Le suivi des réactions de l'invertase est essentiellement basé sur une approche spectrophotométrique, ne permettant pas une détection spécifique de substrats et de produits au sein de matrices complexes. C'est dans ce contexte que ce couplage a permis l'étude rapide, simultanée et spécifiques de substrats et de leurs produits de réactions dans trois extraits de plantes modèles (extrait de réglisse, LV 1784 et mangoustan).

La première partie de ce chapitre II concerne le développement d'une étude de caractérisation de l'enzyme invertase par TLC-UV, selon le modèle de Michaelis-Menten. Ce développement a nécessité au préalable une validation de méthode par TLC-UV pour la séparation et la quantification des sucres d'intérêts : le saccharose, le glucose et le fructose.

A l'issue de cette étude, nous avons, dans une deuxième partie, présenté les différentes optimisations mises en œuvre pour combiner une approche différentielle TLC-UV avec une analyse directe des sucres séparés par TLC-MALDI-TOFMS pour le criblage de substrats de l'invertase en milieu complexe.

La troisième et dernière partie de ce chapitre portera sur l'ouverture de ce développement au cas d'une autre hydrolase : la cellobiohydrolase II (CBH II). Cette étude a été réalisée en collaboration avec une entreprise spécialisée dans la valorisation de la biomasse. Dans le cadre de cette preuve de concept, l'étude d'interactions enzymes-ligands a porté sur l'identification du D-cellobiose comme inhibiteur de la CBH II et non dans l'identification de substrats. Ce travail introduira le développement d'une méthodologie TLC couplée aux approches Ion Fading et Ion Hunting pour l'étude simultanée du comportement inhibiteur du D-cellobiose et substrat d'un oligoglucose. Ces approches sont respectivement basées sur une disparition et une pré-concentration de l'inhibiteur en solution, au moyen de l'utilisation de la cellobiohydrolase II immobilisée.

Le chapitre III de ce manuscrit repose sur la mise en place d'une méthodologie permettant d'évaluer le potentiel de suivi de phosphorylation en cascade d'analogues de nucléosides. Ces travaux s'intègrent dans le projet mené par l'équipe « Hétérocycles, Nucléosides et Agents d'imagerie » dont la recherche se focalise sur la synthèse de nouveaux antiviraux de type nucléosides phosphonates acycliques. Dans ce contexte, l'apport d'une méthodologie telle que la Chromatographie d'Affinité Frontale (FAC) couplée à la spectrométrie de masse (FAC-MS) a été évalué pour deux étapes de phosphorylation. La mise en place de cette méthodologie a été réalisée à travers l'étude de conversion

de l'endogène thymidine monophosphate en thymidine triphosphate en tant que preuve de concept. Ce chapitre III s'articule autour de trois parties.

La première partie de ce chapitre III est dédié à la caractérisation des différents lots d'enzymes kinases humaines Thymidylate Monophosphate Kinase (hTMPK) et Nucléoside Diphosphate Kinase (NDPK) après immobilisation covalente sur billes de silice, et cela, par une approche off-line par FIA-HRMS. L'objectif de cette étude consiste à évaluer et à définir les conditions d'immobilisation des enzymes ainsi que les concentrations en phosphodonneur (ATP) et chelatant (Mg^{2+}) compatibles avec un suivi on-line par FAC-HRMS

A l'issue de cette étude, nous avons, dans une deuxième partie, évalué la faisabilité du suivi de la cascade de phosphorylation au moyen des enzymes immobilisées, à la fois en mode off-line (FIA-HRMS) et en mode on-line par FAC-HRMS. Cette approche dynamique par FAC a été réalisée par la mise en place de deux bioréacteurs en série, contenant les enzymes hTMPK et hNDPK, au sein d'un système (LC)-ESI-QTOF-MS, afin de suivre la conversion de l'endogène thymidine monophosphate en thymidine triphosphate grâce à la visualisation des chromatogrammes d'extractions d'ions des masses d'intérêts. Une optimisation de cette méthodologie à travers la mise en place d'un système de boucles alternatives a permis d'apporter de la versatilité avec pour objectif d'automatiser les analyses.

Enfin la troisième partie de ce chapitre III illustrera l'étude appliquée par FIA et FAC-HRMS de la spécificité des réactions de deux nucléotides phosphonates acycliques, envers une souche enzymatique humaine ou virale. La connaissance de la spécificité de la réaction de nucléotides envers ces deux souches est primordiale dans le cadre de la recherche de nouveaux agents antiviraux dans les maladies telles que l'Herpès ou bien encore le VIH. Par conséquent, la transposition de ces méthodes pour l'étude de la spécificité de deux nucléotides phosphonates acycliques à l'égard de l'enzyme TMPK de souche humaine et virale a été effectuée.

◇◇◇

CHAPITRE I. Étude bibliographique

SOMMAIRE

CHAPITRE I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... 7

1. Description des interactions enzymes-ligands..... 11

1.1. Interactions enzymes-inhibiteurs..... 11

1.2. Interactions enzymes-substrats..... 13

2. Etudes de caractérisations enzymatiques..... 14

2.1. Description des cinétiques enzymatiques..... 14

2.2. Différents modes de représentation pour la détermination des paramètres cinétiques (K_M, V_{max}, k_{cat})..... 15

2.3. Détermination des vitesses initiales : exemple de cas de courbes de Michaelis-Menten..... 16

3. Techniques de criblage d'interactions enzymes-ligands par spectrométrie de masse..... 18

3.1. Réaction in-situ par Chromatography sur Couche Mince ou "Thin-Layer Chromatography" : TLC-Bioautography..... 19

3.2. Détection d'agents antimicrobiens..... 20

3.2.1. Détection d'antioxydants..... 21

3.2.2. Détection d'inhibition d'enzyme : cas de l'enzyme tyrosinase..... 22

3.2.3. Couplage de la TLC-Bioautography avec une détection en spectrométrie de masse..... 22

3.3. Etude d'interactions par infusion directe..... 26

3.3.1. Injections post-réactionnelles, « expérience à temps fixe »..... 26

3.3.2. Injections de suivi réactionnel, « expérience à temps variable »..... 26

3.4. Etude d'interactions par infusion continue..... 27

3.5. Etude des interactions par le suivi des intensités d'ions par MALDI-TOFMS..... 30

3.5.1. Etude en enzymes libres..... 30

3.5.2. Enzymes immobilisées..... 31

3.6. Etude d'interactions on-line par Chromatographie d'Affinité Frontale (FAC)..... 35

3.6.1. Chromatographie d'Affinité Frontale : étude des interactions enzymes-substrats..... 36

3.6.2. Chromatographie d'affinité frontale : interactions enzymes-inhibiteurs..... 37

4. Les stratégies d'immobilisations enzymatiques..... 39

4.1. Immobilisation par adsorption..... 40

4.1.1. Exemple de l'immobilisation par adsorption via des interactions spécifiques avidin-biotin..... 43

4.2. Immobilisation par piégeage..... 44

4.2.1. Principe du piégeage..... 44

4.2.2. Immobilisation par encapsulation..... 44

4.3. Immobilisation par réticulation intra-moléculaire..... 46

4.4. Immobilisation par liaison covalente..... 47

5. Description des techniques utilisées..... 51

5.1. Chromatographie sur Couche Mince ou Thin-Layer Chromatography..... 51

5.2. Concepts généraux..... 51

5.3. Principe de la Thin-Layer Chromatography..... 52

5.3.1. Protocole d'analyse par Thin-Layer Chromatography..... 54

5.3.2. Choix de la phase stationnaire..... 54

5.3.3. Optimisation de la séparation en TLC par imprégnation de la plaque dans une solution tampon..... 55

5.3.4. Dépôt des échantillons sur plaque TLC..... 55

5.3.5. Choix de la phase mobile..... 56

5.3.6. Dérivation 57
5.3.7. Détection par densitométrie 57
5.4. Etude de séparation des sucres par Thin-Layer Chromatography 58
5.4.1. Détection des sucres 64
5.4.2. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry 66
5.4.3. Analyseur à temps de vol (TOF) 71
5.4.4. Source par ionisation électrospray 73
5.4.5. Description du spectromètre de masse BrukermaXis UHR-Qq-TOF 76
6. Références 79
7. Table des figures 85
8. Table des tableaux 87

Préalablement à la description des différents développements et optimisations mis en place au cours de ce projet de recherche, il convient de présenter et de dresser un état de l'art des différentes notions et méthodologies utilisées dans ce manuscrit. De ce fait, ce chapitre se composera de quatre volets d'études. Le premier volet introduira les différentes notions d'interactions enzymes-ligands (inhibiteurs et substrats) utilisées lors de ce travail de thèse. Les notions de caractérisations enzymatiques, mises en jeu dans les premières parties des chapitres II et III pour la détermination des paramètres cinétiques enzymatiques, seront illustrées. Cette caractérisation se focalisera sur le modèle de cinétique de Michaelis-Menten qui sera par la suite appliquée pour l'étude des enzymes d'intérêts. Le deuxième volet dressera un état de l'art des méthodologies, basées en spectrométrie de masse, pour l'étude d'interactions enzymes-ligands. Il ciblera en particulier les approches et les techniques qui seront par la suite développées au cours des chapitres II et III. Les notions d'immobilisations d'enzymes, introduites dans notre développement au sein du chapitre III, feront l'objet d'une description succincte à travers la présentation des méthodes d'immobilisations existantes relatées dans la littérature. Enfin, nous décrirons dans le dernier volet, l'ensemble des techniques, basées sur la spectrométrie de masse, appliquées dans le cadre de ce projet, à savoir : la Chromatographie sur Couche Mince ou Thin-Layer Chromatography, le système (LC)-ESI-QTOF-MS et pour finir le MALDI TOFMS.

1. Description des interactions enzymes-ligands

Les interactions enzymes-ligands sont régies par l'existence de différents types d'activités des ligands : inhibiteurs ou substrats. Bien qu'une ouverture à l'étude d'interactions enzymes-inhibiteurs soit proposée au sein du chapitre II, ce projet de thèse s'articulera principalement autour du développement de méthodes, basées en spectrométrie de masse, pour les études d'interactions enzymes-substrats. De ce fait, préalablement à la description de l'état de l'art des méthodologies pour le criblage d'interactions enzymes-substrats et enzymes-inhibiteurs, il convient d'introduire et de décrire ces deux notions d'interactions. Selon le type de ligands, les mécanismes d'interactions mis en jeu ne seront pas les mêmes.

1.1. Interactions enzymes-inhibiteurs

Un inhibiteur est une molécule qui, de par ses interactions avec une enzyme, peut engendrer une baisse d'activité de l'enzyme. Les inhibiteurs enzymatiques sont classés en deux grandes catégories :

- <u>réversibles</u> : se lient de façon non-covalente avec l'enzyme. Il en résulte différents types d'inhibitions (compétitives, non-compétitives, in-compétitives et mixtes) [1]. Leur mécanisme d'action est présenté en Figure I-1.
- <u>irréversibles</u> : l'inhibiteur se lie de façon covalente à l'enzyme suite à une réaction chimique. [1].

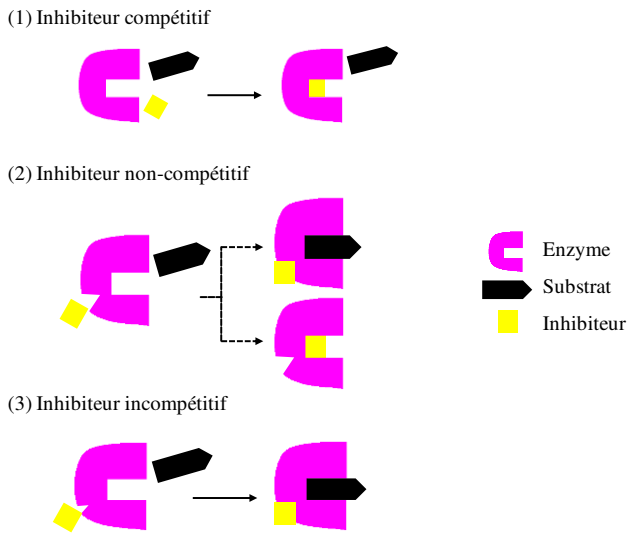


Figure I-1- Représentation des différents types d'inhibitions en fonction des interactions enzymes-inhibiteurs et enzymes-substrats.

Les inhibiteurs **compétitifs** (1) se lient au site actif de l'enzyme (E) sous sa forme libre (non complexée avec un substrat), empêchant la formation du complexe enzyme-substrat (ES). Ainsi, du fait de la compétition d'accès au site actif entre l'inhibiteur et le substrat, l'affinité de l'enzyme pour ce dit substrat diminue. Bien que ce phénomène engendre une augmentation de la valeur de la constante d'affinité K_M, la valeur de la vitesse maximale de conversion (V_{max}) ne varie pas. A fortes concentrations en substrat, le phénomène de compétition entre le substrat et l'inhibiteur devient alors négligeable.

Un inhibiteur **non-compétitif** (2) présente une affinité similaire pour le site actif de l'enzyme sous sa forme libre (E) et/ou pour le complexe enzyme-substrat (ES). Ce type d'inhibiteur se lie à l'enzyme sans bloquer significativement l'accès du substrat. Ainsi, l'affinité de l'enzyme pour le substrat n'est pas altérée par la présence de ce type d'inhibiteur. En revanche, la vitesse maximale de conversion (V_{max}) diminue.

Les inhibiteurs **in compétitifs** (3) se lient seulement au complexe enzyme-substrat (ES). Les interactions entre le site actif de l'enzyme et le substrat induisent un changement conformationnel de l'enzyme, propice aux interactions enzymes-inhibiteurs.

Les inhibiteurs **mixtes** se lient à la fois au site actif de l'enzyme sous forme libre (E) ainsi qu'au complexe enzyme-substrat (ES), bloquant partiellement l'accès du substrat au site actif.

L'évaluation de la force inhibitrice d'un ligand est généralement exprimée par la valeur IC_{50} appelée concentration inhibitrice médiane. Cette valeur correspond à la concentration de l'inhibiteur pour laquelle l'activité de l'enzyme est diminuée de moitié dans des conditions données (Figure I-2). Elle est particulièrement employée dans le cadre de la recherche de nouveaux candidats médicamenteux pour la mesure de l'efficacité d'un médicament antagoniste. Une molécule candidate sera d'autant plus active que sa concentration requise pour l'inhibition d'une fonction biologique sera faible. Il en résulte que l'efficacité de candidats médicamenteux est évaluée par comparaison de ces valeurs [2, 3].

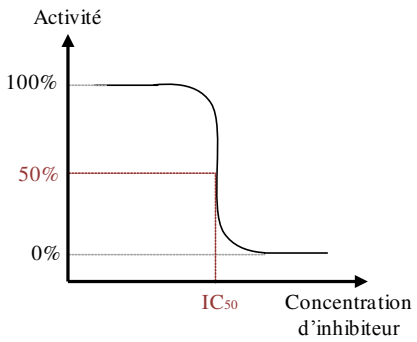


Figure I-2- Détermination graphique de la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) par représentation de l'efficacité de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en substrat.

1.2. Interactions enzymes-substrats

Dans le cadre du suivi d'interactions enzymes-substrats, les mécanismes d'interactions diffèrent de ceux présentés précédemment pour les inhibiteurs. Leur étude sera alors abordée différemment.

Un substrat enzymatique est défini comme une molécule interagissant avec le site actif d'une enzyme pour subir une réaction chimique. A l'issue de cette réaction catalysée par l'enzyme, le substrat enzymatique est converti en produit. L'étude des propriétés cinétiques et catalytiques enzymatiques a été introduite au début du XXème siècle par les travaux de deux biologistes allemand et canadien, Léonor Michaelis et Maud Leonora Menten. En 1913 est parue la publication de la célèbre étude de Michaelis-Menten dans laquelle ont été étudiées les cinétiques enzymatiques d'interactions enzymes-substrats. La formation d'un complexe transitoire enzyme-substrat durant la conversion d'un substrat catalysée par voie enzymatique, a été postulée dans leurs travaux. Cette étude a exposé une relation de proportionnalité entre le taux et la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat dans le milieu [4].

Il a donc été montré que la vitesse réactionnelle augmente avec la concentration en substrat pour atteindre un palier de conversion, nommé vitesse maximale de conversion V_{max}. Un modèle simple de cinétique pour la réaction observée a alors été proposé. Dans ce modèle, l'enzyme (E) se lie avec le substrat (S) pour former ce dit complexe enzyme-substrat (ES). Celui-ci peut alors soit se dissocier à nouveau en E et S ou alors poursuivre la réaction pour former le(s) produit(s) (P) selon l'équation suivante :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$

Avec :

- *k_1 : constante d'association E + S*
- *k_{-1} : constante de dissociation du complexe ES*
- *k_2 : constante de réaction de ES en E + P*
- *k_{-2} : constante d'association E + P*

Cet équilibre de réaction est régi par l'affinité de l'enzyme pour le substrat d'intérêt ainsi que par la vitesse de conversion du substrat en produit. Pour toute étude d'interactions enzymes-substrats, il est indispensable d'évaluer l'activité enzymatique à savoir :

- l'affinité de l'enzyme pour un substrat donné (K_M),
- la vitesse de réaction enzymatique (V_{max}).

La détermination des constantes cinétiques reflète un aspect important des développements qui seront introduits dans ce manuscrit. En effet, dans le cadre de la mise en place de développements méthodologiques de criblages d'interactions enzymatiques, la fiabilité de ces méthodes ne peut être définie que par une connaissance précise de l'activité des lots d'enzymes employés. Par ailleurs, plusieurs de nos développements seront basés sur la méthodologie de l'enzyme immobilisée. De la même manière, les lots immobilisés nécessiteront une caractérisation enzymatique propre, de façon à estimer l'impact de cette approche. Par conséquent, nous introduirons dans le paragraphe ci-après les notions de caractérisations enzymatiques.

2. Etudes de caractérisations enzymatiques

2.1. Description des cinétiques enzymatiques

Dans le cadre de la caractérisation enzymatique, L. Michaelis et M. L.Menten ont développé, en 1913, une équation permettant de décrire une cinétique enzymatique. Cette équation regroupe différentes constantes cinétiques représentatives de l'activité enzymatique dont les valeurs peuvent être déterminées expérimentalement.

L'équation de Michaelis-Menten vise à établir une expression de la vitesse de réaction initiale $V_i = \frac{d[P]}{dt}$ en fonction de grandeurs mesurées ou fixées par l'expérimentation. Cette expérience exige plusieurs conditions :

- la concentration en substrat [S] doit être très largement supérieure à la concentration totale en enzymes,
- l'absence ou la quasi-absence de produit de réaction (P).

Cette dernière condition est obtenue en réalisant les mesures suffisamment rapidement pour que la quantité de substrat transformé en produit soit faible. Ces conditions engendrent :

- une vitesse d'apparition du complexe (ES) par association (E) + (P) (constante k_{-2}) négligeable,
- un équilibre des concentrations entre [E], [S] et [ES] très rapide. Une fois l'équilibre atteint, la concentration en complexe [ES] reste constante tant que [P] reste négligeable ($\frac{d[ES]}{dt} = 0$),
- la concentration maximale en complexe [ES] doit être toujours négligeable par rapport à la concentration initiale $[S]_0$. Or sachant que $[S] = [S]_0 - [ES]$, si [ES] est négligeable face à $[S]_0$ alors $[S]=[S]_0$.

2.2. Différents modes de représentation pour la détermination des paramètres cinétiques (K_M, V_{max}, k_{cat})

Il existe différentes représentations de l'activité enzymatique, à savoir, la courbe de Michaelis-Menten et ses représentations linéaires nommées Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee et Hanes-Woolf [5]. Ces représentations ont pour vocation à linéariser les résultats, permettant d'améliorer, par extrapolation, la précision de la détermination graphique des deux constantes cinétiques majeures que sont K_M et V_{max}.

Les différentes représentations de ces extrapolations sont présentées en Figure I-3.

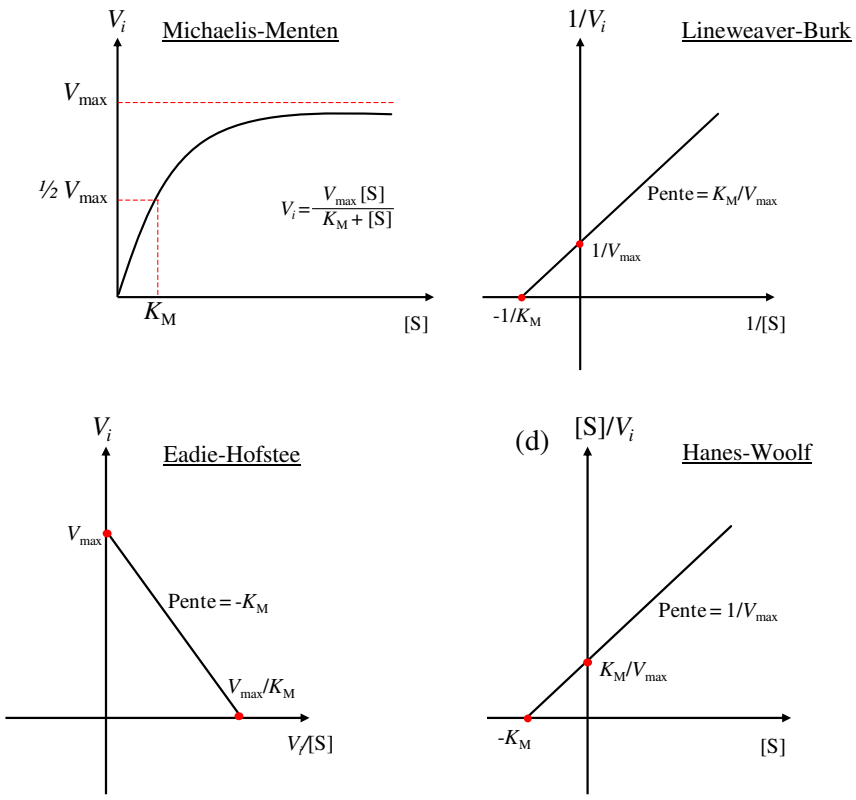


Figure I-3- Vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat pour une réaction catalysée par voie enzymatique, suivant les modèles de Michaelis-Menten, de Lineweaver-Burk, d'Eadie-Hofstee et de Hanes-Woolf.

Les modèles de Lineweaver-Burk [6] et d'Eadie-Hofstee [7, 8] sont décrits comme des représentations plus précises du modèle de Michaelis-Menten. Les constantes d'activité de l'enzyme sont déterminées par la représentation des inverses $1/V_i$ et 1/[S].

Les points expérimentaux présentant les plus grandes incertitudes sont les points de plus faibles concentrations en substrat. La représentation en inverse permet de concentrer dans la même région, proche de l'axe des ordonnées, les points les plus fiables (à fortes concentrations en substrat). Cette représentation offre un meilleur tracé de la droite ainsi qu'une plus haute précision dans la détermination des valeurs des constantes K_M et V_{max}. Contrairement à ces deux représentations, celle de Hanes-Woolf [9, 10] ne présente qu'un seul axe transformé (axe des ordonnées en $[S]/V_i$). De ce fait, ce modèle limite la propagation des erreurs de mesures.

L'ensemble de ces représentations permet de définir, par extrapolation, les valeurs des différentes constantes cinétiques caractérisant une réaction enzymatique :

- la constante d'affinité K_M (µM) : constante de Michaelis-Menten, indicatrice de l'affinité de l'enzyme pour un substrat donné. Elle correspond à la valeur de la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale. Plus cette valeur est élevée et moins le substrat présente d'affinité pour le site actif de l'enzyme.
- la vitesse maximale de réaction V_{max} (µM/min) : vitesse maximale de conversion pour des valeurs de concentrations saturantes en substrat.
- la constante catalytique k_{cat} (s^{-1}) : nommée « turnover number ». Elle correspond au nombre de moles de substrat converti par mole d'enzyme par unité de temps (ratio V_{max}/[E]).

Ces valeurs seront déterminées dans le cadre de la caractérisation des enzymes invertase et kinases respectivement dans les chapitres II et III de ce manuscrit. Par conséquent, le paragraphe suivant décrira la méthodologie adoptée pour la détermination de ces valeurs.

2.3. Détermination des vitesses initiales : exemple de cas de courbes de Michaelis-Menten

Dans le contexte de nos travaux, la détermination des paramètres cinétiques est réalisée par extrapolation de la courbe de Michaelis-Menten. Ce type de représentation a été choisi en accord avec nos collègues biologistes, dont le modèle est préférablement utilisé. De ce fait, la détermination des vitesses initiales est présentée dans cette partie pour l'étude de cas d'une courbe de Michaelis-Menten. Il est à noter que les trois autres extrapolations présentées précédemment sont des représentations linéaires qui reposent sur le même principe de réalisation.

L'équation de Michaelis-Menten exprime la vitesse initiale d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat dans le milieu réactionnel. Cette vitesse, nommée V_i, est définie comme étant la quantité de substrat consommée par unité de temps ou la quantité de produit formée selon l'équation suivante :

$$V_i = \frac{-d(S)}{d(t)} = \frac{d(P)}{d(t)}$$

Ainsi, V_i est déterminée par mesure quantitative du substrat consommé [S] ou du produit formé [P] à différents temps de réaction. Les vitesses initiales de réaction, pour chaque concentration en substrat, sont déterminées par le tracé de la courbe de la concentration en produit en fonction du temps. Ces vitesses initiales sont représentées par la partie linéaire de ces courbes. La courbe de Michaelis-Menten peut être réalisée selon deux procédés schématisés en Figure I-4 :

- l'expérience à temps fixe : détermination de la zone de linéarité (T_l) pour la plus faible concentration en substrat $[S]_0$, à une concentration d'enzyme fixée [E]. Les réactions sont effectuées à différentes concentrations en substrats ($[S] > [S]_0$) pour un temps fixé dans la zone

de linéarité ($T < T_l$). La concentration en produit, déterminée pour chaque concentration de substrat, permettra de calculer la vitesse initiale.

- l'expérience à temps variable : détermination des vitesses initiales (V_i) par mesure de la pente de la zone linéaire des cinétiques d'apparition des produits, pour différentes concentrations de substrats, à une concentration d'enzyme fixée [E].

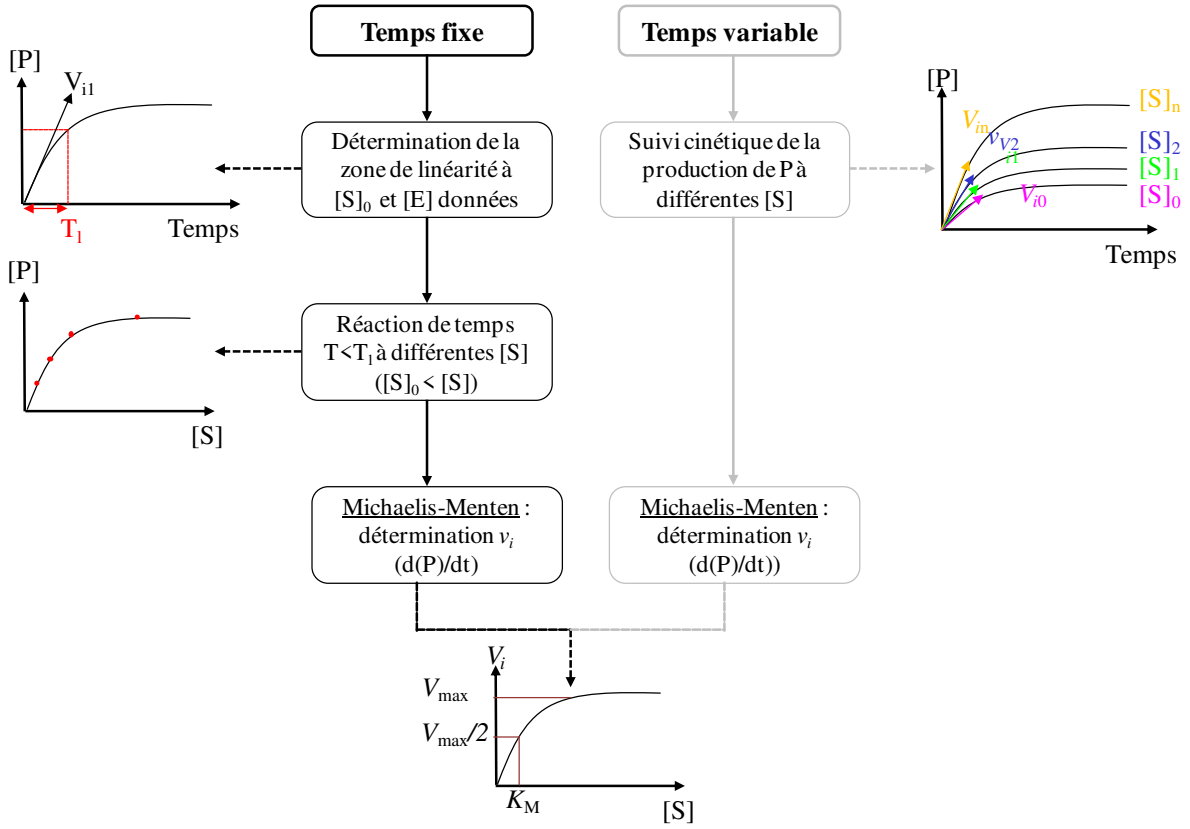


Figure I-4- Protocoles de réalisation d'une courbe de Michaelis-Menten à temps fixe et à temps variable.

Cette caractérisation enzymatique, par détermination des paramètres cinétiques, est cruciale pour l'étude de l'activité enzymatique. Après production enzymatique et avant utilisation de chaque enzyme, une connaissance précise de l'activité de l'enzyme est nécessaire pour la réalisation d'un criblage enzymatique fiable et précis.

Remarque : dans le cadre de notre étude, chaque enzyme libre et immobilisée a été caractérisée afin de valider leur activité dont ont dépendu nos développements méthodologiques. Cette caractérisation sera réalisée à temps fixe selon le modèle de Michaelis-Menten. De ce fait, les chapitres II et III s'articuleront de manière similaire. Dans un premier temps, les enzymes sous formes immobilisées et/ou libres ont été caractérisées afin d'évaluer la faisabilité de notre développement. Une fois les activités validées, nous avons été en mesure de décrire et de discuter des développements méthodologiques de criblage présentés.

De cette manière, les méthodes de caractérisations enzymatiques constitueront les premières parties des deux chapitres. Il est important de noter que ces méthodes ont fait l'objet de deux approches novatrices pour l'étude des enzymes d'intérêts.

Dans cette première partie de l'étude bibliographique ont été définies les notions d'interactions enzymes-inhibiteurs, enzymes-substrats ainsi que de caractérisation enzymatique. Comme il a été évoqué précédemment, la détermination des constantes cinétiques est cruciale pour la mise en place de développements méthodologiques permettant de suivre les interactions enzymes-ligands. Par conséquent, suite à l'introduction des notions de caractérisations enzymatiques, nous exposerons un état de l'art de différentes méthodologies, basées sur la détection en spectrométrie de masse, pour le suivi de ce type d'interactions.

3. Techniques de criblage d'interactions enzymes-ligands par spectrométrie de masse

De nombreux développements relatifs à l'étude d'interactions entre des molécules cibles (substrat et/ou inhibiteur) et différentes enzymes d'intérêts sont relatés dans la littérature.

Une majorité d'essais enzymatiques sont basés sur le changement de propriétés spectrophotométriques d'une solution (variation de la longueur d'onde d'absorption) lors de la conversion d'un substrat en produit [11, 12]. Le mode de détection privilégié pour ce type d'essai est la spectroscopie UV ou la fluorescence. Dans le cas où le substrat et le produit présentent des propriétés optiques similaires, la détection peut être basée sur une réaction secondaire couplée à la réaction enzymatique d'intérêt, dans laquelle un changement dans le signal optique est détectable. C'est notamment le cas du dosage d'activité des enzymes monophosphates kinases. L'activité enzymatique est suivie par apparition d'un co-facteur NAD^+ (forme oxydée de la nicotinamide adénine dinucléotide) issu de la consommation d'ATP (adénosine triphosphate) lors de la réaction [13]. Ce type d'essais enzymatiques est habituellement apprécié pour sa rapidité et sa simplicité de mise en place.

D'autres types d'études couramment employées pour le suivi d'interactions enzymes-ligands reposent sur la détection de produit marqué. Le principe de cette analyse consiste à détecter une variation d'intensité de radiation avant et après la réaction enzymatique. Cependant, la disponibilité de substrat marqué est souvent limitée et le retraitement des déchets se révèle contraignant.

La spectrométrie de masse est proposée comme une technique complémentaire dans ce domaine, dont l'intérêt grandissant découle de ses nombreuses avancées technologiques. Grâce à sa détection rapide, sensible, précise, quantitative et spécifique, ce mode de détection se révèle être une alternative adéquate aux méthodes existantes d'études d'interactions enzymes-ligands. Dans le cas de l'analyse de mélanges ou d'extraits complexes (extraits de plantes, mélanges réactionnels complexes comprenant des co-facteurs de réaction), la spectrométrie de masse présente l'avantage d'une détection spécifique et par conséquent, d'un suivi simultané de différentes molécules d'intérêts. Cette spécificité de détection offre la possibilité de s'abstenir d'une séparation chromatographique en amont.

Le volet de ce chapitre aura pour vocation à présenter succinctement différentes méthodologies de criblage d'interactions enzymes-ligands décrites dans la littérature. Les développements méthodologiques des chapitres II et III étant réalisés à l'aide de sources MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry, source d'ionisation sous vide) et ESI (Electrospray Ionization, source à pression atmosphérique) couplées à des analyseurs de type quadrupôle (Q) et

temps de vol (TOF), l'étude se focalisera sur l'utilisation de ces deux types de sources. La Figure I-5 regroupe les principales techniques (non exhaustives) couplées à une détection en spectrométrie de masse dans le cadre d'études d'interactions enzymes-ligands. Nous aborderons succinctement le principe de ces différentes méthodologies pour l'étude d'interactions enzymes-substrats et enzymes-inhibiteurs puis quelques exemples d'applications seront donnés à travers des tableaux récapitulatifs.

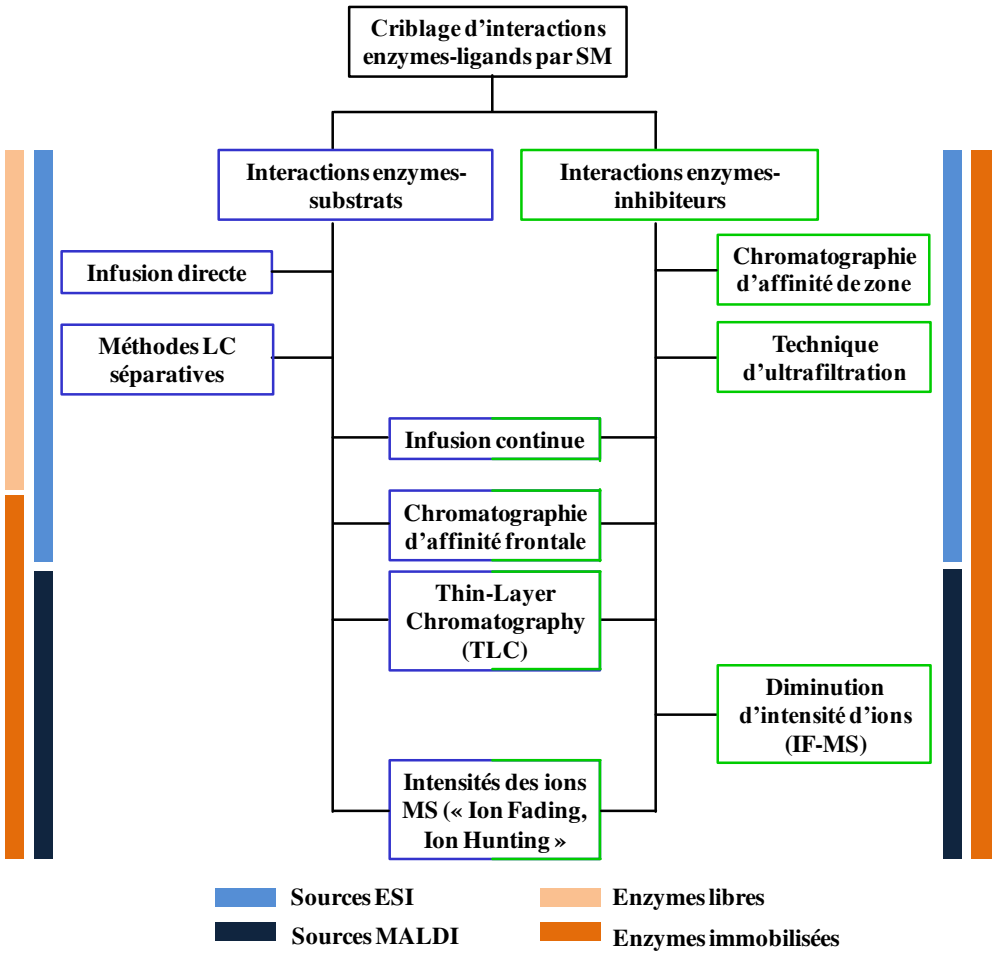


Figure I-5- Les principaux développements réalisés par Spectrométrie de Masse pour l'étude d'interactions enzymes-ligands.

3.1. Réaction in-situ par Chromatography sur Couche Mince ou "Thin-Layer Chromatography" : TLC-Bioautography

La TLC-Bioautography repose sur le couplage de la chromatographie planaire et d'une réaction biologique in-situ sur ce support. Cette technique est très utilisée pour isoler des molécules bioactives au sein de matrices complexes [14, 15]. Le couplage direct de la Thin-Layer Chromatography bioguidée à une détection en spectrométrie de masse a été montré comme une technique puissante pour la découverte de composés biologiquement actifs vis-à-vis de certaines cibles biologiques [16]. Ce couplage, simple et rapide à mettre en place, regroupe les avantages liés aux deux techniques, présentés dans le Tableau I-1.

Avantages du couplage TLC-(bioguidée)-MS	
Séparation par Thin-Layer Chromatography	**Détection par Spectrométrie de Masse**
✓ Séparation d'extraits bruts (peu de préparation d'échantillons) ✓ Temps d'analyse courts ✓ Possibilité d'analyses simultanées ✓ Résultat visuel ✓ Détection spécifique de familles moléculaires (agents de dérivation spécifiques)	✓ Spécificité de détection ✓ Sensibilité

Tableau I-1- Synthèse des avantages du couplage TLC-MS.

Le principe de cette méthodologie, présenté en Figure I-6, repose sur une séparation par TLC des extraits à analyser, suivi d'une détection biologique par application d'une solution de cibles biologiques telles que des enzymes, des agents antioxydants ou des solutions fongiques. Après réaction in-situ sur la plaque, les zones bioactives peuvent être visuellement observées avec et/ou sans étape de dérivation. Ces zones sont par la suite soit directement analysées sur plaque par couplage TLC-MS, soit recueillies et solubilisées en vue d'une analyse TLC-MS off-line (TLC préparative ou semi-préparative). Cette dimension permettra une identification voire une caractérisation rapide des molécules actives.

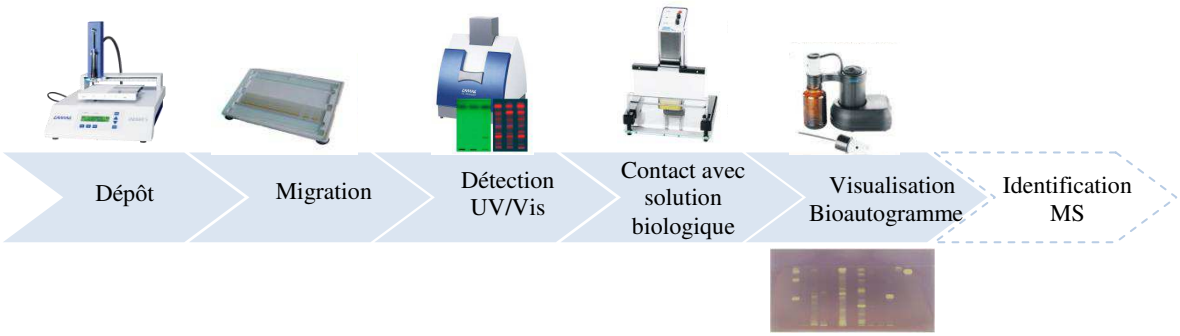


Figure I-6- Schématisation du procédé de TLC-Bioautography.

Nous aborderons dans un premier temps les méthodologies développées pour l'étude d'activité biologique par essais bioguidés en TLC avant de présenter différents exemples d'applications de couplage TLC-MS dans ce domaine.

Les premiers développements de la TLC-Bioautography datent des années 1970. A cette date, Penzes *et al.* ont mis en place une méthode de bioautography permettant la détection de composés antifongiques. De cette manière, l'effet fongicide du benomyl au regard de différentes solutions fongiques (*Ascochyata pisi*, *Fusarium culmorum, Penicillium expansum*) a été étudié [17]. Depuis, cette technique a fortement évolué, avec une utilisation généralisée pour l'analyse d'activités antibactériennes, antioxydantes et d'inhibitions d'enzymes. Nous aborderons de manière succincte les principes de ces différents types d'essais.

3.2. Détection d'agents antimicrobiens

La détection d'agents antimicrobiens par TLC-Bioautography a été développée selon trois approches présentées sur la Figure I-7. [15] :

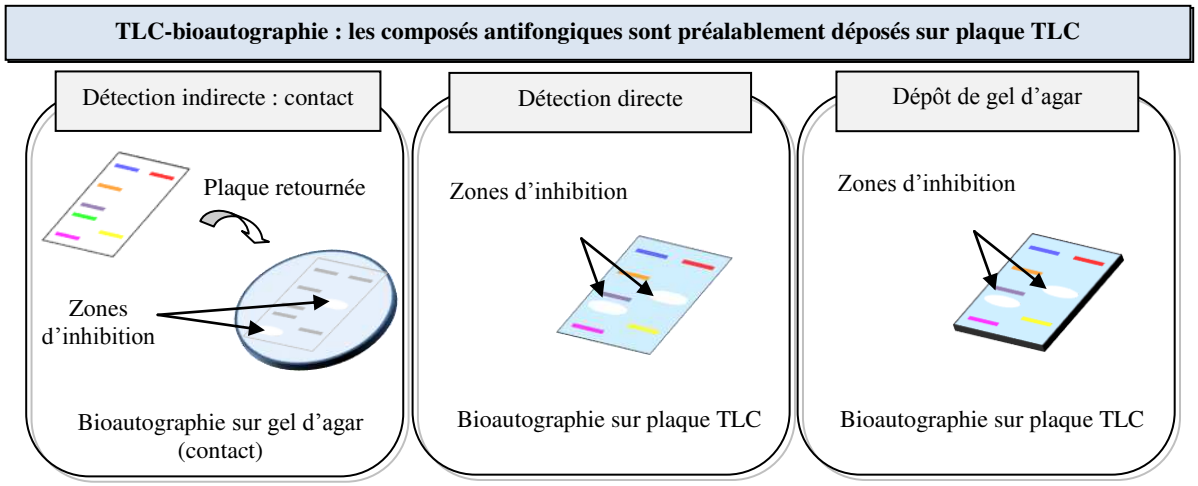


Figure I-7- Détection d'agents antimicrobiens par TLC-bioautography par détection indirecte (contact de la plaque TLC avec un gel d'agar), détection directe sur plaque TLC, recouvrement d'une solution d'agar.

- Contact de la plaque TLC avec un gel d'agar : la plaque TLC contenant les agents antifongiques est placée face contre la surface inoculatrice d'agar pendant un temps donné, permettant la diffusion des agents antimicrobiens. Après diffusion, la plaque est retirée et la surface d'agar est laissée incubée entre 16 à 24 heures. Les zones d'inhibition sont observées par détection de zones contrastées avec la surface du gel.
- Détection directe sur plaque TLC : après migration, la plaque TLC (contenant les agents antifongiques), est pulvérisée ou immergée dans une solution bactérienne ou fongique. Le bioautogramme est laissé à incuber 48 heures à 25°C sous conditions humides. Afin de visualiser les croissances bactériennes, la plaque est pulvérisée par une solution de sels de tétrazolium, convertis par les déhydrogénases des organismes vivants pour former des cristaux de formazan de couleur violette. De ce fait, les zones inhibitrices sont détectées par visualisation de spots blancs sur fond violet.
- Recouvrement ou immersion d'une solution d'agar : la plaque TLC (contenant les agents antifongiques à tester) est recouverte d'une solution d'agar. Après solidification du gel et un temps d'incubation donné, les bandes inhibitrices peuvent être détectées par dérivation au sel de tétrazolium.

3.2.1. Détection d'antioxydants

La détection d'antioxydant par TLC-bioautography est réalisée par immersion (ou par pulvérisation) d'une plaque développée dans une solution d'agent oxydant. Différents types d'agents de visualisation d'activité antioxydante sont utilisés comme le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ou l'acide 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic) (ABTS), β-carotène [15]. Le DPPH représente l'agent le plus communément employé pour ce type de tests.

3.2.2. Détection d'inhibition d'enzyme : cas de l'enzyme tyrosinase

La TLC-bioautography est également très utilisée dans le cadre de la recherche d'inhibiteurs d'enzymes. Cette méthodologie a été appliquée dans le cadre de l'analyse d'un large panel de cibles biologiques : acétylcholinesterase, α- et β-glucosidase, xanthine oxidase, lipase, tyrosinase [18-22]. Dans l'objectif d'illustrer le principe de cette méthodologie, nous décrirons à titre d'exemple, le processus de détection d'inhibiteurs de tyrosinase.

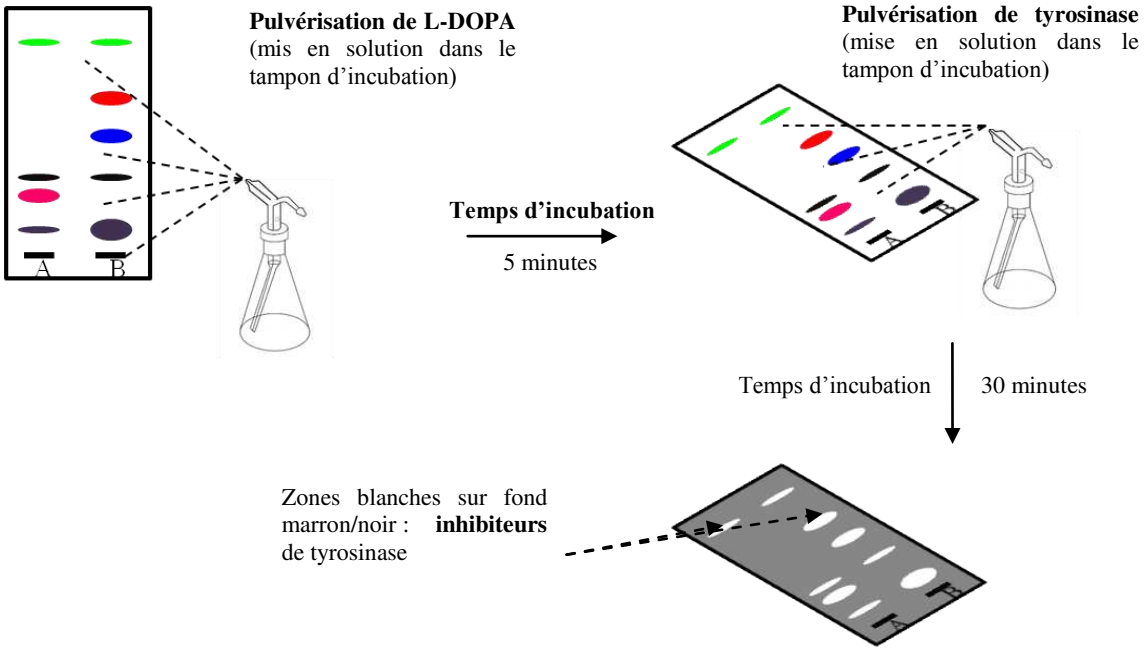


Figure I-8- Méthodologie de détection d'inhibiteur de tyrosinase par TLC-Bioautography.

Après dépôts et migrations des échantillons sur support TLC, la réaction est initiée in-situ sur la plaque, par vaporisations successives d'enzymes (tyrosinase) et de substrat (3,4-dihydroxyphénylalanine). La conversion du 3,4-dihydroxyphénylalanine en acide 5,6-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-indole-2-carboxylique, catalysée par la tyrosinase, engendre une teinte noirâtre visible sur la plaque. Ainsi, les zones inhibitrices sont révélées par détection de zones blanches sur fond noir [23].

3.2.3. Couplage de la TLC-Bioautography avec une détection en spectrométrie de masse

Traditionnellement, des méthodologies chimiques (dérivations) et optiques (lectures densitométriques) sont employées pour la visualisation des taches en TLC. Bien que ces techniques de détection présentent l'avantage d'être quantitatives, elles permettent difficilement la caractérisation et l'identification structurale des analytes d'intérêts. Il en découle que de nombreux développements de couplages entre la TLC et la spectrométrie de masse (TLC-MS) ont été utilisés afin d'apporter, en complément à cette technique, des dimensions de caractérisation et d'analyses structurales. Le premier couplage TLC-MS a été reporté en 1969 par *Raiser et al.* à travers la mise en place d'une méthode d'évaporation de molécules des taches TLC par un flux de gaz emporté dans la source du spectromètre de masse. Depuis, différentes techniques TLC-MS ont été reportées dans la littérature avec une

volonté croissante de développer et de commercialiser des interfaces facilitant ces types de couplages. Ces approches sont usuellement réalisées en mode off-line permettant une pré-évaluation de la plaque avant l'analyse par spectrométrie de masse. La Figure I-9 résume l'ensemble des types de couplages existants en TLC-MS basées sur les approches d'élution et de désorption laser.

La réalisation de ces couplages a été notamment appliquée aux essais bioguidés réalisés par TLC. Après détection des zones bioactives par TLC, les molécules d'intérêts peuvent être identifiées et caractérisées par analyse des zones d'intérêts en spectrométrie de masse [24]. De nombreuses études décrites dans la littérature ont mis en évidence le potentiel de ce type de couplage dans l'identification de molécules bioactives. Ce couplage peut être réalisé selon différentes approches :

- analyses des zones d'intérêts sur plaque TLC dérivées biologiquement,
- analyses de ces zones sur des plaques développées mais non dérivées,
- par récupération de l'analyte de la plaque TLC et solubilisation de celui-ci avant analyse (TLC préparative).

En 2015, Toha *et al*. ont développé une approche TLC-bioassays-MS pour la détection et l'identification de substances biologiquement actives au sein de 21 extraits de plantes. Cette étude s'est focalisée sur l'analyse de deux extraits : le curcuma (*curcuma longa*) et le chardon-Marie (*silybum marianum*). Les deux zones bioactives révélées par TLC ont été par la suite analysées directement sur plaques TLC par couplage TLC-ESI-MS. Ces analyses ont été réalisées après développement chromatographique. L'acquisition des spectres sur plaques dérivées biologiquement a engendré un bruit de fond trop important, dû à la forte présence de sels. Ces acquisitions ont permis d'identifier deux molécules : le curcumin (*m/z* 391 $[M-H+Na]^+$) et le silibinin (*m/z* 481 $[M-H]^-$). L'activité de ces deux molécules a été validée par les données issues de la littérature [25].

D'autres exemples de ce type de couplage pour la caractérisation de molécules bioactives sont résumés dans le Tableau I-2.

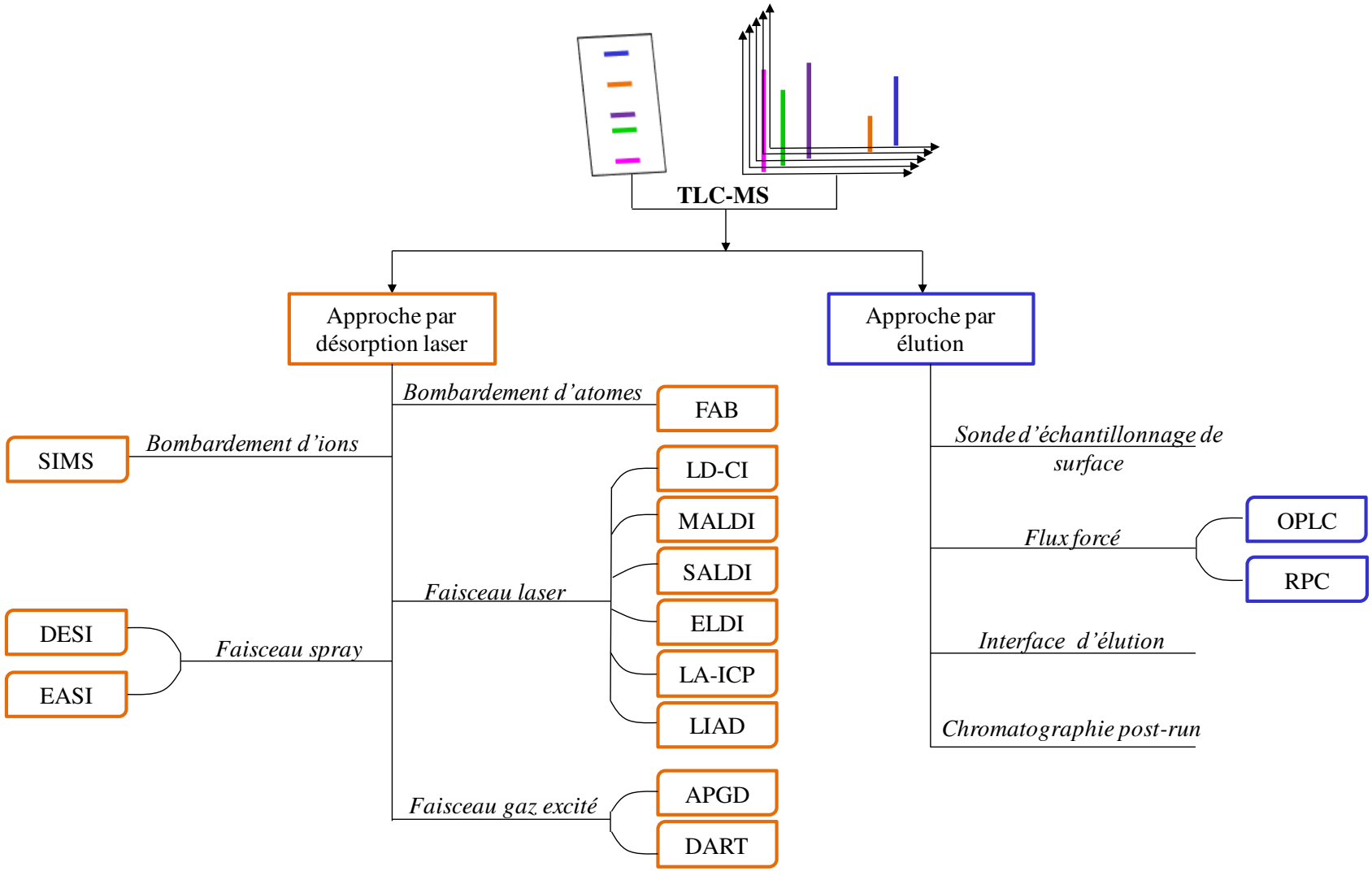


Figure I-9- Méthodologies de couplages de TLC-MS basées sur des approches élutives ainsi que sur la désorption laser. Figure inspirée de la publication référencée [26].

Type d'activité	Extrait	Agent biologique	Conditions d'analyses	Molécules bioactives détectées	Réf.
Antibactérienne	*Chelidonium majus* (racine, feuille, tige)	*Bacillus subtilis* *Escherichia coli*	TLC préparative, Echantillons analysés en LC-HRMS et LC-Q/TOF	Sanguinarine, chelerythrine, berberine, coptisine, corydine, dihydrosanguinarine, dihydrochelerythrine, 6-acetonyl-dihydrosanguinarine, 6-acetonyl-dihydrochelerythrine, stylopine, chelidonine et isoquinoline.	[27]
Antibactérienne	Huiles essentielles de *Tanacetum vulgare*	*Bacillus subtilis,* *B. subtilis Spizizenii* *Xanthomonas Euvesicatoria,* *Pseudomonas Syringae,* *Ralstonia solanacearum* *Aliivibrio fischeri*	Analyse sur plaque HPTLC-DART-MS	Chrysanthenol, chrysanthenyl acetate	[28]
Antioxydante Antimicrobienne Inhibitrice Estrogénique	Graines de lin, de colza et de chanvre	1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl *Aliivbrio fischeri* *Bacillus subtilis* Acetylcholinesterase	Analyse sur plaque HPTLC-ESI-MS	Chrysophanol-1-O-glucoside, emodin-O-glucoside, luteolin-7-O-glucoronide, 6-glucosyl luteolin, linolenic, linoleic, acide oléique, cyanidine, cyanidin-3-O-arabinoside	[29]
Antioxydante Antimicrobienne Inhibitrice	*Zingiber officinale*	1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl *Aliivbrio fischeri* *Bacillus subtilis* Acetylcholinesterase Tyrosinase	Analyse sur plaque HPTLC-ESI-HRMS	6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol	[30]
Antimicrobienne Antioxydante	*curcuma longa* *silybum marianum*	1,1-diphenyl-2 picrylhydrazyl *Aliivbrio fischeri* *Bacillus subtilis*	Analyse sur plaque HPTLC-ESI-MS	Curcumin, silibinin	[25]
Antimicrobienne	*Onopordum acanthium* (feuille)	*B. subtilis* *X. euvesicatoria* *P. maculicola* *A. fischeri* *E. coli* *L. plantarum*	Analyse sur plaque HPTLC-ESI-MS OPLC préparative HPLC-ESI-MS/MS	Germacranolide sesquiterpene lactone onopordopicrin Linoléine Acide linolénique	[31]

Tableau I-2-Exemples d'applications du couplage TLC-MS pour la détection de molécules bioactives.

3.3. Etude d'interactions par infusion directe

L'étude d'interactions enzymes-substrats par injection directe en mode flux continu (mode FIA : Flow Injection Analysis) repose sur l'injection d'un mélange réactionnel réalisé en mode off-line, *via* un système HPLC. Cette méthodologie est utilisée pour des analyses aussi bien qualitatives (suivi de conversion) ou quantitatives de caractérisation de l'activité enzymatique. Cette caractérisation par injection directe peut être réalisée selon deux méthodologies différentes : (a) injections post-réactionnelles ou (b) injections de suivi réactionnel.

3.3.1. Injections post-réactionnelles, « expérience à temps fixe »

La détermination des paramètres cinétiques enzymatiques par injections post-réactionnelles nécessite une étude préalable d'une zone de linéarité d'apparition de produit, pour une concentration d'enzyme fixée. Cette zone de linéarité constitue l'état stationnaire du modèle de Michaelis-Menten. Pour une série d'expériences réalisées en mode off-line à différentes concentrations de substrat, la réaction est stoppée à un temps donné ne dépassant pas la zone linéaire de formation du produit de réaction. Après injection de la solution en FIA, le produit de réaction peut être quantifié par mesure des intensités des pics correspondant au produit *via* l'utilisation d'une gamme d'étalonnage. Par conséquent, la détermination des vitesses initiales de réactions pour différentes concentrations en substrat permet l'obtention des paramètres cinétiques enzymatiques (K_M, V_{max}, k_{cat}) [32-35]. Bien que cette méthodologie n'offre pas une possibilité d'analyse d'isomères et requière l'utilisation d'un étalon interne pour la réalisation d'une quantification plus fiable, elle comporte de nombreux avantages :

- une rapidité d'analyse (1 minute d'injection),
- une faible consommation de solution de milieu réactionnel (quelques µL),
- une absence de dimension séparative permettant un suivi direct de conversion.

3.3.2. Injections de suivi réactionnel, « expérience à temps variable »

Le principe de ce type d'injections consiste à suivre la cinétique de la réaction enzymatique par programmation de l'injecteur. De cette manière, un spectromètre de masse combiné à un passeur automatique d'échantillons et deux pompes HPLC, fournit pour une analyse réalisée en mode « injection en flux continu », un suivi simultané de la diminution de la concentration en substrat [S] et une augmentation de la concentration en produit [P].

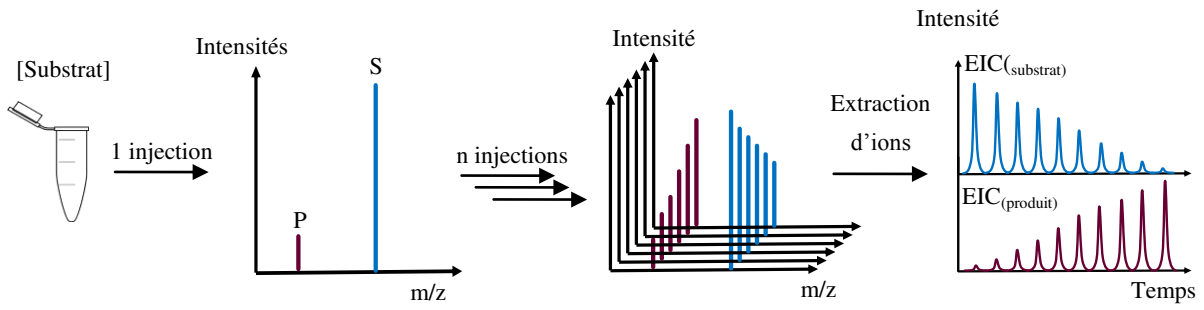


Figure I-10- Schéma du procédé de suivi de réactions enzymatiques par FIA-MS. Suivi des Chromatogrammes d'Extraction d'Ions (EIC) du substrat (S) et du produit (P) de réactions enzymatiques en fonction du temps.

Comme schématisé sur la Figure I-10, la vitesse de conversion est déterminée par le suivi des Chromatogrammes d'Extraction d'Ions (EIC) du produit de réaction, acquis par les multiples injections. Cette étude permet donc de déterminer les vitesses initiales de réaction à différentes concentrations de substrat sans étude préliminaire de la zone de linéarité [36]. Différents exemples d'applications du suivi post-réactionnel et du suivi de réaction sont résumés dans le Tableau I-3.

Remarque : la méthodologie « Flow Injection Analysis » couplée à la spectrométrie de masse sera développée dans le ***chapitre III*** *de ce manuscrit dans le cadre :*

- *de la* ***caractérisation d'enzymes*** *libres et immobilisées,*
- *de l'étude de* ***cascade de phosphorylation****.*

Comme mentionné ultérieurement, les études de caractérisations enzymatiques ont reposé sur le principe de « l'analyse à temps fixe ». Dans un premier temps, la recherche de la ***zone de linéarité*** *a été réalisée par* ***injection de suivi réactionnel*** *à des concentrations d'enzymes et de substrats données. Par la suite,* ***l'injection post-réactionnelle*** *a été appliquée dans le cadre de l'expérience de* ***Michaelis-Menten.***

3.4. Etude d'interactions par infusion continue

Le suivi de la conversion enzymatique par infusion continue a connu d'importants développements au cours des dernières années. La première approche, employant l'ESI-MS pour l'étude de la conversion et de la cinétique enzymatique, a été introduite en 1989 par Henion *et al*. [37]. Une seringue d'injection, support de la réaction enzymatique, a été couplée directement à une interface ESI-MS. L'infusion continue du mélange réactionnel a permis le suivi en ligne et en direct de l'hydrolyse du o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside catalysée par une enzyme lactase. Une approche plus quantitative a également été réalisée à travers la détermination des paramètres cinétiques enzymatiques.

C'est dans le même esprit, qu'une approche en-ligne par ESI-MS a été présentée par Zechel *et al.* en 1988 pour l'étude de molécules à l'état pré-stable (état transitoire) [38]. Le principe de cette méthodologie, couramment connue sous l'appellation « on-line time-resolved approach », repose sur l'analyse à haute résolution temporelle des états intermédiaires de réaction par voie enzymatique.

L'interface ESI-MS a été sélectionnée dans le cadre de ces travaux pour son transfert efficace et rapide des molécules de la phase liquide à la phase gazeuse à pression atmosphérique. Par ailleurs, cette source est décrite comme l'une des plus adaptée pour le criblage rapide d'intermédiaire présent en solution [38].

Le protocole mis en œuvre par Zechel *et al.*, schématisé en Figure I-11, se compose de deux seringues délivrant continuellement des solutions de substrat et d'enzyme. La réaction est rapidement initiée par mélange dans un T couplé à l'interface ESI. Différents temps de réaction ont été réalisés par changement de la longueur des capillaires de réaction. De cette manière, une résolution d'une dizaine de millisecondes a été observée. Cette haute précision a permis la détection en spectrométrie de masse de l'intermédiaire covalent « enzyme-substrat » (xylanase-β-xylobioside).

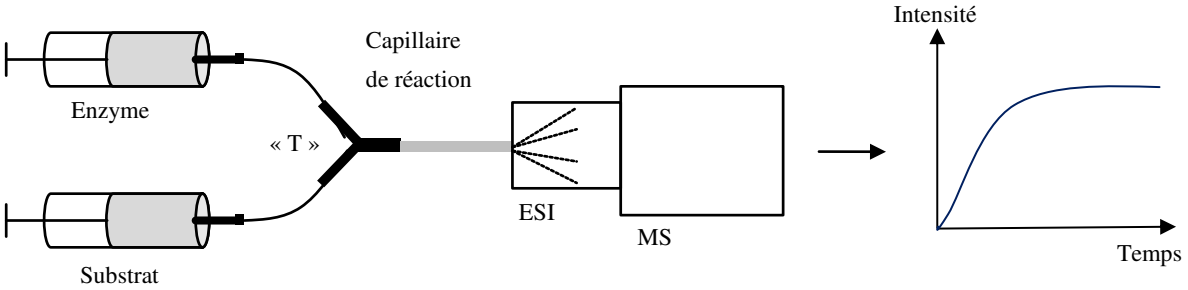


Figure I-11- Schématisation du suivi de conversion enzymatique par infusion continue en spectrométrie de masse.

Basés sur un concept similaire, des développements complémentaires ont été réalisés afin d'optimiser le montage. L'approche alternative proposée par Wilson *et al.* en 2003 conserve l'idée générale du montage tout en lui prodiguant une meilleure flexibilité [39]. Ainsi, l'introduction d'une chambre de réaction à volume ajustable offre la possibilité de réaliser différents temps de réactions enzymatiques sans changement de capillaire.

L'ensemble de ces approches a été développée pour des analyses aussi bien qualitatives que quantitatives pour la détermination des paramètres cinétiques. Des exemples d'applications non exhaustifs sont présentés dans le Tableau I-3.

Protéine cible	Ligand		Techniques	Colonne	Source	Remarques	Réf.
	Substrat	Inhibiteur					
α-glucosidase (libre)	p-nitrophenyl-α-glucopyranoside	/	Injection directe "FIA"	/	ESI-MS	Réaction off-line « post-réactionnelles », détermination K_M et V_{max}	[32]
Glutathione S-transferase (libre)	1-chloro-2,4-dinitrobenzene	/	Injection directe "FIA"	/	ESI-MS	Réaction off-line « post-réactionnelles », détermination K_M, V_{max}, K_i	[33]
Esterase (libre)	bis(2-pyridylmethyl)(2-acetoxyphenyl)amine	/	Injection directe "FIA"	/	ESI-MS	Réaction on-line « suivi réactionnel », suivi direct de l'apparition du produit et de la disparition du substrat	[36]
Bovine pancreatic ribonuclease A/ β-galactosidase (libres)	Dinucléotide/lactose	/	Séparation chromatographique	Spherisorb	API	Détermination K_M, V_{max}	[40]
Bacillus circulans xylanase (libre)	2,4-dinitrophenyl β-xylobioside	/	Infusion continue	/	ESI-MS	Analyse cinétique de la conversion enzymatique par observation de l'état transitoire du complexe enzyme-substrat	[38]
Lactase (libre)	o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside	/	Infusion continue	/	API-MS	Suivi en ligne de l'apparition du produit Détermination K_M, V_{max}	[37]
Cathepsin B (libre)	Z-FR-AMC	Extraits de trèfle et de champignon	Infusion continue Séparation chromatographique	ODS hypersil RP-C18	ESI-MS	Inhibiteurs détectés par diminution de la concentration en produit	[41]

Tableau I-3- Exemples d'applications de l'infusion directe et continue en spectrométrie de masse pour les études d'interactions enzyme-ligand.

3.5. Etude des interactions par le suivi des intensités d'ions par MALDI-TOFMS

Depuis l'introduction de la technique MALDI pour l'analyse de biomolécules par désorption/ionisation par laser dans les années 1980 [42, 43], cette technique d'ionisation a été employée pour diverses applications, comme l'étude d'interactions enzymes-ligands [44-48]. Les méthodologies associées à la technique MALDI dans le cadre de ces études apparaissent comme étant très diversifiées. Plusieurs approches par MALDI-MS, pour le suivi de conversions enzymatiques, ont été décrites dans la littérature à savoir : étude d'interactions enzymes-substrats [49] et enzymes-inhibiteurs [50], utilisation des enzymes libres [51] et immobilisées [52, 53] en réactions hors-ligne [54] ou in-situ sur la plaque MALDI [53, 55]. Des exemples de ces diverses applications sont relatés dans le Tableau I-4.

3.5.1. Etude en enzymes libres

Les enzymes libres sont usuellement employées pour le suivi de conversions enzymatiques en mode off-line. Le succès d'une réaction est défini par la détection d'une baisse d'intensité du pic correspondant au substrat, combinée à l'apparition du (des) pic(s) du produit de la réaction.

Par ailleurs, les études d'activités inhibitrices sont déterminées par mesure de l'efficacité de la conversion enzymatique en présence de différentes concentrations d'inhibiteur.

Bien que cette technique présente de nombreux avantages dans ce domaine, tels que la rapidité d'analyse, la possibilité d'automatisation et la forte tolérance aux sels (tampons de réaction), la quantification se révèle plus hasardeuse. Le processus de cristallisation de la matrice combinée avec l'analyte résulte généralement en une distribution hétérogène du dépôt. La faible reproductibilité d'analyses d'échantillons qui en résulte, relative à l'intensité des signaux obtenus en spectrométrie de masse, peut apporter des imprécisions de quantification.

Une autre limite de l'analyse MALDI MS pour l'analyse quantitative réside en la possible interférence de la matrice avec les pics d'analytes situés dans la région des basses masses, de *m/z* 0 à 500 [56]. De cette manière, les paramètres suivants sont cruciaux afin d'obtenir une analyse quantitative :

- une sélection appropriée de la matrice,
- un ratio matrice sur analyte optimisé,
- l'utilisation d'un étalon interne, chimiquement similaire à la molécule d'intérêt [57].

Malgré l'ensemble de ces limites, la technique MALDI MS a montré son efficacité pour la caractérisation d'activités enzymatiques ainsi que dans le cadre de criblage d'interactions enzymes-ligands.

Dans le but de pallier les interférences provoquées par les signaux de matrices dans la zone des basses masses moléculaires, Wei *et al*. ont développés une méthodologie basée sur la désorption/ionisation pulsée par laser, ne nécessitant pas de matrice d'analyse (Desorption/ionization on silicon, DIOS) [58]. Les analytes en solution sont directement placés sur une plaque de silicone.

En raison de la faible présence d'interférences dans la région des basses masses engendrées par ce type de surface d'analyse, les produits de faibles poids moléculaires formés peuvent être facilement détectés et, par conséquent, l'activité enzymatique mesurée [55]. De cette manière, cette étude s'est focalisée sur des analyses qualitatives et quantitatives d'activités enzymatiques catalysées par l'enzyme acétylcholine estérase pour la conversion de l'acétylcholine (*m/z* 146) en choline (*m/z* 104). L'efficacité d'inhibition de l'huperzine et de la tacrine a également été évaluée par détermination des constantes d'inhibition de ces deux inhibiteurs.

3.5.2. Enzymes immobilisées

L'utilisation de ce type de support (DIOS) a marqué les débuts des stratégies d'immobilisations d'enzymes sur plaque support MALDI. Les groupements Si-H et Si-OH, présents à la surface du support DIOS, sont facilement modifiables et fonctionnalisables par différents types de réactifs et d'agents dérivants, tels que le 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine et le 3-aminopropyltriethoxysilane. Ces agents ont permis, entre autres, l'immobilisation de l'enzyme trypsine sur ce type de support pour le suivi des produits de digestion enzymatique in-situ sur plaque [53].

L'emploi des enzymes immobilisées a également initié le développement de la méthodologie nommée «Ion Fading » par MALDI-TOFMS (IF-MS) pour le criblage d'inhibiteurs en solution. Cette méthodologie a été mise en pratique pour la première fois au sein du laboratoire du professeur Francesc X. Avilés [59]. Cette dernière est basée sur la formation de complexes spécifiques entre une cible biologique et un ligand dans un milieu complexe. La formation de ce complexe entraine le piégeage des ligands présents dans l'échantillon analysé qui amène à la disparition de l'ion correspondant du spectre de masse.

Les principaux travaux relatifs à cette méthodologie d'Ion Fading, bien que peu nombreux, sont essentiellement réalisés par une détection MALDI-TOF MS. Cette approche peut être réalisée selon deux modes :

- <u>mode direct</u> : ce protocole consiste à mélanger la solution d'étude avec l'enzyme cible, dans un tampon compatible au système biologique. Après ajout d'une matrice organique MALDI, les dépôts sont réalisés sur plaque et les analyses effectuées. Les inhibiteurs sont détectés par extinction de signal (Ion Fading),
- <u>mode indirect</u> : la cible biologique est immobilisée sur un support solide. Ainsi, après isolement de l'enzyme du reste du mélange, une extinction de signal de la molécule d'intérêt est visible (Ion Fading). Par ailleurs, après dénaturation de l'enzyme et libération de l'inhibiteur, une hausse du signal correspondant au pic de l'inhibiteur peut être détectée (Ion Hunting).

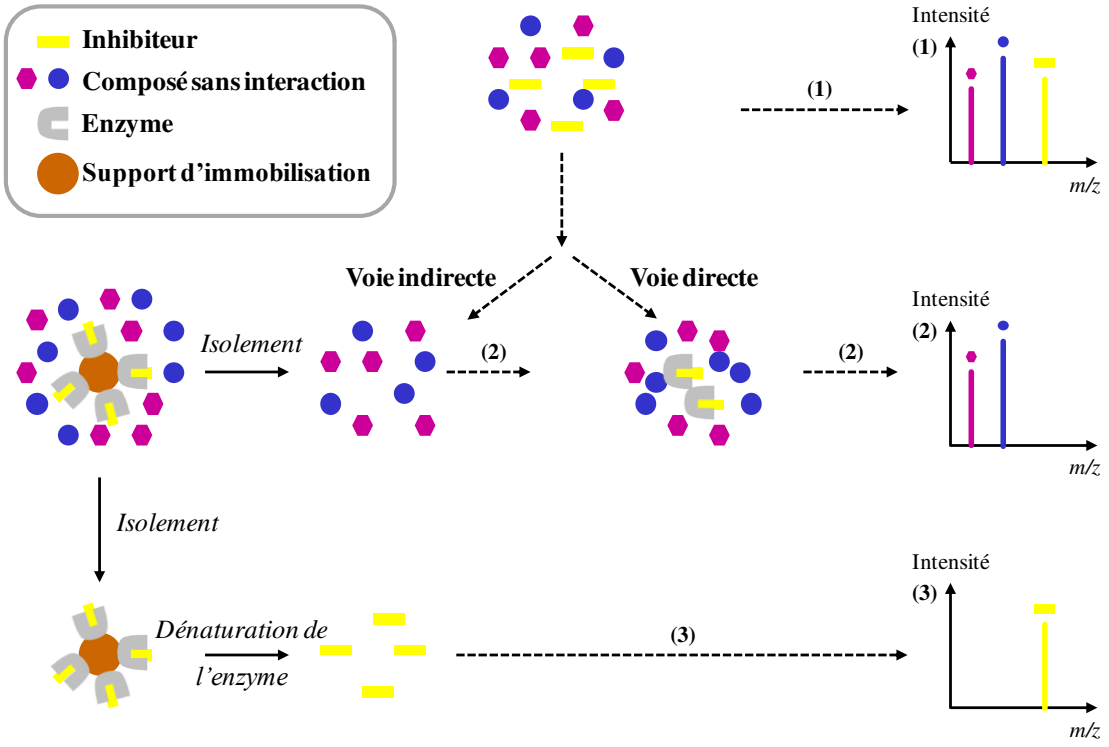


Figure I-12- Stratégie d'étude d'interactions enzymes-inhibiteurs par l'approche « Ion Fading » : (1) spectre de masse de la solution (2) phénomène de diminution de l'intensité de l'inhibiteur « Ion Fading » par piégeage de celui-ci dans les sites actifs de l'enzyme, (3) libération de l'inhibiteur par dénaturation de l'enzyme et analyse de ce dernier « Ion Hunting » (figure inspirée de la référence [60]).

Récemment, au sein de notre laboratoire, cette technique a été appliquée à la recherche d'inhibiteurs de tyrosinase au sein d'extraits de plantes. Cette étude a été menée par réaction in-situ sur plaque par la méthodologie nommée « Enzyme Coupled-Nanoparticles Assisted/Laser Desorption/Ionization, ENALDI [61] selon le procédé présenté en Figure I-13.

Le principe de cette méthodologie repose sur l'immobilisation de l'enzyme sur un support solide magnétique compatible avec le mode d'ionisation SALDI (Surface Assisted Laser Desorption/Ionization). Les extraits de plantes sont déposés sur le support MALDI en contact des solutions d'enzymes immobilisées actives et dénaturées. La réaction est initiée in-situ sur la plaque pendant l'étape d'évaporation de la solution. Durant cette étape, les interactions des inhibiteurs avec le site actif de l'enzyme les rendent indisponibles pour l'étape de désorption et d'ionisation. Après complète évaporation, les spots sont directement analysés par MALDI TOFMS, le support d'immobilisation faisant office de matrice solide. Cette technique d'analyse permet de détecter une baisse d'intensité de l'ion inhibiteur *via* le principe « d'Ion Fading ».

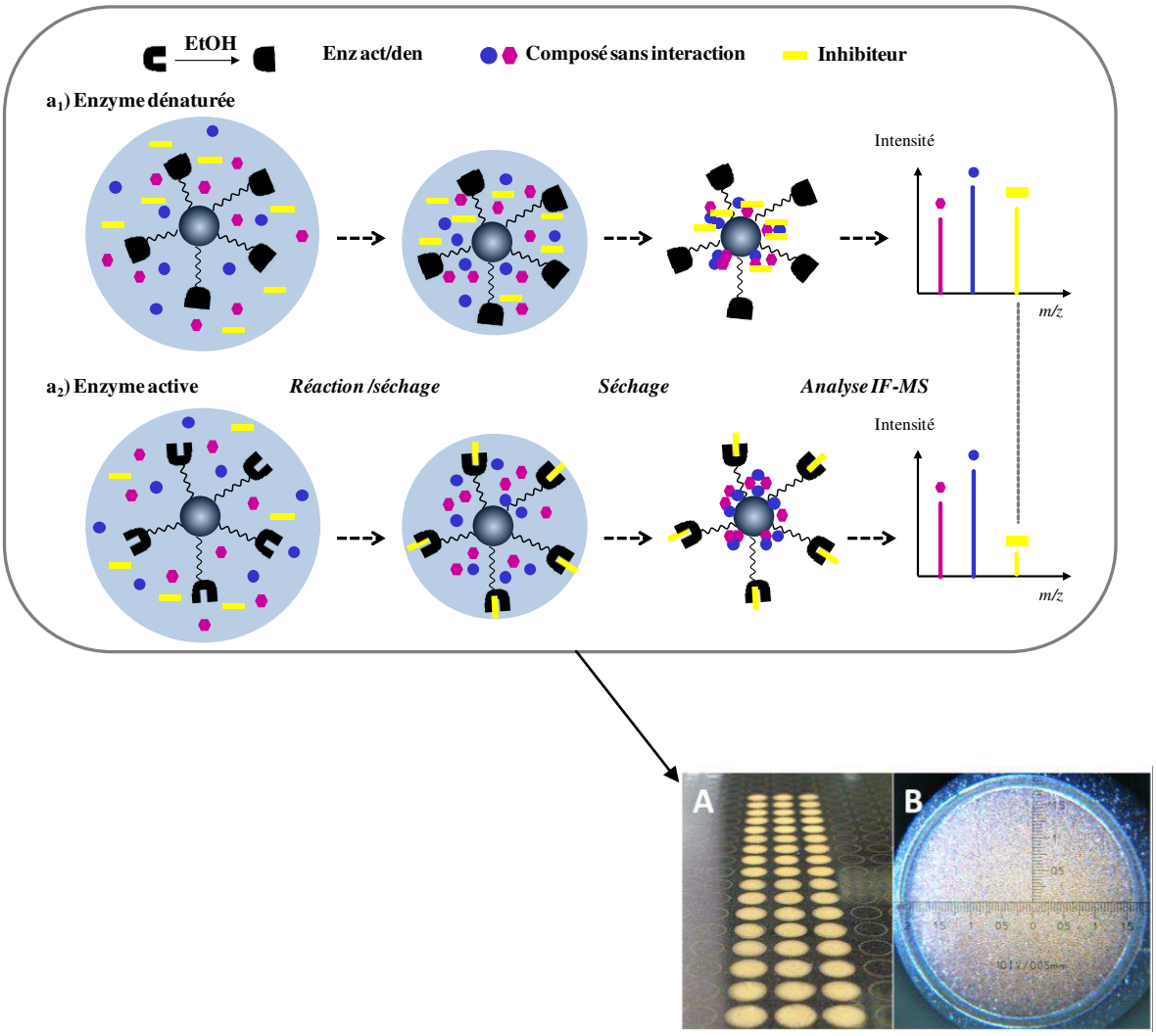


Figure I-13- Schéma général du principe d'Ion Fading « IF-ENALDI MS » développé au sein de l'équipe analytique de l'ICOA [61].

<u>Remarque</u> : au cours des travaux de cette thèse, des études d'interactions enzymes-inhibiteurs et enzymes-substrats ont été réalisées via l'utilisation de la méthodologie de l'enzyme immobilisée par des approches MALDI TOFMS et TLC. Ces études seront présentées au sein du chapitre II de ce manuscrit.

Protéine cible	Ligand		Techniques	Matrice	Source	Remarques	Réf.
	Substrat	Inhibiteur					
Acetylcholine estérase (libre)	Acetylcholine	Tacrine	Réaction off-line	/	MALDI-TOFMS	Détermination K_M, V_{max}, IC_{50}	[50]
Trypsine (immobilisée)	Nα-Benzoyl-L-arginine ethylester hydrochloride	Benzamidine	Réaction in-situ sur plaque	/	MALDI-TOFMS	Détermination K_M, V_{max}	[53]
Tyrosinase (immobilisée)		Extraits de plantes (racines de réglisse, tige et feuilles de *sparmannia discolor*)	Ion Fading MS	Nanoparticules Fe_3O_4	MALDI-TOFMS	Trois candidats inhibiteurs dans l'extrait de réglisse, deux candidats pour l'extrait de *sparmannia discolor*	[61]
Trypsine (immobilisée)		Extrait de sang de sangsue	Ion Fading MS	Acide sinapinique	MALDI-TOFMS	Détection de plus de 75 molécules de l'extrait présentant des interactions spécifiques avec l'enzyme	[62]
Lebetase (*vipera lebetina)* de venin de serpent (libre)	Peptide : bradykin, kallidin		Réaction off-line	Acide 2,5-dihydrobenzoïque	MALDI-TOFMS	Caractérisation de la composition de peptides clivés Analyse qualitative	[63]
Protéases (immobilisées)	N-(4-méthoxyphenyl azoformyl)-phenylalanine	Invertébrés marins	Ion Fading MS	2,6- dihydroxy-acétophénone, Acide 2,5-dihydrobenzoïque, 1,5-diaminonaphtalène	MALDI-TOFMS	Calcul de l'activité inhibitrice des extraits (IC_{50})	[64]

Tableau I-4- Exemples d'applications de la technique MALDI TOFMS pour l'étude d'interactions enzymes-ligands. Etudes en enzymes libres et immobilisées.

A l'issue de la description des méthodologies MALDI pour l'étude d'interactions enzymes-ligands, nous avons exposé le caractère bivalent de cette technique dans le cadre de l'utilisation d'enzymes sous formes libre et immobilisée. Dans le contexte d'approches mettant en jeu l'immobilisation d'enzymes, nous présenterons par la suite la Chromatographie d'Affinité Frontale.

3.6. Etude d'interactions on-line par Chromatographie d'Affinité Frontale (FAC)

La chromatographie d'affinité frontale a été développée dans les années 1960 notamment par les travaux de P. Cuatrescasas basés sur des études de purification de la protéine avidine (contenue dans le blanc d'œuf). Par synthèse d'une surface présentant des interactions spécifiques avec l'avidine (colonne biocytin-sepharose), ces travaux ont permis de piéger et de retenir la protéine d'intérêt à la surface de la colonne. De cette manière, l'enzyme avidine, présente dans le blanc d'œuf, a pu être extraite à hauteur de 90% [65]. Depuis, cette technique a connu d'importants développements dans le cadre de purification de protéines, d'études d'interactions enzymes-inhibiteurs ou enzymes-substrats [66-71].

La méthodologie FAC est définie comme un type de chromatographie liquide utilisant un agent biologique (i.e enzymes immobilisées sur support solide) comme phase stationnaire dans le cadre de l'étude des interactions entre une enzyme et un (des) ligand(s). Elle repose sur l'infusion continue d'un ligand (ou d'un mélange de ligands) au travers d'un contenant (colonne, capillaire, bioréacteur) rempli d'une protéine immobilisée sur un support solide [72]. Les réacteurs contenant les enzymes immobilisées, appelés également bioréacteurs, sont très utilisés dans diverses applications biologiques incluant l'analyse de protéines et les études cinétiques. Une liste non exhaustive d'exemples d'études est présentée dans le Tableau I-5.

Cette méthodologie a montré une grande diversité relative aux types d'immobilisations (i.e covalent [73], non-covalent [74], piégeage [75]) et de types et volumes des bioréacteurs. Dans le but d'éviter la consommation excessive d'enzymes, d'échantillons et de solvants, ces derniers ont connu une forte diminution de leur volume. Ainsi, dans la littérature sont décrits des bioréacteurs :

- de type tube ouvert de diamètre de 100 µm avec des longueurs variant de 30 à 40 cm (volumes entre 2 à 4 µL),
- des capillaires remplis de diamètres supérieurs à 0,5 mm ayant une longueur comprise entre 5 à 15 cm (10 µL < V < 30 µL),
- des supports monolithiques de plus forts diamètres (2,1 mm) mais de plus faibles longueurs (de 1 à 5 cm) pour des volumes compris entre 30 à 175 µL [76].

Cette technique a été couplée à différents types de détecteurs comme la fluorescence [77] et le détecteur UV [78]. La Chromatographie d'Affinité Frontale, couplée à la spectrométrie de masse (FAC-MS), a connu un essor important ces dernières années, lié à ses nombreux avantages :

- une stabilité des bioréacteurs dans le temps,
- une purification de la solution (diminution de l'effet matrice),

- une possible réutilisation des bioréacteurs,
- une visualisation directe de l'activité biologique,
- une possible automatisation d'analyse,
- une spécificité de détection.

L'ensemble de ces avantages en fait une méthodologie de choix pour la mise en place d'une étude de criblage enzymatique par FAC.

Dans le cadre de cette thèse, ce couplage a été mis en place pour le suivi direct de la conversion de substrats en produits de réaction. Il convient donc d'exposer le principe de cette méthodologie ainsi que ses applications relatées dans la littérature pour l'étude de ce type d'interactions. Par la suite, nous décrirons succinctement son principe pour une approche d'études d'interactions enzymes-inhibiteurs.

3.6.1. Chromatographie d'Affinité Frontale : étude des interactions enzymes-substrats

L'utilisation des bioréacteurs dans le cadre de suivi de conversion enzymatique (interactions enzymes-substrats) s'est majoritairement focalisée sur l'étude de digestions de protéines par hydrolyse enzymatique [79, 80].

Ces études ont pour but de pallier les inconvénients des procédés off-line [81] tels que :

- une autodigestion enzymatique,
- de faibles efficacités de conversion,
- des temps d'incubation longs,
- une difficulté d'automatisation.

La mise en place de ces procédés de digestion enzymatique on-line, a été réalisée par étude de simple [82, 83] ou de multi étapes d'hydrolyses [81] mettant en jeu un processus de conversions en séries catalysées par différentes enzymes.

De cette manière, un système on-line comportant trois étapes de conversion, dans le cadre de la digestion rapide de l'ADN, a récemment été développé. Trois bioréacteurs contenant chacun une enzyme immobilisée (déoxyribonucléase I, phosphodiestérase de venin de serpent, alkaline phosphatase) ont été placés en série dans le cadre de l'analyse des nucléotides simples de l'ADN. Une digestion rapide de 45 minutes, d'une efficacité de près de 20 fois supérieure, comparées à des réactions effectuées en off-line, a été observée [81]. Ce développement expose la faisabilité et l'efficacité d'un suivi on-line de multi-conversions enzymatiques et met en lumière la rapidité de conversion de cette approche dynamique.

Remarque : dans le cadre de cette thèse, la ***Chromatographie d'Affinité Frontale*** *couplée à une détection en* ***spectrométrie de masse*** *(FAC-MS) a été mise en place pour le suivi de mono- et de* ***diphosphorylation*** *de ligands d'intérêts. La description du système ainsi que sa mise en place seront décrites et discutées dans le chapitre III de ce manuscrit.*

3.6.2. Chromatographie d'affinité frontale : interactions enzymes-inhibiteurs

L'intérêt de l'étude d'interactions enzymes-inhibiteurs, par la méthodologie FAC, a été démontré en 1975 par Kasai *et al.* lors du développement d'une approche de quantification d'interactions enzymes-ligands. Après immobilisation du ligand sur une phase stationnaire et par élution de différentes enzymes trypsine, ces études ont permis de déterminer la constante de dissociation (K_d) de l'enzyme trypsine pour son ligand benzoyl-L-arginine p-nitroanilide [84]. De nos jours, la Chromatographie d'Affinité Frontale utilise une approche inversée à savoir l'immobilisation des protéines sur support solide.

Similairement à l'étude de conversion de substrat, cette méthodologie repose sur le principe d'une infusion continue de ligands au travers d'un bioréacteur contenant l'enzyme immobilisée. Dans l'exemple présenté en Figure I-14, un mélange de composés contenant un inhibiteur est infusé dans un bioréacteur contenant l'enzyme immobilisée sur support. Dans cet exemple, nous statuons que l'ensemble des composés ne présente aucune interaction non spécifique avec l'enzyme ou le support. Durant l'infusion de la solution, les composés ne présentant aucune interaction passent au travers du bioréacteur. L'inhibiteur sera retenu par interaction avec le site actif de l'enzyme. Cette interaction va générer un retard d'élution (Δt) qui sera visible lors du suivi des chromatogrammes d'extraction d'ions (EIC) d'intérêts. Ce délai, représentatif du niveau de saturation de la colonne, permettra d'obtenir les constantes de dissociation de l'enzyme pour son ligand (K_d). De nombreux travaux relatés dans la littérature ont été réalisés afin de déterminer les constantes de dissociation de cibles d'intérêts (inhibiteur compétitif et détermination des constantes de dissociation) [85-87]. Différents exemples sont cités dans le Tableau I-5.

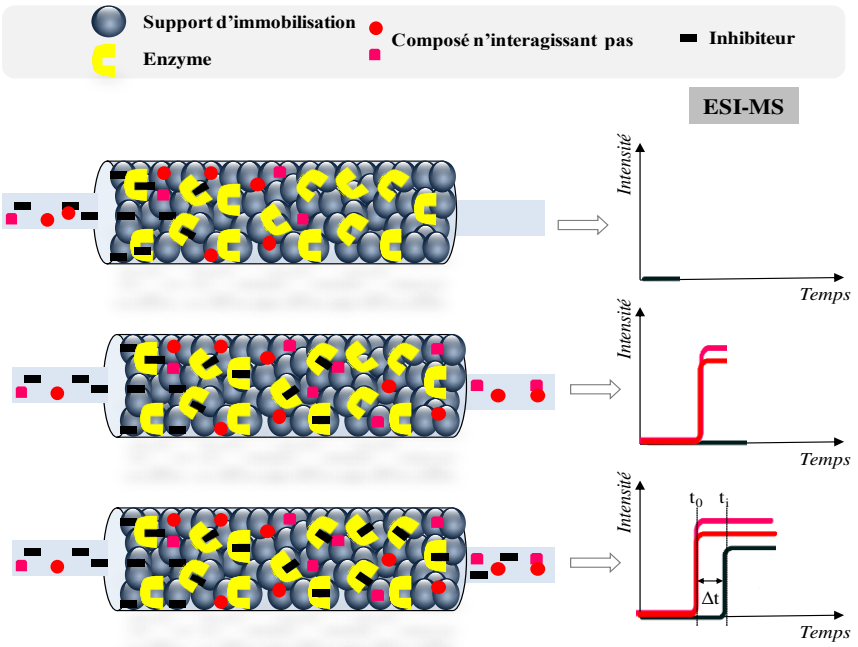


Figure I-14- Détection de la présence d'un inhibiteur d'une enzyme spécifique par le suivi des chromatogrammes d'extraction d'ions des masses d'intérêts par FAC.

Protéine cible immobilisées	Ligand		Techniques	Colonne	Source	Remarques	Réf.
	Substrat	Inhibiteur					
Trypsine (immobilisée)	Nα-Benzoyl-L-arginine p-nitroanilide/myoglobin	/	FAC 1 bioréacteur	Colonne C18 Symmetry 300	ESI-MS	Détermination K_M, Vmax, digestion en-ligne	[79]
Déoxyribonucléase Venin de serpent Phosphodiestérase Alkaline phosphatase	ADN génomique	/	FAC 3 bioréacteurs en série	/	ESI-MS	Hydrolyse rapide et efficace en comparaison de l'étude off-line	[81]
Truncated peroxin	/	Peptides	FAC	/	ESI-MS	Mesures simultanées d'affinités de plusieurs ligands, détermination des constantes de dissociation K_d	[88]
Nicotinic acétylcholine (nAChR)	/	Peptides	FAC	/	ESI-MS	Détermination de la capacité de la colonne et des constantes de dissociation K_d	[89]
G-protéine GPR17	/	Dérivés de nucléotides	FAC	/	ESI-MS	Criblage d'une bibliothèque de molécules Détermination EC_{50}, classement d'inhibiteurs	[90]

Tableau I-5- Exemples d'applications de la Chromatographie d'Affinité Frontale (FAC) pour l'étude d'interactions enzymes-inhibiteurs et enzymes-substrats.

Cette description non exhaustive, des méthodologies de criblages basées sur la spectrométrie de masse pour l'étude d'interactions enzymes-ligands, a permis de mettre en exergue la diversité des techniques dans ce domaine. Ce paragraphe a notamment dépeint les approches qui seront rencontrées au sein de ce manuscrit, comme les injections directes « FIA », la TLC couplée à la spectrométrie de masse, les méthodologies d'Ion Hunting et d'Ion Fading ainsi que la Chromatographie d'Affinité Frontale « FAC ». De toute évidence, certaines de ces méthodologies, notamment le FAC, requièrent l'utilisation d'enzymes immobilisées. Il convient donc de dresser un état de l'art des principes généraux des différents types d'immobilisations rencontrés dans la littérature.

4. Les stratégies d'immobilisations enzymatiques

La méthodologie d'immobilisation d'enzymes est fréquemment utilisée dans divers domaines d'applications à l'échelle industrielle [91] ainsi qu'à l'échelle des laboratoires tels que des laboratoires de chimie analytique [92], de diagnostics [93] et dans le criblage de molécules bioactives [94]. Bien que l'immobilisation puisse engendrer certains inconvénients, sa large utilisation résulte de ses nombreux avantages [95, 96]. Un résumé de ces avantages et inconvénients est proposé dans le Tableau I-6.

Immobilisation d'enzymes	
Avantages	**Inconvénients**
✓ hausse de la stabilité sous différentes conditions (température, pH, solvants) [97], ✓ meilleure stabilité d'activité dans le temps [98], ✓ possibilité de séparation facile de l'enzyme et des produits de réaction, ✓ arrêt rapide de la réaction par retrait du support solide, ✓ possibilité de réutilisation de l'enzyme (réduction des coûts d'analyses) [81].	✗ diminution de l'activité [99], ✗ changement de spécificité d'activité [100], ✗ temps d'immobilisation.

Tableau I-6- Synthèse des avantages et inconvénients de l'immobilisation d'enzymes.

La diversité des méthodologies découle en partie des nombreux développements réalisés sur la nature du support et sur le type d'immobilisations. Bien qu'il existe des méthodologies variées, les méthodes les plus connues et utilisées (présentées en Figure I-15) sont :

- l'adsorption [101, 102],
- la réticulation [103],
- la liaison covalente [104, 105],
- le piégeage [106],
- l'encapsulation [107].

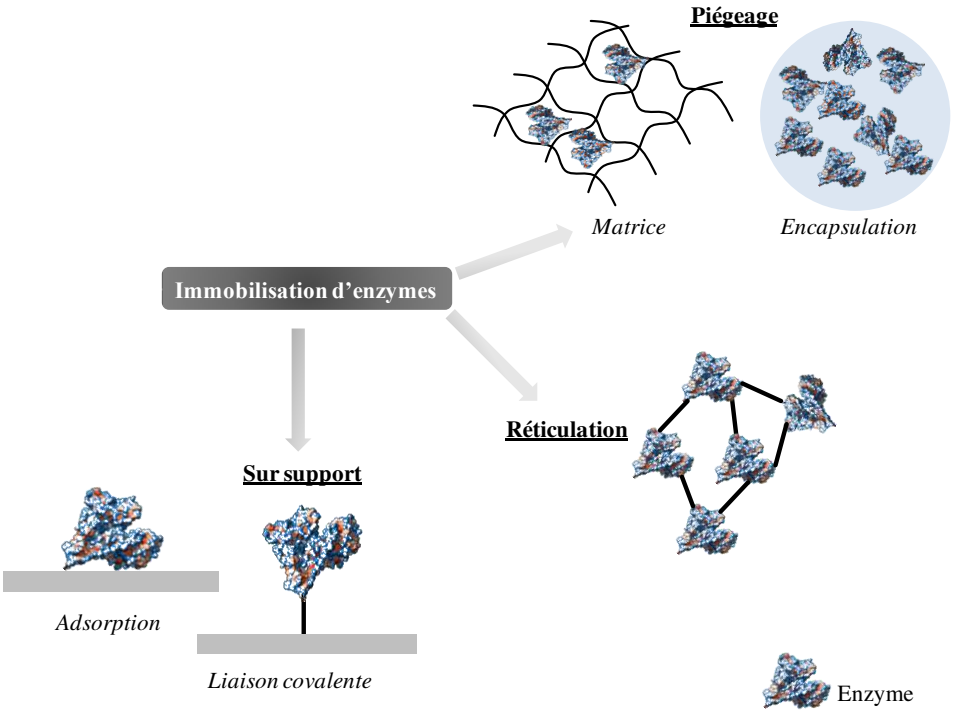


Figure I-15- Les différentes stratégies d'immobilisations d'enzymes sur support solide, par réticulation ou par piégeage.

Ces méthodologies d'immobilisation sont des procédés minutieux à mettre en œuvre. Plusieurs facteurs sont à prendre en compte à savoir le type de surface, les propriétés de l'enzyme, les tampons d'immobilisation (pH, force ionique), ainsi que les performances d'immobilisation (quantité, activité des lots, réutilisation, sélectivité et reproductibilité). Une immobilisation idéale comprend deux facteurs principaux [108] :

- aucune perte d'activité : les sites actifs de l'enzyme doivent rester accessibles. Une immobilisation non contrôlée, engendrant des sites actifs tournés vers le support, peut provoquer un encombrement stérique et empêcher l'accès du ligand,
- maintien de la conformation de l'enzyme (spécificité, activité).

Dans le cadre de cette section, nous présenterons succinctement le principe, les avantages et inconvénients des différentes méthodologies d'immobilisations puis proposerons des exemples d'applications.

4.1. Immobilisation par adsorption

L'adsorption d'enzymes sur support peut être définie comme la méthode d'immobilisation réversible la plus simple et donc la plus attractive à mettre en œuvre.

Une grande diversité de supports a été utilisée pour ce type d'immobilisation. Ces derniers peuvent être divisés en deux catégories [101] :

- les supports organiques (silice, titane, verre poreux),
- les supports inorganiques (chitine, chitosan, cellulose, alginate, polymère, agar-agar, collagène).

Il est important de noter que les enzymes ne peuvent être adsorbées sur n'importe quel support. Cette adsorption physique nécessite une affinité du support avec l'enzyme, affinité régie par des interactions de types hydrophobes, électrostatiques, hydrophobiques, de Van der Waals, liaisons hydrogènes ou une combinaison de ces interactions. Les avantages et inconvénients de ce type d'immobilisation sont consignés dans le Tableau I-7.

Immobilisation par adsorption	
Avantages	**Inconvénients**
✓ simplicité, ✓ rapidité, ✓ possibilité de régénération (et donc de réutilisation) du support en fin de cycle de vie de l'enzyme à des conditions de pH, force ionique et température donnés, ✓ économe, ✓ l'absence de changement structural de l'enzyme.	✗ perte d'enzymes, ✗ désactivation possible de l'enzyme par la nature du support (conditions de pH données), ✗ immobilisation non orientée, ✗ contrainte stérique liée au support.

Tableau I-7- Synthèse des avantages et inconvénients de l'immobilisation d'enzyme par adsorption.

Ce type d'immobilisation est l'un des plus anciens évoqués dans la littérature. En 1916, Nelson et Griffin ont montré une possible immobilisation de l'enzyme invertase par adsorption sur un support solide tel que du charbon ou de l'hydroxyde d'aluminium [109]. Depuis, ces immobilisations ont connu une évolution relative aux supports et aux enzymes étudiées. Différents exemples d'applications, appliquées notamment aux enzymes invertase, kinase et cellobiohydrolase, sont reportés dans le Tableau I-8.

Bien que ce type d'immobilisation soit attractif du fait de sa simplicité de mise en œuvre, une grande majorité des études reportées dans la littérature montre une diminution de l'activité des enzymes immobilisées comparativement à leur forme libre. Cette baisse d'activité provient majoritairement de l'orientation aléatoire de l'enzyme sur le support, créant une gêne stérique pour accéder au site actif [108]. D'autre part, les enzymes peuvent être immobilisées en surface via des points de liaison multiples pouvant résulter en un changement conformationnel de l'enzyme et donc une désactivation de celle-ci [15]. De plus, ce type d'adsorption découle d'interactions enzymes-supports relativement faibles. Les protéines forment donc des complexes avec le support, pouvant se révéler instables par de fortes influences des conditions de pH, de force ionique et de température [110].

Enzyme	Support	Applications	Remarques	Réf.
Invertase	Cellulose diéthylaminoéthyle	Suivi de l'hydrolyse continue du saccharose	pH optimal déplacé vers les pH acides (de 2 unités), diminution de la stabilité thermique, rétention de 50% de l'activité après 10 cycles d'utilisation	[111]
Invertase	Cellulose diéthylaminoacétyle	Infusion continue dans colonne Etude des paramètres d'immobilisations (pH, température, stabilité)	Stable entre 5 < pH < 7 Activité moindre de la forme immobilisée (perte de 50%) Complexe enzyme-substrat stable pendant 9 jours à 30°C	[112]
Invertase (*zymomonos mobilis*)	Sorbitol	Production de sirop inverti	Comparaison des activités des formes libres et immobilisées : meilleurs affinité et taux d'hydrolyse de la forme immobilisée	[113]
Phosphorylase kinase	Calmodulin sepharose	Optimisation de l'adsorption de l'enzyme pour la purification	Purification de phosphorylase de lapin et de grenouille	[114]
Cellobiohydrolase I Endoglucanase I	Résine de papier	Compréhension des mécanismes d'adsorption application à l'industrie du papier	Etude des paramètres d'adsorption (force ionique, type de résine)	[115]
Alanine racémase (*Geobacillus stearothermophilus*)	Silice poreuse	Etude de paramètres influençant l'immobilisation (pores) Comparaison des activités des enzymes libres et immobilisées	Rétention de 51% de l'activité après immobilisation Six réutilisations possibles Meilleure stabilité thermique	[116]

Tableau I-8- Exemples d'applications d'enzymes immobilisées par adsorption.

Il est également possible d'aboutir à des immobilisations d'enzymes par adsorption basées sur des interactions spécifiques enzymes-supports. Ce type d'immobilisation engendre des interactions fortes et orientées liées à l'utilisation d'agents affins au support et à l'enzyme. Différents types d'agents sont relatés dans la littérature tels que le couple avidin/biotin, les anticorps ou les aptamères [117]

Cette méthodologie requiert soit :

- un pré-traitement du support, par couplage avec une entité présentant une forte affinité avec l'enzyme,
- une conjugaison de l'enzyme avec un ligand affin avec le support (liaisons avidin/biotin [118] ou polyhistidine tag/ions métalliques [119]).

Les avantages et inconvénients de ce type d'immobilisations sont résumés dans le Tableau I-9.

Immobilisation par adsorption via des interactions spécifiques enzymes-supports [120-122]	
Avantages	**Inconvénients**
✓ amélioration de la sélectivité, ✓ immobilisation orientée (et donc contrôlée) permettant une optimisation de l'activité de l'enzyme, ✓ perte d'enzyme moins prononcée (interaction non-covalente forte), ✓ faibles changements conformationnels de l'enzyme, ✓ immobilisation pouvant être réversible par traitement chimique (chauffage, pH) ✓ hausse de la stabilité	✓ phases commerciales onéreuses (ex avidin-agarose, Sigma-Aldrich, prix > 100€/mL, agarose fonctionnalisée avec des groupements anti-His-tag, prix > 1000€/1mL), ✓ temps d'immobilisation conséquent.

Tableau I-9- Synthèse des avantages et inconvénients de l'immobilisation d'enzyme par adsorption via des interactions spécifiques.

4.1.1. Exemple de l'immobilisation par adsorption via des interactions spécifiques avidin-biotin

Le procédé d'immobilisation, basé sur les interactions spécifiques entre la streptavidin/avidin-biotin, schématisé en Figure I-16, présente l'avantage de la présence d'interactions non-covalentes fortes entre les protéines avidin (66 kDa) ou la streptavidin (60 kDa) et la biotin avec une constante de dissociation de l'ordre de 1 femtomolaire [123]. La biotin est une petite molécule (244,31Da) qui, une fois introduite sur la cible, ne risque pas d'en affecter son activité [124].

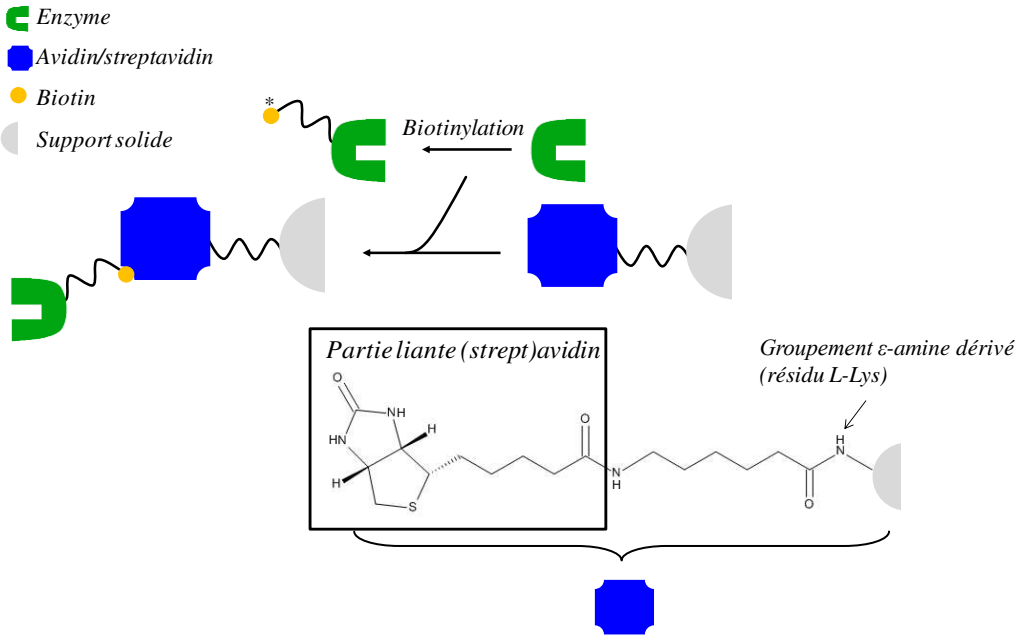


Figure I-16- Exemple de procédure d'immobilisation utilisant des interactions spécifiques entre la streptavidin/avidin et la biotin. L'enzyme préalablement biotinylée est directement couplée avec des supports solides commerciaux fonctionnalisés avec la streptavidin/avidin.

Cette approche se décompose en deux étapes :

- biotinylation de la cible biologique par réaction de la biotin avec le groupement ε-amino du résidue lysine de l'enzyme,

- mise en contact de la solution contenant la cible modifiée avec l'avidin (ou la streptavidin) lié au support.

4.2. Immobilisation par piégeage

La méthodologie d'immobilisation par piégeage d'enzymes est définie comme une méthode irréversible d'immobilisation d'enzymes. Elle peut être réalisée par piégeage dans les mailles d'un réseau polymérique ou par encapsulation dans des solutions sol-gel.

4.2.1. Principe du piégeage

Le principe du piégeage repose sur la formation d'un réseau polymérique via des réticulations autour de l'enzyme à piéger. A cette fin, le système est réalisé in-situ par mélange de monomères et de l'enzyme d'intérêt dans une solution tampon. Ce mode d'immobilisation permet de piéger l'enzyme dans un support de type polymérique (polyninyl alcohol, glycidyl methacrylate, poly(2-hydroxyethyl acrylate)) tout en permettant le passage du substrat et des produits à travers ce support. Une liste des avantages et des inconvénients de l'immobilisation par piégeage est proposée dans le Tableau I-10.

Immobilisation par piégeage [125]	
Avantages	**Inconvénients**
✓ peu de modifications structurales de l'enzyme de par l'absence de contraintes mécaniques, ✓ protection des enzymes du milieu extérieur, ✓ hausse de la stabilité.	× transfert limité du substrat au site actif, × possible perte d'enzymes, × faible capacité de chargement (quantité d'enzyme piégée).

Tableau I-10- Synthèse des avantages et inconvénients de l'immobilisation d'enzyme par piégeage.

Différents types de supports sont utilisés afin de créer un microenvironnement compatible à l'activité biologique tels que des solutions sol-gels réalisées avec différents matériaux : polymères acryliques [126-128], le silicone [129], le gel de silice [130-132], la fibrine [133], l'alginate [128, 134], la carrageenan [135], le polyurethane [136], le polyvinylalcohol [137] et l'agarose [138].

4.2.2. Immobilisation par encapsulation

L'immobilisation par encapsulation, méthode irréversible, est basée sur un principe similaire à l'immobilisation par piégeage. La solution d'enzyme est encapsulée ou enveloppée à l'intérieur d'une membrane empêchant la fuite d'enzyme ainsi que le contact de l'enzyme avec le milieu extérieur. La taille des particules des matériaux utilisés varie généralement entre 10 et 100 µm de diamètre. De ce fait, les substrats de volumes similaires pourront traverser les pores pour réagir avec l'enzyme [139].

Immobilisation par encapsulation [125, 140]	
Avantages	**Inconvénients**
✓ protection de l'enzyme du milieu extérieur, ✓ micro-environnement compatible à l'activité enzymatique, ✓ chargement des capsides en enzyme conséquent, ✓ peu de modification structurale, ✓ hausse de la stabilité.	✗ application limitée dans le cas de l'étude de substrats volumineux ne pouvant pas traverser la capside.

Tableau I-11- Synthèse des avantages et inconvénients de l'immobilisation d'enzyme par encapsulation.

Les matériaux sol-gel sont très populaires dans le cadre de l'encapsulation d'enzymes. Ces supports montrent une forte activité enzymatique liée aux taux de chargement important d'enzymes. L'immobilisation par encapsulation a été appliquée à différentes études dont certaines études on-line. Sakai-Kato et al. ont mis en place un bioréacteur basé sur une encapsulation de l'enzyme trypsine par une solution sol-gel de PMMA pour le suivi on-line de la digestion de protéines. L'enzyme trypsine immobilisée a montré une activité sur deux jours contrairement à la forme libre qui a perdu son activité au bout d'une journée. Après une semaine de stockage, le bioréacteur n'a montré aucune baisse d'activité [141].

Enzyme	Support	Type d'immobilisation	Remarques	Réf.
Invertase	Alginate de strontium et de barium	Piégeage	Comparaison des deux supports d'immobilisation par détermination des constantes cinétiques. Le support alginate de stontium-barium présente de meilleures propriétés (activité de l'enzyme) que les deux prises individuellement	[142]
Invertase	Poly(vinyl alcohol) PVA	Piégeage	Baisse d'activité de 50% après immobilisation, enzyme active après 100 jours de stockage	[143]
Cellulase	Tétramethoxysilane	Encapsulation	Rétention de 92% de l'activité après immobilisation Stabilité améliorée 40% de rétention d'activité après 5 utilisations	[144]
Cellulase Xylanase Laccase	Ester de cellulose	Piégeage	Amélioration des propriétés catalytiques : activité et réutilisation des enzymes Meilleure stabilité dans le temps	[145]
Adénylate/acetat kinases	Gel de polyacrylamide	Piégeage	Rétentions de 70% de l'activité pour l'adénylate kinase et de 30% pour l'acétate kinase Activité stable sur 5 jours	[146]
Créatine kinase	Monolithe sol-gel de silice	Encapsulation	Meilleures stabilité thermique et d'activité de l'enzyme immobilisée	[147]

Tableau I-12- Exemples d'applications d'enzymes immobilisées par piégeage et encapsulation.

La littérature reflète l'aspect diversifié des immobilisations par piégeage concernant les enzymes et les supports. Ce type d'immobilisation a été notamment utilisé pour les trois enzymes d'intérêts de ces travaux. Différents exemples sont résumés dans le Tableau I-12.

Au regard des remarques énoncées dans ce tableau, bien que l'étape d'immobilisation engendre généralement une baisse d'activité des enzymes, celle-ci améliore leur stabilité. Il est important de noter que l'efficacité de l'immobilisation est dépendante du type d'enzyme. En effet, bien que l'adénylate kinase et l'acétate kinase soient immobilisées selon la même procédure de piégeage dans un gel de polyacrylamine, leur activité après immobilisation diffère avec 70% de rétention d'activité pour l'adénylate kinase et 30% pour l'acétate kinase. Ainsi, il est important de veiller à choisir un support adapté à l'enzyme.

4.3. Immobilisation par réticulation intra-moléculaire

L'immobilisation par réticulation intra-moléculaire est une méthodologie d'immobilisation d'enzymes irréversible, ne nécessitant pas de support d'immobilisation pour empêcher la perte d'enzyme en solution. Ces enzymes agissent comme leur propre support. Cette immobilisation est réalisée par formation de réticulations intra-moléculaires entre les enzymes via l'utilisation d'agents bi- ou multifonctionnels tels que le glutaraldéhyde [148-150], le dextran polyaldéhyde [151] ou des nanoparticules (TiO_2, MgO, Cu, Ni, Fe_3O_4) [152]. Ces agents permettent la formation de ponts entre les enzymes créant un réseau réticulé en trois dimensions. Les avantages et les inconvénients de ce type d'immobilisation sont résumés dans le Tableau I-13.

Immobilisation par réticulation intra-moléculaire [125, 139, 140]	
Avantages	**Inconvénients**
✓ immobilisation sans support, ✓ stabilisation des enzymes par rigidification de la structure (liaisons intra-moléculaires).	✗ contrôle rigoureux nécessaire des conditions de précipitations (pH, température, concentrations d'enzymes…), ✗ consommation importante d'enzymes pour initier la cristallisation (aux alentours de 50 mg [148]), ✗ liaison non orientée.

Tableau I-13- Synthèse des avantages et inconvénients de l'immobilisation d'enzyme par réticulation intra-moléculaire..

Enzyme	Agent de réticulation	Remarques	Réf.
Invertase	Glutaraldéhyde	Changements de condition de pH et de température Augmentation de la stabilité thermique Diminution de K_M et V_{max}	[153]
β-glucosidase	Glutaraldéhyde	Meilleure stabilité de temps Rétention de plus de 90% de l'activité après 10 cycles d'utilisation Perte d'activité en comparaison de l'enzyme libre (diminution de V_{max}, hausse de K_M)	[154]
Cellulase	Glutaraldéhyde	Agrégats préparés dans un réacteur microfluidique Meilleure stabilité thermique (>60°C) Possibilité de 5 cycles d'utilisation	[155]
Cellulase	Glutaraldéhyde (noyau de silice)	Conversion du cellobiose en glucose deux fois plus efficace avec le noyau de silice Perte de 20% d'activité après 5 cycles d'utilisation de 24h	[156]

Tableau I-14- Exemples d'applications d'enzymes immobilisées par réticulation intra-moléculaire.

D'après les exemples cités dans le Tableau I-14, la combinaison de deux types d'immobilisation (réticulation/adsorption) peut prodiguer de meilleures propriétés [156]. Comme mentionné précédemment, chaque processus d'immobilisation présente des avantages et des inconvénients. Les limites de chaque procédé individuel peuvent être contre balancées par la combinaison de différentes stratégies d'immobilisations [117].

4.4. Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation covalente est l'une des techniques d'immobilisation la plus utilisée pour l'immobilisation irréversible d'enzymes. La grande majorité de ce type d'immobilisation est basée sur le couplage d'un groupement terminal ε-amino d'un groupement lysine, exposé à la surface de la protéine, avec une phase stationnaire. L'activité d'une enzyme immobilisée dépend majoritairement de la taille et de la forme du support ainsi que de la nature du couplage. Les matrices utilisées pour ce type d'immobilisation sont généralement des matrices d'agarose, cellulose, de polychlorure de vinyle, de silice et de verre poreux. Les groupements fonctionnels peuvent être ajoutés au support par modifications chimiques afin de générer des groupements actifs. Il existe un grand nombre de phases stationnaires activatrices évoquées dans la littérature. La liste suivante, schématisée en Figure I-17, est non exhaustive.

- Phase activée contenant un groupement aldéhyde **(A)** : elles sont généralement générées par couplage entre un groupement aldéhyde, obtenu par dérivation d'un support amine avec du glutaraldéhyde [157-159], ou par ouverture d'un groupement époxyde suivi d'un clivage oxydant générant la formation d'un diol [160, 161].
- Phase activée par un réactif contenant deux groupements de chlorure d'acyle **(B)** : un des groupements chlorure réagit avec l'amine du support tandis que l'autre peut se lier à l'enzyme via le groupement amine [162].
- Phase activée via la réaction avec un bromure de cyanogène **(C)** : une amine réactive est formée *via* un groupement d'ester cyanique à la surface de l'enzyme [163].
- Phase activée par groupements époxyde **(D)** : ils peuvent être couplés directement à l'enzyme par réaction entre les groupements amine et époxyde par addition nucléophile [164]. Ce type de phase peut-être obtenu par activation d'un gel d'agarose avec de l'épichlorohydrine.
- Support polymérique **(E)** : l'obtention du support polymérique peut être basée sur la réaction entre un monomère tel que l'acide acrylique N-hydroxysuccinimide **(E_1)** [165] et le poly(2-vinyl-4,4-dimethylazlactone) **(E_2)** [166].

Plusieurs études reportées dans la littérature montrent que ce type d'immobilisation augmente la durée de vie ainsi que la stabilité thermique des enzymes [167-170].

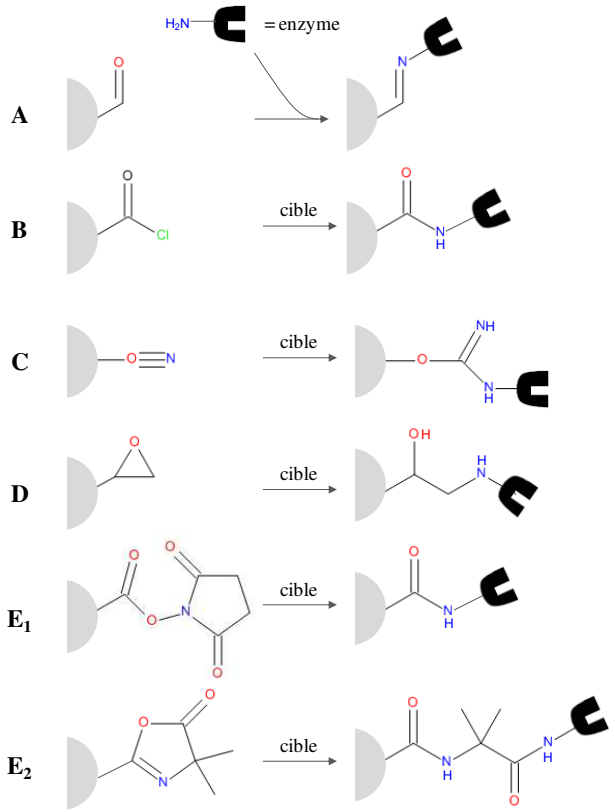


Figure I-17- Méthodes d'immobilisations covalentes d'enzymes utilisant les résidus amines à la surface des enzymes.

Une liste des avantages et des inconvénients de l'immobilisation par liaison covalente est proposée dans le Tableau I-15.

Immobilisation par liaison covalente [139, 167-170]	
Avantages	**Inconvénients**
✓ liaison covalente empêchant la fuite d'enzyme, ✓ hausse de la stabilité.	× perte d'activité de l'enzyme (liaison non orientée)

Tableau I-15- Avantages et inconvénients de l'immobilisation par liaison covalente.

L'immobilisation réalisée lors de ce projet a été préalablement développée au sein de notre laboratoire. Cette immobilisation sur ***bille de silice*** *consiste en une* ***liaison covalente*** *entre les groupements terminaux ε-amino de résidu lysine de la protéine et la bille de silice via l'utilisation d'un bras espaceur,* ***le glutaraldéhyde*** *(GLA). Pour cela, Les billes de silice vierges sont dans un premier temps activées avec l'agent (3-aminopropyl)triethoxysilane (****APTES****). Le glutaraldéhyde est ensuite additionné par réaction d'addition nucléophile entre le groupement amine du siloxane et le groupement aldéhyde du glutaraldéhyde. Finalement, l'enzyme est immobilisées grâce à des réactions entre les groupements ε-amino des résidus lysine et le deuxième groupement aldéhyde du glutaraldéhyde. Cette voie d'immobilisation est schématisée en Figure I-18.*

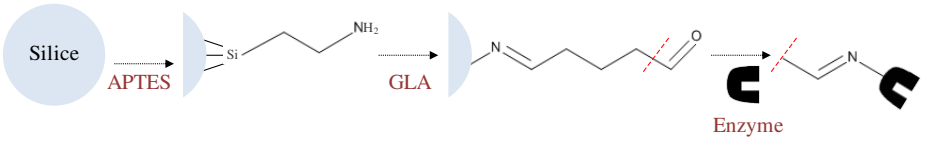


Figure I-18- Voie d'immobilisation covalente des enzymes sur bille de silice.

Bien qu'une baisse de l'activité enzymatique ait été détectée avec ce type d'immobilisation, cette technique a préalablement fait ses preuves dans le contexte d'études d'interactions enzymes-inhibiteurs au sein de notre laboratoire.

Dans le contexte de notre étude, l'immobilisation covalente d'enzymes sur support a été réalisée pour l'étude d'interaction ***enzymes-inhibiteurs*** *(****cellobiohydrolase II****) présentée dans le chapitre* ***II*** *ainsi que pour l'étude de la cascade de phosphorylations impliquant trois enzymes* ***kinases*** *présentées dans le* ***chapitre III*** *de ce manuscrit.*

A la suite d'une présentation succincte des techniques pour l'études des interactions enzymes-ligands basées sur une détection en spectrométrie de masse ainsi que des stratégies d'immobilisations, nous introduirons les différentes techniques mises en œuvre durant ce projet de thèse. Nous présenterons donc les techniques suivantes :

- **Thin-Layer Chromatgraphy (TLC),**
- **MALDI TOFMS** : les principes de la source Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization ainsi que de l'analyseur temps de vol,
- **(LC)-ESI-QTOF-MS** : la source à électronébulisation.

Afin d'apporter une meilleure compréhension du contexte de ces travaux, le diagramme schématisé en

Figure I-19 permettra de resituer l'ensemble de ces techniques utilisées, aux méthodologies développées avec au sein des chapitres II et III.

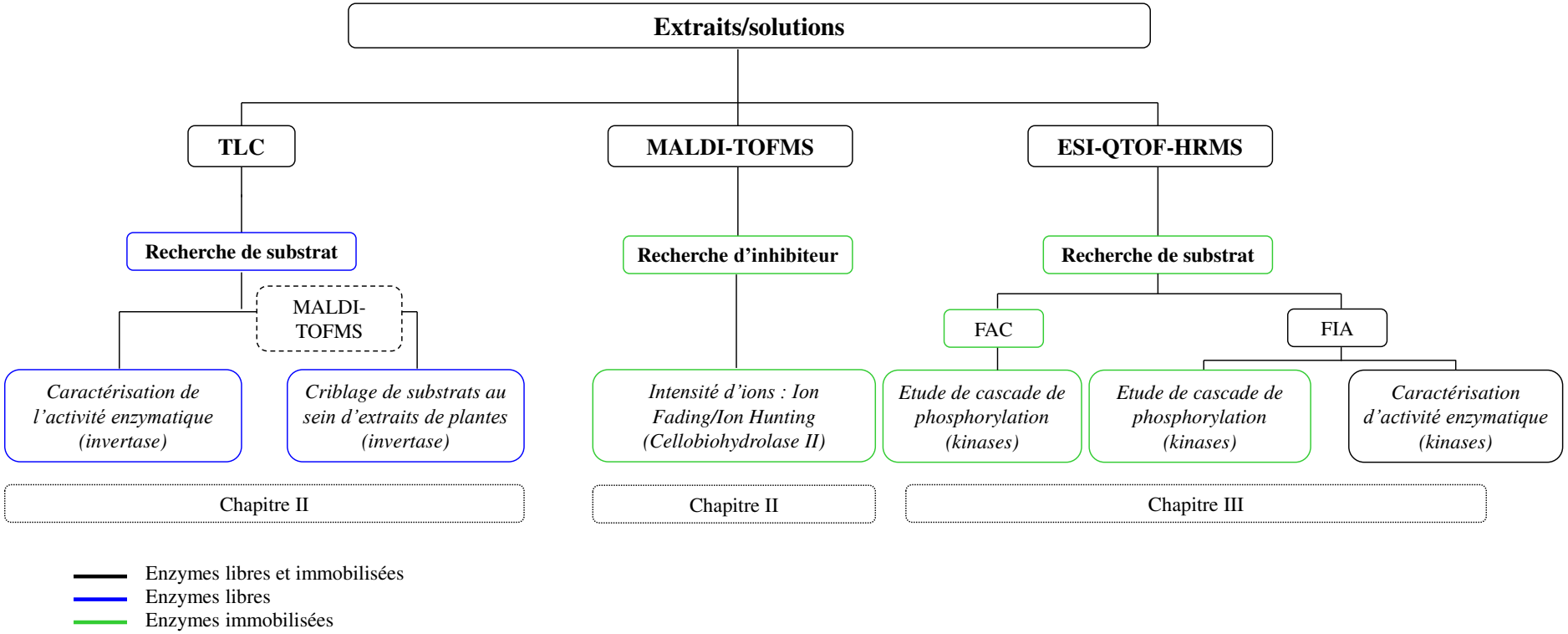


Figure I-19- Techniques utilisées lors de ces travaux de thèse pour le développement de méthodologies dans le cadre de l'étude d'interactions enzyme/substrat et enzymes-inhibiteurs. Méthodologies basées sur les enzymes libres et immobilisées pour la mise en place de caractérisation d'activité enzymatique, le suivi de conversions enzymatiques ainsi que la recherche d'inhibiteurs au sein de mélanges simples ou de milieux complexes.

5. Description des techniques utilisées

5.1. Chromatographie sur Couche Mince ou Thin-Layer Chromatography

Dans le cadre des travaux réalisés lors de cette thèse, la technique Thin-layer Chromatography a été employée pour la mise en place d'une étude d'activité de l'invertase (hydrolase de sucres). Cette technique est présentée au sein du chapitre II de ce manuscrit. Cette étude s'est articulée autour d'un développement méthodologique pour la caractérisation de l'activité enzymatique et pour le criblage de substrats au sein d'extraits de plantes.

Afin de mener à bien ces développements, il a été développé une validation de méthode de séparation et de quantification de sucres. Dans ce contexte, nous proposons une description globale de la technique avant de nous focaliser sur l'étude de séparation et de détection de la famille moléculaire d'intérêt, à savoir les sucres.

5.2. Concepts généraux

La Chromatographie sur Couche Mince, plus communément connue sous le terme anglais « Thin Layer Chromatography » ou « TLC », est une technique chromatographique apparue vers la fin des années 1930, avec le développement de la « drop chromatography » introduite par Izmailov et Schreiber de l'institut expérimental de pharmacie de l'Université de Kharkov. Les premières chromatographies réalisées par cette équipe consistaient en une séparation circulaire d'extraits de plantes. Ces séparations étaient initiées par dépôt d'une goutte de solvant sur différents types de surface (oxyde de magnésium, oxyde d'aluminium) reposant sur un verre de microscope [171]. Dès ses débuts, cette technique a présenté de nombreux avantages tels que la rapidité, la simplicité de mise en œuvre et de grandes capacités de séparations.

La TLC, telle que nous la connaissons aujourd'hui, a été développée dans les années 1950 à travers la mise en place de procédures, des matériels, des nomenclatures et de systèmes de solvants standardisés pour la séparation de différentes classes de composés. Cette standardisation de procédures a permis d'augmenter l'efficacité de séparation et de reproductibilité des analyses [172].

Au cours de cette même période, la commercialisation de matériels et d'appareils à plus large échelle, a permis à cette technique de connaître une accélération de son développement, découlant de son accessibilité en laboratoires. La TLC était considérée comme une technique qualitative sous bien des aspects. La dimension quantitative a été démontrée par Kirchner *et al*. en 1954 par la description d'une méthode d'élution pour l'identification et la quantification de biphényl au sein d'extraits d'agrumes. Ainsi, des concentrations de 0,1 ppm et 600 ppm de biphényl ont été déterminées dans le jus et les pelures de peaux de citron [173].

La chromatographie planaire a connu d'importantes évolutions dans le choix des phases stationnaires, des systèmes de séparation, dans l'automatisation du processus et dans le couplage à différents types de détections (UV, MS…). Les caractéristiques principales d'une TLC moderne regroupent :

- l'utilisation d'une surface de séparation de particules fines (séparations rapides et efficaces),
- l'utilisation de solvants possédant différentes propriétés de sorption (optimisation de la sélectivité),
- l'utilisation d'une instrumentation pratique et automatisée,
- la possibilité de détections variées (UV, MS, NMR).

La chromatographie planaire regroupe trois sortes de chromatographies présentées dans le Tableau I-16 : « Thin-Layer Chromatography, TLC », « High Performance Thin-Layer Chromatography, HPTLC » et « Ultra Thin-Layer Chromatography, UTLC ».

Paramètres	TLC	HPTLC	UTLC
Taille de plaque (cm)	20x20	10x10	6x3,6
Epaisseur plaque (µm)	100-250	100-200	10
Taille des particules (µm)	8-10	6-8	/
Volume appliqué (µL)	1-5	0,1-5	0,01-0,1
Temps de séparation (min)	30-200	3-20	1-5
Distance de migration (cm)	6-15	3-7	1-3

Tableau I-16- Comparaison des paramètres des plaques TLC, HPTLC, UTLC.

La catégorie la plus connue et la plus utilisée est la TLC. Elle a connu un grand nombre de développements relatifs à la phase stationnaire, à l'efficacité de séparation et aux couplages avec des techniques de détection. La HPTLC se distingue de la TLC par des particules de phase stationnaire plus petites (6-8 µm contre 8-10 µm pour la TLC) avec une distribution plus homogène et une épaisseur de phase stationnaire plus fine (100-200 µm contre 100-250 µm). La sous-catégorie la plus récente est l'UTLC. Cette technique peut être considérée de nos jours comme étant à la pointe de la miniaturisation et de la diversité des phases stationnaires.

5.3. Principe de la Thin-Layer Chromatography

La Thin-Layer Chromatography est une technique séquentielle (semi-automatisée) réalisée en off-line selon les étapes présentées en Figure I-20.

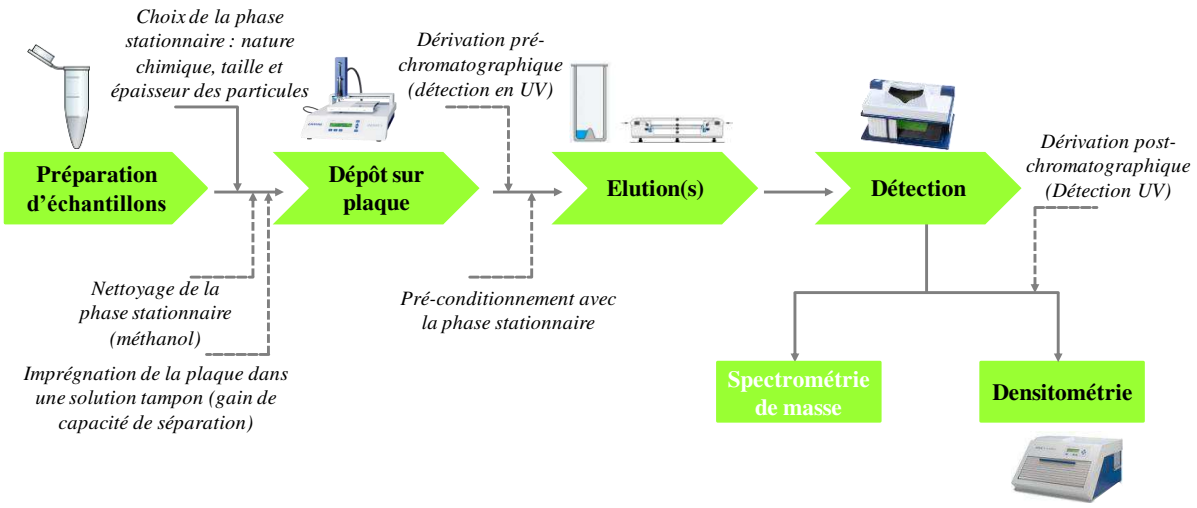


Figure I-20- Schématisation du procédé d'analyse d'échantillons par Thin-Layer Chromatography.

Contrairement à la majorité des techniques chromatographiques, la détection et l'identification des différents composés ne sont pas réalisées par l'intermédiaire de l'étude du temps d'élution ou de migration mais par calcul d'un facteur de retardement. Ce facteur, nommé R_F, est égal au quotient des distances de migration de l'échantillon (Z_n) sur celle de la phase mobile (Z_f) selon l'équation suivante :

$$\frac{Z_n}{Z_f - Z_0}$$

Z_n : distance de migration de l'échantillon à partir de la zone de dépôt (mm)

Z_f : distance de migration du front de solvant (mm)

Z_0 : distance entre la base de la plaque et la ligne de dépôt (mm)

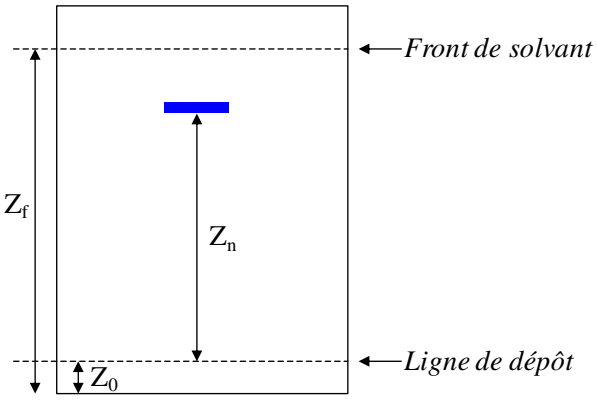


Figure I-21- Paramètres de migration sur plaque TLC développée.

Afin de faciliter la présentation des résultats, la valeur R_F peut être multipliée par 100 pour décrire la valeur hR_F. Cette dernière dépend entièrement des caractéristiques des composés analysés, pour un système de séparation et dans des conditions de température et d'humidité donnés.

L'identification des composés par TLC est réalisée par comparaison des R_F d'inconnus à des R_F de composés de références. De ce fait, cette identification n'apparaît possible que pour des valeurs de R_F

constantes pour un système donné. Cependant, celles-ci présentent des fluctuations selon différents paramètres de séparation :

- le type et la dimension de la chambre de migration,
- la nature et la taille de la plaque TLC,
- le volume et la composition de la phase mobile,
- le conditionnement de la chambre,
- le taux d'humidité de la chambre,
- la préparation des échantillons en amont de l'analyse.

De cette manière, l'identification de composés analysés par TLC peut être effectuée par couplage à un détecteur comme le couplage TLC-MS présenté en section 3.2.3 de ce chapitre.

5.3.1. Protocole d'analyse par Thin-Layer Chromatography

Avant la réalisation du dépôt et de l'analyse par TLC, les analytes d'intérêts sont dissous dans un solvant volatil (MeOH, ACN) permettant :

- une évaporation après dépôt,
- une faible viscosité (dépôt, migration),
- une capacité de mouillabilité de la surface de plaque TLC (optimisation du dépôt sur la surface).

Les échantillons sont ensuite déposés sur la plaque manuellement ou de manière automatisée grâce à l'utilisation d'un déposeur automatique permettant la sélection de différents volumes (usuellement allant de 1 µL à 10 µL) et vials d'application. Ensuite, la plaque est installée dans une chambre de migration verticale ou horizontale, conditionnée avec la phase mobile d'intérêt (saturation en phase vapeur). Lors du contact de la phase mobile avec la phase stationnaire, la phase mobile migre sur la plaque dans une direction donnée et sur une distance déterminée, appelée « front de solvant ». Après migration(s), le solvant est évaporé et la détection est réalisée directement sur la phase stationnaire. La détection peut être réalisée selon différents modes comme :

- la détection densitométrique quantitative. Cette détection peut être réalisée après révélation avec des réactifs spécifiques à une famille de composés (réactif Neu pour les flavones, acide 4-aminobenzoïque pour les sucres),
- la détection par spectrométrie de masse pour l'identification voire la caractérisation des molécules.

5.3.2. Choix de la phase stationnaire

Les mécanismes de séparations des analytes en TLC sont dominés par l'utilisation de larges gammes de phases stationnaires et de différents types de chromatographies. Une grande variété de plaques commerciales est disponible sur différents types de supports comme des supports en verre, en plastique ou en aluminium.

D'après l'étude de 1752 publications réalisées entre 1979 et 1985, présentées dans le Tableau I-17, les phases stationnaires appréciées et les plus couramment utilisées pour la chromatographie d'absorption en TLC sont le gel de silice, (phase la plus utilisée en TLC), l'oxyde d'aluminium, kieselguhr ainsi que le silicate de magnésium [174]. Les chromatographies de partage sont plus fréquemment employées avec des phases de types cellulosiques ou de polyamide (utilisées aussi pour l'échange d'ions) tandis que les phases de types gels (dextrans) sont particulièrement appréciées pour leur efficacité de séparation dans les chromatographies d'exclusions stériques.

Type de phase	TLC (%d'utilisation)	Type de chromatographie
Gel de silice	73.3	Adsorption
Cellulose	5.2	Partage
Polyamide	1.8	Echange d'ions/partage/adsorption
Phases liées	5.5	Partage
Oxyde d'aluminium	2.6	Adsorption
Kieselguhr	0.3	Adsorption
Gels	0.4	Exclusion stérique

Tableau I-17- Types de phases stationnaires et de chromatographies associées les plus utilisées répertoriées dans 1752 publications entre 1979 et 1985.

5.3.3. Optimisation de la séparation en TLC par imprégnation de la plaque dans une solution tampon

Dans le but d'améliorer la séparation d'un mélange de composés, une étape d'imprégnation de la plaque (solution tampon, agents chélatant, ions métalliques) peut être réalisée en amont du dépôt des échantillons. Le dépôt d'un film fin de ces solutions à la surface de la plaque TLC permet de modifier les propriétés de la phase stationnaire afin d'augmenter le pouvoir résolutif de la séparation. Différents agents sont reportés dans la littérature tels que l'acide borique [175] (séparation des sucres et lipides), le nitrate d'argent [176] (composés possédant une double liaison carbonée), l'acétate de magnésium [177] (phospholipides). Ces agents sont appliqués sur les plaques selon différents modes de dépôts comme la pulvérisation, le dépôt par pinceau, les immersions verticales ou horizontales ou par développement de la plaque dans la solution d'intérêt [178].

5.3.4. Dépôt des échantillons sur plaque TLC

L'étape de dépôt des échantillons est décisive pour l'obtention d'une séparation optimale et d'une quantification fiable des composés. L'application automatique (ou semi-automatique) est usuellement préférée à l'application manuelle pour l'obtention de résultats répétables et de spots bien définis. L'échantillon est déposé sous forme de fines bandes par vaporisation d'un spray d'azote à la surface de la plaque. Différents paramètres de dépôts sont à considérer pour l'obtention d'une séparation optimale :

- Le volume d'application : ce paramètre est décisif. Il doit être optimisé de manière à déposer une quantité suffisante de produit pour la détection et la quantification des analytes, mais pas

sans excès afin d'éviter tout effet de diffusion ou de co-migration qui impacterait considérablement la séparation. Les volumes appliqués sont usuellement compris entre 1µL et 10 µL.

- La distance entre deux zones de dépôts : cette distance doit être judicieusement choisie pour éviter toute contamination inter-échantillons durant la migration tout en optimisant le nombre de dépôts sur la plaque. Généralement, une distance de 5 mm est appliquée.
- La vitesse de dépôts : cette vitesse doit être inférieure à la vitesse d'évaporation du solvant de dissolution pour éviter toute diffusion. Selon le solvant utilisé, cette vitesse peut varier de 4 µL/s à 15 µL/s.
- La distance du bord de la plaque : il est nécessaire de laisser un espace suffisant afin d'éviter tout phénomène de migration de bord. L'espace recommandé par les constructeurs est généralement de 20 mm.
- La hauteur de dépôt : l'échantillon doit être déposé à une hauteur qui ne sera pas immergée par la phase mobile lors de la mise en place de la plaque dans la chambre de migration. La migration commencera alors par capillarité et non pas par immersion (diminution des effets de diffusion). Le niveau de solvant d'une cuve de 20 x 10 cm, remplie de 10 mL de solvant, est de 5 mm. De ce fait, la ligne de dépôt doit se situer à plus de 8 mm du bord.

Remarque : l'ensemble de ces paramètres ont été optimisé lors de la validation de méthodes de séparation et de quantification des sucres présentée dans le chapitre II de ce manuscrit.

5.3.5. Choix de la phase mobile

Les phases mobiles utilisées en TLC sont généralement sélectionnées après recherche dans la littérature des phases utilisées pour la séparation des composés d'intérêts. Les sélections des phases mobiles lors de cette thèse ont donc été réalisées en adéquation avec la littérature. Cependant, dans le cadre de développements méthodologiques, deux paramètres principaux sont à considérer dans le choix de solvants de migration à savoir :

- la force éluante (capacité d'élution des composés sur la phase stationnaire),
- la sélectivité (capacité de séparation des analytes).

Afin de faciliter le choix des phases mobiles, Snyder a réalisé un classement de solvants regroupés dans un triangle [179].

Classe	Solvants
I	Ethers aliphatiques
II	Alcools aliphatiques
III	Pyridine, THF, DMSO, DMF, diéthylène glycol
IV	Alcool benzylique, éthylène glycol, acide acétique, formamide
V	Dichlorométhane
VI	Cétones, esters, dioxane, nitriles
VII	Hydrocarbures aromatiques (halogénés), composés nitrés
VIII	Ethers aliphatiqes, trialkylphosphates

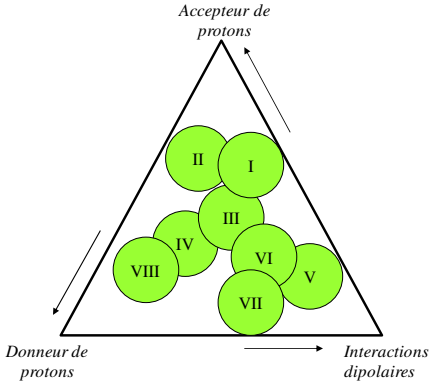


Figure I-22- Classification des solvants dans le triangle de Snyder. Solvants regroupés en trois catégories (donneur/accepteur de protons, interaction dipolaire) et en 8 groupes de sélectivité.

Dans le triangle se Snyder sont classés différents solvants en trois catégories selon leur capacité à créer des interactions accepteurs de protons, donneurs de protons ou des interactions dipolaires et en huit groupes de sélectivité. Ainsi, le remplacement d'un solvant par un autre solvant du même groupe de sélectivité n'aura pas d'impact sur la sélectivité de la séparation et donc sur l'ordre de migration des composés. Cependant, il aura un effet sur la solubilité de l'échantillon ainsi que sur la force éluante de la phase mobile.

5.3.6. Dérivation

La dérivation chimique est une étape optionnelle pour la détection d'analytes sur plaque TLC. Cette étape n'est pas nécessaire pour la détection de composés colorés visibles sous lumière blanche ou pour la détection de composés possédant un chromophore détectable sous UV. Elle devient cependant indispensable pour la détection de composés n'absorbant ni dans le domaine visible ni dans le domaine UV. Cette révélation consiste en une dérivation chimique réalisée soit avant dépôt de l'échantillon sur la plaque (pré-chromatographique), ou après l'étape de migration (post-chromatographique). Les dérivations pré-chromatographiques sont usuellement moins utilisées que les dérivations post-chromatographiques.

5.3.7. Détection par densitométrie

La détection par densitométrie permet de représenter le profil TLC sous forme d'un densitogramme par mesure d'absorbance ou de fluorescence des composés. Les densitomètres sont constitués de trois types de lampes (deutérium : 10-400 nm, tungstène : 400-800 nm, mercure : 400-600 nm) permettant de balayer une large gamme de longueurs d'onde. A travers un système de lentilles, le faisceau de lumière est dirigé verticalement à la plaque. Cette dernière est placée sur un support mobile, se dirigeant piste par piste selon les données rentrées préalablement dans le logiciel. Une ligne de base est réalisée à l'emplacement indiqué par l'utilisateur.

En mesure d'absorbance de la lumière réfléchie, une diminution de la ligne de base est observée lors de l'absorption de la lumière par l'analyte. Ce signal sera ensuite inversé électroniquement afin d'obtenir un pic positif d'absorbance. Cette mesure peut être aussi réalisée par transmission. Cependant, ce mode est moins couramment utilisé car le choix du type de plaque est restreint (verre et non aluminium).

Le volet de ce chapitre a permis de définir les notions liées à l'analyse par Thin-Layer Chromatography. Comme mentionné précédemment, une validation de méthode de la séparation et de la quantification des sucres sera présentée dans le chapitre II de ce manuscrit. De ce fait, il convient de présenter un état de l'art des conditions expérimentales présentées dans la littérature pour la séparation, la détection et la quantification de cette famille de composés.

5.4. Etude de séparation des sucres par Thin-Layer Chromatography

Les sucres possèdent une formule chimique $C_n(H_2O)_n$ où 5 (pentoses) voire 6 unités (hexoses) forment le cycle de base de la structure. La grande famille des sucres inclut :

- des monomères appelés monosaccharides (nombre d'ose n = 1),
- des dimères (disaccharides, n = 2),
- des oligosaccharides ($2 < n < 10$)
- des polysaccharides de structures plus complexes ($n > 10$).

La complexité de leur séparation résulte de la grande variété des formes existantes (hémiacétals, hemikétals, cycliques, acycliques) et de la forte présence d'isomères. Par ailleurs, à cette difficulté de séparation s'ajoute une détection difficile due au manque de groupements chromophore et fluorophore. En raison de la complexité et la diversité de cette famille moléculaire, il n'existe pas de système de solvants de migration universel permettant une séparation optimale de ces composés. Une grande variété de systèmes a été prouvée comme étant efficace pour les séparations de mono- et de polysaccharides. Parmi ces systèmes peuvent être cités l'eau combinée à l'acétonitrile, les alcools, l'acétone, l'acide acétique, l'acétate d'éthyle et la pyridine. Des phases mobiles constituées d'acétonitrile et d'eau (de 85/15 v/v à 75/25 v/v) prodiguent de bonnes résolutions combinées à des temps courts de migration. Cette diversité en termes de type de phase stationnaire et de système de migration est mise en exergue par les différents exemples non exhaustifs de conditions de séparation résumés dans les Tableau I-18, 19, 20.

Bien que la séparation des sucres puisse être réalisée grâce à l'utilisation de plaques commercialement disponibles, plusieurs solutions d'imprégnations ont été développées afin d'ajuster la sélectivité et d'obtenir une meilleure résolution [180]. Dans le cadre de la séparation de sucres, différents types d'agents d'imprégnations ont été développés tels que des solutions de phosphates, d'acide borique, de bisulphate ou de sels métalliques. Des exemples d'applications de ces agents d'imprégnation sont présentés dans le Tableau I-21. Cette méthodologie d'imprégnation présente également une diversité

relative aux agents d'imprégnation et aux conditions de préparation de plaques (température et temps de séchage).

Plaques	Remarques	Système d'élution	Sucres analysés	Echantillons	Réf.
Cellulose	TLC	n-Butanol-acide acétique-eau (42:10:7	Muco-polysaccharides	Urine	[181]
	TLC	n-Butanol-éthanol-eau (3:2:1)	Fructose, galactose, glucose, lactose, GlcNAc, fructose, xylose, 3'- et 6'-sialillactose, malto-oligosaccharides	Mélange test, sang, urine, lait, excréments, lait	[182]
	TLC	n-Butanol-pyridine-acide acétique-eau (10:6:1:3)	Raffinose, maltose, glucose, fructose, isomalto-oligosaccharides	Produits de réactions de sucrases	[183]
	TLC	n-Butanol-acide acétique-eau (3:1:1)	Monosaccharides de xyloglucanes	Solutions tests	[184]
	TLC	Acide formique-butanone-butanol-eau (15 :30 :40 :15)	Mono- et disaccharides, aldohexoses, kethohexoses, aldopentoses	Solutions tests	[185]

Tableau I-18 - Exemples de phases mobiles développées pour l'analyse par TLC de sucres sur plaque cellulose par Thin-Layer Chromatography.

Plaques	Remarques	Système d'élution	Sucres analysés	Echantillons	Réf.
Amino	TLC imprégnée avec un tampon phosphate	Acétonitrile-eau (90:10-60:40)	Mono-, di-, et trisaccharides, malto-oligosaccharides	Solution test	[186]
	HPTLC	Acétonitrile-eau (85:15)	Glucose, fructose	Solution test, miel, chocolat, suspension E. coli	[187]
	TLC	Acetronitrile-10 mM aq. Acétate de triethylamine (3:2)	Oligosaccharides	Mucines	[188]
	HPTLC imprégnée dans une solution de KH_2PO_4	Acétonitrile-acétone-eau (gradient)	Raffinose, lactose, cellobiose, galactose, glucose, fructose, sorbitol, arabinose, xylose, ribose, rhamnose, malto-oligosaccharides	Solution test, bière	[189]
	HPTLC	Acétate d'éthyl, pyridine, acide acétique-acide propionique-eau (10:10:1:1:2)	Lactose, saccharose, galactose, glucose, fructose, arabinose, xylose, ribose	Solution test	[190]
	HPTLC	Acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (12:6:1:2) (2:6:1:3)	Mono-, disaccharides, oligosaccharides	Solution test	[191]

Tableau I-19- Exemples de phases mobiles développées pour l'analyse de sucres par TLC sur plaque amino.

Plaques	Remarques	Système d'élution	Sucres analysés	Echantillons	Ref
Silice	TLC	Acétonitrile-eau (85:15)	Raffinose, lactose, maltose, galactose, glucose, fructose, xylose, rhamnose	Solution test	[200]
	HPTLC imprégnée avec du bisulphate de sodium		Mono- et oligosaccharides	Solution test	[201]
	HPTLC	Acétonitrile-0,3% aq. NH3-2M aq. KCl (85:15:5)	Rhamnose, xylose, fructose, glucose, maltose, lactose, malto-oligosaccharides	Solution test	[202]
	TLC	Acétonitrile-acétate d'éthyle-1-propanol-eau (85:20:50:X; X=50-70 ou 90-100)	Gluco-oligosaccharides	Amylopectines	[203]
	TLC	Acétone-eau-chloroforme (8 :0,5 :1 :1)	Mono-, oligosaccharides, dérivés α-méthylés	Solution test	[192]
	TLC	n-Butanol-acide acétique-eau (2:1:1)	Oligosaccharides, glucose	Urine	[204]
	TLC	n-butanol-acétone-eau (3:3:1)	Verbascose, stachyose, raffinose	Extrait de plante	[205]
	TLC imprégnée avec du bisulphate de sodium	Propanol-eau (85:15)	Mono-, di-, et trisaccharides	Solution test	[195]
	HPTLC	Acétate d'éthyle-pyridine-acide acétique-eau (75:15:10:10)	Xylose, glucose méthylé, rhamnose	Urine	[206]
	TLC imprégnée avec de l'acide molybdique ou phospho-tungstique	Acétate d'éthyle, 2-propanol-eau (2 :1 :1)	Mono-, di-, tri- et tétrasaccharides	Solution test	[207]

Tableau I-20- Exemples de phases mobiles développées pour l'analyse de sucres par TLC sur plaque de silice.

Agents	Système d'imprégnation	Phase stationnaire	Types de sucres	Eléments complémentaires	Réf.
Phosphates	Acétate de sodium, phosphate monosodium, phosphate disodium	TLC, gel de silice	Monosaccharides, oligosaccharides	Séchage 24 h à température ambiante (RT) et activation de la plaque 1h à 110°C	[192]
	Disodium phosphate	TLC, gel de silice	Monosaccharides, oligosaccharides	Activation 1 h à 105 °C, séchage dans un dessiccateur	[193]
	Monosodium phosphate	HPTLC, aminopropyl bonded silica	Disaccharides, pentoses, hexoses, heptoses	30 min sous hotte, 2 h à 70°C sous vide	[186]
Acide borique		TLC, gel de silice	Monosaccharides, oligosaccharides	Après imprégnation, séchage 24h à RT et activation de la plaque 1 h à 110°C	[175]
		TLC, gel de silice	Saccharose, lactose, arabinose, glucose	15 min à RT, 60 min 100°C	[194]
Bisulfite	Bisulphate de sodium	TLC, gel de silice	Monosaccharides, disaccharides, trisaccharides	30 min à RT, 1 h à 115°C	[195]
	Bisulphate de sodium, tampon citrate	HPTLC, gel de silice	Saccharose, glucose, fructose, galactose, ribose	60 min, 100°C	[196]
Sels métalliques	Complexe de sulfate et d'ammoniaque de cuivre (II)(CuSO4, Cu(NH3)n2+)	TLC, gel de silice	Monosaccharide, disaccharides (isomères)	Lavage quelques secondes dans l'eau distillée, séchage à RT, Activation 60 min 110°C.	[197]
	Na+, Mg2+, Al3+, Ca2+, Cr3+, Fe3+, Ni2+,Cu2+, Zn2+, Sr2+, Cd2+, Ba2+	TLC, gel de silice/Ionex-25SA	Monosaccharide, disaccharides (isomères)	Immersion dans l'eau distillée, 1h dans la solution aqueuse de sels, séchage 24 h, RT	[198]
Lanthanides	LA3+, Sm3+	TLC gel de silice/Ionex-25 SA Na	Fructose, galactose, glucose, mannose, talose, thréose, xylose	3 immersions dans l'eau distillée, 1h dans la solution aqueuse de lanthanide, 4-5h dans une solution de HCl, séchage 24h, RT	[199]

Tableau I-21- Exemples d'agents d'imprégnation utilisés pour la séparation des sucres par TLC.

5.4.1. Détection des sucres

Comme mentionné précédemment, la visualisation des sucres sur plaque TLC ne peut être réalisée qu'à la suite d'une étape de dérivation chimique pré- ou post-chromatographique.

a. Dérivation pré-chromatographique

La dérivation pré-chromatographique des sucres est couramment rencontrée dans les techniques de chromatographie autres que la chromatographie planaire. Plusieurs agents de dérivation sont décrits dans la littérature tels que :

- le dansyl ou dansylhydrazine [208],
- le 4-amino-4'-dimethylaminobenzène [209],
- le 4-(4-dimethylamino phenylazo)benzène sulfonyl hydrazine [210],
- le 2-aminoacridone [211],
- l'acide 8-aminonaphthalène-1,3,6-trisulfonique (ANTS) [212].

Cependant, du fait de temps de dérivation conséquents comparés aux temps de dérivation post-chromatographiques, les dérivations post-chromatographiques sont préférées en TLC.

b. Dérivation post-chromatographique

En vue de réaliser des études quantitatives, le mode de dépôt du révélateur ainsi que le temps et la température d'activation sont des paramètres primordiaux. Plusieurs types d'agents dérivants ont été décrits dans la littérature pour différents types de sucres (mono-, di- et oligosaccharides) présentant des valeurs variables de limite de détection. Les principaux agents dérivants pour l'analyse de sucres sont consignés dans le Tableau I-22.

Agent de dérivation	Sucres analysés	Limite de détection (/spot)	Type de plaque	Remarques	Réf.
Aniline (2%)-diphenylamine (2%)-acide phosphorique (15%)	Mono-, di- et oligosaccharides, malto-oligosaccharides	10 ng	Gel de silice, NH_2	10-15 min à 85-120°C, lecture (385 nm) après 20 min	[213-215]
Aniline-acide phosphorique	Mono et disaccharides	Glucose, fructose : 10 ng Maltose : 100 ng	Gel de silice, NH_2	Sucres réduits, 45 min à 125-130°C (365 nm)	[215]
Aniline-acide phtalique	Mono-, di, et oligosaccharides, sucres méthylés	10 µg	Gel de silice, aluminium, cellulose, polyamide	Sucres réduits, 20-30 min à 80-130°C (365 nm)	[216-218]
Acide 4-aminobenzoïque	Mono- et disaccharides	Lactose, fructose : 50 ng	Gel de silice, cellulose	15 min à 120°C (365 nm)	[219-222]
Acide 4-aminohipurique- acide phtalique	Mono- et disaccharides	10 ng	Gel de silice, cellulose, NH_2, polyamide	10 min à 140°C (365 nm)	[223]
Acide phtalique 4-anisidine	Mono-, di- et oligosaccharides	Pentoses 10 ng Fructose : 500 ng	Gel de silice, cellulose, NH_2, polyamide	10 min à 100-130°C (480 nm)	[224]
Anthrone	Ketoses, glycolipids	20-30 ng	Gel de silice	8 min à 110°C (435 nm)	[225]
2',7'-dichlorofluorecein tetraacétate	Mono-, di- et oligosaccharides	< 10 ng	Gel de silice	3-30 min à 100°C (313 nm)	[226]
Nitrate d'argent-hydroxyde de sodium	Mono-, di- et oligosaccharides	1 ng	Gel de silice, cellulose	1-2 min à 100°C (530 nm)	[227]

Tableau I-22- Exemples d'agents de dérivation utilisés pour la détection des sucres par TLC.

Description des paramètres appliqués à l'approche Thin-Layer Chromatography dans le cadre de l'analyse des sucres

Dans le cadre du développement de la caractérisation d'activité de l'enzyme ***invertase*** *par* ***TLC-UV*** *et du criblage de substrats issus des métabolites primaires d'extraits de plantes par* ***TLC-MALDI-TOFMS,*** *une* ***validation de méthode*** *de séparation des trois sucres standards, le saccharose, le glucose et le fructose est présentée en* ***chapitre II*** *du manuscrit. L'ensemble des conditions de séparation (phase stationnaire, agent d'imprégnation et phase mobile) et de détection (agent de dérivation) sont repérées dans chaque tableau récapitulatif. La séparation et la détection des sucres d'intérêts ont été réalisées par :*

- ***imprégnation*** *de la plaque TLC (****gel de silice****) dans une solution tampon de* ***bisulphate****,*
- *migration réalisée avec une phase mobile générant une migration rapide des composés (****ACN/H_2O****),*
- *par dérivation avec* ***l'acide 4-aminobenzoïque*** *(détection sensible et répétable).*

A la suite d'une présentation de l'état de l'art de la technique Thin-Layer Chromatography contextualisée à l'étude des sucres, nous aborderons dans le paragraphe ci-après le principe de la technique MALDI TOFMS qui sera couplée au support TLC dans le cadre du criblage de substrat de l'invertase présenté dans le chapitre II. En premier lieu, nous présenterons le principe de la source combinée à l'utilisation de matrice. Nous décrirons ensuite le principe de l'analyseur à temps de vol (TOF).

5.4.2. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry

La technique de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) a été développée par plusieurs équipes dont celles de Franz Hillenkamp, Karas et Tanaka en 1985 [228]. Cette technique d'ionisation est réalisée sous vide (10^{-7} mbar) par irradiation laser pulsée d'une longueur d'onde généralement comprise entre 180 et 450 nm. Lors d'une analyse MALDI, l'analyte est mélangé et co-cristallisé avec une matrice organique de faible poids moléculaire devant présenter certains critères. En effet, cette matrice doit :

- favoriser la séparation des molécules cibles les unes des autres,
- absorber à la longueur d'onde du laser d'ionisation,
- permettre la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires pour favoriser les transferts d'énergie au sein de l'échantillon,
- favoriser l'ionisation en induisant des transferts de protons de la matrice vers les molécules cibles.

La matrice doit être présente en large excès par rapport aux molécules cibles (rapport analytes/matrice 1/1000). A la suite de l'évaporation du solvant, le dépôt solide cristallisé avec les analytes est irradié par un laser à impulsions. Du fait du large excès de matrice, les photons du laser rencontreront, de

manière statistique, plus de molécules de matrice que de molécules cibles. Cette matrice aura deux fonctions principales :

- protéger les molécules cibles des photons de l'impact laser,
- aider à l'ionisation des molécules cibles.

Le dépôt des échantillons sur une plaque cible MALDI peut être réalisé selon trois procédés différents :

- Goutte séchée (« dried droplet ») : elle est la méthodologie la plus couramment utilisée. La matrice et l'analyte sont placés, soit dans un tube avant dépôt soit directement sur la plaque MALDI par mélange.
- Couche mince : le dépôt est réalisé en deux étapes successives sur la plaque, soit par recouvrement de la matrice par l'analyte après évaporation du solvant soit par dépôt de l'analyte sur la couche de matrice déjà cristallisée.
- Sandwich : le dépôt est effectué par insertion de l'analyte entre deux couches de matrices. Les couches de matrices peuvent être de nature similaire ou différente (« two layers »).

L'étape d'évaporation du solvant entraîne une co-cristallisation de la matrice avec l'analyte. Suite à l'absorption de l'énergie par la matrice, un processus de désorption correspondant à un changement de phase (de la phase condensée vers la phase gazeuse) se produit. C'est au cours de cette désorption qu'une très faible partie de l'énergie désorbée par la matrice est transférée aux molécules cibles. Il se produit alors une co-éjection des espèces moléculaires et de fragments de matrice.

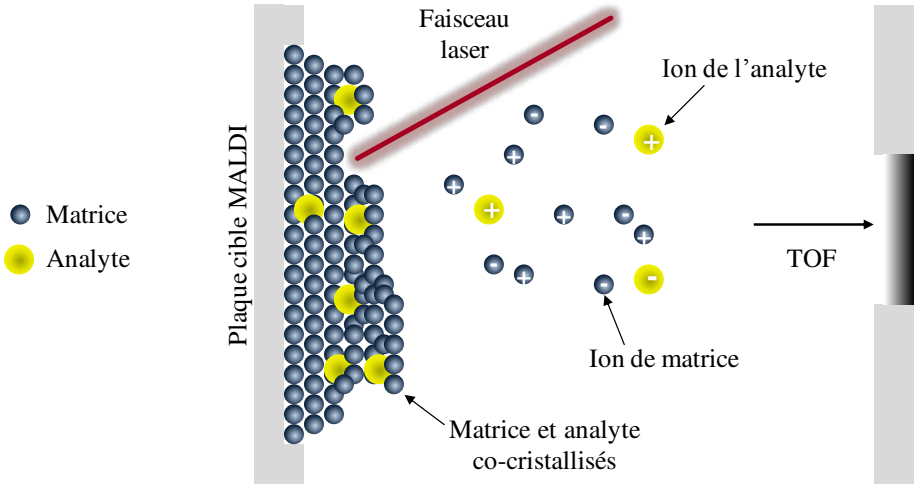


Figure I-23- Schéma du procédé d'ionisation MALDI : l'énergie laser est absorbée par la matrice provoquant une désorption et une ionisation des analytes.

Bien que le processus d'ionisation par MALDI ne soit pas encore complètement élucidé, deux étapes dans le processus d'ionisation de l'analyte se distinguent, à savoir une ionisation primaire et secondaire [229]:

- ionisation primaire : la matrice absorbe l'énergie photonique du laser conduisant à la formation de molécules excitées.

- ionisation secondaire : il s'agit d'un transfert de protons en phase gazeuse de la matrice à l'analyte. Ce transfert est réalisé lors de la collision entre les molécules photo-excitées de la matrice avec l'analyte. -

A l'issue du transfert de protons, les ions sont majoritairement produits par des phénomènes de protonation $[M+H]^+$, déprotonation $[M-H]^-$ et de cationisation ($[M+K]^+$, $[M+K]^+$). Lors de ce processus, il est rare d'observer la formation d'ions multichargés car le transfert d'énergie est faible.

La technique MALDI est décrite comme une technique empirique dont les choix de la nature de la matrice, de sa concentration, du ratio analyte/matrice ainsi que son mode de dépôt peuvent influencer fortement l'ionisation et la qualité de l'empreinte spectrale.

Différents types de matrices organiques ont été développés pour l'analyse de molécules d'intérêts. Les matrices les plus couramment utilisées sont résumées dans le Tableau I-23**.**

Abrév.	Noms	Formules	Longueur d'onde d'absorption	Masse molaire	Applications
CHCA	Acide α-Cyano-4-hydroxycinnamique		337, 355, 266	189,17	Protéines, peptides, sucres, oligonucléotides
DHB	Acide 2,5-dihydrobenzoïque		337, 355, 266	154,12	Polymères, molécules organiques, sucres, peptides, protéines
SA	Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique		337, 355, 266	224,21	Peptides, protéines, dendrimères, glycoprotéines
HABA	Acide 2-(4-hydroxyphenylazo)benzoïque		337,355	242,23	Peptides, protéines, glycoprotéines
FA	Acide 4-hydroxy-3-méthoxy cinnaminique		337	196,5	Protéines, peptides

Tableau I-23- Exemples de matrices organiques utilisées pour les analyses MALDI avec les longueurs d'ondes d'absorption, la masse moléculaire et les applications associées.

Cependant, l'utilisation de matrices organiques peut entraîner certains inconvénients comme l'inhomogénéité de la surface de dépôt de l'échantillon. Cette inhomogénéité est responsable d'une faible répétabilité des analyses, résultant de l'existence de points chauds. De plus, la haute intensité du

bruit de fond provoqué par la matrice peut engendrer des interférences dans la zone des bas poids moléculaires (M < 500Da). Ainsi, pour le criblage de substrats et de produits d'hydrolyse de l'invertase (M < 500 Da) au sein d'extraits de plantes présenté dans le chapitre II de ce manuscrit, l'utilisation d'une matrice organique ne semble pas appropriée. L'utilisation de matrices non organiques appliquées dans des approches SALDI (Surface Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry) a été développée et appliquée à l'analyse de ces types d'analytes. Dans le cas de ces matrices non organiques, la surface des nanoparticules est responsable de l'énergie d'adsorption et du transfert. Ce type de matrice a montré de nombreux avantages pour l'analyse de petites molécules ainsi que dans la reproductibilité d'analyse. Une liste de matrice non exhaustive est proposée dans le Tableau I-24.

La source MALDI est couplée à différents analyseurs tels que l'analyseur quadripolaire (Q), l'analyseur à temps de vol (TOF), les analyseurs à transformée de Fourrier (FTICR, Orbitrap) et les pièges d'ions (IT). Dans le cadre de notre travail de thèse, la source MALDI a été combinée à un analyseur à temps de vol (TOF). Le principe de cet analyseur sera décrit ci-dessous.

Analyte	Poids moléculaires (g/mol)	Matrice	Type de dépôt de la matrice	Longueur d'onde	Mode d'ionisation	Réf.
Aminothiols : cystéine, glutathion, homocystéine	121,16; 307,32; 135,18	Nanoparticules d'or	Goutte séchée	337 nm	Positif	[56]
Eostrogènes : estrone, estradiol, estriol	270,37; 272,38; 288,38	Nanoparticules d'argent	Goutte séchée	337 nm	Négatif	[230]
1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine; 1,2-Dioleyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine; 1,2-dilauroyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine; 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine	677.93; 786.11; 621.83; 734.04	Nanofleurs de platinium	Couche mince	337 nm	Positif	[231]
Catechines : catéchine, (-)-épigallocatechine gallate, (-)-épigallocatechine	290,26; 458,37; 306,25	Nanoparticules de dioxyde de titane	Goutte séchée	337 nm	Négatif	[232]
Vérapamil chlorhydrate, testostérone, polymères synthétiques (polyéthylène glycol 400, polystyrène, polyméthacrylate de méthyle).	491,06; 288,42	Nanoparticules d'oxyde de zinc	Goutte séchée	337 nm	Positif	[233]
Peptides	< 1800	Particules magnétiques d'oxyde de fer (silice)	Goutte séchée	337 nm	Négatif	[234]
Stéroïdes : estrone, estradiol, estriol, progestérone, testostérone	270,16; 281,18; 288,17; 314,22; 288,21	Fullerènes C70	Couche mince	337 nm	Négatif	[235]

Tableau I-24- Exemples d'applications de matrices SALDI.

5.4.3. Analyseur à temps de vol (TOF)

L'analyseur à temps de vol a été introduit en 1918 par Dempster [236]. Les premiers spectromètres de masse à temps de vol ont été décrits dans les années 1950. L'apparition de la source de désorption/ionisation laser (LDI) puis celle de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) dans les années 1980 ont permis de mettre en relief son véritable potentiel en tant qu'analyseur.

Les ions générés par la source MALDI sont accélérés dans le temps de vol, où ils seront séparés en fonction du temps mis pour atteindre le détecteur, à travers une zone libre de champ, maintenue à un vide poussé. L'énergie potentielle des ions accélérés dans le temps de vol va se transformer en énergie cinétique selon les équations suivantes :

$$\begin{cases} E_P = U.q \\ q = z.e \end{cases}$$

$$\begin{cases} E_C = \frac{1}{2}\, m.v^2 \\ v = \frac{d}{t} \end{cases}$$

Si $E_p = E_c$ alors

$$\boxed{\frac{1}{2}\, m.v^2 = z.U.e} \qquad \text{(équation 1)}$$

z : charge de l'ion
e : charge élémentaire (1,602.10^{-19} C)
U : différence de potentiel (V)
m : masse de l'ion (Kg)
v : vitesse de l'ion (m.s^{-1})

La vitesse de l'ion est égale à :

$$\boxed{v = \sqrt{\frac{2zeU}{m}}} \qquad \text{(équation 2)}$$

Or, la vitesse est définie comme le rapport de la distance parcourue L (m) par unité de temps t (s). Par ailleurs, l'ion conserve son énergie dans la zone libre de champ sur la longueur L du tube de vol. Ainsi le rapport masse sur charge de l'ion peut être exprimé en fonction du temps de vol selon l'équation 3 :

$$\boxed{t = L\sqrt{\frac{m}{2zev}} = K\sqrt{\frac{m}{z}}} \qquad \text{(équation 3)}$$

De ce fait, le temps de parcourt d'un ion est proportionnel au rapport *m/z.* Les ions seront alors séparés en fonction de leur valeur *m/z* et donc de leur temps de parcours dans le temps de vol avant d'atteindre le détecteur. Les ions vont adopter des vitesses différentes selon l'équation montrée précédemment. La détection des ions peut être réalisée selon deux modes : le mode linéaire et le mode réflecteur.

a. Configuration en mode linéaire

Comme représenté sur la Figure I-24, après accélération des ions, les ions vont adopter des vitesses différentes en fonction de leur masse le long d'un parcours linéaire jusqu'au détecteur. Ce mode est généralement sélectionné pour l'analyse de protéines intactes ou de macromolécules du fait de son taux de transmission élevé. Cependant, la résolution en masse est limitée. Cette faible résolution provient de la dispersion initiale des ions (temps et lieu de formation) qui va influencer la distribution temporelle et spatiale et la distribution en énergie cinétique.

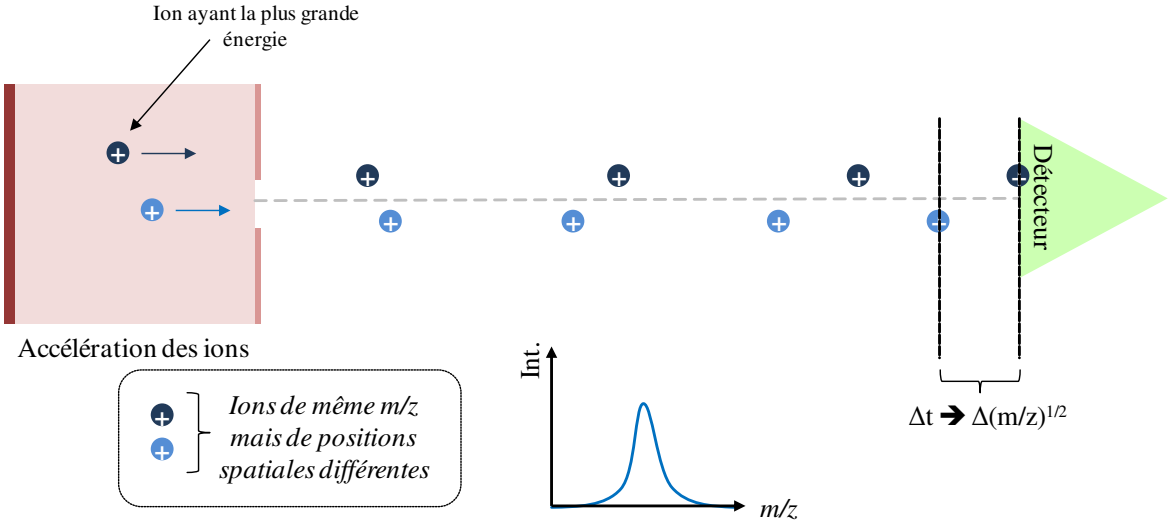


Figure I-24- Principe de fonctionnement de l'analyseur TOF en configuration linéaire.

Le pouvoir de résolution d'un TOFMS est exprimé par la relation suivante :

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \qquad \text{(équation 4)}$$

Ainsi, cette résolution dépend du temps mis par les ions des ions de même rapport masse/charge pour atteindre le détecteur. De cette manière, le mode réflecteur peut pallier à cette limite.

b. Configuration en mode réflecteur

Comme représenté sur la Figure I-25, les ions vont atteindre un « miroir » ou « réflecteur » électrostatique situé à l'extrémité du temps de vol. Ce miroir est constitué de différentes électrodes portées à des potentiels croissants créant un champ électrique qui s'oppose à la pénétration des ions. Les ions seront ralentis au passage de ces électrodes. Les ions de même masse, ayant acquis une énergie cinétique plus importante, vont pénétrer plus en profondeur de ces miroirs électrostatiques et vont être ainsi ralentis (perte progressive de leur énergie cinétique). Ils seront ensuite réfléchis et ré-accélérés plus tardivement par le réflecteur de manière à refocaliser les ions de même valeur *m/z*. Ce phénomène augmente la résolution de l'analyse. Le mode réflecteur sera sélectionné lors de l'analyse de sucre (M < 1 kDa) afin d'augmenter la précision en masse de la mesure réalisée.

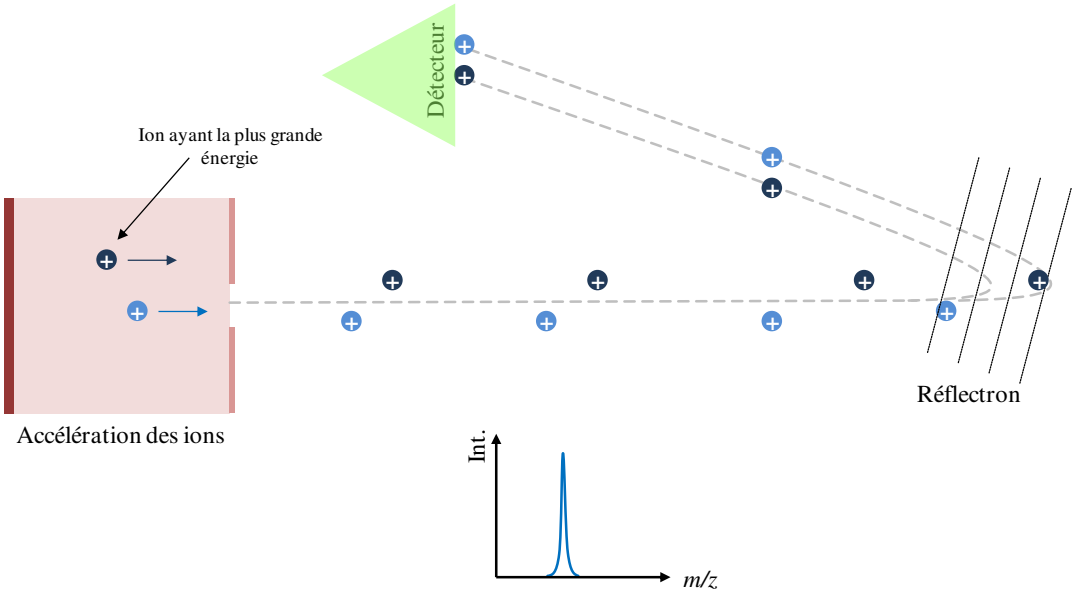


Figure I-25- Principe de fonctionnement de l'analyseur TOF en configuration réflecteur.

Description des paramètres appliqués à l'approche TLC MALDI TOFMS employée dans le cadre de l'analyse de sucres

*La technique utilisée se rapproche de la méthode **SALDI** du fait de l'utilisation d'une matrice de nanoparticules de **Fe_3O_4**. Cette matrice est déposée sur la plaque TLC par trois immersions de la plaque dans une solution éthanolique de matrice à 2 mg/mL. La pression résiduelle dans la région de la source est d'environ 10^{-7} Torr. Les spectres de masse (en mode positif) sont obtenus avec un laser à azote (337 nm) entre m/z 160 et m/z 1300 et une détection en mode réflecteur. La fluence laser a été ajustée avant chaque analyse afin d'obtenir la meilleure empreinte spectrale possible. L'acquisition des spectres est réalisée par trois séries de cent tirs laser. Les ions sont accélérés avec un potentiel de 25 kV sous des conditions d'extractions retardées de 40 ns.*

*Dans le cadre d'un développement méthodologique réalisé en **(LC)-ESi-QTOF HRMS** au sein du **chapitre III** de ce manuscrit, nous présenterons par la suite le principe de l'ionisation par **électronébulisation** ainsi que le principe du spectromètre de masse **BrukermaXis UHR-Qq-TOF**.*

5.4.4. Source par ionisation électrospray

La source d'ionisation par électronébulisation (ESI), décrite pour la première fois en 1984 par Masamichi Yamashita et John Fenn [237], repose sur le processus de nébulisation à pression atmosphérique d'un échantillon liquide. Cette source génère une ionisation douce pour une grande gamme d'analytes polaires et de faibles à forts poids moléculaires. Elle peut être facilement couplée à la chromatographie en phase liquide [238], à la chromatographie en phase supercritique [239] ou encore à l'électrophorèse capillaire [240]. Le processus d'ionisation et désorption des analytes, présenté sur la Figure I-26, peut être résumé selon trois étapes [241] :

- Formation du spray
- Fission des gouttelettes

- Emission des ions en phase gazeuse

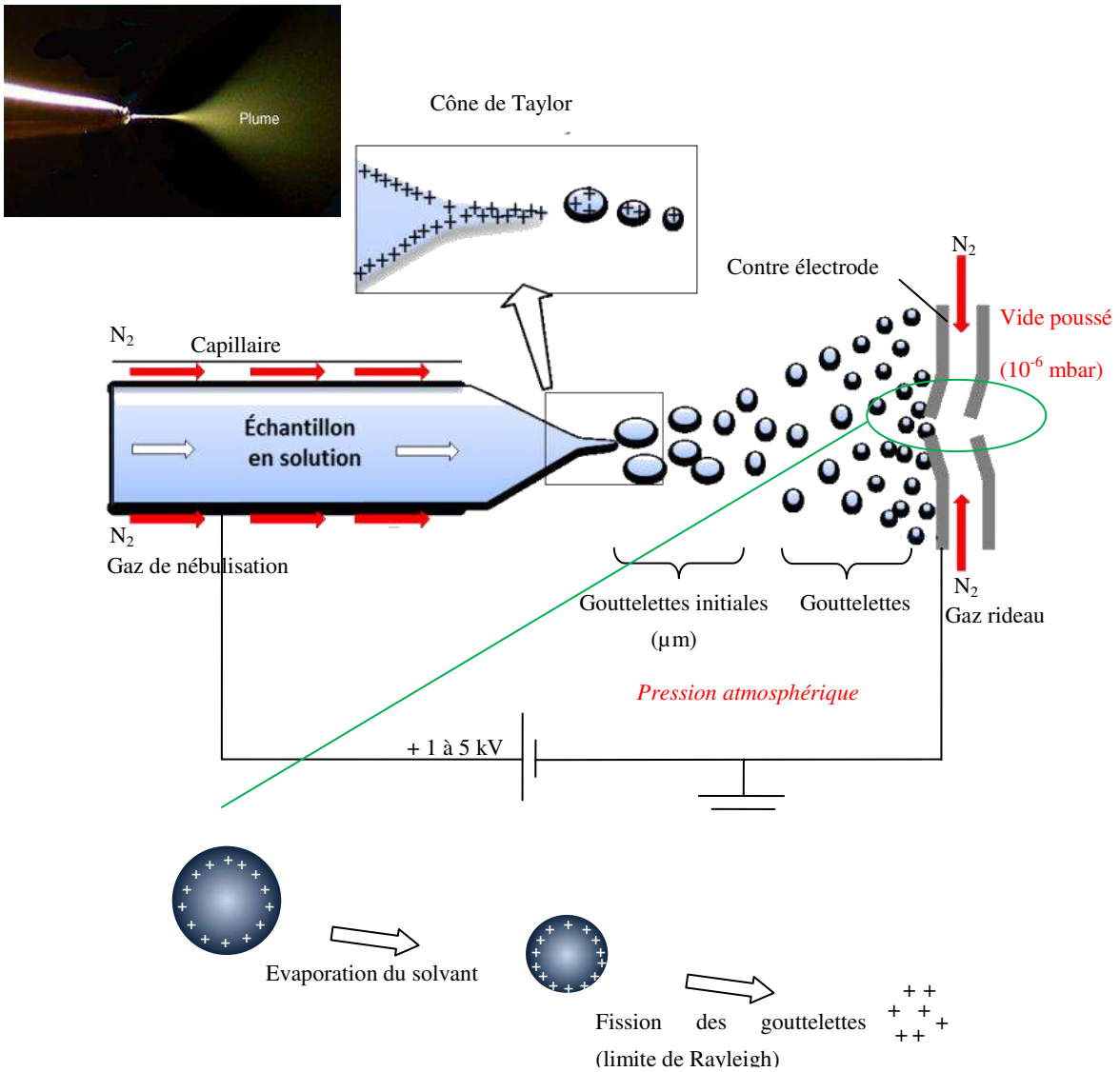


Figure I-26- Schéma du principe de fonctionnement de la source électrospray.

a. Formation du spray

L'échantillon en solution, provenant du système chromatographique ou par infusion directe, est introduit dans la source via un capillaire fin sur lequel est appliqué un champ électrique résultant d'une différence de potentiel de 1 à 5 kV. Les débits à l'intérieur de ce capillaire sont classiquement compris entre 1 à 1000 µL/min. Cette différence de potentiel va induire la création et l'accumulation de charges dans la solution, *via* des réactions d'oxydo-réduction. Les ions de même polarité sont enrichis à la surface du liquide sortant du capillaire. Cet effet, assisté par l'application d'un flux de gaz inerte de nébulisation (N_2), provoque une polarisation du liquide. L'accumulation des charges et de leur mouvement résulte de l'effet d'une pression différentielle, du champ électrique, de la température et d'un flux d'azote tangentiel au capillaire. Du cône de Taylor, se détachent de fines gouttelettes chargées, constituées de solvants et d'analytes.

b. Fission des gouttelettes

L'influence de l'association de la température, du gaz séchant ainsi que du gaz de nébulisation va induire l'évaporation progressive du solvant et donc conduire à une diminution de la taille des gouttelettes. Les gouttelettes se désolvatent tout en gardant une charge constante. De ce fait, la densité de charge augmente progressivement entraînant une augmentation de la répulsion coulombienne à l'intérieur de ces gouttelettes. Lorsque les répulsions coulombiennes deviennent plus importantes que la tension superficielle des gouttelettes, l'équilibre est rompu. Cette limite de Rayleigh est définie comme étant le point où les répulsions coulombiennes entre les charges égalent les forces cohésives de tension de la surface du liquide [242]. Elle est caractérisée par l'équation suivante :

$$q_{Rayleigh} = 8\pi(\gamma\varepsilon_0 r^3)^{1/2}$$

$q_{Rayleigh}$: charge à la limite de Rayleigh (charge moyenne de la gouttelette)
γ : tension de surface du solvant
ε_0 : permittivité du vide
r : rayon de la gouttelette

A cette limite, un phénomène d'explosions coulombiennes entraîne la formation de micro- voire de nano-gouttelettes avant la désorption des molécules chargées.

c. Emission des ions en phase gazeuse

Deux théories, schématisées en Figure I-27**,** sont proposées à ce jour pour décrire le phénomène de production d'ions désolvatés en phase gazeuse : le modèle de la charge résiduelle (CRM) proposé par Dole *et al*. [243] et le modèle d'évaporation ionique (IEM) proposé par Iribarne et Thompson [244].

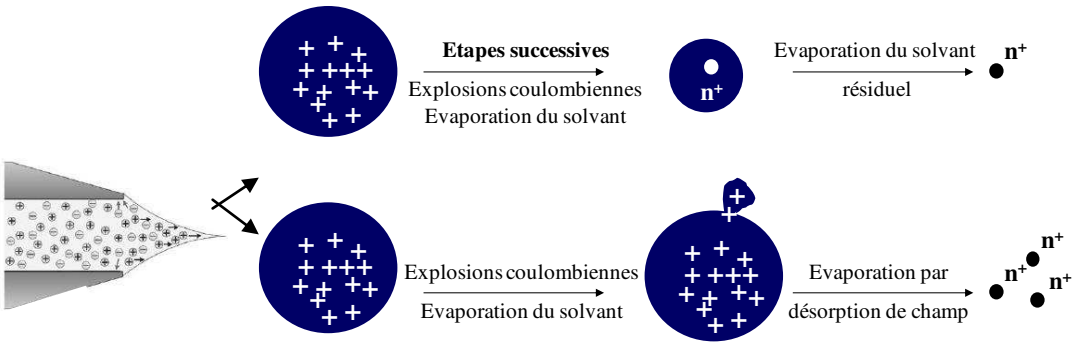


Figure I-27- (a) modèle de la charge résiduelle (b) modèle de l'évaporation ionique.

Le processus décrit par le premier modèle (CRM) résulte des explosions coulombiennes successives conduisant à la désolvatation totale de l'analyte. Ce phénomène mène à la production d'une molécule d'analyte intacte dépourvue de solvant et chargée (voire polychargée si cette molécule possède de nombreux sites ionisables). Il est admis que ce modèle serait appliqué au processus de désorption/ionisation de macromolécules.

Le modèle de l'évaporation ionique (IEM), consisterait, après une série de fissions et d'évaporations, à une augmentation de la densité de charge. La taille des microgouttelettes ainsi obtenues est inférieure à 10 nm. Le champ électrostatique à la surface s'intensifie et induit une désorption des ions directement en phase gazeuse.

5.4.5. Description du spectromètre de masse BrukermaXis UHR-Qq-TOF

Le spectromètre de masse BrukermaXis Q-TOF, combiné à une source électrospray, a été utilisé pour l'ensemble des mesures réalisées dans le chapitre III de ce manuscrit. Chaque partie numérotée du système sera présentée

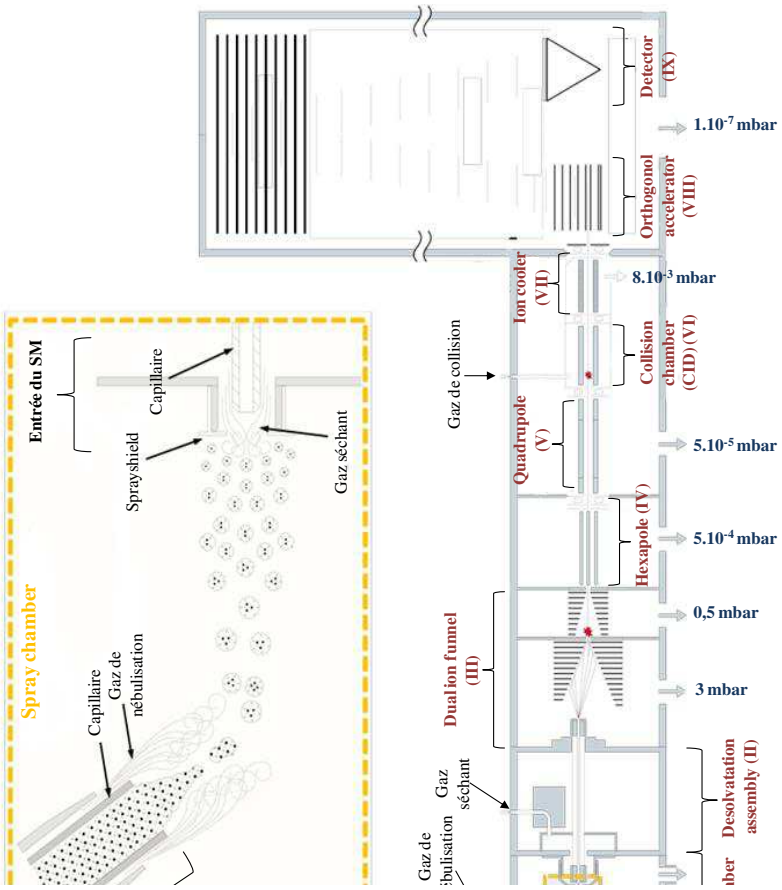


Figure I-28- Schéma général du spectromètre de masse Bruker maXis UHR-Q-TOF.

Après la **chambre de spray (*I*)**, les ions faiblement solvatés atteignent une zone de transfert où est placé un capillaire en silice jouant le rôle d'interface entre la zone à pression atmosphérique et la zone suivante de pression plus réduite **(*II*)**. En sortie de capillaire se trouvent différents skimmers placés à différents potentiels (création d'une différence de potentielle croissante). La différence de potentiel entre la sortie du capillaire et le premier skimmer est seulement d'une dizaine de volts afin d'achever la désolvatation des ions. Cette légère différence de potentiel augmente la vitesse des ions solvatés permettant ainsi de générer des collisions propices à la désolvatation **(*III*)**. Les skimmers refocalisent l'ensemble des ions pour l'entrée dans **l'hexapole (*IV*)**, permettant la transmission des ions sous un gradient de vide.

Les ions entrent ensuite dans le **quadripôle (*V*)** constitué de quatre électrodes parallèles. Ces électrodes sont connectées à une combinaison d'une tension continue (U) de valeur opposée pour chacune des paires d'électrodes et d'une tension alternative (*V*) produisant un potentiel $\pm \Phi_0$. Selon les valeurs de U et de V, le quadrupôle peut transmettre l'intégralité des ions (mode « full scan ») ou peut alors filtrer les ions désirés du fait de l'obtention de trajectoires stables (ions désirés) ou instables (ions filtrés). La combinaison de ces deux tensions permet de déterminer les valeurs de *m/z* (ou la gamme) d'ions que le manipulateur souhaite détecter.

Les ions sont par la suite transférés dans un autre quadrupôle appelé chambre de **fragmentation CID (*VI*)**. Cette chambre permet de transmettre les ions en mode « full scan » ou de les fragmenter (mode MS^2). Les ions sont ensuite transférés dans le compartiment nommé **« ion cooler » (*VII*)** dont l'utilité est de ralentir les ions avant de les envoyer dans un accélérateur orthogonal à l'entrée du temps de vol **(TOF, *IX*)**. Cet analyseur, utilisé en mode réflecteur, est présenté dans la section 5.4.3. Une différence de potentielle est ensuite appliquée à la sortie de « l'ion cooler » accélérant et envoyant les ions dans le temps de vol. Ils seront séparés en fonction du temps mis pour atteindre le détecteur à travers une zone libre de champ, maintenue à un vide poussé. Les ions arrivent ensuite au **détecteur (IX)**.

Approche (LC)-ESI-QTOF HRMS

*Cette approche a été appliquée dans le cadre du suivi de **phosphorylation on-line par FAC-HRMS**, présenté dans le **chapitre III.** Les paramètres de la source **ESI** ont été ajustés dans le but de d'optimiser l'ionisation et de diminuer la **fragmentation** des nucléotides mono-, di- et tri-phosphatés analysés.*

Ce premier chapitre a eu pour objectifs :

- d'introduire les notions d'interactions enzymes-ligands,
- de présenter les notions de caractérisations enzymatiques par détermination des paramètres cinétiques selon le modèle de Michaelis-Menten qui sera employé dans les chapitres suivants,
- d'exposer un état de l'art des différentes méthodologies basées sur la spectrométrie de masse dans ce domaine. Cette étude a permis de mettre en relief la diversité des approches méthodologiques et d'introduire la notion d'immobilisation d'enzymes,
- de décrire succinctement les différentes méthodologies d'immobilisations d'enzymes,

- puis finalement de présenter les matériels utilisés lors de ce projet de recherche.

A l'issue de cette présentation bibliographique et du matériel, nous exposerons les différents développements méthodologiques qui ont été réalisés dans ce contexte. Ces développements seront présentés dans deux chapitres qui s'articuleront chacun sur un même axe d'étude, selon trois parties :

- la caractérisation d'activité des enzymes d'intérêts par développement méthodologique de la technique qui a été employée pour l'étude d'interactions enzymes-ligands,
- le développement de ce dit procédé, basé en spectrométrie de masse, pour l'étude de ces interactions,
- la description de l'application qui résulte de cette étude.

6. Références

[1] T. S. Chang, Int. J. Mol. Sci, 10 **(2009)** 2440-2475.
[2] E. De Clerq, Y. Mehellou, *J. Med. Chem*., 53 **(2010)** 521-538.
[3] K.E. Rittle, B. E. Evans, M. G. Bock, R. M. Dipardo, R. M. Freidinger, W. L. Whitter, G. F. Lundell, D. F. Veber, P. S. Anderson, R. S. L. Chang, V. J. Lotti, D. J. Cerino, T. B. Chen, P. J. Kling, K. A. Kunkel, J. P. Springer, J. Hirshfield, *J. Med. Chem.*, 31 **(1988)** 2235-2246.
[4] L. Michaelis, M. L. Menten, K. A. Johnson, R. S. Goody, *J. Biochem*, 50 **(2011)** 8264-8269.
[5] A. Rogers, Y. Gibon, *Plant Metabolic Networks*, **(2009)** 71-103.
[6] D. B. H. Lineweaver, *J. Am. Chem. Soc*., 56 **(1934)** 658-666.
[7] G.S. Eadie, *J. Biol. Chem*., 146 **(1942)** 85-93.
[8] B. H. Hofstee, *Nature*, 24 **(1959)** 1296-1298.
[9] C. S. Hanes, *Biochem. J*., 26 **(1932)** 1406-1421.
[10] J. B. S. Haldane, *Nature*, 179 **(1957)**.
[11] S. Belaz, T. Rattier, P. Lafite, P. Moreau, F.H. Routier, F. Robert-Gangneux, J.P. Gangneux, R. Daniellou, *Carbohydr Res*, 415 **(2015)** 31-38.
[12] R. Uchida, S. Ishikawa, H. Tomoda, *Acta Pharm. Sci.* B, 4 **(2014)** 141-145.
[13] L. S. C. Blondin, L. Wiesmuller, A. Gilles, O. Barzu, *Anal. Chem*., 220 **(1994)** 219-221.
[14] I. M. Choma, E. M. Grzelak, *J. Chrom. A*, 1218 **(2011)** 2684-2691.
[15] S. Dewanjee, M. Gangopadhyay, N. Bhattacharya, R. Khanra, T. K. Dua, *JPA*, 5 **(2015)** 75-84.
[16] S. S. Teh, G. E. Morlock, *Food Chem*., 187 **(2015)** 460-468.
[17] A. Fuchs. A. L. Homans, *J. Chrom. A*, 51 **(1970)** 327-329.
[18] J. K. A. Marston, K. Hostettmann, *Phytochem. Anal*., 13 **(2002)** 51-54.
[19] B. H Hmicha, C. A. Simoes-Pires, A. Marston, K. Hostettmann, *Phytochem. Anal*., 20 **(2009)** 511-515.
[20] I. A. Ramallo, S. A. Zacchino, R. L. E. Furlan, *Phytochem. Anal.* : PCA, 17 **(2005)** 15-19.
[21] S. Hassan, Phytochem. Anal., 23 **(2012)** 405-407.
[22] S. Momtaz, B. M. Mapunya, P. J. Houghton, C. Edgerly, A. Hussein, S. Naidoo, N. Lall, *J. ethnopharmacol.*, 119 **(2008)** 507-512.
[23] J. Zhou, Q. Tang, T. Wu, Z. Cheng, *Phytochem. Anal.*, 28 **(2017)** 115-124.
[24] G. E. Morlock, *Instrumental Methods for the Analysis and Identification of bioactive molecules, Chapter 5* **(2014)** 101-121.
[25] M. N. Taha, M. B. Krawinkel, G. E. Morlock, *J. Chrom. A*, 1394 **(2015)** 137-147.
[26] G. Morlock, W. Schwack, *Trends in Analytical Chemistry*, 29 **(2010)** 1157-1171.
[27] Á. M. Móricz, E. Fornal, W. Jesionek, B. Majer-Dziedzic, I. M. Choma, *Chromatographia*, 78 **(2015)** 707-716.
[28] A. M. Moricz, T. T. Habe, A. Boszormenyi, P. G. Ott, G. E. Morlock, *J. Chrom. A*, 1422 **(2015)** 310-317.
[29] S. S. Teh, G. E. Morlock, *Food Chem*, 187 **(2015)** 460-468.
[30] S. Krüger, A. Bergin, G.E. Morlock, *Food Chem*., 243 **(2017)** 258-268.
[31] Á. M. Móricz, D. Krüzselyi, Á. Alberti, A. Darcsi, G. Horváth, P. Csontos, S. Béni, P.G. Ott, *J. Chrom. A*, **(2017)**.
[32]B. Bothner, R. Chavez, J. Wei, C. Strupp, Q. Phung, A. Schneemann, G. Siuzdak, *J. Biol. Chem*, 275 **(2000)** 13455-13459.
[33] X. Ge, T. L. Sirich, M. K. Beyer, H. Desaire, J. A. Leary, *Anal. Chem*., 73 **(2001)** 5078-5082.
[34] D. Fabris, *J. Am. Chem*., 122 **(2000)** 8779-8780.
[35] J. Norris, J. P. Whitelegge, K. F. Faull, T. Toyokuni, *Biochem*., 40 **(2001)** 3774-3779.
[36] T. Steinkamp, A. Liesener, U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem*, 378 **(2004)** 1124-1128.
[37] E. D. Lee, W. Mück J. D. Henion, T. R. Covey, *J. Am. Chem. Soc*, 111 **(1989)** 4600-4604.
[38] D. L. Zechel, L. Konermann, S. G. ithers, D. J. Douglas, *Biochem*., 37 **(1998)** 7664-7669.
[39] D. J. Wilson, L. Konermann, *Anal. Chem*., 75 **(2003)** 6408-6414.

[40] F. Y. L. Hsieh, X. Tong, T. Wachs, B. Ganem, J. Henion, *Anal. Biochem*., 229 **(1995)** 20-25.
[41] A. R. de Boer, T. Letzel, D. A. Van Elswijk, H. Lingeman, W. M. Niessen, H. Irth, *Anal. Chem.*, 76 **(2004)** 3155-3161.
[42] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem*., 60 **(1988)** 2299-2301.
[43] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2 **(1988)** 151-153.
[44] A. I. Gusev, D. C. Muddiman, A. Proctor, A. G. Sharkey,D. M. Hercules, P. N. V. Tata, R. Venkataraman, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 10 **(1996)** 1215-1218.
[45] J. C. Brès, F. Morvan, I. Lefebvre, J. J. Vasseur, A. Pompon, J. L. Imbach, *J. Chrom. B*, 753 **(2001)** 123-130.
[46] U. Puapaiboon, J. Jai-nhuknan, J. A. Cowan, *Nucleic Acids Res*, 29 **(2001)** 3652-3656.
[47] R. Rathore, J. J. Corr, D. T. Lebre, W. L. Seibel, K. D. Greis, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 23 **(2009)** 3293-3300.
[48] M. Kang, A. Tholey, E. Heinzle, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15 **(2001)** 1327-1333.
[49] D. Bungert, E. Heinzle, A. Tholey, *Anal. Biochem*., 326 **(2004)** 167-175.
[50] D. B. Wall, J. W. Finch, S. A. Cohen, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18 **(2004)** 1482-1486.
[51] M. Field, D. Papac A. Jones, *Anal. Biochem*., 239 **(1996)** 92-98.
[52] E. J. Zaluzec, D. A. Gage, J. Allison, J. T. Watson, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom*, 5 **(1993)** 230-237.
[53] S. Xu, C. Pan, L. Hu, Y. Zhang, Z. Guo, X. Li, H. Zou, *Electrophoresis,* 25 **(2004)** 3669-3676.
[54] H. Matsumoto, E. S. Kahn, N. Komori, *Anal. Biochem*., 260 **(1998)** 188-194.
[55] J. J. Thomas, Z. Shen, J. E. Crowell, M. G. Finn, G. Siuzdak, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 **(2001)** 4932-4937.
[56] C. K. Chiang, Y. W. Lin, W. T. Chen, H. T. Chang, *Nanomedicine*, 6 **(2010)** 530-537.
[57] M. W. Duncan, H. Roder, S. W. Hunsucker, *Brief Funct Genomic Proteomic*, 7 **(2008)** 355-370.
[58] J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak, *Nature*, 399 **(1999)** 243-246.
[59] J. Villanueva, O. Yanes, E. Querol, L. Serrano, F. X. Aviles, *Anal. Chem*., 75 **(2003)** 3385-3395.
[60] O. Yanes, J. Villanueva, E. Querol, F. V. Aviles, *Nat Protoc*, 2 **(2007)** 119-130.
[61] A. Salwinski, D. Da Silva, R. Delépée, B. Maunit, *JASMS*, 25 **(2014)** 538-547.
[62] O. Yanes, J. Villanueva, E. Querol, F. V. Aviles, *Mol. Cell. Proteomics*, 4 **(2005)** 1602-1613.
[63] K. Trummal, H. Vija, J. Subbi, J. Siigur, *Biochim. Biophys. Acta*, 1476 **(2000)** 331-336.
[64] G. Covaleda, S. A. Trejo, E. Salas-Sarduy, M. A. Del Rivero, M. A. Chavez, F. X. Aviles, *J. Proteomics*, 165 **(2017)** 75-92.
[65] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 33 **(1968)** 235-239.
[66] J. Kasai, Y. Oda, M. Nishikata, S. Ishii, *J. Chromatogr.*, 376 **(1986)** 33-47.
[67] B. Zhang, M. M. Palcic, D. C. Schriemer, G. Alvarez-Manilla, M. Pierce, O. Hindsgaul, *Anal. Biochem*., 299 **(2001)** 173-182.
[68] D. A. Annis, E. Nickbarg, X. Yang, M. R. Ziebell, C. E. Whitehurst, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 11 **(2007)** 518-526.
[69] A. M. Girelli, E. Mattei, *J. Chrom. B*, 819 **(2005)** 3-16.
[70] H. Zou, Q. Luo, D. Zhou, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49 **(2001)** 199-240.
[71] D. M. F. Prazeres, J. M. S. Cabral, *Enzyme Microb.Technol*., 16 **(1994)** 738-750.
[72] R. Mallik, D. S. Hage, *J. Sep. Sci.,* 29 **(2006)** 1686-1704.
[73] X. J. Huang, A. G. Yu, Z. K. Xu, *Bioresour Technol,* 99 **(2008)** 5459-5465.
[74] G Garbisu, J. M. Gil, M. J. Bazin, D. O. Hall, J. L. Serra, *J. Appl. Phycol.,* 3 **(1991)** 221-234.
[75] J. Heo, K. J. Thomas, G. H. Seong, R. M. Crooks, *Anal. Chem*., 75 **(2003)** 22-26.
[76] X. Zheng, Z. Li, S. Beeram, M. Podariu, R. Matsuda, E. L. Pfaunmiller, C. J. White, N. Carter, D. S. Hage, *J. Chrom. B*, 968 **(2014)** 49-63.
[77] J. Hirabayashi, T. Hashidate Y. Arata, N. Nishi, T. Nakamura, M. Hirashima, T. Urashima, T. Oka, M. Futai, W. E. G. Muller, F. Yagi, K. Kasai, *Biochim. Biophys. Acta,* 1572 **(2002)** 232-254.
[78] E. Pfaunmiller, A. C. Moser, D. S. Hage, *Methods*, 56 **(2012)** 130-135.
[79] E. Calleri, C. Temporini, E. Perani, C. Stella, S. Rudaz, D. Lubda, G. Mellerio, J.L. Veuthey, G. Caccialanza, G. Massolini, *J. Chrom. A.*, 1045 **(2004)** 99-109.

[80] G. Massolini, E. Calleri, *J. Sep. Sci.*, 28 **(2004)** 7-21.
[81] J. Yin, T. Xu, N. Zhang, H. Wang, *Anal. Chem*., 88 **(2016)** 7730-7737.
[82] C. Temporini, E. Perani, F. Mancini, M. Bartolini, E. Calleri, D. Lubda, G. Felix, V. Andrisano, G. Massolini, *J. Chrom. A*, 1120 **(2006)** 121-131.
[83] J. Sproß, A. Sinz, *Anal. Chem.*, 82 **(2010)** 1434-1443.
[84] K. Kaisai, S. Ishii, *J. Biochem.*, 77 **(1975)** 261-264.
[85] E. Calleri, C. Temporini, G. Massolini, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 54 **(2011)** 911-925.
[86] E. S. Ng, F. Yang, A. Kameyama, M. M. Palcic, O. Hindsgaul, D. C. Schriemer, *Anal. Chem*., 77 **(2005)** 6125-6133.
[87] E. Calleri, G. Fracchiolla, R. Montanari, G. Pochetti, A. Lavecchia, F. Loiodice, A. Laghezza, L. Piemontese, G. Massolini, C. Temporini, *J. Chrom. A*, 1232 **(2012)** 84-92.
[88] Y. Ogata, L. Scampavia, T. L. Carter, E. Fan, F. Tureček, *Anal. Biochem.*, 331 **(2004)** 161-168.
[89] T. R. Besanger, R. J. Hodgson, D. Guillon, J. D. Brennan, *Anal. Chim. Acta*, 561 **(2006)** 107-118.
[90] E. Calleri, S. Cerruti,, G. Cristalli, C. Martini, C. Temporini, C. Parravicini, R. Volpini, S. Daniele, G. Caccialanza, D. Lecca, C. Lambertucci, M. L. Trincavelli, G. Marucci, I. W. Wainer, G. Ranghino, P. Fantucci, M. P. Abbracchio, G. Massolini, *J. Med. Chem.*, 53 **(2010)** 3489-3501.
[91] A. Gallifuoco, F. Alfani, M. Cantarella, G. Spagna, P. G. Pifferi, *Process Biochem*., 35 **(1999)** 179-185.
[92] C. Yao, L. Qi, J. Qiao, H. Zhang, F. Wang, Y. Chen, G. Yang, *Talanta*, 82 **(2010)** 1332-1337.
[93] J. A. Ho, L. C. Wu, N. C. Fan, M. S. Lee, H. Y. Kuo, C. S. Yang, *Talanta*, 71 **(2007)** 391-396.
[94] Y. Cheng, E. Ho, B. Subramanyam, J. L. Tseng, *J. Chrom. B*., 809 **(2004)** 67-73.
[95] N. R. Mohamad, N. H. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, R. A. Wahab, *Biotechnol. Biotechnol. Equip*., 29 **(2015)** 205-220.
[96] S. Nisha, S. Arun, N. Gobi, *Chem. Sci*., 3 **(2012)** 148-155.
[97] T. L. de Albuquerque, S. Peirce, N. Rueda, A. Marzocchella, L. R. B. Gonçalves, M. V. P. Rocha, R. Fernandez-Lafuente, *Process Biochem.*, 51 **(2016)** 875-880.
[98] L. Fang, B. Liang, G. Yang, Y. Hu, Q. Zhu, X. Ye, *Biosen. bioelectron*., 56 **(2014)** 91-96.
[99] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol*., 40 **(2007)** 1451-1463.
[100] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente, *Chem. Soc. Rev*, 42 **(2013)** 6290-6307.
[101] T. Jesionowski, J. Zdarta, B. Krajewska, *Adsorption*, 20 **(2014)** 801-821.
[102] L. D. S. Marquez, B. V. Cabral, F. F. Freitas, V. L. Cardoso, E. J. Ribeiro, *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 51 **(2008)** 86-92.
[103] R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.*, 15 **(2011)** 213-223.
[104] H. Tran, N. Nosworthy, M. Bilek, D.R. McKenzie, *Biomass Bioenergy*, 81 **(2015)** 234-241.
[105] Y. Chen, E. T. Kang, K. G. Neoh, K. L. Tan, *Eur. Polym. J.*, 36 **(2000)** 2095-2103.
[106] G. M. Whitesides, A. L. Lamotte, O. Adalsteinsson, R. F. Baddour, A. C. Chmurny, C. K. Colton, A. Pollak, *J. Mol. Catal.*, 6 **(1979)** 177-198.
[107] C. K. Chow, S. P. Palecek, *Biotechnol Prog.*, 20 **(2004)** 449-456.
[108] F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules*, 8 **(2007)** 1775-1789.
[109] J. M. Nelson, E. G. Grifin, *J A C S*, 38 **(1916)** 1109-1115.
[110] K. Nakanishi, T. Sakiyama, Y. Kumada, K. Imamura, H. Imanaka, *Curr. proteomics*, 5 **(2008)** 161-175.
[111] H. Suzuki, Y. Ozawa, H. Maeda, *Agr. Biol. Chem*, 30 **(1966)** 807-812.
[112] H. Maeda, H. Suzuki, A. Sakimae, *Biotechnol. Bioeng,* 15 **(1973)** 403-412.
[113] V. Vallejo-Becerra, M. E. Marin-Zamora, J. M. Vasquez-Bahena, F. Rojas-Melgarejo, M. E. Hidalgo-Lara, P. A. Garcia-Ruiz, *J. Agri. Food Chem*., 56 **(2008)** 1392-1397.
[114] H.P. Jennissen, G. Botzet, *J. Mol. Recognit*, 6 **(1993)** 117-130.
[115] P. J. Gerber, J. A. Heitmann, *Cellulose*, 4 **(1997)** 255-268.
[116] T. Y. Nara, H. Togashi, C. Sekikawa, K. Inoh, K. Hisamatsu, K. Sakaguchi, F. Mizukami, T. Tsunoda, *J. Mol. Catal. B. Enzymatic*, 64 **(2010)** 107-112.

[117] D. Kim, A. E. Herr, *Biomicrofluidics*, 7 **(2013)** 41501.
[118] J. Anzai, T. Hoschi, S. Lee, T. Osa, *Sens. Actuators B*, **(1993)** 73-75.
[119] A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, *J. Chem. Biol.*, 6 **(2013)** 185-205.
[120] L. N. Amankwa, W. G. Kuhr, *Anal. Chem*., 64 **(1992)** 1610-1613.
[121] G. B. Sigal, C. Bamdad, A. Barberis, J. Strminger, G. M. Whitesides, *Anal. Chem*., 68 **(1996)** 490-497.
[122] J. Yakovleva, R. Davidsson, M. Bengtsson, T. Laurell, J. Emnéus, *Biosens. Bioelectron*., 19 **(2003)** 21-34.
[123] N. M. Green, *Biochem. J*, 89 **(1963)** 585-591.
[124] E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, *Clin. Chem,* 37 **(1991)** 625-636.
[125] D. Brady, J. Jordaan, *Biotechnol. Lett*, 31 **(2009)** 1639-1650.
[126] T. Mori, T. Tosa, I. Chibata, *Cancer Res.*, 34 **(1974)** 3066-3068.
[127] N. Munjal, S. K. Sawhney, *Enzyme Microb. Technol.*, 30 **(2002)** 613-619.
[128] N. Ortega, M. D. Busto, M. Perez-Mateos, *Bioresour. Technol*., 64 **(1998)** 105-111.
[129] S. N.Pennington, H. D. Brown, A. B. Patel, C. O. Knowles, *Biochim. Biophys Acta*, 167 **(1968)** 476-479.
[130] A. F. Mansor, N. A. Mohidem, W. M.Zawawi, N. S. Othman, S. Endud, H. Mat, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 220 **(2016)** 308-314.
[131] A. Rai, A. Prabhune, C. C. Perry, *Mater.Sci. Engineering C*, 32 **(2012)** 785-789.
[132] D. Pirozzi, M. Abagnale, L. Minieri, P. Pernice, A. Aronne, *Chem. Eng. J.*, 306 **(2016)** 1010-1016.
[133] Y. Inada, S. Hirose, M. Okada, H. Mihama, *Enzyme Microb. Technol*., 20 **(1975)** 188-192.
[134] N. Munjal, S. K. Sawhney, *Enzyme Microb. Technol*., 30 **(2002)** 613-619.
[135] E. J. Mammarella, A. C. Rubiolo, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 34 **(2005)** 7-13.
[136] M. F. Silva, D. Rigo, V. Mossi, R. M. Dallago, P. Henrick, G. Kuhn, C. D. Rosa, D. Oliveira, J. V. Oliveira, H. Treichel, F*ood Bioprod. Process.*, 91 **(2013)** 54-59.
[137] S. K. Jha, S. F. D'Souza, *J. Biochem. Bioph. Meth*, 62 **(2005)** 215-218.
[138] M. A. Nawaz, A. Karim, Z. Bibi, H. U. Rehman, A. Aman, D. Hussain, M. Ullah, S.A.U. Qader, *J.Taiwan Inst. Chem. Eng*., 64 **(2016)** 31-38.
[139] M. M. Magdy, Biotechnol. Biopol., **(2011)**.
[140] S. Matsuura, R. Ishii, T. Itoh, S. Hamakawa, T. Tsunoda, T. Hanaoka, F. Mizukami, *Chem. Eng. J.*, 167 **(2011)** 744-749.
[141] K. Sakai-Kato, M. Kato, T. Toyo'oka, *Anal. Chem*., 75 **(2003)** 388-393.
[142] K. Meena, T. K. Raja, *IJBT*, 3 **(2004)** 606-608.
[143] J. Wiley, *Biotechnol. Bioeng.*, 25 **(1983)** 613-617.
[144] M. Ungurean, C. Paul, F. Peter, Bioprocess and biosystems engineering, 36 **(2013)** 1327-1338.
[145] K.L. Chang, J. Thitikorn-amorn, S. H. Chen, J. F. Hsieh, K. Ratanakhanokchai, P. J. Huang, T. C. Lin, S. T. Chen, *Bioresour. Techno*l., 102 **(2011)** 519-523.
[146] G. M. Whitesides, O. Adalsteinsson, R. M. F. Baddour, A. C. Chmurny, C. K. Colton, A. Pollak, *J. Mol. Catal*, 6 **(1979)** 177-198.
[147] D. T. Nguyen, M. Smit, B. Dunn, J. I. Zink, *Chem. Mater*., 14 **(2002)** 4300-4306.
[148] S. Rehman, H. N. Bhatti, M. Bilal, M. Asgher, *Int. J. Biol. Macromol*., 91 **(2016)** 1161-1169.
[149] S. Talekar, S. Waingade, V. Gaikwad, S. Patil, N.Nagavekar, *J. Biochem. Tech*, 3 **(2012)** 349-353.
[150] F. Kartal, M. H. A. Janssen, F. Hollmann, R. A. Sheldon, A. Kılınc, *J. Mol. Catal. B. Enzymatic,* 71 **(2011)** 85-89.
[151] L. Zhou, H. Mou, J. Gao, L. Ma, Y. He, Y. Jiang, *Chin. J. Chem. Eng.*, 25 **(2017)** 487-492.
[152] S. Wang, D. Zheng, L. Yin, F. Wang, *Enzyme Microb. Technol*., 107 **(2017)** 22-31.
[153] S. Talekar, V. Ghodake, A. Kate, N. Samant, C. Kumar, S. Gadagkar, *AJBAS*, 4 **(2010)** 4760-4765.
[154] R. Reshmi, S. Sugunan, *J. Mol. Catal. B.Enzymatic*, 85-86 **(2013)** 111-118.
[155] T. Nguyen, K. L. Yang, *J. Colloid Interface Sci*., 428 **(2014)** 146-151.
[156] L. Sutarlie, K.L. Yang, *J. Colloid Interface Sci*, 411 **(2013)** 76-81.
[157] R. Moaddel, M. P. Marszatt, F. Bighi, Q. Yang, X. Duan, I. W. Wainer, *Anal. Chem*., 79 **(2007)** 5414-5417.

[158] C. Temporini, G. Pochetti, G. Fracchiolla, L. Piemontese, R. Montanari, R. Moaddel, A. Laghezza, F. Altieri, L. Cervoni, D. Ubiali, E. Prada, F. Loiodice, G. Massolini, E. Calleri, *J. Chrom. A*, 1284 **(2013)** 36-43.
[159] E. Karakuş, Ş. Pekyardımcı, *J. Mol. Catal. B. Enzymatic*, 56 **(2009)** 13-19.
[160] M. J. Yoo, J. E. Schiel, D. S. Hage, J. Chrom. B, 878 **(2010)** 1707-1713.
[161] M. R. Sobansky, D. S. Hage, *Anal. Bioanal. Chem*., 403 **(2012)** 563-571.
[162] M. Kahraman, G. Bayramoglu, N. Kayamanapohan, A. Gungor, *Food Chem*., 104 **(2007)** 1385-1392.
[163] Y. Ogata, L. Scampavia, T. L. Carter, E. Fan, F. Turecek, *Anal. Biochem.*, 331 **(2004)** 161-168.
[164] H. Luo, L. Chen, Z. Li, Z. Ding, X. Xu, *Anal. Chem.*, 75 **(2003)** 3994-3998.
[165] S. Ota, S. Miyazaki, H. Matsuoka, K. Morisato, Y. Shintani, K. Nakanishi, *J Biochem Biophys Methods*, 70 **(2007)** 57-62.
[166] M. E. Buck, J. Zhang, D. M. Lynn, *Advanced Materials,* 19 **(2007)** 3951-3955.
[167] C. Ispas, I. Sokolov, S. Andreescu, *Anal. Bioanal. Chem*., 393 **(2009)** 543-554.
[168] T. N. Nwagu, B. N. Okolo, H. Aoyagi, *AJB*, 10 **(2011)** 15989-15997.
[169] M. Y. Arıca, G. Bayramoğlu, N. Bıçak, *Process Biochem.*, 39 **(2004)** 2007-2017.
[170] Y. Ren, J. G. Ribera, L. He, H. Kulkarni, D. Lee, P. B. Messersmith, *BMC Biotechnol*., 11 **(2011)** 1-8.
[171] N. A. Izmailov, M. S. Schraiber, *Farmatsiya*, **(1938)**.
[172] E. Stahl, G. Schroter, R. Renz, *Pharmazie*, 11 **(1956)** 633-637.
[173] J. G. Kirchner, J. M. Miller, R. C. Rice, *J. Agric. Food Chem*, 2 **(1954)** 1031-1033.
[174] N. Grinberg, Dekker, New York, **(1990)**.
[175] M. Lato, B. Brunelli, G. Ciuffini, *J. Chromatogr*, 34 **(1968)** 26-34.
[176] C. Michalec, *J. Chrom. A*, 41 **(1969)** 267-269.
[177] B. Fuchs, R. Suss, K. Teuber, M. Eibisch, J. Schiller, *J. Chrom. A*, 1218 **(2011)** 2754-2774.
[178] I.D. Wilson, *Impregnation Techniques: Thin-Layer Chromatography*, **(2000)** 3065-3071.
[179] L. R. Snyder, *J. Chrom. A*, 656 **(1993)** 537-547.
[180] M. Ghebregzabher, S. Rufini, B. Monaldi, M. Lato, *J. Chrom. A*, 127 **(1976)** 133-162.
[181] Hsieh, H. K. Berry, *J. Planar Chromatogr*, 5 **(1992)** 118-123.
[182] F. Bosch-Reig, M. J. Marcotte, M. D. Minana, *Talanta*, 39 **(1992)** 1493-1498.
[183] T. Koga, T. Horikoshi, T. Fujiwara, S. Hamada, *Microbiol. Immunol.*, 32 **(1988)** 25-31.
[184] G. J. McDougall, S. C. Fry, *Planta,* 175 **(1988)** 412-416.
[185] D. W. Vomhof, T. C. Tucker, *J. Chrom. A*, 17 **(1965)** 300-306.
[186] L. W. Doner, L. M. Biller, *J. Chrom. A*, 287 **(1984)** 391-398.
[187] R. Klaus, W. Fischer, H. E. Hauck, *Chromatographia*, 28 **(1989)** 364-366.
[188] Y. Goso, *Anal. Biochem*., 188 **(1990)** 181-186.
[189] G. Lodi, V. Brandolini, E. Menziani, B. Tossi, *J. Planar Chromatogr*, 29 **(1994)** 29-33.
[190] R. Klaus, H. E. Hauck, *Chromatographia*, 29 **(1990)** 467-472.
[191] J. L. Magnani, *Anal. Biochem.*, 150 **(1985)** 13-17.
[192] M. Lato, G. Ciuffini, *J. Chrom. A*, 39 **(1969)** 407-417.
[193] N. Ilzima, T. Nagumo, *J. Chrom. A*, 193 **(1980)** 464-469.
[194] A. Panahi, A. Izadi, F. Abolhasani, E. S. Abutorabi, L. Abedini, S. Almasi, A. Akbarzadeh, *JACR*, 9 **(2009)** 52-58.
[195] S. Adachi, *J. Chrom. A*, 17 **(1965)** 295-299.
[196] R. D. Fell, *Comp. Biochem. Physiol*, 95A **(1990)** 539-544.
[197] J. F. H. Szumilo, *Acta Pol Pharm*, 58 **(2001)** 3-8.
[198] J. Briggs, P. Finch, M. C. Matulewicz, H. Weigel, *Carbohydr. Res.*, 97 **(1981)** 181-188.
[199] Y. Israëli, N. Morel-Desrosiers, *Carbohydr. Res.*, 263 **(1994)** 25-33.
[200] R. Gauch, E. Baumgartner, *J. Chrom. A*, 174 **(1979)** 195-200.
[201] C. Anderton, J. Sherma, *J. Planar Chromatogr*, 6 **(1993)** 51-54.
[202] J. Vajda, *J. Planar Chromatogr*, 1 **(1988)** 347-348.
[203] J. F. Robyt, *Carbohydrate research*, 251 **(1994)** 187-202.

[204] W. Blom, H. H. Kelholt-Dijkman, J. G. M. Huijmans, M. C. B Loonen, *Clin. Chim. Acta*, 134 **(1983)** 221-227.
[205] A. Dini, E. Ramundo, F. Senatore, *Biochem. Syst. Ecol.*, 17 **(1989)** 559-561.
[206] P. Poukens-Renwart, *J. Planar Chromatogr*, 4 **(1991)** 77-79.
[207] T. Mezzetti, S. Rufini, G. Ciuffini, *j. Chrom. A*, 63 **(1971)** 329-342.
[208] J. K. Lin, *Anal. Chem*., 59 **(1987)** 1320-1326.
[209] G. Rosenfelder, J. Chang, C. Schönenberger, D. G. Braun, H. Towbin, *Anal. Biochem.*, 147 **(1985)** 156-165.
[210] K. Muramoto, R. Goto, H. Kamiya, *Nippon suisan gakkaishi*, 56 **(1990)** 967-971.
[211] P. Jackson, *Anal. Biochem.*, 196 **(1991)** 238-244.
[212] C. Chiesa, C. Horvath, *J. Chrom. A,* 645 **(1993)** 337-352.
[213] A. Puscas, A. Hosu, C. Cimpoiu, *J. Chrom. A,* 1272 **(2013)** 132-135.
[214] K. Anderson, S. C. Li, Y. T. Li, *Anal. Biochem.*, 287 **(2000)** 337-339.
[215] J. Mes, L. Kamm, *J. Chrom. A*, 38 **(1968)** 120-125.
[216] W. M. Lamkin, D. N. Ward, E. F. Walborg, *Anal. Biochem*., 17 **(1966)** 485-494.
[217] L. M. L. Wolfrom, G. Schwab, *J. Chrom. A*, 22 **(1966)** 474-476.
[218] J. L. Meyertons, G. L. Cote, M. P. Lechevalier, *The actinomycetes*, 20 **(1988)** 182-192.
[219] I. S. Menzies, J. N. Mount, M. J. Wheeler, *Ann. Clin. Biochem*., 15 **(1978)** 65-76.
[220] I. S. Menzies, *J. Chrom. A*, 81 **(1973)** 109-127.
[221] D. J. Bell, M. Q. Talukder, *J. Chrom. A*, 49 **(1970)** 469-472.
[222] X. Di, K. K. C. Chan, H. W. Leung, C. W. Huie, *J. Chrom. A*, 1018 **(2003)** 85-95.
[223] P. J. Deschepper, S. P. Bessman, *J. Biol. Chem*., 240 **(1964)** 1670-1674.
[224] R. D. Hartley, E. C. Jones, *Phytochem*., 15 **(1976)** 305-307.
[225] D. W. Vomhof, J. Truitt, , T. C.Tucker, *J. Chromatogr*, 21 **(1966)** 335-337.
[226] K. Kakehi, S. Honsa, *J. Chrom. A*, 379 **(1986)** 27-55.
[227] N. S. Han, J. F. Robyt,, *Carbohydr. Res*., 313 **(1998)** 135-137.
[228] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, *Anal. Chem*. , 57 **(1985)** 2935-2939.
[229] R. Knochenmuss, R. Zenobi, *Chem. Rev*., 103 **(2003)** 441-452.
[230] T. C. Chiu, L. C. Chang, C .K. Chiang, H. T. Chang, *JASMS*, 19 **(2008)** 1343-1346.
[231] H. Kawasaki, T. Watanabe, R. Arakawa, *J. Phys. Chem*., 111 **(2007)** 16278-16283.
[232] K. H. Lee, C. K. Chiang, Z. H. Lin, H. T. Chang, *Rapid Commun Mass Spectrom,* 21 **(2007)** 2023-2030.
[233] T. Watanabe, H. Kawasaki, T. Yonezawa, R. Arakawa, *J Mass spectrom*, 43 **(2008)** 1063-1071.
[234] W. Y. Chen, Y. C. Chen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 **(2006)** 699-704.
[235] G. Montsko, A. Vaczy, G. Maasz, E. Mernyak, E. Frank, C. Bay, Z. Kadar, R. Ohmacht, J. Wolfling, L. Mark, *Anal. Bioanal. Chem.*, 395 **(2009)** 869-874.
[236] A. J. Dempster, 11 **(1918)** 316.
[237] J. B. Fenn, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science*, 246 **(1989)** 64-71.
[238] C. M. Park, K. Lee, S. H. Jun, S. H. Song, J. Song, *J. Chrom. B*., 1060 **(2017)** 76-83.
[239] J. Duval, C. Colas, V. Pecher, M. Poujol, J.-F. Tranchant, É. Lesellier, *Comptes Rendus Chimie*, 19 **(2016)** 1113-1123.
[240] H. Stutz, *Electrophoresis*, 26 **(2005)** 1254-1290.
[241] P. Kebarle, *J Mass spectrom*, 35 **(2000)** 804-817.
[242] L. Rayleigh, *Phil. Mag*, 14 **(1882)** 184.
[243] M. Dole, *J. Chem. Phys*, 49 **(1968)** 2240.
[244] B.A.T. J. V. Iribarne, *J. Chem. Phys*, 64 **(1976)** 2287.

7. Table des figures

FIGURE I-1- REPRESENTATION DES DIFFERENTS TYPES D'INHIBITIONS EN FONCTION DES INTERACTIONS ENZYMES-INHIBITEURS ET ENZYMES-SUBSTRATS. 12

FIGURE I-2- DETERMINATION GRAPHIQUE DE LA CONCENTRATION INHIBITRICE MEDIANE (IC_{50}) PAR REPRESENTATION DE L'EFFICACITE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT. 13

FIGURE I-3- VITESSE INITIALE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT POUR UNE REACTION CATALYSEE PAR VOIE ENZYMATIQUE, SUIVANT LES MODELES DE MICHAELIS-MENTEN, DE LINEWEAVER-BURK, D'EADIE-HOFSTEE ET DE HANES-WOOLF. 15

FIGURE I-4- PROTOCOLES DE REALISATION D'UNE COURBE DE MICHAELIS-MENTEN A TEMPS FIXE ET A TEMPS VARIABLE. 17

FIGURE I-5- LES PRINCIPAUX DEVELOPPEMENTS REALISES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ETUDE D'INTERACTIONS ENZYMES-LIGANDS. 19

FIGURE I-6- SCHEMATISATION DU PROCEDE DE TLC-BIOAUTOGRAPHY. 20

FIGURE I-7- DETECTION D'AGENTS ANTIMICROBIENS PAR TLC-BIOAUTOGRAPHY PAR DETECTION INDIRECTE (CONTACT DE LA PLAQUE TLC AVEC UN GEL D'AGAR), DETECTION DIRECTE SUR PLAQUE TLC, RECOUVREMENT D'UNE SOLUTION D'AGAR. 21

FIGURE I-8- METHODOLOGIE DE DETECTION D'INHIBITEUR DE TYROSINASE PAR TLC-BIOAUTOGRAPHY. 22

FIGURE I-9- METHODOLOGIES DE COUPLAGES DE TLC-MS BASEES SUR DES APPROCHES ELUTIVES AINSI QUE SUR LA DESORPTION LASER. FIGURE INSPIREE DE LA PUBLICATION REFERENCEE [26]. 24

FIGURE I-10- SCHEMA DU PROCEDE DE SUIVI DE REACTIONS ENZYMATIQUES PAR FIA-MS. SUIVI DES CHROMATOGRAMMES D'EXTRACTION D'IONS (EIC) DU SUBSTRAT (S) ET DU PRODUIT (P) DE REACTIONS ENZYMATIQUES EN FONCTION DU TEMPS. .. 27

FIGURE I-11- SCHEMATISATION DU SUIVI DE CONVERSION ENZYMATIQUE PAR INFUSION CONTINUE EN SPECTROMETRIE DE MASSE... 28

FIGURE I-12- STRATEGIE D'ETUDE D'INTERACTIONS ENZYMES-INHIBITEURS PAR L'APPROCHE « ION FADING » : (1) SPECTRE DE MASSE DE LA SOLUTION (2) PHENOMENE DE DIMINUTION DE L'INTENSITE DE L'INHIBITEUR « ION FADING » PAR PIEGEAGE DE CELUI-CI DANS LES SITES ACTIFS DE L'ENZYME, (3) LIBERATION DE L'INHIBITEUR PAR DENATURATION DE L'ENZYME ET ANALYSE DE CE DERNIER « ION HUNTING » (FIGURE INSPIREE DE LA REFERENCE [60]). 32

FIGURE I-13- SCHEMA GENERAL DU PRINCIPE D'ION FADING « IF-ENALDI MS » DEVELOPPE AU SEIN DE L'EQUIPE ANALYTIQUE DE L'ICOA [61]. 33

FIGURE I-14- DETECTION DE LA PRESENCE D'UN INHIBITEUR D'UNE ENZYME SPECIFIQUE PAR LE SUIVI DES CHROMATOGRAMMES D'EXTRACTION D'IONS DES MASSES D'INTERETS PAR FAC. 37

FIGURE I-15- LES DIFFERENTES STRATEGIES D'IMMOBILISATIONS D'ENZYMES SUR SUPPORT SOLIDE, PAR RETICULATION OU PAR PIEGEAGE. 40

FIGURE I-16- EXEMPLE DE PROCEDURE D'IMMOBILISATION UTILISANT DES INTERACTIONS SPECIFIQUES ENTRE LA STREPTAVIDIN/AVIDIN ET LA BIOTIN. L'ENZYME PREALABLEMENT BIOTINYLEE EST DIRECTEMENT COUPLEE AVEC DES SUPPORTS SOLIDES COMMERCIAUX FONCTIONNALISES AVEC LA STREPTAVIDIN/AVIDIN. 43

FIGURE I-17- METHODES D'IMMOBILISATIONS COVALENTES D'ENZYMES UTILISANT LES RESIDUS AMINES A LA SURFACE DES ENZYMES. 48

FIGURE I-18- VOIE D'IMMOBILISATION COVALENTE DES ENZYMES SUR BILLE DE SILICE. 49

FIGURE I-19- TECHNIQUES UTILISEES LORS DE CES TRAVAUX DE THESE POUR LE DEVELOPPEMENT DE METHODOLOGIES DANS LE CADRE DE L'ETUDE D'INTERACTIONS ENZYME/SUBSTRAT ET ENZYMES-INHIBITEURS. METHODOLOGIES BASEES SUR LES ENZYMES LIBRES ET IMMOBILISEES POUR LA MISE EN PLACE DE CARACTERISATION D'ACTIVITE ENZYMATIQUE, LE SUIVI DE CONVERSIONS ENZYMATIQUES AINSI QUE LA RECHERCHE D'INHIBITEURS AU SEIN DE MELANGES SIMPLES OU DE MILIEUX COMPLEXES. 50

FIGURE I-20- SCHEMATISATION DU PROCEDE D'ANALYSE D'ECHANTILLONS PAR THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY. 53
FIGURE I-21- PARAMETRES DE MIGRATION SUR PLAQUE TLC DEVELOPPEE. 53
FIGURE I-22- CLASSIFICATION DES SOLVANTS DANS LE TRIANGLE DE SNYDER. SOLVANTS REGROUPES EN TROIS CATEGORIES (DONNEUR/ACCEPTEUR DE PROTONS, INTERACTION DIPOLAIRE) ET EN 8 GROUPES DE SELECTIVITE. 57
FIGURE I-23- SCHEMA DU PROCEDE D'IONISATION MALDI : L'ENERGIE LASER EST ABSORBEE PAR LA MATRICE PROVOQUANT UNE DESORPTION ET UNE IONISATION DES ANALYTES. 67
FIGURE I-24- PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE L'ANALYSEUR TOF EN CONFIGURATION LINEAIRE. 72
FIGURE I-25- PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE L'ANALYSEUR TOF EN CONFIGURATION REFLECTEUR. 73
FIGURE I-26- SCHEMA DU PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA SOURCE ELECTROSPRAY. 74
FIGURE I-27- (A) MODELE DE LA CHARGE RESIDUELLE (B) MODELE DE L'EVAPORATION IONIQUE. 75
FIGURE I-28- SCHEMA GENERAL DU SPECTROMETRE DE MASSE BRUKER MAXIS UHR-Q-TOF. 76

8. Table des tableaux

TABLEAU I-1- SYNTHESE DES AVANTAGES DU COUPLAGE TLC-MS. 20
TABLEAU I-2-EXEMPLES D'APPLICATIONS DU COUPLAGE TLC-MS POUR LA DETECTION DE MOLECULES BIOACTIVES. 25
TABLEAU I-3- EXEMPLES D'APPLICATIONS DE L'INFUSION DIRECTE ET CONTINUE EN SPECTROMETRIE DE MASSE POUR LES ETUDES D'INTERACTIONS ENZYME-LIGAND. 29
TABLEAU I-4- EXEMPLES D'APPLICATIONS DE LA TECHNIQUE MALDI TOFMS POUR L'ETUDE D'INTERACTIONS ENZYMES-LIGANDS. ETUDES EN ENZYMES LIBRES ET IMMOBILISEES. 34
TABLEAU I-5- EXEMPLES D'APPLICATIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE FRONTALE (FAC) POUR L'ETUDE D'INTERACTIONS ENZYMES-INHIBITEURS ET ENZYMES-SUBSTRATS. 38
TABLEAU I-6- SYNTHESE DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'IMMOBILISATION D'ENZYMES. 39
TABLEAU I-7- SYNTHESE DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'IMMOBILISATION D'ENZYME PAR ADSORPTION. 41
TABLEAU I-8- EXEMPLES D'APPLICATIONS D'ENZYMES IMMOBILISEES PAR ADSORPTION. 42
TABLEAU I-9- SYNTHESE DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'IMMOBILISATION D'ENZYME PAR ADSORPTION VIA DES INTERACTIONS SPECIFIQUES. 43
TABLEAU I-10- SYNTHESE DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'IMMOBILISATION D'ENZYME PAR PIEGEAGE. 44
TABLEAU I-11- SYNTHESE DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'IMMOBILISATION D'ENZYME PAR ENCAPSULATION. 45
TABLEAU I-12- EXEMPLES D'APPLICATIONS D'ENZYMES IMMOBILISEES PAR PIEGEAGE ET ENCAPSULATION. 45
TABLEAU I-13- SYNTHESE DES AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'IMMOBILISATION D'ENZYME PAR RETICULATION INTRA-MOLECULAIRE.. 46
TABLEAU I-14- EXEMPLES D'APPLICATIONS D'ENZYMES IMMOBILISEES PAR RETICULATION INTRA-MOLECULAIRE. 46
TABLEAU I-15- AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'IMMOBILISATION PAR LIAISON COVALENTE. 48
TABLEAU I-16- COMPARAISON DES PARAMETRES DES PLAQUES TLC, HPTLC, UTLC. 52
TABLEAU I-17- TYPES DE PHASES STATIONNAIRES ET DE CHROMATOGRAPHIES ASSOCIEES LES PLUS UTILISEES REPERTORIEES DANS 1752 PUBLICATIONS ENTRE 1979 ET 1985. 55
TABLEAU I-18 - EXEMPLES DE PHASES MOBILES DEVELOPPEES POUR L'ANALYSE PAR TLC DE SUCRES SUR PLAQUE CELLULOSE PAR THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY. 60
TABLEAU I-19- EXEMPLES DE PHASES MOBILES DEVELOPPEES POUR L'ANALYSE DE SUCRES PAR TLC SUR PLAQUE AMINO. 61
TABLEAU I-20- EXEMPLES DE PHASES MOBILES DEVELOPPEES POUR L'ANALYSE DE SUCRES PAR TLC SUR PLAQUE DE SILICE. 62
TABLEAU I-21- EXEMPLES D'AGENTS D'IMPREGNATION UTILISES POUR LA SEPARATION DES SUCRES PAR TLC. 63
TABLEAU I-22- EXEMPLES D'AGENTS DE DERIVATION UTILISES POUR LA DETECTION DES SUCRES PAR TLC. 65
TABLEAU I-23- EXEMPLES DE MATRICES ORGANIQUES UTILISEES POUR LES ANALYSES MALDI AVEC LES LONGUEURS D'ONDES D'ABSORPTION, LA MASSE MOLECULAIRE ET LES APPLICATIONS ASSOCIEES. 68
TABLEAU I-24- EXEMPLES D'APPLICATIONS DE MATRICES SALDI. 70

CHAPITRE II. Criblage de substrats présents dans des extraits de plantes

CHAPITRE II. CRIBLAGE DE SUBSTRATS PRESENTS DANS DES EXTRAITS DE PLANTES 89

PARTIE I. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE 93

1. Contexte de l'étude 93

1.1. Objectifs de l'étude 93

1.2. Description de l'enzyme invertase 95

1.2.1. Mécanisme d'action 95

1.2.2. Les utilisations de l'invertase 96

1.2.3. Rôle de l'invertase au sein des plantes 96

1.2.4. Invertase BfrA étudiée dans ce travail 97

1.3. Test d'activité colorimétrique par détection indirecte à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) 97

1.4. Analyses des sucres 99

1.4.1. Méthodes chromatographiques 99

1.4.2. Chromatographie sur Couche Mince (CCM) ou Thin-Layer Chromatography « TLC » 99

1.5. Introduction aux couplages TLC-MS pour l'analyse des sucres 101

1.6. Validation de méthode de séparation et de quantification du saccharose, du glucose et du fructose 102

1.6.1. Instrumentation TLC 102

1.6.2. Méthode TLC 103

1.6.3. Préparation des solutions 103

1.6.4. Spécificité 103

1.6.5. Limites de détection et de quantification 105

1.6.6. Fidélité 106

1.6.7. Robustesse 107

1.6.8. Exactitude de la méthode en milieu complexe 110

1.7. Analyse de sucres par TLC-MALDI-TOFMS 112

1.7.1. Choix de la matrice MALDI 112

1.7.2. Analyse de l'extrait de réglisse par TLC-MALDI-TOFMS 113

2. Mise en place d'une étude de caractérisation d'activité de l'invertase par TLC-UV 116

2.1. Principe de l'étude 116

2.2. Méthode TLC 117

2.3. Courbes d'étalonnages 117

2.4. Essais enzymatiques : linéarité 118

2.5. Essais enzymatiques : la détermination des paramètres cinétiques 120

2.6. Hydrolyse de substrats alternatifs 123

PARTIE II. DEVELOPPEMENT D'UNE PREUVE DE CONCEPT DE SUIVI DE CONVERSION ENZYMATIQUE : LE CRIBLAGE DE SUBSTRATS DE L'INVERTASE AU SEIN D'EXTRAITS DE PLANTES PAR TLC-MALDI TOFMS 127

1. Préparation des extraits de plantes 129

2. Protocole des essais enzymatiques 129

3. Méthode de TLC-(UV)-MALDI TOFMS 129

4. Résultats et discussions 129

4.1.1. Criblage par TLC-UV 130

4.1.2. Analyse par TLC-MALDI-TOFMS 132

PARTIE III. OUVERTURE A L'APPLICATION DE LA PREUVE DE CONCEPT : ETUDE DE L'ENZYME CELLOBIOHYDROLASE II 139

1. Détection de l'inhibition du D-cellobiose par les méthodologies d'Ion Fading et d'Ion Hunting par MALDI-TOFMS 140

1.1. Synthèse des nanoparticules magnétiques 140

1.2. Fonctionnalisation des nanoparticules 140

1.3. Immobilisation de l'enzyme CBH II sur billes magnétiques 141

1.4. Expériences d'Ion Fading et d'Ion Hunting 141

2. Etude simultanée des interactions enzyme-substrat et enzyme-inhibiteur du maltohexaose et du D-cellobiose par TLC-ENALDI 144

2.1.1. Principe de l'approche 144

2.1.2. Etude de l'activité substrat et inhibiteur par TLC-ENALDI 144

2.1.3. Etude de faisabilité d'ionisation de polysaccharides par TLC-MALDI TOFMS 146

CONCLUSIONS 148

REFERENCES 151

TABLE DES FIGURES 153

TABLE DES TABLEAUX 155

PARTIE I. Caractérisation de l'activité enzymatique

1. Contexte de l'étude

1.1. Objectifs de l'étude

Les matrices naturelles représentent une source diversifiée en substances biologiquement actives. Ces matrices ont trouvé des applications dans des domaines industriels variés tels que les domaines agroalimentaires ou énergétiques dans le cadre, par exemple, de la production de la biomasse. Le criblage de molécules bioactives, ainsi que la compréhension des mécanismes des interactions enzymes-ligands au sein des matrices naturelles, présentent un intérêt certain [1-3]. Cependant, le criblage de molécules bioactives se révèle être un véritable challenge, découlant de la nature complexe de la composition de ce type d'échantillons. De nombreuses techniques analytiques, (spectrophotométriques [4], chromatographiques [5, 6] et RMN [7, 8]) ont été développées pour l'identification de ces molécules bioactives. Parmi l'ensemble de ces techniques, la Thin-Layer Chromatography (TLC), a été particulièrement utilisée comme support pour la recherche de molécules bioactives [9] au sein de milieux complexes [10-13].

Ce chapitre est axé sur la mise en place d'une méthodologie de criblage de substrats d'une enzyme modèle l'invertase. La méthodologie développée permettra de réaliser le suivi de l'hydrolyse de sucres au sein de mélanges complexes tels que dans des extraits de plantes. Ce développement méthodologique présente un objectif double :

- l'amélioration des procédés existants pour l'étude de l'invertase dans le but de pallier les imprécisions de l'approche spectrophotométrique. Ces imprécisions sont dues à une non-spécificité de détection,
- la mise en lumière de l'intérêt de cette technique dans le cadre des interactions enzymes-substrats.

Dans ce contexte, notre approche a pour finalité de concilier rapidité et sélectivité afin de tendre vers une méthodologie de criblage, proche de l'analyse par spectrophotométrie UV.

Dans ce but, le couplage TLC-MALDI TOFMS a été développé afin d'identifier rapidement et de caractériser sélectivement les potentiels substrats de l'invertase au sein d'extraits de plantes, tout en limitant la préparation d'échantillons. Ce couplage apparaît être une technique de choix dans ce domaine grâce à l'association des avantages de :

- la dimension séparative TLC : simultanéité des analyses, séparation rapide et dérivation chimique spécifique aux familles moléculaires,
- la détection par MALDI TOFMS : analyses rapides et précises.

Afin de répondre à l'objectif principal proposé, ce chapitre s'articulera en trois parties.

Préalablement à la caractérisation de l'enzyme invertase ainsi qu'à la mise en place du suivi de l'hydrolyse de sucres au sein d'extraits de plantes, une validation des conditions opératoires pour l'analyse des sucres au sein de milieux complexes en TLC-MALDI TOFMS a été réalisée. Cette validation a été effectuée en deux étapes :

- la validation de la méthode de séparation et de quantification des trois sucres d'intérêts : le saccharose, le glucose et le fructose. Cette méthode a été validée pour ces trois sucres mais évaluée dans le cas de l'analyse d'un extrait de plante. Cette validation représente le support de nos développements. Elle sera garante de la fiabilité et de la robustesse de notre approche,
- l'étude de la faisabilité d'ionisation des sucres d'intérêts dans un extrait de plante par couplage TLC-MALDI TOFMS. Cette optimisation a notamment exigé le choix d'une matrice compatible à l'analyse TLC et à l'ionisation des sucres de faibles poids moléculaires à travers l'analyse MALDI TOFMS.

L'étude ayant été consolidée par les résultats de la validation de séparation et de quantification des trois sucres par TLC-UV, la caractérisation de l'enzyme invertase a pu être effectuée de manière fiable et robuste. Cette caractérisation a été réalisée dans le but de déterminer des paramètres cinétiques K_M et V_{max} selon le modèle de Michaelis-Menten. Ces travaux ont donné lieu à une publication dans le journal *Journal of Chromatography A* en 2016.

Cette méthodologie a été appliquée dans le cas de l'étude de criblage de substrats au sein d'extraits de plantes suite :

- à l'optimisation des conditions opératoires pour l'analyse de sucres par couplage TLC-MALDI TOFMS,
- à la validation de l'activité par le développement d'une méthode de caractérisation en TLC-UV.

Ce développement a été réalisé en deux temps :

- le suivi par TLC-UV a permis la mise en place d'une approche différentielle visuelle de l'intensité des taches des substrats et des produits de réaction. Cette approche différentielle visuelle permet le criblage de substrats de l'invertase dans des mélanges complexes modèles.
- l'analyse des taches d'intérêts a été réalisée par couplage TLC-MALDI TOFMS afin d'identifier rapidement les substrats et les produits de la réaction enzymatique.

Ces développements ont donné lieu à une publication dans le journal *Talanta* en 2017.

En dernier lieu, cette approche a été appliquée pour la mise en place de la preuve de concept de l'étude d'une hydrolase : la cellobiohydrolase II (CBH II). Dans cette démarche, le comportement inhibiteur du D-cellobiose a été, dans un premier temps, confirmé par les approches Ion Fading et Ion Hunting par MALDI TOFMS. Ces approches sont basées sur l'utilisation de l'enzyme immobilisée. Dans un deuxième temps, une ouverture d'application du développement méthodologique de la TLC couplée à

ces deux approches est présentée pour l'étude simultanée du caractère inhibiteur du D-cellobiose et substrat d'un oligoglucose. Cette application représentera une introduction à l'étude d'une hydrolase de sucres, valorisée dans le domaine industriel de valorisation de la biomasse, pour l'étude de matrices plus complexes telles que la cellulose ou la lignine.

Le travail présenté dans ce chapitre a été initié par une collaboration avec l'équipe « GlycoBio&Chimie » de notre laboratoire. Bien que l'enzyme invertase représente un modèle dans le cadre de notre développement méthodologique, il convient d'introduire son rôle ainsi que son mode de fonctionnement. Nous présenterons également de façon succincte le principe de l'approche spectrophotométrique, classiquement utilisée pour la caractérisation et l'étude de criblage de cette enzyme pour pouvoir alors discuter de l'apport de la méthodologie développée.

1.2. Description de l'enzyme invertase

1.2.1. Mécanisme d'action

L'invertase est connue plus spécifiquement sous le nom de ß-D-fructofuranosidase. Cette enzyme est une glycoside hydrolase qui catalyse l'hydrolyse d'un résidu de ß-fructofuranoside non réduit présent dans une molécule de saccharose. Cette réaction produit un mélange équimolaire de glucose et de fructose d'après la réaction présentée en Figure II-1 [14].

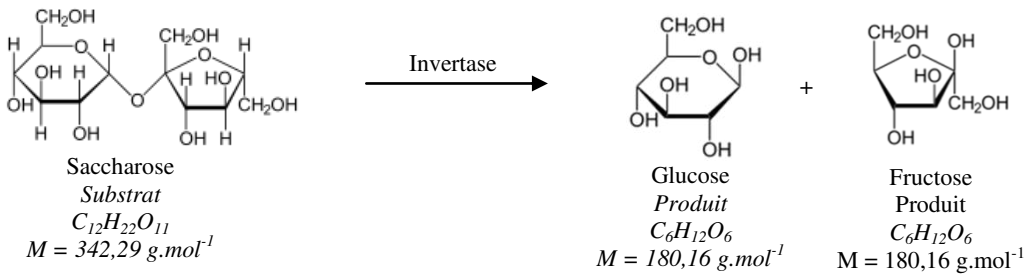


Figure II-1 - Schéma général de l'hydrolyse du saccharose par l'invertase.

Cette enzyme appartient à la famille des sucroses hydrolases (GH32) regroupant :

- les invertases,
- les fructanes hydrolases,
- les fructosyltransférases,
- les saccharose-6-phopshate hydrolases.

L'invertase doit son nom au changement de propriétés rotatoires qu'elle impose au milieu réactionnel. Le saccharose (substrat) et le glucose (produit) étant deux molécules dextrogyres et le fructose étant fortement lévogyre, l'invertase catalyse une inversion du sens de rotation de la lumière polarisée du milieu réactionnel.

L'activité de l'invertase a été indirectement détectée pour la première fois en 1842 par Mitscherlin, qui décrit l'existence d'une substance capable d'inverser la propriété dextrogyre en lévogyre du sucre de canne. L'activité directe de cette enzyme dans un mélange de glucose et de fructose a été identifiée en 1847 par Dubrunfant. Ce n'est qu'en 1860 que l'invertase a été isolée pour la première fois par Berthelot [15].

Cette enzyme est naturellement présente dans différents types d'organismes tels que les bactéries, les champignons, les levures, les insectes et les plantes. L'invertase est cependant absente du génome humain. Elle est également l'une des enzymes qui a été la plus utilisée afin de décrire divers principes de cinétiques enzymatiques du fait de sa facilité d'utilisation.

1.2.2. Les utilisations de l'invertase

L'invertase est l'une des enzymes les plus commercialisées grâce à ses nombreuses utilisations notamment dans l'industrie agroalimentaire et plus spécifiquement dans la préparation des aliments (confitures, bonbons, chocolats, miels artificiels). Elle y est utilisée comme additif pour la production de sucres invertis tels que le fructose, connu pour son fort pouvoir sucrant (augmentation du pouvoir sucrant d'une boisson sans effet de cristallisation) [16]. Cette voie enzymatique de production de sucres invertis est couramment employée et est préférée à l'hydrolyse acide qui génère des produits indésirables (et augmente du coût de production). L'invertase est également utilisée dans d'autres domaines tels que dans la production d'éthanol dont elle permet une augmentation de la production (notamment dans la mélasse) et dans l'industrie pharmaceutique [17, 18]. Ce chapitre se focalisera essentiellement sur l'étude de l'activité de l'invertase au sein d'extraits de plantes (modèles sélectionnés comme matrices complexes). Nous exposerons donc, dans le paragraphe ci-après, le rôle de l'invertase au sein de ces extraits.

1.2.3. Rôle de l'invertase au sein des plantes

Les sucres représentent la principale source de carbone et d'énergie indispensable au développement des plantes [19]. Ils ont un rôle important dans le système de défense de la plante lui permettant de se protéger contre une grande variété de micro-organismes (bactéries, champignons), animaux et autres [20]. Ils sont également impliqués dans la résistance aux stress thermique et hydrique et participent à la régulation des processus de développements physiologiques et métabolomiques [18, 21]. Les sucres, au sein des plantes, sont synthétisés lors de la photosynthèse : lors de la production de matière organique à partir du dioxyde de carbone, d'eau et de lumière (cycle de Calvin). Les sucres ainsi produits sont ensuite généralement transportés sous forme de saccharose, des tissus autotrophes (tissus producteurs) vers les tissus hétérotrophes (racine, tige, pétiole), en ayant besoin. Le saccharose, le plus commun des disaccharides dans les tissus des plantes, peut être le précurseur de la plupart des molécules organiques (protéines et polysaccharides). Ces sucres peuvent être également transportés sous forme d'oligosaccharides tels que le raffinose et le stachyose. L'ensemble de ces sucres est ensuite hydrolysé par deux types d'invertases : une invertase acide

(extracellulaire) située majoritairement dans les vacuoles ou pariétales et une invertase neutre (intracellulaire) située dans le cytoplasme [18]. Le glucose ainsi libéré sera ensuite assimilé par la plante pour sa croissance.

Remarque : les sucres représentent les molécules naturelles les plus abondantes au sein du métabolome primaire des plantes. Par ailleurs, l'invertase, indispensable à la survie de la plante, est une enzyme naturellement présente au sein des plantes. Dans ce contexte, l'étude de la réaction de l'invertase au sein d'extraits de plantes est apparu comme un modèle pertinent afin d'exposer l'intérêt de la méthodologie TLC-MALDI TOFMS pour le criblage de substrats au sein de matrices complexes.

1.2.4. Invertase BfrA étudiée dans ce travail

L'enzyme invertase a été choisie pour mettre en lumière l'intérêt et l'apport du couplage TLC-MALDI TOFMS dans le cadre de la recherche de substrat au sein de matrices complexes. Cette enzyme a été sélectionnée comme modèle pour notre développement méthodologique car :

- ses utilisations sont variées pour la description de fondamentaux enzymatiques et pour le développement de nouvelles méthodologies,
- sa présence est naturelle au sein d'extraits de plantes.

L'invertase utilisée dans cette étude a été clonée, purifiée puis caractérisée chimiquement pour la première fois au sein de notre laboratoire par nos collaborateurs de l'équipe « GlycoBio&Chimie » [14]. Cette enzyme, nommée BfrA, est une invertase intracellulaire exprimée à partir du génome de leishmania.

1.3. Test d'activité colorimétrique par détection indirecte à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS)

Dans l'optique d'aborder l'intérêt des approches TLC-UV et TLC-MALDI TOFMS développées dans le cadre de ces travaux pour la caractérisation et le criblage de substrats de l'enzyme invertase, il convient d'exposer le principe du test spectrophotométrique. Ce test est le plus couramment utilisé en biologie pour la détection et la quantification rapide de sucres réduits en solution [14]. La détermination des constantes cinétiques (K_M et V_{max}) est communément réalisée par détection colorimétrique du 3-amino-5-nitrosalicylique [22]. En présence de sucres réducteurs, comme le fructose ou le glucose, l'acide 3,5-dinitrosalicylique, couramment connu sous l'acronyme DNS, est oxydé pour former l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique de couleur rouge (absorbant à 540 nm) d'après la réaction présentée en Figure II-2. La quantification des sucres réduits en solution est réalisée grâce à la quantification indirecte de la quantité de 3-amino-5-nitrosalicylique produit.

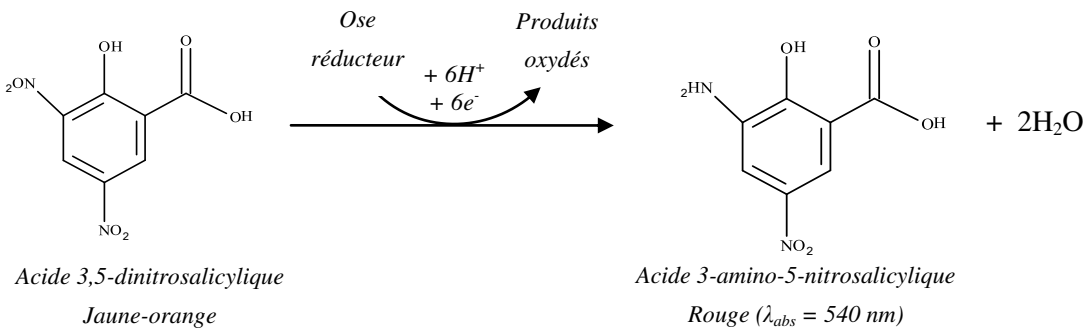


Figure II-2 - Réaction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique en présence d'un sucre réducteur.

Dans le cas de l'hydrolyse du saccharose, le glucose et le fructose sont détectés à travers la mesure de l'absorbance du mélange. La quantité de monosaccharide formée est donc déterminée par la division par deux de l'absorbance du mélange. Cette division ne peut être réalisée de manière fiable que dans le cas de l'étude de l'hydrolyse du saccharose. Pour l'hydrolyse de substrats de types oligosaccharides, cette approche amène à des imprécisions de mesures qui seront discutées dans la suite de ce chapitre.

Bien que ce test présente l'avantage d'être simple et rapide à mettre en œuvre, il présente néanmoins deux inconvénients majeurs :

- une forte consommation de milieu réactionnel (supérieure à 100 µL),
- des incapacités à réaliser l'identification et la quantification spécifique de chaque sucre présent en solution (suivi indirect).

Ce manque de spécificité peut engendrer certaines approximations dans le cas de l'hydrolyse de polysaccharide à plus haut degrés de polymérisations. L'oxydation du DNS peut être initiée par la présence des monosaccharides et des polysaccharides réducteurs présents dans la solution. Une surexpression de l'activité peut donc être observée. En outre, dans le cadre d'une recherche ou d'une identification de molécules bioactives au sein d'un milieu complexe, cette étude serait difficilement menée à bien avec le test colorimétrique classique.

Grâce à sa spécificité de détection, une analyse par spectrométrie de masse du milieu réactionnel, avant et après réaction avec l'invertase, permet de suivre facilement et rapidement la conversion du substrat en produits. Cependant, dans le cas de figure présenté, une analyse par spectrométrie de masse seule apparaît incompatible :

- la présence d'isomères (fructose et glucose) ne permet pas d'identifier spécifiquement les produits de la réaction,
- l'effet matrice des extraits de plantes (forte présence de sucres) peut fausser l'interprétation des résultats de l'hydrolyse.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés au couplage des techniques TLC et MALDI TOFMS. L'approche séparative par TLC se révèle être un atout indéniable afin de mener à bien la visualisation du rapport frontal (R_F) et la détection spécifique de chaque substrat et produit de la

réaction enzymatique (isomères et ou isobares). Cette approche apporterait en prime une possible dimension quantitative à la méthodologie grâce à l'utilisation d'un révélateur adéquat par densitométrie.

1.4. Analyses des sucres

1.4.1. Méthodes chromatographiques

De nombreuses techniques séparatives sont décrites dans la littérature pour la séparation et la quantification des sucres au sein de matrices complexes. Des méthodes variées en HPLC couplées à différents types de détection (spectrométrie de masse, réfractomètre et détecteur évaporatif à diffusion de lumière) ont été développées [23-26]. Par ailleurs, les méthodes chromatographiques couplées à une détection UV, nécessitant une dérivation des sucres avant l'analyse (absence de groupement chromophore) ne semblent pas les plus favorables.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (SM) ou par ionisation de flamme (FID) a montré des séparations rapides de sucres (< 20 minutes [27]). Cependant l'étape de dérivation, nécessaire à la volatilisation des sucres est longue (généralement plus d'une heure) [28] et fastidieuse. Elle n'est donc pas compatible avec la réalisation d'un criblage d'activité enzymatique [29, 30].

Bien que ces techniques soient utilisées pour l'analyse de sucres, dans le cadre d'un criblage de substrats de l'invertase dans des extraits de plantes, plusieurs points semblent limitants :

- les fortes concentrations en sucres peuvent conduire à une faible séparation des composés d'intérêts,
- la nécessité d'injecter des enzymes dans une colonne chromatographique (risques d'agglomération dans la colonne),
- l'impossibilité de réaliser des analyses simultanées (temps d'analyse conséquent).

Une approche séparative classique, telle que la TLC, semble alors intéressante du fait de la possibilité d'analyser :

- des solutions à fortes concentrations en sels et en enzymes,
- de larges gammes de concentrations en substrats,
- plusieurs échantillons simultanément.

1.4.2. Chromatographie sur Couche Mince (CCM) ou Thin-Layer Chromatography « TLC »

La TLC est très développée dans le cadre de la séparation et de la quantification de sucres. Elle apparaît comme une technique de choix dans le cadre de recherches de molécules bioactives au sein de milieux complexes. Cette technique est notamment appréciée pour sa compatibilité avec l'analyse d'échantillons bruts.

En 2011, une méthode de séparation et de quantification sur plaque de silice HPTLC pré-traitée a été développée par Morlock *et al.* Cette méthode présente l'analyse de sept sucres (glucose, galactose, fructose, saccharose, maltose, mannose et lactose) présents dans des matrices alimentaires (yaourt, lait, chocolat, praline) [31]. Bien que cette technique possède certaines limites (saturation du support aux fortes concentrations, des limites de détections et de quantifications pouvant être élevées), ses avantages en font une technique de choix pour le criblage d'activités enzymatiques :

- préparations d'échantillons peu importantes,
- faible consommation d'échantillons (volume déposé < 15µL),
- la possibilité d'analyses simultanées (souvent aux alentours de 20 dépôts par plaque),
- un faible coût,
- une dérivation spécifique,
- une faible consommation en solvant (5 à 10 mL pour un développement),
- des tolérances aux sels et à la présence d'enzymes (indispensable pour l'analyse de réactions enzymatiques),
- l'exploitation et la lecture des plaques chromatographiques sous le format image (résultat visuel).

Par ailleurs, cette technique a fait preuve d'intérêt, ces dernières années, pour l'étude de la recherche d'inhibiteurs (aspect détaillé dans l'étude bibliographique de la TLC-bioautography) ainsi que pour l'étude d'interactions enzymes-substrats. De nombreux travaux utilisent les plaques TLC comme des supports de réactions enzymatiques. Après réaction in-situ sur la plaque et séparation par développement, les substrats et les produits de la réaction sont détectés [32-34]. En 1983, S. Misra *et al*. ont mis en place une étude de l'hydrolyse d'esters, catalysée par une lipase, in situ sur plaque TLC de gel de silice. La réaction a été initiée par des dépôts successifs de l'enzyme puis du substrat sur une même bande de dépôt. Les alcools et les acides gras ont été par la suite séparés (trois migrations, n-hexane-éther diéthylique-acide acétique 90 :10 :1,5 v/v/v) puis détectés (vapeur d'iode) [35].

Néanmoins, dans le cadre de l'analyse de milieux complexes, la technique TLC exercée seule présente certains inconvénients :

- des co-migrations possibles des composés (superposition des bandes de migration),
- un assignement ambigu dû à des variations de facteurs de retardement selon certains paramètres (composition de la phase mobile, humidité de la chambre d'élution et température).

Dans ce cas, une identification directe des composés n'est possible que par la réalisation de dépôts des solutions de composés standards sur la même plaque TLC. Une méthode de détection par spectrométrie de masse couplée à la séparation TLC permet une identification directe et univoque de chaque composé.

1.5. Introduction aux couplages TLC-MS pour l'analyse des sucres

D'après l'étude bibliographique réalisée dans le premier chapitre de ce manuscrit, de nombreux types de couplages TLC-MS ont été développés. Dans le contexte de notre étude, la source MALDI a été sélectionnée puisque son utilisation permet :

- la réalisation d'une analyse rapide à mettre en place,
- l'obtention d'une haute résolution spatiale, de par le faible diamètre du faisceau laser (µm), qui permet de conserver la séparation établie en TLC,
- la réutilisation de la plaque TLC en vue d'analyses complémentaires grâce à une analyse non invasive.

Très peu d'études relatées dans la littérature portent sur l'analyse de sucres par couplage direct TLC-MALDI. La méthodologie MALDI ne serait pas adaptée à l'analyse de petites molécules *(m/z* < 500) du fait de la présence d'ions interférents de matrice dans la région des basses masses. Ce phénomène est à l'origine d'une difficulté de détection des sucres et donc d'une faible sensibilité.

En 2010, K. Nimptsch *et al*. ont évalué le potentiel du couplage TLC-MALDI pour la détection d'oligosaccharides dérivés de polysaccharides tels que le dextran ou l'alginate. Après la fragmentation de ces polysaccharides par traitement à l'acide chlorhydrique, les solutions ont été déposées sur une plaque de silice à fond aluminium, indispensable pour la conductivité électrique. Suite à l'analyse de la plaque en mode positif, par ionisation au moyen de la matrice acide-2,5-dihydroxybenzoïque (DHB, 100 mg/mL), trois types de polysaccharides ont pu être détectés : un pentasaccharide *(m/z* 689,2), un hexasaccharide (*m/z* 851,3) et un heptasaccharide (*m/z* 1013,3). Cette étude évoque notamment le bruit de fond marqué dans la région des basses masses provenant de l'ionisation de la matrice. C'est pourquoi, les oligosaccharides de plus faibles degrés de polymérisation n'ont pas été détectés [36].

Bien que la matrice DHB soit usuellement employée pour l'analyse de sucres en mode positif par analyse MALDI, la littérature souligne les avantages d'une approche SALDI-MS « Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry » découlant de l'utilisation de nanoparticules comme matrice. L'emploi de ce type de matrice a permis de dépasser les limites des matrices MALDI qui génèrent des pics interférents dans la région des basses masses [37, 38].

De ce fait, dans le cadre de la mise en place d'un couplage TLC-MALDI TOFMS pour le criblage de substrats et de produits d'hydrolyse de l'invertase (mono-, di-, trisaccharide), le choix de la matrice se révèle crucial.

Suite à cette description succincte de l'enzyme invertase ainsi que de la mise en lumière des avantages que pourrait apporter un couplage TLC MALDI-TOFMS dans ce domaine, nous aborderons les différentes optimisations réalisées pour mener à bien notre développement méthodologique. Dans le but de réaliser la caractérisation de l'activité de l'invertase par TLC-UV ainsi que de développer une méthodologie de criblage de substrats de l'invertase au sein d'extrait de plantes, il est nécessaire d'étudier les faisabilités :

- des approches séparative et quantitative des sucres par TLC-UV,
- d'une ionisation des sucres par couplage TLC-MALDI TOFMS.

Une validation de méthode doit donc être réalisée en premier lieu dans le but :

- d'entériner la quantification des trois sucres (le saccharose, le glucose et le fructose) pour aboutir à la caractérisation enzymatique de l'invertase par TLC-UV. Cette validation permet d'apporter de la fiabilité et de la robustesse pour la détermination des paramètres cinétiques K_M et V_{max} pour l'hydrolyse du saccharose.
- d'évaluer les limites de la technique TLC pour la détection d'augmentations ou de diminutions d'intensités des taches correspondant à la présence de produits et de substrats de réaction. Cette étude aura pour seul objectif d'évaluer les limites associées à un seuil de confiance pour une mesure de quantité augmentée suite à l'hydrolyse de substrat.

1.6. Validation de méthode de séparation et de quantification du saccharose, du glucose et du fructose

Des conditions optimales (pré-traitement de la plaque, nombre de migrations, dérivation) ont été définies pour la séparation et la détection des sucres impliqués dans la réaction de l'invertase. Ces conditions sont présentées dans les annexes de ce manuscrit. Afin de mener à bien notre approche, la méthode de séparation et de quantification du saccharose, du glucose et du fructose a été validée pour l'étude des milieux simples (mélanges de standards) et évaluée dans le cas de l'analyse de milieux complexes (extrait de plante).

Cette méthode a été validée pour les trois sucres après une analyse des paramètres :

- de spécificité,
- de limites de détection et de quantification,
- de précision,
- de robustesse.

Une validation a été acceptée pour des coefficients de variation inférieurs à 20%. Des études d'exactitude et de spécificité ont également été réalisées sur l'extrait de réglisse utilisé ici comme extrait de plante modèle.

1.6.1. Instrumentation TLC

Les analyses quantitatives ont été réalisées à l'aide de plaques d'aluminium de gel de silice 60 (Si_{60}) avec indicateur fluorescent F_{254} de dimensions 20 x 20 cm (épaisseur de la phase stationnaire : 200 µm). Les dépôts ont été effectués à l'aide d'un déposeur automatique CAMAG Linomat IV et d'une seringue de 100 µL. La chambre de migration utilisée, est une chambre verticale en verre de dimensions 20 x 20 cm (DESAGA HEIDELBERG). Les plaques sont scannées à une longueur d'onde

λ = 390 nm et lues à l'aide d'un densitomètre CAMAG TLC Scanner 3. Les profils densitométriques sont ensuite intégrés et retraités par le logiciel winCATS v 3.0.

1.6.2. Méthode TLC

La description de la méthode détaille les conditions opératoires optimales pour une séparation et analyse rapide des sucres d'intérêts par TLC-UV. Ces optimisations sont exposées en annexe de ce chapitre.

Les plaques sont préalablement lavées au méthanol (migration des impuretés de la fabrication et de la conservation des plaques) afin obtenir une ligne de base stable pour la détection UV. Chaque plaque est ensuite imprégnée par immersion rapide (inférieure à 1 seconde d'immersion, correspondant à un aller-retour, avec l'instrument TLC Dip-Fix 200) dans une solution contenant 0.1 M de bisulphate de sodium et 0.01 M de tampon citrate.

Après immersion, la plaque est chauffée à 100°C pendant 1 heure dans l'étuve. La solution d'imprégnation a été réalisée selon le protocole proposé par Ghebregzabher *et al*. [39] et par Fell *et al.* [40]. Un µL de chaque solution a été déposé en bandes de 5 mm de longueur, à une vitesse de dépôt de 4 s/µL, avec 5 mm d'espace entre chaque dépôt et une distance de 10 mm de chaque bord (axes x, y).

Les dépôts sont migrés sur 6,5 cm avec une phase mobile constituée d'ACN/H_2O 80/20 (v/v), deux fois dans la même direction, sans conditionnement de la chambre de migration avec la phase mobile.

Lors de la dérivation des sucres, chaque plaque est immergée dans une solution d'acide 4-aminobenzoïque à l'aide de l'instrument TLC Dip-Fix200 (DESAGA) à vitesse verticale de 3 cm/s sans temps d'immersion (inférieur à 1 seconde).

Les plaques sont ensuite placées dans une étuve à 130°C pendant 15 minutes. Les mesures quantitatives ont été réalisées par absorbance à une longueur d'onde de 390 nm utilisant une longueur et une largeur de fente respectivement de 6 mm et 0,45 mm. Les scans ont été réalisés dans le sens de migration. Les aires des pics, obtenus après intégration avec le logiciel winCATS v. 3.0., ont été utilisées pour l'analyse quantitative.

1.6.3. Préparation des solutions

Afin de réaliser les courbes d'étalonnage, cinq solutions mélanges (de 25 ppm à 500 ppm) des trois sucres ont été préparées dans une solution ACN/H_2O 50/50 (v/v).

1.6.4. Spécificité

La spécificité de la méthode a été étudiée afin de :

- valider l'assignement de taches dans le cas d'un mélange simple des trois sucres standards pour la caractérisation enzymatique,
- d'évaluer la fiabilité d'assignement des taches pour le criblage de substrats au sein d'extraits de plantes.

a. Mélange simple

*Définition : **la spécificité** d'une méthode est décrite comme étant sa capacité à **évaluer explicitement l'analyte** en présence d'autres composés pouvant être présents tels que des **impuretés** ou de **la matrice** [41].*

Afin de vérifier la spécificité de la méthode, les facteurs de retardement (R_F) des trois sucres en mélange ont été comparés à ceux des sucres déposés individuellement à trois positions : début, milieu et fin du pic. Un exemple est schématisé sur la Figure II-3, dans le cas de l'étude du saccharose à une concentration.

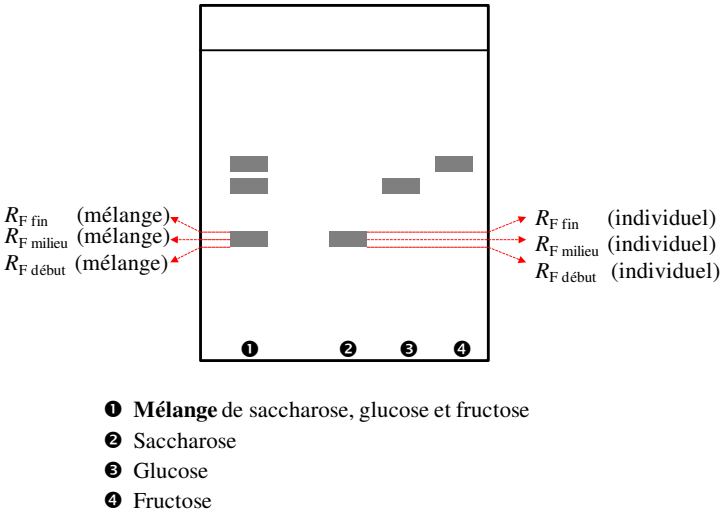


Figure II-3- Schématisation de la détermination de la spécificité : étude des facteurs de retardements à trois positions (début, milieu et fin) entre les molécules déposées individuellement et en mélange.

Pour chaque sucre, trois réplicats de trois concentrations (50 ppm, 125 ppm et 250 ppm) ont été effectués. Selon la valeur du coefficient de variation (inférieur ou égal à 20%), la méthode a été considérée comme spécifique. Les résultats de cette étude sont consignés dans le Tableau II-1.

Spécificité, CV (%) entre les R_F du mélange et des sucres individuels			
Quantité (ng/spot)	**Début***	**Milieu***	**Fin***
Saccharose, R_F = 0,10			
50	10,0	10,0	10,0
125	10,0	10,0	0
250	0	10,0	0
Glucose R_F = 0,16			
50	6,3	6,3	0
125	0	6,3	12,5
250	0	0	18,8
Fructose R_F = 0,22			
50	9,1	0	4,5
125	18,2	0	0
250	13,6	0	0

*Tableau II-1 - Spécificité de la méthode analytique, CV % (ΔR_F) (mélange/standards), (*n = 3).*

D'après ces résultats, en fixant notre critère de spécificité à 20% de variation, la méthode se révèle spécifique pour le saccharose, le glucose et le fructose. Les facteurs de retardement de début, milieu et fin des sucres en mélange sont similaires à ceux des standards purs.

b. Mélange complexe (extrait de plante)

L'étude de spécificité des trois sucres a été évaluée pour l'analyse d'un extrait de réglisse. Cette spécificité est étudiée selon le protocole présenté précédemment. Les valeurs connues des R_F des trois sucres de l'extrait de réglisse ont été comparées aux valeurs de R_F des trois sucres déposés individuellement. Ces sucres ont été déposés à une concentration de l'ordre de grandeur de celle estimée dans l'extrait. Les résultats sont résumés dans le Tableau II-2.

Spécificité, CV (%) entre les R_F du milieu complexe et les sucres individuels			
Quantité (ng/spot)	**Début***	**Milieu***	**Fin***
Saccharose R_F = 0,10			
125	20,0	0,0	0,0
Glucose R_F = 0,16			
50	0,0	6,3	6,3
Fructose R_F = 0,22			
50	4,5	0	4,5

*Tableau II-2 - Spécificité de la méthode analytique, CV % (ΔR_F) (extrait de réglisse), (*n = 3).*

Les coefficients de variation des valeurs du facteur de retardement étant inférieurs à 20%, notre méthode est spécifique dans le cas de l'analyse de milieux complexes. Il est alors possible d'assigner, avec un seuil de confiance de 20%, les rapports frontaux du saccharose, du glucose et du fructose au sein de l'extrait de réglisse.

1.6.5. Limites de détection et de quantification

*<u>Définition</u> : la **limite de détection** d'une procédure analytique définit **la plus petite quantité** d'analyte dans un échantillon pouvant être **détectée** sans pour autant être nécessairement quantifiable en une valeur exacte. **La limite de quantification** est définie comme étant la **plus petite quantité** d'analyte pouvant être déterminée **quantitativement** avec une précision acceptable [41].*

Les limites de quantification (LQ) et de détection (LD) sont déterminées par le dépôt de trois réplicats de blanc ACN/H_2O 50/50 (v/v) (détermination du signal sur bruit, S/N) et de sept concentrations de solutions mélanges des trois sucres de 10 ppm à 70 ppm. La limite de détection est déterminée par S/N 3:1 et la limite de quantification par S/N 10:1.

	Saccharose	Glucose	Fructose
Limite de détection (LD) [ng/spot]	15	20	20
Limite de quantification (LQ) [ng/spot]	20	50	60

Tableau II-3- Paramètres analytiques de la méthode TLC (n = 3).

D'après les résultats présentés dans le Tableau II-3, cette méthode montre de faibles limites de quantification et de détection (de l'ordre du ng/spot) pour les trois sucres de références. Elle prouve la sensibilité de la méthode résultant de l'utilisation de l'acide 4-aminobenzoïque comme agent dérivant. De ce fait, cette étude de limites de détection et de quantification permet :

- de nous conforter dans l'idée d'employer la TLC pour la caractérisation de l'activité de l'invertase. Ces faibles limites permettent de quantifier finement les points de faibles concentrations,
- de prouver la compatibilité de la gamme dynamique pour l'analyse de sucres au sein de milieux complexes.

1.6.6. Fidélité

*Définition : La fidélité d'une méthode regroupe la **répétabilité** ainsi que la **précision intermédiaire** de la méthode. La répétabilité exprime la précision d'une méthode sous les mêmes conditions opératoires sur un intervalle de temps court. Cette répétabilité est aussi appelée la **fidélité intra-jour**. La fidélité regroupe aussi la précision intermédiaire qui exprime les variations pouvant survenir au niveau intra-laboratoire (analyse sur différents jours et avec différents analystes).*

La fidélité intra-jour a été déterminée par le dépôt et l'analyse de trois réplicats (le même jour) de solutions mélanges à 5 niveaux de concentrations (de 10 à 250 ppm). La fidélité inter-jour a été évaluée par l'analyse de 6 réplicats des 3 concentrations (de 50 à 250 ppm) de solutions mélanges sur 6 jours. La fidélité inter-jour a été réalisée par deux manipulateurs, chaque manipulateur ayant effectué 3 réplicats. Comme énoncé précédemment, le critère de validation de la fidélité est fixé à 20% dans le cas de l'analyse de sucres standards.

Les résultats de ces expériences sont présentés sous forme de coefficients de variations (CV, %) dans le Tableau II-4.

Sucre	Concentration (ppm)	Fidélité intra-jour* (CV %)	Fidélité inter-jour* (CV %)
Saccharose			
	50	2,1	9,3
	125	1,6	7,3
	250	0,9	2,0
Glucose			
	50	2,9	7,9
	125	0,8	6,8
	250	4,9	5,9
Fructose			
	50	1,7	10,0
	125	0,7	7,8
	250	2,8	6,9

*Tableau II-4 - Fidélités intra- et inter-jour de la méthode TLC (*n = 3).*

D'après les résultats présentés dans le Tableau II-4, les différents coefficients de variations des aires du saccharose, glucose et fructose pour des analyses intra et inter-jour sont inférieurs ou égaux à 10%. La méthode est donc considérée comme étant fidèle selon le critère attribué.

1.6.7. Robustesse

*Définition : la **robustesse** d'une procédure analytique est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des petites **variations dans les paramètres** de la méthode. Elle permet de donner des indications sur la **fiabilité** de la méthode [41].*

La robustesse de la méthode est étudiée par la variation de sept facteurs impliqués dans la séparation et la quantification des composés. Cette étude de robustesse a été réalisée par des dépôts de solutions à 125 ng/spot en 6 réplicats. La migration et l'analyse des plaques ont été effectuées selon les différents facteurs altérés présentés dans le Tableau II-5, ci-dessous. Pour chaque variation, un niveau haut et un niveau bas sont représentés, respectivement par les symboles « + » et « - ». Le choix des facteurs ainsi que les variations de ces facteurs ont été fixés en fonction des données issues de la littérature [42, 43]

Symbole	**Facteurs et effets associés**	**Conditions**	**Niveaux**	
			(+)	(-)
F1	Temps entre dépôt et migration (h), $\mathbf{E_1}$	0	2	1
F2	Distance de migration (cm), $\mathbf{E_2}$	6	6,5	5,5
F3	Longueur d'onde (nm), $\mathbf{E_3}$	390	392	388
F4	Analyste, $\mathbf{E_4}$	A	A	B
F5	Composition de la phase mobile (ACN/H_2O v/v), $\mathbf{E_5}$	80/20	82/18	78/22
F6	Température de dérivation (°C), $\mathbf{E_6}$	130	135	125
F7	Volume de phase mobile (mL), $\mathbf{E_7}$	6	8	4

Tableau II-5 - Conditions altérées utilisées dans le test de robustesse, les facteurs avec les niveaux associés.

Les effets (E) caractérisant chaque facteur individuel sont calculés selon les équations suivantes :

$$E_1 = 0.25 \,.\, (y_1 + y_2 + y_3 + y_4) - 0.25 \,.\, (y_5 + y_6 + y_7 + y_8)$$

$$E_2 = 0.25 \,.\, (y_1 + y_2 + y_5 + y_6) - 0.25 \,.\, (y_3 + y_4 + y_7 + y_8)$$

$$E_3 = 0.25 \,.\, (y_1 + y_3 + y_5 + y_7) - 0.25 \,.\, (y_2 + y_4 + y_6 + y_8)$$

$$E_4 = 0.25 \,.\, (y_1 + y_2 + y_7 + y_8) - 0.25 \,.\, (y_3 + y_4 + y_5 + y_6)$$

$$E_5 = 0.25 \,.\, (y_1 + y_4 + y_5 + y_8) - 0.25 \,.\, (y_2 + y_3 + y_6 + y_7)$$

$$E_6 = 0.25 \,.\, (y_1 + y_3 + y_6 + y_8) - 0.25 \,.\, (y_2 + y_4 + y_5 + y_7)$$

$$E_7 = 0.25 \,.\, (y_1 + y_4 + y_6 + y_7) - 0.25 \,.\, (y_2 + y_3 + y_5 + y_8)$$

Les valeurs des effets (y_i) représentent la moyenne des valeurs des aires pour chaque sucre dans les conditions de paramètres altérés comme représentés dans le Tableau II-5. Ces valeurs sont ensuite

évaluées par représentation graphique de la loi de probabilité demi-normale selon l'équation : $p_i = (i-0.5)/N$ (p_i représentant le niveau de probabilité de l'effet, i le rang de l'effet et N le nombre d'effets).

Les aires de chacun des sucres en solution pour les différentes expériences ainsi que les effets des différents facteurs sont résumés dans le Tableau II-6. Afin d'illustrer les résultats de cette étude, l'exemple du glucose est donné en Figure II-4.

Expérience No.	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	Aires sucres			
								Saccharose	Glucose	Fructose	(y_i)
1	+	+	+	+	+	+	+	5747.1	8209.7	6472.2	*y1*
2	+	+	-	+	-	-	-	4358.9	8603.3	4670.7	*y2*
3	+	-	+	-	-	+	-	5870.5	7986.0	5878.7	*y3*
4	+	-	-	-	+	-	+	4472.8	8377.3	5089.3	*y4*
5	-	+	+	-	+	-	-	5108.4	8404.6	5647.7	*y5*
6	-	+	-	-	-	+	+	6170.8	8135.3	6235.9	*y6*
7	-	-	+	+	-	-	+	4434.7	8283.0	4580.3	*y7*
8	-	-	-	+	+	+	-	5653.6	7885.2	5920.0	*y8*
Effets *(E)*	*E1*	*E2*	*E3*	*E4*	*E5*	*E6*	*E7*				
Saccharose	-229.5	238.4	126.1	-357.0	36.7	1266.8	-41.5				
Glucose	117.0	205.4	-29.5	19.5	-32.7	-363.0	31.5				
Fructose	-68.3	389.5	165.7	-302.1	440.9	1129.7	65.2				

Tableau II-6 - Matrice expérimentale (2^3) pour le test de robustesse.

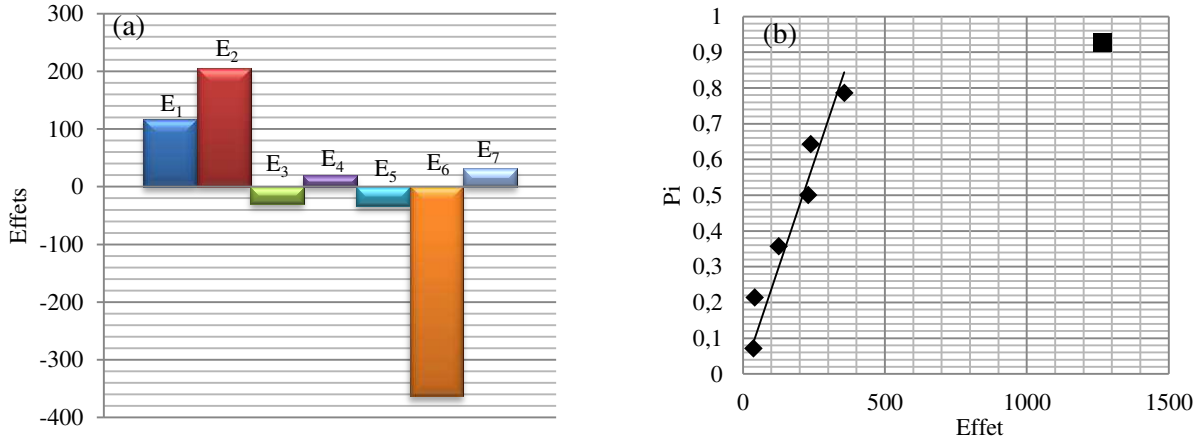


Figure II-4 - Résultats du test de robustesse : expérience avec les conditions altérées (Fi), conditions niveau haut (+), niveau bas (-). Moyenne des valeurs des fonctions réponses pour un paramètre altéré (n = 6) (yi), les effets de chaque facteur (Ei), (a) évaluation de l'effet des facteurs (Ei) pour chaque expérience (Fi) et (b) graphe de la loi normale de demi-probabilité des effets pour le glucose.

Les différents effets ont été placés sur le graphe de la loi normale de demi-probabilité, permettant une meilleure visualisation des facteurs influents. Selon ce mode de visualisation, les effets ayant des points situés à proximité (de parts et d'autres) de la droite sont considérés robustes. Au contraire, un point éloigné de cette droite indique une forte influence de ce facteur sur l'obtention de nos résultats. De ce fait, le graphe présenté en Figure II-4 (b) permet de définir le facteur « température de révélation » comme étant le seul facteur influençant fortement la robustesse des résultats. Les autres facteurs sont alors considérés comme minimes pour notre étude. Ainsi, il est important de contrôler la température de révélation en fixant la même température d'étuve pour une même expérience. Aussi, l'ensemble de ces résultats permet de considérer la méthode comme étant robuste.

1.6.8. Exactitude de la méthode en milieu complexe

L'exactitude vient compléter la spécificité pour un mélange complexe. Dans le contexte de notre étude, l'exactitude de la méthode a été étudiée pour un extrait de réglisse. Ce paramètre a été mesuré par réalisation d'études de recouvrement à trois niveaux (50%, 100% et 150%) pour les trois sucres d'intérêts. Ces valeurs correspondent au pourcentage du quotient de la quantité de sucre ajoutée à l'extrait sur la quantité de sucre initialement présente. Cette étude d'ajouts dosés, a permis d'évaluer la faisabilité de détection de quantités augmentées de produits, suite à l'hydrolyse de substrats dans le cadre de la mise en place de la méthodologie de criblage.

Pourcentage d'ajout de sucre	Quantité présente (ng)	Quantité ajoutée (ng)	Quantité calculée (ng)	Recouvrement (%*)	Moyenne du recouvrement (%)
			Sucrose		
50% saccharose (n=3)	150	75	231.9	103.1	
100% saccharose (n=3)	150	150	296.2	98.7	104.2
150% saccharose (n=3)	150	225	415.2	110.7	
			Glucose		
50% glucose (n=3)	93	46.5	136.9	98.1	
100% glucose (n=3)	93	93	196.6	105.7	98.9
150% glucose (n=3)	93	139.5	216.2	93.0	
			Fructose		
50% fructose (n=3)	60	30	89.3	99.3	
100% fructose (n=3)	60	60	91.9	76.6	82.9
150% fructose (n=3)	60	90	109.1	72.7	

Tableau II-7 - Test de l'exactitude de la méthode TLC pour la quantification du saccharose, glucose et fructose dans un extrait de plante.

D'après les résultats présentés dans le Tableau II-7, la méthode permet de retrouver les quantités théoriquement attendues pour le saccharose et le glucose après ajout du standard à l'extrait (CV < 10% pour les deux composés). Les quantités trouvées pour le fructose varient plus fortement par rapport à celles attendues avec des coefficients de variations pouvant aller jusqu'à 30%.

Il est important de rappeler que l'étude du criblage de substrats au sein d'extraits de plantes par TLC-UV a pour objectif de détecter des augmentations ou des diminutions d'intensités de taches résultant de l'hydrolyse de substrats en produits. Cette étude n'a pas pour vocation à quantifier ces sur- et sous-expressions. Il en découle que cette étude d'exactitude, réalisée sur l'extrait de réglisse, permet de confirmer la faisabilité de détection :

- d'une quantité de plus de deux fois plus élevée de glucose avec une erreur de 5,7%,
- d'une quantité de près de deux fois plus élevée de fructose avec une erreur de 27,3%.

Cet écart de confiance entre le glucose et le fructose provient de la co-migration de ces deux composés. Bien que cette étude souligne les limites de la technique en présence d'un fort effet matrice, il sera possible d'évaluer des augmentations d'intensités pour le glucose prenant en compte 5,7% d'erreurs et pour le fructose avec un seuil à 27,3% d'erreurs.

Cette validation de méthode de séparation et de quantification des sucres saccharose, glucose et fructose a donc permis de confirmer :

- la séparation et la quantification de ces trois sucres au sein de mélanges de standards. Cette validation sera garante de la fiabilité, de la robustesse et de la précision du développement méthodologique de caractérisation de l'invertase par TLC-UV,

- la faisabilité de la détection d'augmentations et de diminutions d'intensités (avec un seuil d'erreur connu) pour l'étude de criblage de substrats dans le cadre du couplage TLC-MALDI TOFMS.

Cette méthode a été appliquée aussi bien pour la détermination des paramètres cinétiques de l'invertase que pour l'approche de criblage par TLC-MALDI TOFMS. A l'issue de sa validation, il convient d'étudier la faisabilité de l'analyse de sucres par ce couplage.

1.7. Analyse de sucres par TLC-MALDI-TOFMS

Comme il a été mentionné précédemment, le choix de la matrice représente un paramètre crucial pour la mise en place de l'analyse de sucres par TLC-MALDI TOFMS. La matrice devra permettre l'ionisation de sucres, et cela sur support TLC, tout en présentant une compatibilité avec la méthode TLC développée (pas de perte de séparation des sucres et possibilité de dérivation).

1.7.1. Choix de la matrice MALDI

Dans le cadre de notre étude, une matrice inorganique de nanoparticules d'oxyde de fer (nommées MPs) a été sélectionnée. Cette matrice a d'ores et déjà présenté un bon potentiel d'ionisation des molécules flavonoïdes avec de faibles pics interférents dans la zone des basses masses, au sein de notre laboratoire.

En premier lieu, la capacité d'ionisation de cette matrice de sucres simples élués sur plaque de silice a été évaluée. Outre le paramètre primordial d'ionisation, la neutralité de cette matrice présente également d'autres points positifs. En effet, cette dernière ne fluoresce pas. De ce fait, elle semble compatible avec une dérivation post-développement, à l'acide-4-aminobenzoïque qui permettra de corréler et d'identifier les zones d'analyse (R_F) pour une analyse ciblée sur plaque TLC. C'est dans ce contexte qu'une étude d'ionisation des sucres de l'extrait de réglisse (matrice modèle déjà utilisée lors de la validation de méthode) sur plaque TLC a été effectuée.

Il sera montré, en premier lieu, l'apport de cette matrice pour l'analyse TLC-MALDI TOFMS dans le cadre de la séparation TLC établie (séparation et dérivation) et pour l'ionisation de ces sucres au sein de l'extrait de réglisse.

<u>Remarque</u> : l'ionisation des sucres d'intérêts a été comparée grâce à l'utilisation d'une matrice organique de référence, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et de la matrice inorganique de nanoparticules par analyse MALDI TOFMS. Les résultats ne sont pas présentés dans ce manuscrit. Bien que la matrice organique DHB ait montré une meilleure capacité d'ionisation que la matrice MPs, la forte présence de pics interférents dans la région des basses masses apparaît incompatible avec l'analyse de sucres. Bien que l'efficacité d'ionisation obtenue par utilisation de la matrice inorganique de nanoparticules étant plus faible, cette matrice a été sélectionnée grâce à la propreté de l'empreinte spectrale dans la région des masses d'intérêts..

1.7.2. Analyse de l'extrait de réglisse par TLC-MALDI-TOFMS

La plaque destinée à l'analyse TLC-MALDI TOFMS a été immergée trois fois dans la solution éthanolique de matrice MPs à une concentration de 2 mg/mL (selon le protocole développé par Bruker pour une analyse par MALDI TOFMS avec la matrice DHB). Après chaque immersion, la plaque est séchée à l'aide d'un sèche-cheveux afin d'obtenir une pellicule la plus homogène possible à la surface.

Un volume de 10 µL d'extrait de réglisse a été déposé en double sur la même plaque TLC. Après migration, la plaque est séparée en deux parties égales (5 cm x 10 cm) : une partie de la plaque sera dédiée à l'analyse UV et l'autre partie à l'analyse MALDI TOFMS. Les paramètres de dépôts, d'élutions ainsi que de dérivation sont identiques à ceux décrits dans la section 1.6.2. Comme schématisé en Figure II-5, après séparation de la plaque, chaque zone détectée à 366 nm sur la plaque UV (valeurs de R_F) a été reportée sur la plaque prévue pour l'analyse MALDI afin de sélectionner les zones d'intérêts à analyser.

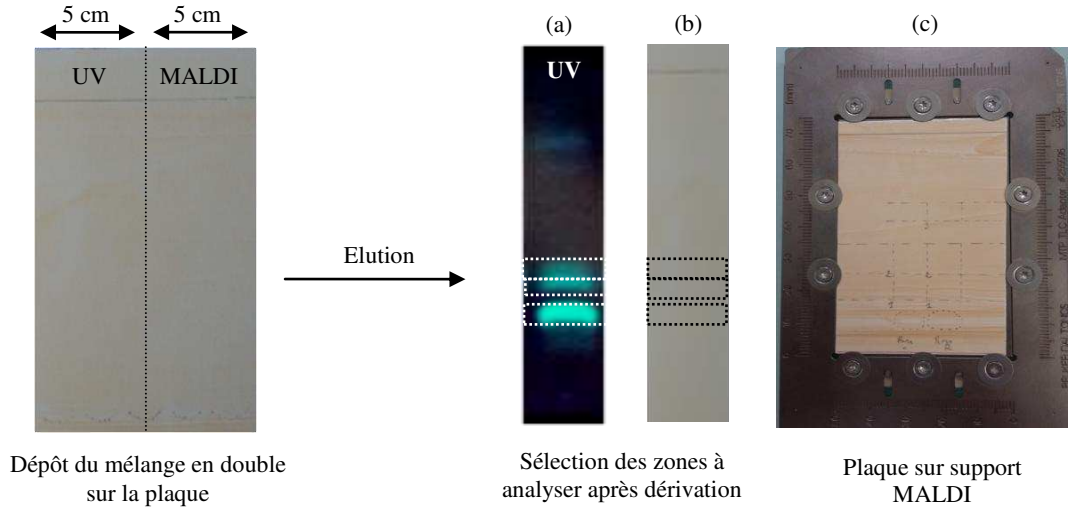


Figure II-5 - Plaque divisée après dépôt et migration. (a) détection des zones d'intérêts après révélation UV, (b) Report des zones sur la plaque MALDI, (c) insertion de la plaque TLC non révélée sur le support pour l'analyse par couplage TLC-MALDI-TOFMS.

La plaque destinée à l'analyse MALDI TOFMS est placée sur une cible conçue pour l'analyse TLC-MALDI-TOFMS (Bruker Daltonik®, Allemagne). Les conditions expérimentales sont exposées dans la section CHAPITRE I.5.4.2 de l'étude bibliographique. Les empreintes spectrales ont été ensuite traitées à l'aide du logiciel labellisé Flexanalysis (Bruker Daltonik®, Bremen, Allemagne) version 2.2.

Il sera présenté en premier lieu, l'influence de la matrice de nanoparticules sur la séparation et la dérivation des sucres d'intérêts (au sein de l'extrait de réglisse) dans le cadre de l'analyse TLC-UV. La Figure II-6 présente deux plaques développées et dérivées de l'extrait de réglisse avec et sans immersion au préalable dans la matrice.

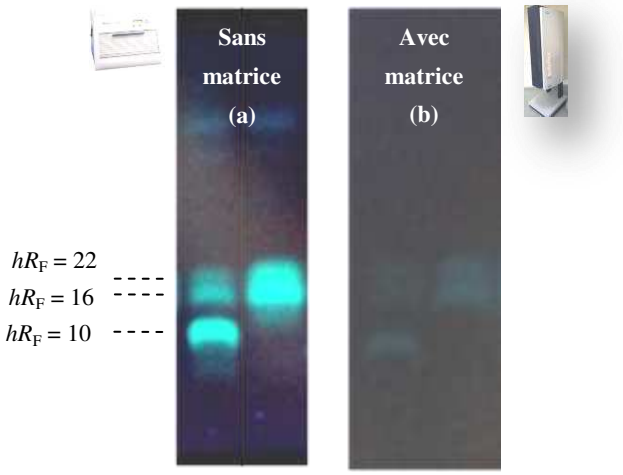


Figure II-6 - Mélange de saccharose, glucose et fructose dérivés sur (a) plaque non immergée dans la solution de matrice et (b) plaque immergée avant migration. Détection à 366 nm.

A l'issue de cette expérience, la matrice MPs apparaît compatible avec la méthode précédemment développée en TLC-UV. Cette matrice présente :

- Aucune migration durant le développement de la plaque. En raison de sa faible granulométrie, les nanoparticules s'incorporent entre les grains de silice de la phase stationnaire, empêchant la migration de la matrice lors du processus de migration (contrairement à d'autres matrices organiques telle que la DHB).
- Aucune influence sur la migration des composés d'intérêts. Les facteurs de retardements des trois sucres saccharose, glucose et fructose sont identiques pour les deux plaques (imprégnée et non imprégnée de matrice). Il en découle que l'immersion de la plaque TLC dans une solution de matrice (2 mg/mL) ne perturbe pas l'étape de pré-imprégnation dans les solutions tampons.
- Possibilité de dérivation des sucres. Bien qu'une perte de contraste, due à la couleur brune apportée par l'ajout des nanoparticules, soit observée, le disaccharide et les monosaccharides sont visibles après dérivation à l'acide 4-aminobenzoïque et détection à 366 nm. Cette détection ne serait pas possible avec l'utilisation d'une matrice organique telle que la DHB qui présente une absorbance conséquente à cette longueur d'onde.

Suite à la vérification de la compatibilité de cette matrice avec l'analyse TLC-UV, il convient alors d'évaluer l'ionisation des sucres d'intérêts par cette matrice.

Dans un deuxième temps, les spectres obtenus lors de l'analyse des trois sucres dans un extrait de plante par TLC-MALDI TOFMS sont présentés. Afin de se rapprocher du contexte de notre étude, la faisabilité de ce couplage a été expérimentée à travers l'analyse de sucres dans l'extrait de réglisse. Celui-ci a été choisi pour cette analyse car son étude a été réalisée dans la validation du modèle TLC-UV.

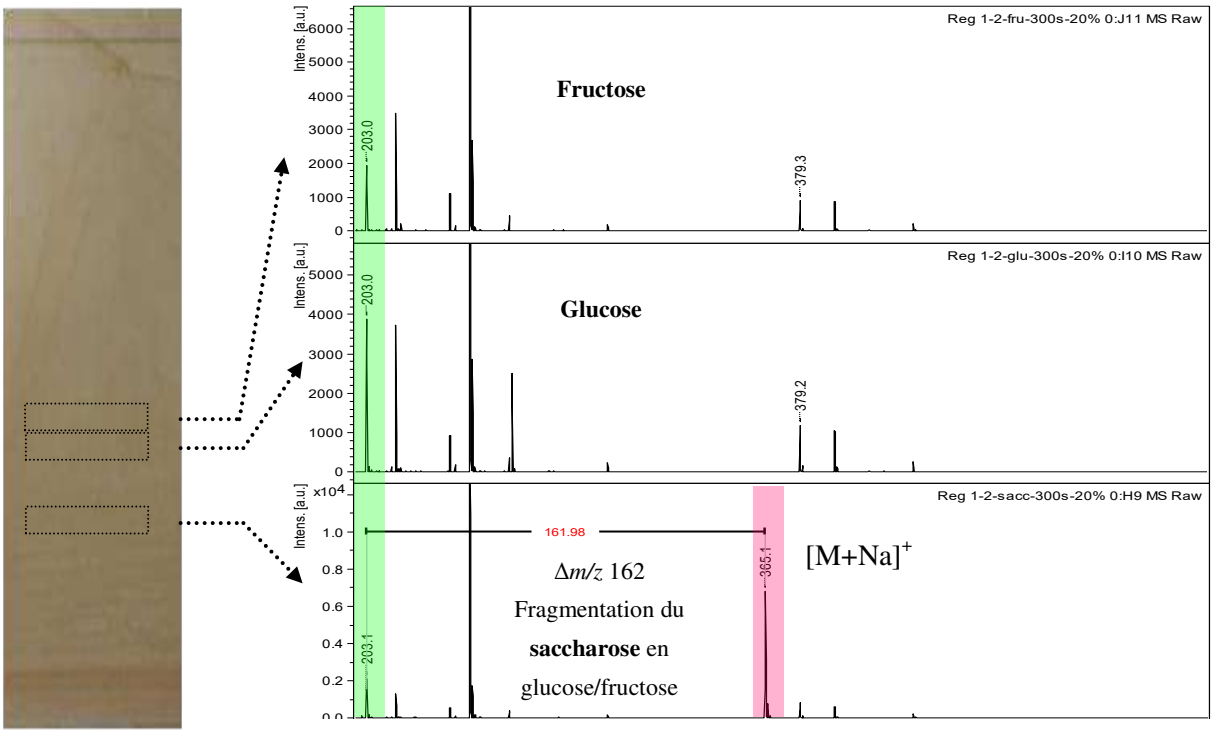


Figure II-7 - Spectres obtenus après détection TLC-MALDI-TOFMS d'un extrait de réglisse.

D'après la Figure II-7, l'association des facteurs de retardement et des empreintes spectrales analysées a mis en évidence la présence des trois sucres d'intérêts :

- le saccharose, m/z 365 (disaccharide, n = 2, R_F = 0,10),
- le glucose, m/z 203 (monosaccharide, n = 1, R_F = 0,16),
- le fructose, m/z 203 (monosaccharide, n = 1, R_F = 0,22).

Les spectres des trois sucres, de masses moléculaires $M_{(saccharose)}$ = 342,29 Da et $M_{(glucose/fructose)}$ = 180,16 Da, présentent des pics à *m/z* 365 et *m/z* 203 correspondants aux adduits sodium $[M+Na]^+$. Le spectre du saccharose affiche un pic de masse présent à *m/z* 203 correspondant à une perte de *m/z* 162 suite à la perte d'un ose (M = 180 Da). Ce pic provient de la fragmentation du saccharose.

Ces premières optimisations nous confortent dans le bienfondé de la mise en place des futurs développements de caractérisation de l'enzyme invertase par TLC-UV et de criblage de substrats au sein d'extraits de plantes par couplage TLC-MALDI TOFMS. A l'issue de ces études, les conditions opératoires des développements ont été établies à travers la validation de la méthode de séparation et de quantification des sucres d'intérêts ainsi que de l'utilisation d'une matrice de nanoparticules d'oxyde de fer pour l'analyse TLC-MALDI TOFMS.

- La séparation et la quantification des trois sucres (le saccharose, le glucose et le fructose) par TLC-UV ont été validées dans le cas d'un mélange standard. Cette étude a permis de déterminer de manière fiable et robuste les paramètres cinétiques K_M et V_{max} de l'hydrolyse du saccharose, catalysée par l'invertase.
- La faisabilité de détection d'augmentations et de diminutions d'intensités des taches de ces trois sucres au sein d'un milieu complexe tel qu'un extrait de réglisse a été estimée. L'évaluation des

seuils de confiance de détection des augmentations d'intensités a pu être réalisée à travers cette étude.

- L'empreinte spectrale représentative de la zone d'analyse des sucres a été obtenue grâce à la matrice inorganique MPs. Par ailleurs, cette matrice s'est révélée compatible avec l'analyse TLC mise en place.

Suite à l'évaluation et l'optimisation des différents paramètres d'analyse, nous exposerons la mise en place de la caractérisation enzymatique de l'invertase pour le suivi d'hydrolyse du saccharose. Cette étude aura un double objectif :

- le développement d'une méthode TLC-UV pour la caractérisation rapide et précise de l'invertase,
- l'évaluation de son activité afin de permettre son utilisation pour le développement méthodologique de criblage par TLC-MALDI TOFMS.

2. Mise en place d'une étude de caractérisation d'activité de l'invertase par TLC-UV

Cette partie est consacrée à la mise en place de la caractérisation de l'enzyme invertase par TLC-UV, par quantification directe et spécifique des produits de réaction.

Comme énoncé précédemment, les paramètres cinétiques de l'invertase sont déterminés par mesure indirecte d'une estimation globale des sucres réduits en solution, via le test colorimétrique (DNS). Cette méthodologie peut alors apporter certaines approximations dans le cadre de l'analyse de l'hydrolyse de sucres à plus haut degré de polymérisation.

La technique TLC, présentée dans cette partie, s'est révélée être une technique offrant de nombreux avantages et points communs avec les approches colorimétriques par spectrophotométrie UV. Nous évoquerons la faisabilité d'une caractérisation enzymatique par TLC-UV et discuterons de l'apport d'une mesure directe de cette activité enzymatique suite à la description de la validation de méthode. L'ensemble des résultats présentés sera comparé et validé par les valeurs obtenues *via* le test colorimétrique classique.

La validation de la méthode par TLC-UV a prouvé sa compatibilité pour une étude cinétique de l'invertase. La robustesse, la spécificité, la répétabilité (CV ≤ 10%) et les faibles limites de détection et de quantification (LOD ≤ 20 ng/spot et LOQ ≤ 60 ng/spot) ont permis de déterminer de façon fiable et précise les paramètres cinétiques de l'enzyme. Bien que la séparation établie pour le glucose et le fructose ne soit pas optimale, avec non-retour à la ligne de base, la validation de méthode prouve que cette séparation est suffisante pour réaliser l'étude cinétique.

2.1. Principe de l'étude

La caractérisation de l'enzyme invertase, basée sur l'expérience à temps fixe, a été réalisée selon le modèle de Michaelis-Menten. La procédure de cette expérience est décrite dans la section CHAPITRE I.2.3 du chapitre I. Pour rappel, cette étude est réalisée selon le protocole suivant :

- détermination d'une zone de linéarité (T_l) pour la plus faible concentration en saccharose $[S]_0$, à une concentration d'invertase fixée [E],
- réalisation des réactions à différentes concentrations en saccharose ($[S] > [S]_0$) pour un temps fixé dans la zone de linéarité ($T < T_l$). Les concentrations en produits (glucose et fructose) ont été déterminées pour chaque concentration de saccharose afin de calculer les vitesses initiales de réactions.

2.2. Méthode TLC

Les plaques TLC de gel de silice60 F_{254} ont été préalablement lavées au méthanol puis pré-traitées avec le tampon d'imprégnation comme décrit dans la section 1.6.2. Un volume de 1µL de chaque solution a été déposé sur une plaque de 10 x 10 cm avec les paramètres de dépôt présentés précédemment. La migration, la dérivation et la lecture densitométrique ont été réalisées selon la procédure également décrite dans la section 1.6.2.

2.3. Courbes d'étalonnages

Les courbes d'étalonnage du saccharose, glucose et fructose pour l'analyse TLC-UV ont été effectuées selon les conditions présentées dans le Tableau II-8.

Droites d'étalonnage des produits par TLC-UV et dosage colorimétrique		
	TLC-UV	**Dosage colorimétrique**
Conditions de concentrations	Glucose : 7 solutions de 69 µM à 5,54 mM Fructose : 6 solutions de 146 µM à 5,86 mM	Glucose et fructose : 9 solutions de 100 µM à 1 mM
Conditions d'analyses	Solutions diluées dans un mélange ACN/H_2O 50/50 (v/v). Dépôt de 1µL sur plaque TLC.	Ajout (v/v) d'une solution de DNS (DNS 0,5% m/v, NaOH 0,8% m/v, tartrate 15% m/v) aux solutions de calibrations. Chauffage 5 minutes à 95°C (réaction de réduction). Lecture de l'absorbance à 540 nm dans une plaque 96 puits.

Tableau II-8 – Conditions expérimentales de réalisation des droites d'étalonnage par TLC-UV et par dosage colorimétrique.

Les courbes d'étalonnage réalisées par TLC-UV et par dosage colorimétrique sont présentées en Figure II-89.

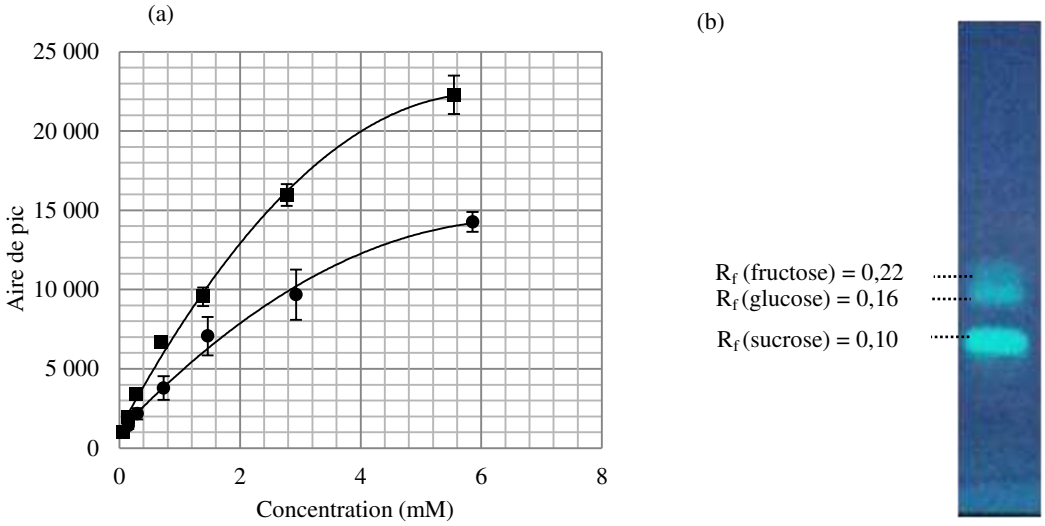


Figure II-8 - (a) Courbe d'étalonnage du glucose (▪, y = -552.14x² + 6823.1x + 1297.5, R² = 0.9945) et fructose (•, = -300.54x² + 3999.2x + 1069.4, R² = 0.9922) (n = 6, dérivation à l'acide 4-aminobenzoïque, λ = 366 nm) et (b) plaque TLC des molécules standards

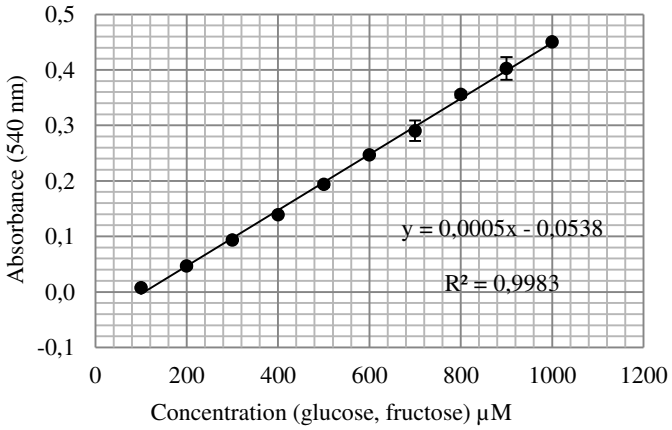


Figure II-9 - Droite d'étalonnage du glucose et du fructose par détection spectrophotométrique (λ = 540nm) après dérivation DNS.

Analyse TLC-UV : les courbes d'étalonnage du glucose et du fructose montrent une tendance polynomiale avec des coefficients de détermination corrects ($R^2 > 0,99$). Les faibles valeurs d'écarts-types, représentées en barres d'erreur, confirment la répétabilité de la méthode (n = 6). La tendance polynomiale résulte des fortes quantités de produits déposés sur la plaque (effet de saturation de la plaque de silice).

Dosage colorimétrique : la courbe d'étalonnage montre une tendance linéaire avec un coefficient de détermination acceptable ($R^2 = 0.998$).

2.4. Essais enzymatiques : linéarité

Les protocoles des études de linéarités de l'enzyme invertase par TLC-UV et par dosage colorimétrique sont résumés dans le Tableau II-9**.** Il est important de noter que les solutions

réactionnelles ont été divisées équitablement, de façon à analyser ces solutions à la fois par TLC-UV et par dosage colorimétrique.

Etude de linéarité de l'invertase par TLC-UV et dosage colorimétrique		
	TLC-UV	**Dosage colorimétrique**
Conditions de concentrations	[invertase] = 0,01 g/L (soit 0,156 µM) [saccharose] = 5 mM	
Solutions d'analyses	7 solutions réactionnelles (tubes Eppendorf 0,25 mL) pour différents temps de réaction : 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 minutes.	5 solutions réactionnelles (tubes Eppendorf 0,25 mL) pour différents temps de réaction : 30, 45, 60, 90, 120 minutes
Conditions de réaction	• Tampon d'incubation : $FANH_4$, 50 mM, pH = 6,4 • Température thermostatée dans un bloc chauffant : - 22°C pendant la réaction, - 95°C pendant 5 minutes (dénaturation), - 4°C (stockage).	
Conditions d'analyses	Solutions diluées (v/v) dans un mélange ACN/H_2O 50/50 (v/v). Dépôt de 1µL.	Ajout d'une solution de DNS (v/v) aux solutions réactionnelles. Chauffage 5 minutes à 95°C (réaction de réduction). Lecture de l'absorbance à 540 nm dans une plaque 96 puits.

Tableau II-9 - Conditions expérimentales de l'étude de linéarité par TLC-UV et par dosage colorimétrique.

<u>Remarque</u> : les solutions dédiées à l'analyse TLC-UV sont diluées (v/v) dans un mélange ACN/H_2O 50/50 (v/v) pour permettre une bonne nébulisation et une diminution de la diffusion lors du dépôt. Par ailleurs, l'ajout de solvant organique contribue à finaliser la dénaturation de l'enzyme.

Grâce à l'étude de linéarité de l'apparition des produits de réaction glucose et fructose, dont les résultats sont présentés en Figure II-10, l'activité de l'enzyme BfrA a été trouvée linéaire sur un temps de 120 minutes. Un résultat similaire est trouvé avec l'approche colorimétrique.

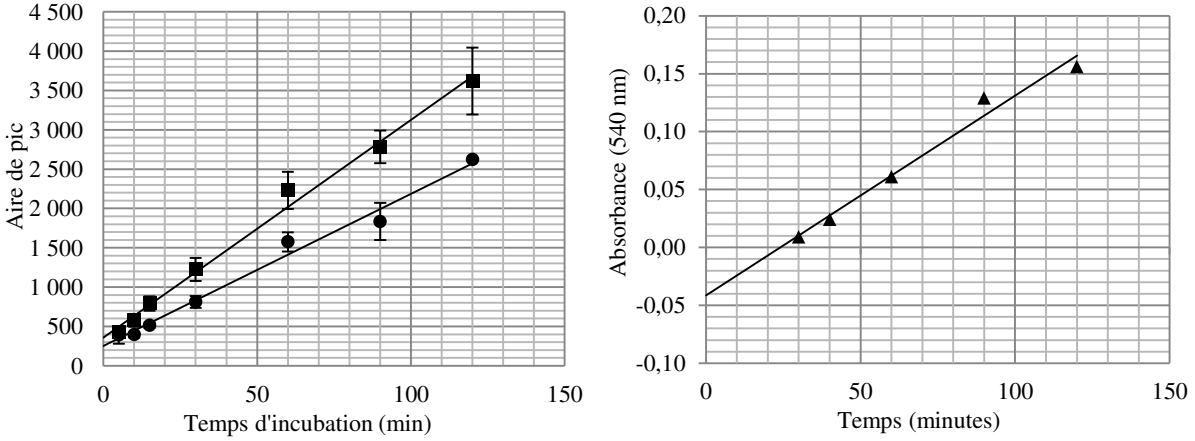


Figure II-10 - Cinétiques de production (a) du glucose (carrés, y = 27.66x + 359.33, R^2 = 0.993) et du fructose (ronds, y = 19.337x + 251.93, R^2 = 0.9867) détectées par TLC-UV et (b) du glucose et du fructose par dosage spectrophotométrique (y = 0,0016x - 0,0398, R^2 = 0,9992) après hydrolyse du saccharose catalysée par l'enzyme BfrA. Les données représentées sont moyennées par 4 réplicats biologiques.

Un temps de 20 minutes (pour les deux types d'analyses TLC-UV et DNS) a donc été fixé afin de trouver un compromis entre le temps d'analyse et la quantité de produits formés (au-delà de la limite de quantification et du maintien de la résolution spatiale entre le glucose et le fructose).

2.5. Essais enzymatiques : la détermination des paramètres cinétiques

Les conditions expérimentales des études de Michaelis-Menten par TLC-UV et par dosage colorimétrique sont consignées dans le Tableau II-10. Lors de l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose, une molécule de DNS réagit avec une molécule de glucose ou une molécule de fructose. Ainsi, pour l'hydrolyse d'une molécule de saccharose, deux molécules de DNS sont réduites. Les quantifications du glucose et du fructose en solution sont alors égales à la quantité d'acide 3-amino-5-nitrosalicylique formée divisée par deux.

Etude de Michaelis-Menten par TLC-UV et par dosage colorimétrique		
	TLC-UV	**Dosage colorimétrique**
Conditions de concentrations	[invertase] = 0,01 g/L [saccharose] = 0-500 mM 11 solutions	[invertase] = 0,01 g/L [saccharose] = 0-1000 mM 10 solutions
Conditions de réaction	• Tampon d'incubation : $FANH_4$, 50 mM, pH = 6,4 • Température thermostatée dans un bloc chauffant : - 22°C pendant la réaction, - 95°C pendant 5 minutes (dénaturation), - 4°C (stockage).	
Conditions d'analyses	Solutions diluées (v/v) dans un mélange ACN/H_2O 50/50 (v/v). Dépôt de 1µL. Ajout d'un étalon interne de α-L-rhamnose.	Ajout d'une solution de DNS (v/v) aux solutions réactionnelles. Chauffage 5 minutes à 95°C (réaction de réduction). Lecture de l'absorbance à 540 nm dans une plaque 96 puits.

Tableau II-10 - Conditions expérimentales de l'étude de Michaelis-Menten par TLC-UV et par dosage colorimétrique.

<u>Remarque</u> : l'étalon interne α-L-rhamnose a été ajouté aux solutions de Michaelis-Menten dédiées à l'analyse TLC-UV afin de détecter de potentiels problèmes survenus lors du dépôt des échantillons sur plaque.

a. Plaque TLC de l'expérience de Michaelis-Menten de l'invertase

Les études cinétiques de Michaelis-Menten de l'hydrolyse du saccharose par l'enzyme BfrA ont été réalisées en réplicats (n = 5 essais biologiques) pour le test par TLC-UV. Après réaction de 20 minutes en tube Eppendorf, chaque solution est déposée sur une même plaque TLC. La Figure II-11 montre la plaque TLC après développement et dérivation.

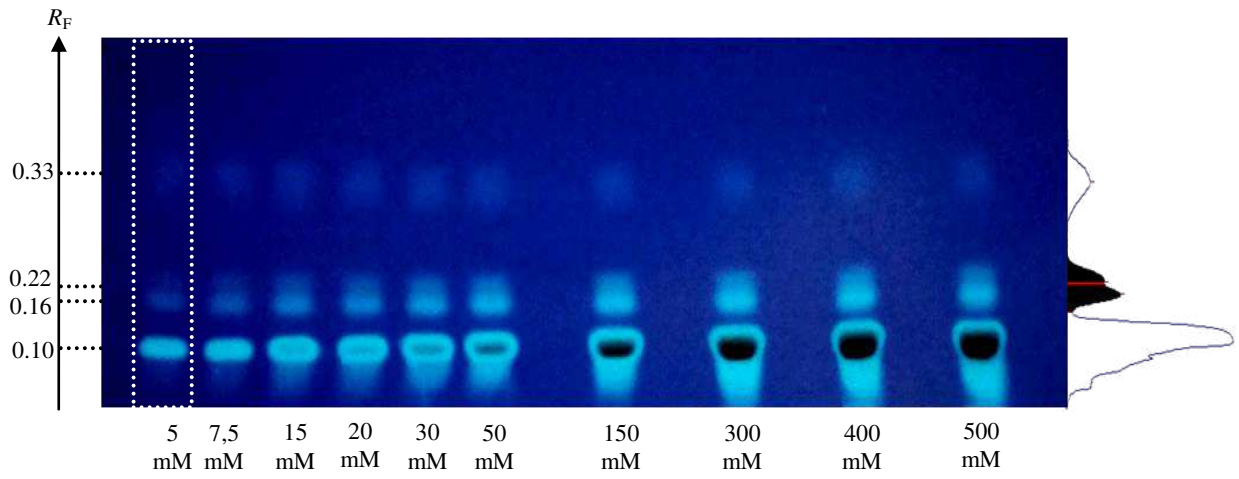


Figure II-11 - Plaque TLC et profil densitométrique de l'expérience de Michaelis-Menten de l'hydrolyse du saccharose catalysée par l'enzyme BfrA, après dérivation sous 366 nm. Détections du saccharose (R_F = 0,10), du glucose (R_F = 0,16) et du fructose (R_F = 0,22) (rhamnose, R_F = 0,33).

D'après la Figure II-11, des zones intenses ont été obtenues avec les plus fortes concentrations en saccharose. Au-delà d'une concentration de 150 mM en saccharose (dépôt de 150 mM à 500 mM) des diffusions apparaissent, provenant d'un effet de saturation de la silice. Ces diffusions de zones étant placées en bas de plaque, l'intégration et donc la quantification densitométrique du glucose et du fructose ne sont pas affectées. Pour chaque concentration de saccharose, les produits glucose et fructose ont été quantifiés spécifiquement (grâce aux courbes d'étalonnage) puis convertie en vitesse de réaction (V_i, mM/min). Ainsi, la courbe de Michaelis-Menten a pu être tracée pour le suivi de la formation du glucose et du fructose.

b. Courbes de Michaelis-Menten obtenues par les deux approches

Grâce aux courbes tracées par le logiciel GraphPad Prism 5.0, selon l'équation de Michaelis-Menten, les paramètres cinétiques de l'enzyme ont pu être déterminés, à savoir :

- la constante d'affinité K_M (mM),
- la vitesse de réaction maximale V_{max} (mM/min),
- la constante catalytique k_{cat} (V_{max}/[E], s^{-1}).

Les courbes ainsi que l'ensemble de ces paramètres cinétiques sont présentés respectivement en Figure II-12 et dans le Tableau II-11.

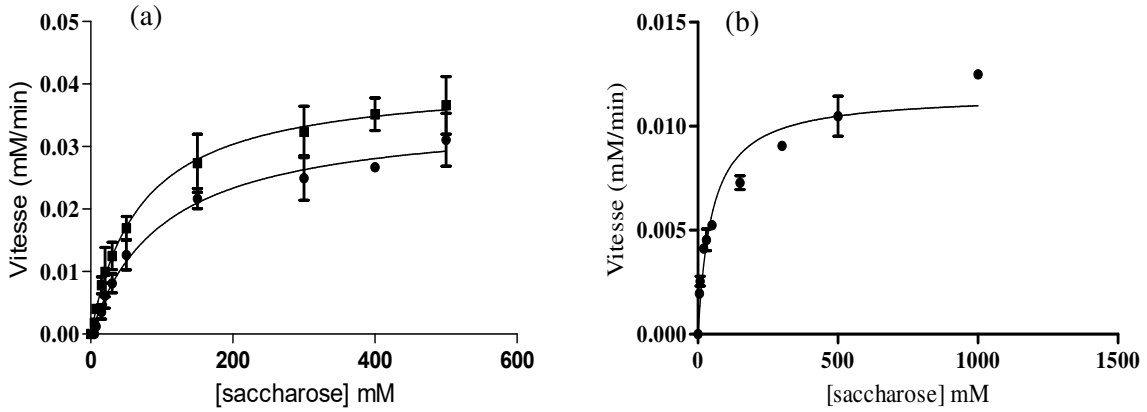


Figure II-12 - (a) Courbes de Michaelis-Menten de l'hydrolyse du saccharose par l'enzyme BfrA avec détections du glucose (▪) et du fructose (•), (TLC-UV, n = 5) (b) Courbes de Michaelis-Menten de l'hydrolyse du saccharose par l'enzyme BfrA par détection d'un mélange de glucose et de fructose (absorbance divisée par 2, n = 3). Courbes obtenues avec le logiciel GraphPad Prism 5.0, extrapolées par l'équation de Michaelis-Menten.

		Analyse TLC-UV	
Produits	K_M (mM)	V_{max} (mM/min)	k_{cat} (s^{-1})
Glucose	63.09 ± 7.590	0.037 ± 0.00094	3.91
Fructose	83.01 ± 14.39	0.031 ± 0.0021	3.30
		Dosage colorimétrique	
	K_M (mM)	V_{max} (mM/min)	k_{cat} (s^{-1})
Glucose-Fructose	98,91	0,012	1,32

Tableau II-11 - Paramètres cinétiques obtenus lors de l'hydrolyse du saccharose par l'enzyme BfrA pour le glucose et le fructose.

Rappelons que l'invertase hydrolyse le saccharose pour obtenir un mélange équimolaire de glucose et de fructose. De ce fait, les paramètres cinétiques déterminés pour le glucose et le fructose par TLC-UV devraient s'avérer similaires. Les constantes d'affinité K_M, déterminées suivant l'apparition du glucose (K_M^{Glc}) et du fructose (K_M^{Fru}), sont similaires avec (K_M^{Glc}) = 63,09 ± 7,590 mM et K_M^{Fru} = 83,01 ± 14.39 mM. Les vitesses maximales de réaction (V_{max}) calculées suivent les mêmes tendances avec V_{max}^{Glc} = 0,037 ±0.00094 mM/min et V_{max}^{Fru} = 0,031 ± 0,0021 mM/min. Ces valeurs similaires de V_{max} engendrent des valeurs de constantes catalytiques k_{cat} semblables avec k_{cat}^{Glc} = 3,91 s^{-1} et k_{cat}^{Fru} = 3,30 s^{-1}.

Les écarts entre les valeurs trouvées pour K_M et V_{max} pour le glucose et le fructose ont été déterminés étant insignifiantes grâce au t-test (niveau de 95% probabilité) avec 2,12 < 2,48 et 2,01 < 2,48. Les valeurs de constantes cinétiques trouvées par TLC-UV sont en adéquation avec les valeurs reportées dans la littérature utilisant d'autres techniques avec des valeurs de K_M allant de 10 à 100 mM [14, 44-48].

Par ailleurs, ces valeurs sont confirmées par le dosage colorimétrique. Les constantes cinétiques trouvées pour le glucose et le fructose sont $K_{M\ (détection\ DNS)}$ = 98.91 mM. Cette valeur est proche de celle déterminée par TLC-UV ($K_{M\ (détection\ glucose)}$ = 63,09 ± 7,59 mM et $K_{M\ (détection\ fructose)}$ = 83,01 ± 14,39 mM. La vitesse maximale de réaction et la constante catalytique trouvées par la méthode DNS sont également similaires aux valeurs trouvées par TLC-UV ($V_{max\ (détection\ DNS)}$ = 0,012 mM/min, $V_{max\ (détection}$

$_{glucose)}$ = 0,037 ± 0,00094 et $V_{max\ (détection\ fructose)}$ = 0,031 ± 0,0021 ; $k_{cat\ (détection\ DNS)}$ = 1,32 s^{-1}, $k_{cat\ (détection\ glucose)}$ = 3,91 s^{-1} et $k_{cat\ (détection\ fructose)}$ = 3,30 s^{-1}).

A l'issue de ces expériences, la méthodologie de caractérisation de l'enzyme invertase a été confirmée par trois aspects :

- la validation de la séparation et de la quantification du saccharose, glucose et fructose a confirmé la répétabilité, la robustesse et la précision de la méthode (selon le texte d'harmonisation des méthodes de validation ICH Q2(R1)). Cette étude de validation est garante de la quantification des produits de réactions (glucose et fructose). Les paramètres cinétiques enzymatiques ainsi déterminés sont robustes, fiables et répétables,
- les valeurs des paramètres cinétiques (K_M, V_{max} et k_{cat}) sont concordantes avec les valeurs obtenues par le test colorimétrique usuellement employé,
- les valeurs de ces paramètres cinétiques sont en accord avec celles décrites dans la littérature [14, 44-48].

Suite à la validation de la caractérisation de l'invertase par hydrolyse du saccharose, la technique TLC-UV a montré une bonne spécificité de détection des produits de la réaction. Dans ce contexte, l'apport de la méthodologie TLC-UV a été évalué dans le cadre de l'analyse de substrats alternatifs présentant de plus forts degrés de polymérisations. A cette fin, la faisabilité d'une classification de l'activité de l'enzyme au regard de différents substrats a été estimée.

2.6. Hydrolyse de substrats alternatifs

L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel de l'approche TLC-UV dans le suivi de l'interaction entre l'enzyme modèle invertase au regard de différents substrats. Dans le cadre de l'analyse des sucres à plus haut degré de polymérisation, nous nous sommes intéressés à étudier la faisabilité d'une classification de l'activité enzymatique selon l'affinité de l'enzyme pour un substrat.

Cette expérience s'est focalisée sur la détection et la quantification du monosaccharide produit lors de la réaction enzymatique. Dans ce cas précis, la résolution spatiale obtenue au cours de la séparation TLC des produits de réactions enzymatiques (polysaccharide, disaccharide et monosaccharide) est meilleure que dans le cas de l'hydrolyse du saccharose.

Les liaisons spécifiques des sucres contenant du fructose sont présentes dans de nombreux polysaccharides comme dans le raffinose, le stachyose et l'inuline. Les sucres raffinose et stachyose sont des dérivés de β-(1-6)-galactosylate de la moitié glucosyl du saccharose. L'inuline est un polysaccharide de fructane, consistant en une chaîne de fructose liée à un résidu terminal de β-D-glucose. Ces sucres sont couramment présents dans de nombreux légumes tels que les oignons et les brocolis.

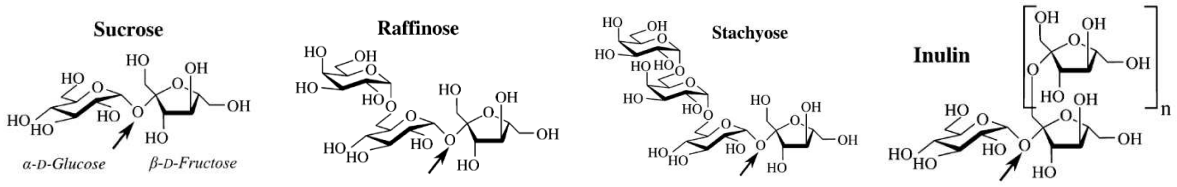


Figure II-13 - Sucres hydrolysés par l'enzyme BfrA : saccharose (n = 2), raffinose (n = 3), stachyose (n = 4) et inuline (n= inconnu).

L'activité de l'invertase vis-à-vis de ces substrats a été étudiée *via* la méthode DNS lors de précédents travaux publiés par l'équipe « GlycoBio&Chimie » [14]. L'étude de ces activités a également été réalisée par utilisation de cette technique en vue de montrer son apport dans le domaine. Les conditions expérimentales de cette expérience sont résumées dans le Tableau I-12.

	Etude d'activité de substrats alternatifs
	TLC-UV
Conditions de concentrations	[invertase] = 0,01 g/L [saccharose] = [raffinose] = [stachyose] = 50 mM [inulin] = 5 g/L
Conditions de réaction	$FANH_4$, 50 mM, pH = 6,4, 5 min de réaction à 22°C
Analyse par TLC-UV	Solutions diluées (v/v) dans un mélange ACN/H_2O 50/50 (v/v). Dépôt de 1µL.

Tableau II-12 – Conditions expérimentales de l'étude de l'hydrolyse de substrats alternatifs.

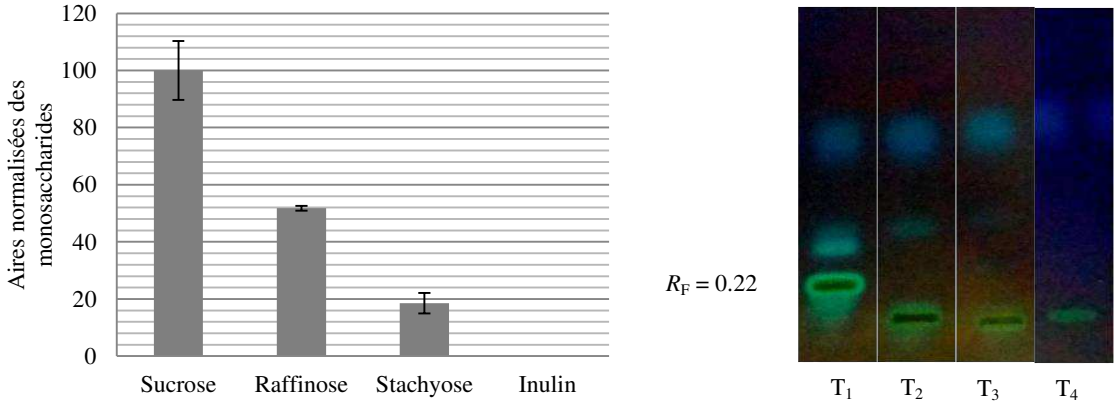


Figure II-14 - (a) spécificité de substrats de l'enzyme BfrA. Représentation des aires normalisées des produits obtenus après hydrolyse (n = 3), (b) plaques TLC de l'hydrolyse des substrats sous 366 nm. T1-T4 : hydrolyse du saccharose, raffinose, stachyose et inulin.

La Figure II-14 résume les aires des pics des monosaccharides produits lors de l'hydrolyse des différents substrats par BfrA, normalisées avec l'aire des monosaccharides provenant de l'hydrolyse du saccharose.

Il en ressort que l'activité de l'enzyme est étroitement liée aux nombres de motifs mono saccharidiques présents dans chaque substrat. Ainsi, l'invertase présente avec le saccharose (constitué de deux motifs mono saccharidiques, n = 2) une activité plus importante qu'avec le raffinose (n = 3) et le stachyose (n = 4). Ces résultats ne sont pas en adéquation avec les travaux de Belaz *et al.* dans lesquels cette enzyme montre une activité plus importante vis-à-vis du stachyose que du raffinose et du saccharose [14]. Ce phénomène peut être expliqué par la forte réactivité du DNS vis-à-vis du di- ou du tri-saccharide. En effet, les droites d'étalonnage de disaccharides, montrées sur la Figure II-15,

présentent une plus grande absorbance que les droites des monosaccharides. Ainsi, cette différence de réactivité du test DNS au regard de di- ou de tri-saccharide peut conduire à une sur-estimation de la quantité de monosaccharide formée et donc expliquer la non convergence des résultats obtenus.

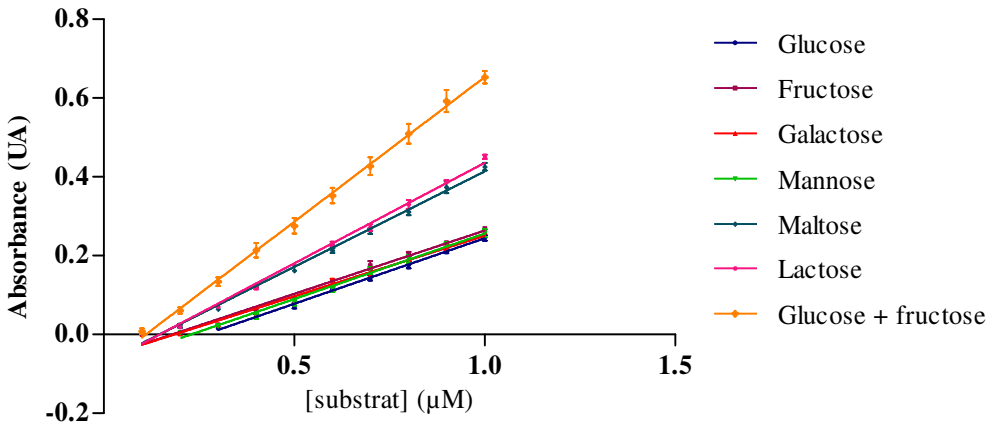


Figure II-15 - Droites de calibration du glucose, fructose, galactose, mannose, maltose, lactose et saccharose par détection spectrophotométrique après dérivation au DNS.

Contrairement au raffinose et au stachyose, aucune activité n'a été observée avec l'inuline. L'enzyme BfrA, comme une enzyme fructofuranosidase, ne peut hydrolyser que des fructosides non ramifiés contenant des substrats comme le saccharose, le raffinose ou le stachyose. L'inuline, de degré de polymérisation inconnu, ne peut pas entrer et se lier au site actif de l'enzyme à cause du fort encombrement stérique causé par la moitié polyfructoside.

Cette étude d'activité de différents substrats par analyse TLC-UV prouve également l'activité spécifique de l'enzyme BfrA qui n'avait jamais été caractérisée. En effet, pour l'étude de chaque substrat, le monosaccharide produit lors de l'hydrolyse est facilement identifiable comme étant le fructose indiquant que l'enzyme BfrA est une vraie fructofuranosidase.

Suite au développement de la méthode TLC pour la caractérisation de l'activité de l'enzyme invertase, nous présenterons l'apport du couplage TLC-MALDI TOFMS pour le criblage de substrats au sein de matrices complexes telles que les extraits de plantes.

PARTIE II. Développement d'une preuve de concept de suivi de conversion enzymatique : le criblage de substrats de l'invertase au sein d'extraits de plantes par TLC-MALDI TOFMS

Au regard des éléments exposés, la technique TLC-UV a présenté de nombreux avantages dans le cadre du suivi de réactions enzymatiques off-line de différents substrats d'hydrolyses de l'invertase. La prochaine partie de ce chapitre est axée sur l'apport de cette technique pour le suivi d'hydrolyses au sein de mélanges complexes. Le couplage de la TLC avec une détection en spectrométrie de masse offre la possibilité d'une confirmation massique des informations de la TLC-UV qui présente certaines limites (comme des co-migrations). C'est dans ce contexte que ces développements méthodologiques ont été appliqués à la mise en place d'une approche différentielle par TLC-MALDI TOFMS.

Le développement du couplage TLC-MALDI TOFMS pour le criblage de substrats de l'invertase au sein d'extraits de plantes a été réalisé en deux temps selon le schéma présenté en Figure II-16.

- Eude différentielle par TLC-UV : cette approche a été réalisée par le dépôt de solutions d'extraits de plantes avant (solution contrôle) et après (solution réactionnelle) la réaction enzymatique. Grâce à une approche différentielle réalisée par TLC-UV, les substrats et les produits de la réaction enzymatique ont été mis en évidence par la détection d'augmentations ou de diminutions d'intensités des taches. Une diminution révèle la présence de substrat alors qu'une augmentation révèle celle de produit de réaction.
- Caractérisation des taches par TLC-MALDI TOFMS : les taches d'intérêts intensifiées ou diminuées par rapport à l'analyse contrôle ont été analysées par TLC-MALDI TOFMS afin de confirmer/identifier la nature des substrats et des produits.

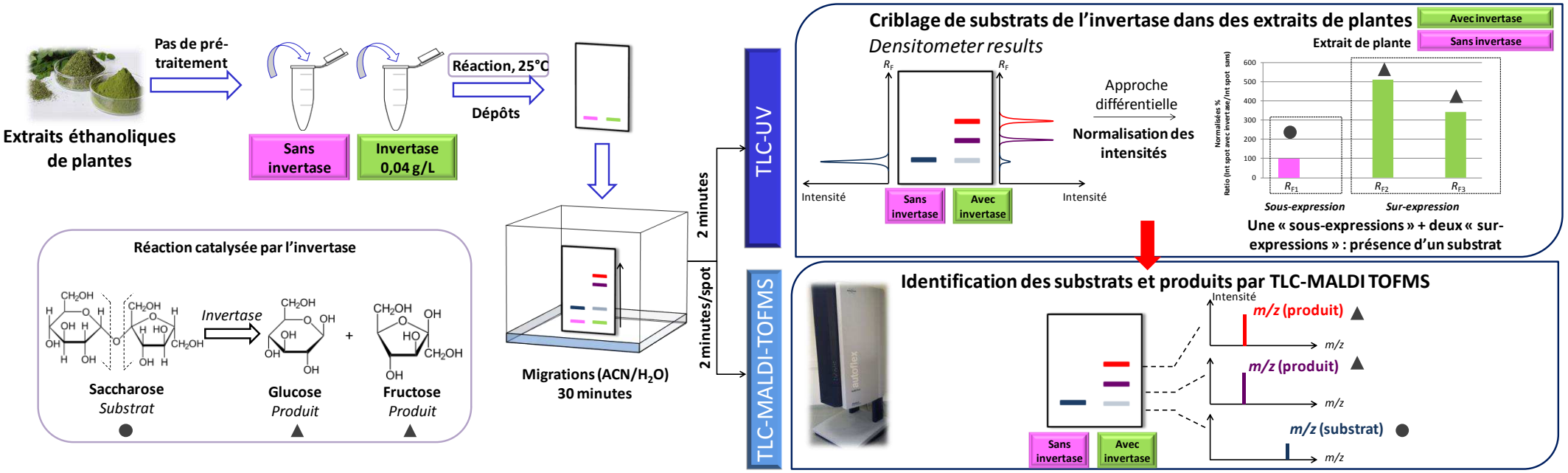


Figure II-16 - Schéma récapitulatif du protocole de recherche de substrats de l'invertase dans des extraits de plantes par TLC-MALDI TOFMS.

1. Préparation des extraits de plantes

L'extraction des différents extraits de plantes a été réalisée à l'aide d'un micro-ondes MicroSYNTH (Sorisole, Italie). Pour chaque extrait (réglisse, LV1784 et mangoustan), 1 g de poudre sèche a été placé dans un réacteur de 12 mL avec 7 mL d'éthanol. Trois extractions de 30 secondes à une puissance de 1000 watts ont été effectuées pour chaque extrait. Chaque réacteur a été refroidi à l'aide d'un bain de glace pour revenir à température ambiante entre chaque cycle d'extraction. Les extraits ont ensuite été centrifugés (7000 rmp, 10 minutes) et filtrés à 0.45 µm avant analyse. Les extraits de réglisse et de mangoustan sont des extraits commerciaux, la plante LV1784 nous a été fournie par la société LVMH.

Remarque : *dans cette partie, nous présenterons trois des cinq plantes étudiées, choisies pour leur « diversité métabolique » de sucres qu'elles présentent.*

2. Protocole des essais enzymatiques

Chaque réaction a été réalisée dans des tubes Eppendorf de 0,5 mL avec 40 µL d'extraits éthanoliques dilués et 40 µL d'une solution d'invertase à 0,08 g/L. Pour chaque plante, un tube contrôle contenant 40 µL d'extrait de plante et 40 µL de formiate d'ammonium (50 mM, pH=6,4) a été également constitué. Les réactions ont été stoppées après 2 heures de réaction par la réalisation des dépôts sur plaque TLC.

3. Méthode de TLC-(UV)-MALDI TOFMS

Trois µL de chaque solution (contrôle et réaction) sont déposés selon les paramètres présentés dans la section PARTIE I.2.2. Deux migrations ont été réalisées sur une hauteur de 6,5 cm avec une phase mobile composée d'ACN/H_2O 80/20 (v/v). Les étapes de dérivation et de lecture densitométrique sont décrites dans la section PARTIE I.2.2.

Les plaques désignées pour l'analyse MALDI sont immergées trois fois dans la solution de matrice MP. Un volume de 10 µL de chaque solution a été déposé en double. Les dépôts ainsi que la migration ont été réalisés comme décrits précédemment. Les plaques ont ensuite été divisées en deux parties identiques (5 cm x 10 cm) : une partie destinée à la dérivation des oses afin de reporter les facteurs de retardements d'intérêts sur la seconde plaque destinée à l'analyse MALDI-TOFMS. Les analyses MALDI ont été réalisées avec les paramètres décrits dans le chapitre I. L'étalonnage a été effectué par l'utilisation d'oses allant du maltose au maltohexaose (de *m/z* 203 $[M+Na]^+$, à *m/z* 1013 $[M+Na]^+$).

4. Résultats et discussions

Rappelons que l'objectif principal de cette étude est la mise en place d'une méthode de criblage par développement d'un couplage TLC-MALDI TOFMS pour identifier rapidement et sélectivement des substrats potentiels de l'invertase dans des mélanges complexes tels que des extraits de plantes.

Dans un premier temps, une approche différentielle a été réalisée par TLC-UV afin de mettre en évidence les substrats et produits de la réaction par détection de d'augmentations ou de diminutions d'intensités des bandes chromatographiques.

4.1.1. Criblage par TLC-UV

Trois extraits éthanoliques ont été analysés directement après extraction et filtration sans préparation d'échantillons supplémentaires. Les profils densitométriques de trois solutions contrôles (sans enzyme) ainsi que des réactions enzymatiques sont présentés sur la Figure II-17.

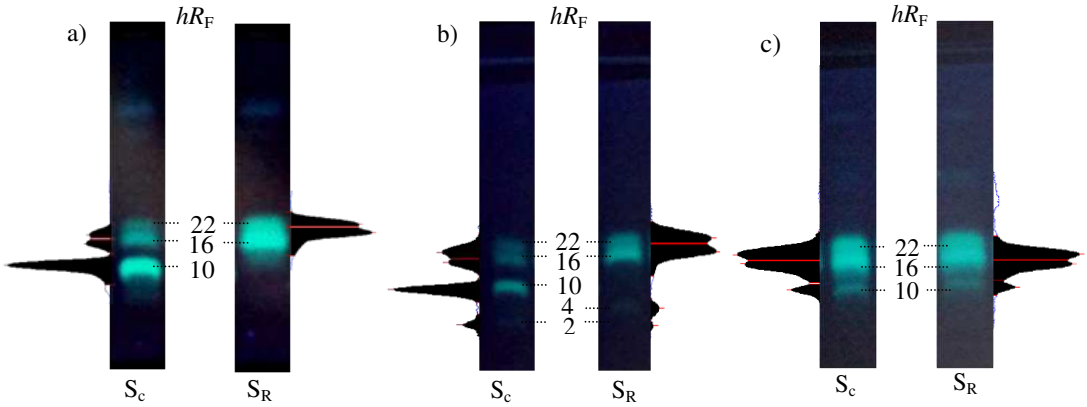


Figure II-17 - Plaques TLC et densitogrammes des solutions de référence et d'hydrolyses avec a) réglisse, b) LV 1784, c) mangoustan après dérivation visible à 366 nm. Sc : solution de l'extrait de référence, S_R : solution de l'extrait après réaction enzymatique. Valeurs de hR_F *correspondantes à la valeur de* R_F *multipliée par 100.*

Les profils densitométriques des solutions des extraits de références de plantes montrent la forte présence de quatre oses avec une variabilité de concentrations. Les aires des bandes obtenues par densitométrie et les valeurs d'intensités obtenues par TLC-MALDI TOFMS sont résumées dans le Tableau II-13.

	Bandes					
	hR_F = 2		**hR_F = 10**		**hR_F = 16, hR_F = 22**	
	MALDI	*Densitomètre*	*MALDI*	*Densitomètre*	*MALDI*	*Densitomètre*
Réglisse	/	/	6816	18448	1931	6476
LV 1784	411	1344	3211	6798	2283	6614
Mangoustan	/	/	516	3250	4515	24366

Tableau II-13 - Tableau récapitulatif des valeurs d'intensités trouvées pour les solutions de références (réglisse, LV 1784, mangoustan) obtenues par analyses MALDI et densitométriques.

Dans l'extrait de réglisse, la zone à hR_F = 10 apparaît comme étant cinq fois moins intense que la zone associée dans les extraits LV1784 et de mangoustan. Par ailleurs, dans l'extrait de mangoustan, les taches aux hR_F = 16 et hR_F = 22 sont cinq fois plus intenses que celles des extraits de réglisse et de

LV1784. Ces différences d'intensités (effets matrices) pourraient interférer et notamment fausser, par saturation de la plaque, l'approche différentielle.

Un criblage rapide de la conversion a été réalisé par TLC-UV. La procédure de criblage est basée sur la différence d'aires des taches entre les solutions contrôles et les réactions enzymatiques. Bien que la saturation de la plaque puisse se révéler comme étant un réel défi pour la détection des différences entre les aires de taches, il est important de rappeler que les ajouts dosés des trois oses d'intérêts (dans l'extrait de réglisse) réalisés lors de la validation de méthode, ont confirmé la faisabilité de détection d'intensification ou de diminution d'aires de taches.

Les zones d'intensités diminuées reflètent l'hydrolyse des substrats tandis que les zones d'intensités intensifiées révèlent l'accumulation de produits pouvant être naturellement présents dans l'extrait de plante. Grâce à la dimension séparative et à la connaissance de la polarité des oses, les zones d'intensités diminuées et augmentées peuvent être reliées entre-elles. Une zone d'intensité diminuée de faible R_F doit être reliée à deux zones d'intensités augmentées de plus haut R_F (hydrolyse d'un substrat en deux produits). D'autre part, les oses de plus hauts degrés de polymérisations montrent de fortes interactions avec la phase stationnaire, engendrant des facteurs de retardement plus faibles. Au contraire, les monosaccharides ont usuellement des valeurs de R_F plus élevées. Ainsi, les diminutions d'intensités de zones obtenues après réaction enzymatiques sont liées aux augmentations d'intensités de zones ayant des valeurs de R_F plus faibles. Le Tableau II-14 résume le nombre de d'augmentations et de diminutions d'intensités associées aux facteurs de retardement pour chacune des trois plantes.

	Aire intensifiée		**Aire diminuée**		**Apparition**	
	Nombre	hR_F	*Nombre*	hR_F	*Nombre*	hR_F
Réglisse	1	10	2	16 22	/	/
LV 1784	2	2 10	2	16 22	1	4
Mangoustan	1	10	/	/	/	/

Tableau II-14 - Tableau récapitulatif du nombre de zones intensifiées et diminuées et d'apparitions associées aux valeurs de facteurs de retardement sur les plaques TLC après réaction enzymatique.

Les différentes augmentations et diminutions détectées dans les trois plantes sont présentées sous forme d'histogrammes présentés sur la Figure II-18.

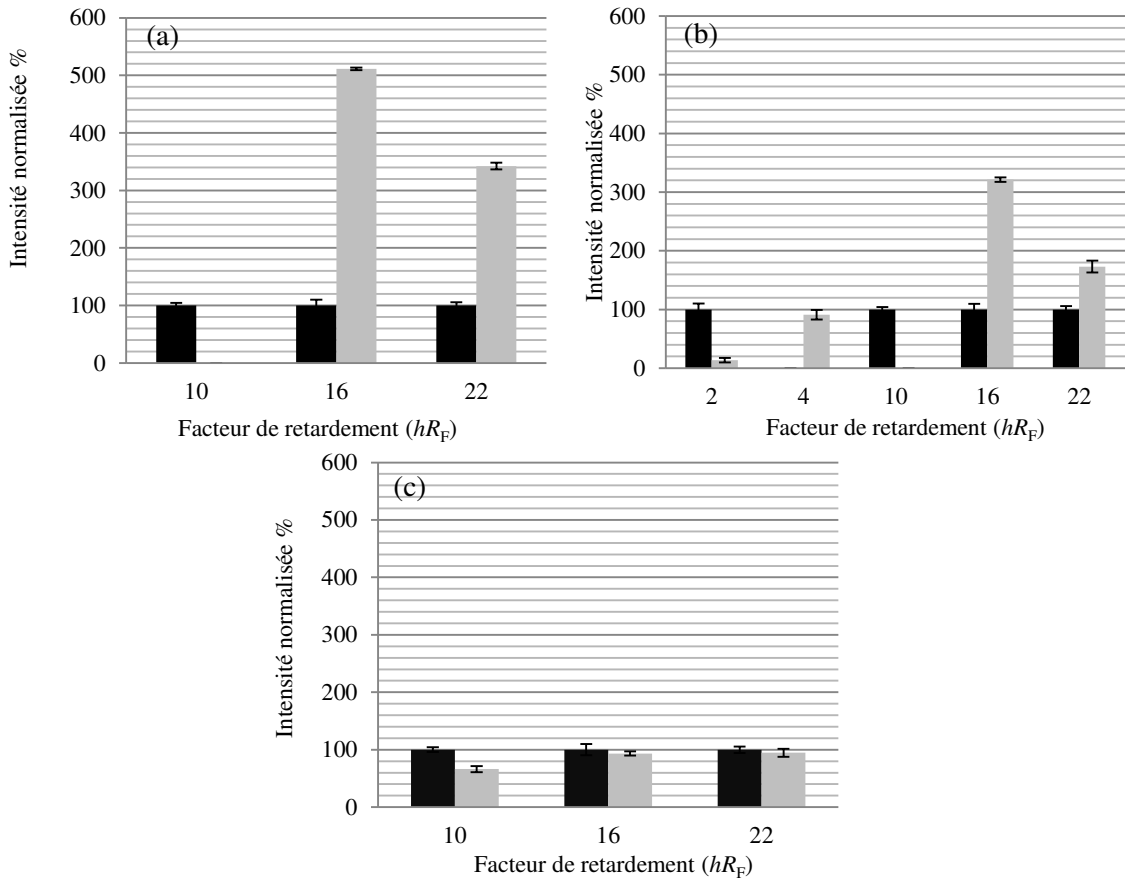


Figure II-18 - Graphes des intensités normalisées de chaque zone d'intérêt avant (■) et après réaction enzymatique (■) pour les extraits de a) réglisse, b) LV 1784 et c) mangoustan (n=3).

Dans le cas de l'extrait de réglisse, une diminution d'intensité de tache est observée à $hR_F = 10$ ainsi que deux augmentations d'intensités à $hR_F = 16$ et $hR_F = 22$. Ces diminutions et augmentations étant significatives avec des barres d'erreurs distinctes, il est possible d'affirmer que l'extrait de réglisse présente un substrat de l'invertase (zone sous-exprimée ayant la plus faible valeur de R_F) hydrolysé en deux produits.

Concernant l'extrait de LV1784, la Figure II-18 montre deux diminutions d'intensités à $hR_F = 2$ et $hR_F = 10$, deux augmentations à $hR_F = 16$ et $hR_F = 22$ et une apparition de bande à $hR_F = 4$. Ces résultats indiquent que l'extrait LV1784 présente deux substrats et trois produits de la réaction enzymatique.

Pour finir, une seule diminution d'intensité ($hR_F = 10$) est visible avec l'extrait de mangoustan, sans sur-expression associée.

4.1.2. Analyse par TLC-MALDI-TOFMS

Le criblage par TLC-UV a permis de mettre en évidence la présence de substrats et de produits suite à l'action de l'invertase sur les trois extraits de plantes. Les zones d'intérêts (augmentées et diminuées) ont été analysées et caractérisées par couplage TLC-MALDI-TOFMS. Ce couplage permet une analyse rapide, sans dépôt de standard sur une même plaque, sélective avec une forte résolution

spatiale (diamètre du laser de l'ordre du µm). Les valeurs de m/z obtenues peuvent être corrélées aux facteurs de retardement.

a. Analyse des solutions contrôles

Dans une première expérience, chaque solution contrôle a été analysée. Comme montré dans la Figure II-19, les zones d'intérêts sont entourées sur la plaque TLC destinée à l'analyse MALDI.

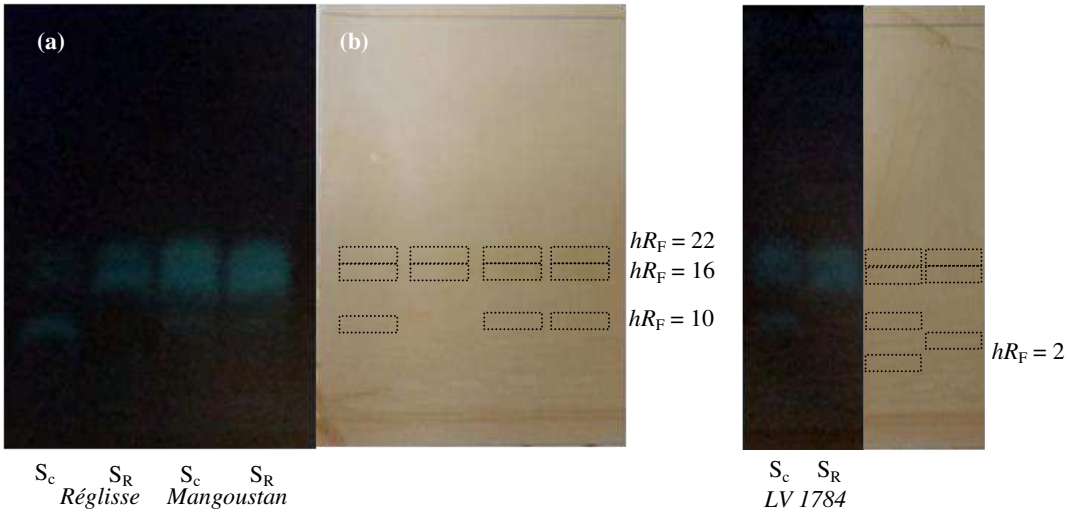


Figure II-19 - Plaques TLC imprégnées de solution de matrice MPs. Solutions de références et solutions après réaction enzymatique pour les extraits de réglisse, LV 1784 et de mangoustan. (a) : Première partie de plaque TLC après dérivation avec l'acide 4-aminobenzoïque (λ = 366 nm), (b) : deuxième partie de plaque dédiée à l'analyse MALDI. S_c : solutions de référence, S_R : solution après réaction enzymatique.

Les différentes valeurs de *m/z* trouvées par TLC-MALDI TOFMS, associées aux taches (hR_F) sont résumées dans le Tableau II-15.

hR_F	*m/z*	M (g.mol^{-1})	Type d'oses
2	527	504	Trisaccharide
10	365	365	Dissacharide
16	203	203	Monosaccharide
22	203	203	Monosaccharide

Tableau II-15- Récapitulatif des valeurs de m/z détectées en fonction des facteurs de retardements lors de l'analayse des trois extraits de plantes par TLC-MALDI TOFMS.

Suite à l'analyse MALDI-TOF MS, trois valeurs de *m/z* se distinguent pour les quatre valeurs de hR_F. Comme mentionné précédemment, les oses étant détectés sous forme d'adduits sodium $[M+Na]^+$, nous pouvons conclure que les masses trouvées reflètent la présence de trisaccharides, disaccharides et de monosaccharide de masses molaires respectives M = 504 g/mol, M = 342 g/mol et M = 180 g/mol.

Les intensités des pics obtenus par analyse MALDI et des aires des bandes obtenues par détection densitométrique ont été analysées et comparées. Pour une même valeur de R_F (et donc de *m/z*), la tendance des intensités sont concordantes.

Suite à l'analyse menée des solutions contrôles, les trois extraits de plantes regroupent potentiellement deux substrats visibles : un trisaccahride et un dissacharide.

b. Analyse des zones d'intensités augmentées et diminuées

Chaque zone d'intérêt des solutions contrôles et de réactions enzymatiques ont été étudiées. Les valeurs de *m/z* obtenues sont résumées dans le Tableau II-16. Des exemples d'empreintes spectrales obtenues pour ces trois valeurs de *m/z* sont présentés en Figure II-20.

	Bandes					
	Sous-expression		**Sur-expression**		**Apparition**	
	hR_F	$[M+Na]^+$	hR_F	$[M+Na]^+$	hR_F	$[M+Na]^+$
Réglisse	10	365	16	203	/	/
			22	203		
LV 1784	2	527	16	203	4	365
	10	365	22	203		
Mangoustan	10	365	(16)	(203)	/	/
			(22)	(203)	/	/

Tableau II-16 - Tableau récapitulatif des valeurs m/z *trouvées par TLC-MALDI-TOFMS.*

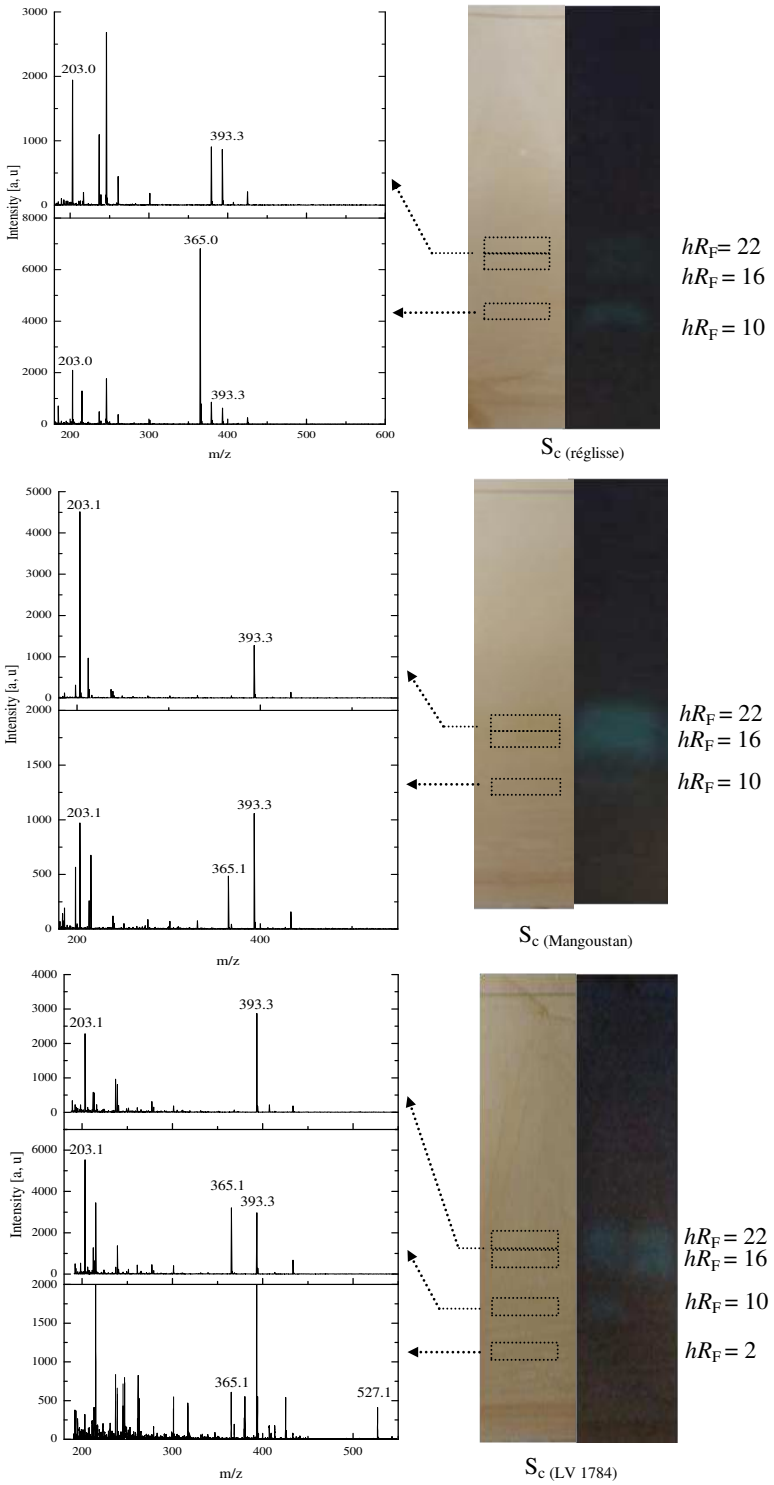


Figure II-20 - Spectres de masses des extraits avant réaction enzymatique associées aux zones d'intérêts en TLC.

La matrice MALDI génère des pics interférents de faible intensité dans les zones de faibles *m/z* avec un pic cationique caractéristique à *m/z* 393. La fragmentation des trisaccharides en disaccharides et des disaccharides en monosaccharides est visible par une perte de masse d'un ose (162 Da).

• Les zones d'intensités diminuées à hR_F =10 présentent une même valeur de *m/z* 365. Comme mentionné précédemment, l'enzyme invertase connue pour catalyser l'hydrolyse du saccharose, le disaccharide de facteur de retardement hR_F =10 est probablement du saccharose. Pour cette raison, les

deux produits d'hydrolyse de ce saccharose, le glucose et le fructose, sont les deux zones d'intensités augmentées présentes à $hR_F = 16$ et $hR_F = 22$ (*m/z* 203). Le glucose étant plus polaire que le fructose, nous pouvons en déduire que $hR_{F(glucose)} = 16$ et $hR_{F(fructose)} = 22$. Ces deux produits ont été identifiés par convolution de l'empreinte spectrale et des rapports frontaux. Ce résultat est en accord avec les expériences précédentes.

• L'analyse de la zone diminuée à $hR_F = 2$ a montré une valeur de *m/z* 527. Cet ose, de masse moléculaire M = 504 g/mol est donc un trisaccharide contenant un motif saccharose. Comme la zone intensifiée associée située à $hR_F = 4$ a montré un pic à *m/z* 365, ce trisaccharide a été hydrolysé en disaccharide et en monosaccharide (glucose ou fructose). Ce disaccharide, ayant une valeur de hR_F plus grande que celle du saccharose (4 et 10 respectivement), est par conséquent moins polaire que le saccharose. Selon des études menées en parallèle, le facteur de retardement du trisaccharide est similaire à celui du raffinose avec $hR_F = 2$. Ainsi, ce trisaccharide peut être identifié comme étant du raffinose hydrolysé en mélibiose (α-D-glucopyranosyl-(1,6)-D-glucopyranose, $hR_F = 4$ et fructose $hR_F = 22$).

Afin d'exposer succinctement les résultats de ces analyses :

- Extrait de mangoustan : l'analyse a permis d'identifier le saccharose ainsi que le glucose et le fructose. Cependant, comme le glucose et le fructose étaient initialement fortements présents dans cet extrait, l'approche différentielle n'a pas pu mettre en évidence les produits de réaction à cause de l'effet de saturation de la plaque. Le substrat a pu être identifié grâce à la mise en évidence d'une diminution d'intensité.
- Extrait de réglisse : seul le saccharose (hydrolysé en fructose et en glucose) a été détecté comme substrat de l'invertase.
- Extrait LV 1784 : deux substrats ont été mis en évidence : le saccharose et un trisaccharide (potentiellement le raffinose hydrolysé en mélibiose et en fructose).

Le criblage de ces trois plantes a pu ainsi démontrer le potentiel du couplage TLC-MALDI-TOFMS à travers :

- une analyse rapide et précise (conservation de la dimension spatiale de la TLC). Ce couplage amène à une identification directe des molécules, sans dépôts de standards, par association des valeurs de R_F et de *m/z*,
- une information massique obtenue en dépit de la présence de larges gammes de concentrations présentes dans les extraits (peu de préparation d'échantillons),
- l'analyse de molécules isomères. L'apport de la dimension séparative par TLC s'est révélé primordial pour l'analyse des composés isomériques que sont le glucose et le fructose ainsi que le saccharose et le mélibiose qui ont pu alors être spécifiquement détectés par une analyse TLC-MALDI TOFMS

Il en découle que le couplage TLC-MALDI TOFMS peut être utilisé dans le cadre de l'apport d'une information massique pour une caractérisation rapide et ciblée de substrats d'un mélange complexe grâce à sa sensibilité et sa conversion spatiale.

A l'issue des deux volets présentés lors de ce chapitre, la technique TLC-UV et le couplage TLC-MALDI TOFMS se sont révélés être des méthodologies de choix pour la caractérisation enzymatique ainsi que pour le criblage préliminaire de substrats de l'invertase au sein d'extraits de plantes. Suite à la mise en place d'une méthodologie de séparation et d'ionisation des oses et de criblage d'interactions enzymes-substrats par TLC-MALDI TOFMS au sein d'extraits de plantes, cette preuve de concept a été appliquée à l'évaluation du potentiel d'identification d'inhibiteur d'une autre hydrolase de sucres. A cette fin, la dernière partie de ce chapitre est consacrée à l'étude de la faisabilité de la recherche d'inhibiteurs de l'enzyme cellobiohydrolase II (CBH II) au moyen des méthodologies développées précédemment.

PARTIE III. Ouverture à l'application de la preuve de concept : étude de l'enzyme cellobiohydrolase II

Dans le contexte de cette étude, le laboratoire a été démarché par une entreprise extérieure, dans la perspective de mettre en place une preuve de concept visant à observer le caractère inhibiteur du D-cellobiose sur l'enzyme cellobiohydrolase II (CBH II). Spécialisée dans le développement de procédés d'optimisations permettant la commercialisation de l'éthanol cellulosique, cette entreprise étudie notamment le comportement enzymatique afin d'augmenter les rendements de production de bioéthanol.

L'objectif de l'hydrolyse par voies enzymatiques est de trouver des organismes permettant l'hydrolyse de la lignocellulose, avec des forts taux de conversion. Cette hydrolyse est réalisable à travers la synergie de plusieurs enzymes [49]:

- les endoglucanases (EGs, EC 3.2.1.4) agissant sur les régions amorphes de la cellulose pour libérer des cyclodextrines [50],
- les exoglucanases comprenant les cellodextrinases et les cellobiohydrolases (CBHs, EC 3.2.1.91) agissant sur la cellulose cristalline de manière progressive commençant par les extrémités des chaînes libres et libérant une grande quantité de cellobiose [50, 51]
- les ß-glucosidases (BGLs, EC 3.2.1.21) hydrolysant le cellobiose et de petits oligosaccharides de cellobiose en glucose [52].

Le cellobiose, produit d'hydrolyse des cellobiohydrolases, a été décrit comme étant un fort inhibiteur de ces enzymes [50, 53]. Ainsi, l'efficacité de l'hydrolyse de la cellulose par l'enzyme CBH II est limitée par la production du produit cellobiose, inhibiteur de la réaction enzymatique. Les taux de conversions sont alors limités par la simple capacité de la CBH II à hydrolyser des polysaccharides de cellobiose. Ce phénomène amène à s'intéresser particulièrement à l'enzyme CBH II à travers l'étude de son activité. Ainsi, des recherches d'activités inhibitrices des oses produits par cette hydrolyse ont été initiées par cette entreprise. C'est dans ce contexte que notre équipe s'est intéressée à étudier simultanément les activités substrat et inhibitrice de molécules cibles de la CBH II.

Dans cette démarche, la CBH II a été immobilisée sur support magnétique solide, afin de développer une approche de TLC couplée à la méthodologie de l'ENALDI « Enzyme coupled Nanoparticules-Assisted Laser Desorption/Ionization ». La preuve de concept de l'étude d'interactions enzymes-substrats par TLC-MALDI TOFMS a mis en avant l'intérêt de ce couplage pour l'analyse et l'identification de substrats et de produits pouvant présenter la même masse. Pour une analyse simultanée de l'effet inhibiteur du D-cellobiose et de la conversion d'oligoglucose pouvant générer des produits de même masse que l'inhibiteur, la technique TLC-ENALDI pourrait se révéler d'un grand intérêt.

Préalablement à l'évaluation de la faisabilité de ce couplage, la pertinence de la méthodologie ENALDI a été testée pour l'identification du caractère inhibiteur du D-cellobiose au regard de

l'enzyme CBH II. Il convient donc d'évaluer la compatibilité de cette approche au cas de l'étude de l'enzyme CBH II.

Remarque : dans le cadre de cette ouverture, l'activité de l'enzyme CBH II sous forme libre et immobilisée n'a pas été caractérisée. Il est important de noter que cette application constitue une étude de faisabilité qualitative pour montrer le potentiel de la technique TLC-ENALDI.

1. Détection de l'inhibition du D-cellobiose par les méthodologies d'Ion Fading et d'Ion Hunting par MALDI-TOFMS

Comme présenté dans le chapitre bibliographique, les expériences « Ion Fading » et « Ion Hunting » sont basées sur l'utilisation d'une enzyme immobilisée sur support magnétique (MPs). Ce support constituera une cible spécifique aux inhibiteurs de l'enzyme présents en solution. Ainsi, l'enzyme CBH II a été immobilisée de manière covalente sur des nanoparticules magnétiques. Ces billes, d'environ 12 nm de diamètre et constituées d'un noyau core-shell d'oxyde de fer recouvert d'une couche de silice, sont synthétisées et fonctionnalisées au laboratoire.

1.1. Synthèse des nanoparticules magnétiques

Le protocole de synthèse et de fonctionnalisation des nanoparticules est basé sur l'étude précédente réalisée par Salwinski A. *et al* [54] au sein de notre laboratoire. Un volume de 6 mL de chlorure de fer à 2M dans une solution d'acide hydrochloridrique à 2M a été ajouté à 44 mL d'eau désionisée déoxygénée. Une solution de sulfate de sodium (0,08 M, 25 mL) a été additionnée sous vive agitation. Un volume de 24 mL de solution aqueuse d'ammoniaque (4,67%) a ensuite été rajouté. Après 25 minutes d'agitation à 70°C, les particules d'oxyde de fer (II, III) sont séparées de la solution par centrifugation (8000 rpm, 10 min). Les particules sont ensuite lavées plusieurs fois avec de l'eau désionisée et par une solution eau/éthanol (2/1, v/v). Ces particules sont ensuite re-suspendues dans un mélange de 40 mL d'EtOH et 10 mL d'eau désionisée. 2,5 mL d'orthosilicate tetraethyl et 2,5 mL d'une solution aqueuse d'ammoniaque à 10% sont ajoutés sous vive agitation à 40°C pendant 16 heures afin d'obtenir une polycondensation du tétraéthylorthosilicate (TEOS) hydrolysé sur les nanoparticules d'oxyde de fer aboutissant à la formation d'une couche de silice. Les nanoparticules (MPs) sont ensuite lavées par une solution de HCl 4M pour éliminer les billes d'oxyde de fer non silicatées. S'en suit un nouveau lavage des MPs avec de l'eau désionisée jusqu'à obtention d'un pH neutre. Elles sont ensuite séchées toute une nuit à 40°C.

1.2. Fonctionnalisation des nanoparticules

Une masse de 0,655g de MPs séchées est additionnée à une solution de 10 mL de toluène. Un volume de 2 mL de (3-aminopropyl)triethoxysilane) (APTES) a été ajouté à la solution mise au bain à ultrasons. La solution d'amination a été réalisée toute une nuit à 60°C sous agitation. Les billes sont ensuite lavées plusieurs fois avec du MeOH et séchées à 40°C toute une nuit. Un volume de 30 mL d'une solution de 2,5% de glutaraldéhyde dans du tampon phspphate (PHB) (100 mM, pH = 7,4) a été

ajouté à 500 mg de nanoparticules. Après homogénéisation par ultrasons, la solution est agitée 5 heures à température ambiante. Les nanoparticules fonctionnalisées sont ensuite lavées et centrifugées plusieurs fois avec de l'eau désionisée puis séchées à 40°C.

1.3. Immobilisation de l'enzyme CBH II sur billes magnétiques

Une solution de CBH II dans un tampon PHB (pH = 6,8, 10 mM) a été placée avec une solution de billes magnétiques fonctionnalisées (MPs, diluées dans le même tampon), sous agitation pendant 6 heures dans un bain de glace à des concentrations finales respectives de 1,57 g/L et 4 mg/mL. Après ajout d'une solution de glycine à une concentration finale de 1mM, le mélange réactionnel est placé à 4°C toute la nuit. L'enzyme immobilisée sur les billes de MPs a été lavée avec du tampon formiate d'ammonium (pH = 6,4, 50 mM) afin d'enlever toute enzyme libre n'ayant pas réagi. La solution d'enzyme immobilisée est stockée à 4°C.

1.4. Expériences d'Ion Fading et d'Ion Hunting

Cette approche consiste en l'immobilisation de l'enzyme sur un support solide pour piéger les molécules inhibitrices au sein du site actif de l'enzyme. Cette manipulation permet d'isoler ces molécules du reste du mélange afin de limiter les effets matrices.

Afin de réaliser cette expérience, une solution contenant 100 µM de D-cellobiose (inhibiteur) et 200 µM de raffinose (étalon interne) a été mise en contact de l'enzyme immobilisée (v/v) pendant 1 heure à 50°C. Après réaction, l'enzyme a été isolée du reste de la solution par attraction magnétique et placée pendant 30 minutes dans une solution de MeOH contenant 2,5 µM de rhamnose (étalon interne) de volume équivalent à la réaction enzymatique. Six dépôts de 1 µL de la solution résiduelle après réaction enzymatique ont été déposés sur plaque MALDI avec 2 µL de matrice MPs selon la méthodologie de la « goutte séchée ». Suite à l'étape de dénaturation au MeOH, six dépôts similaires ont été également effectués. Le même protocole a été réalisé avec l'enzyme dénaturée.

<u>Remarques</u> : l'étalon interne, choisi pour les études d'Ion Fading et d'Ion Hunting, doit présenter une ionisation similaire aux molécules d'intérêts. En effet, dans le cadre de cette expérience, les intensités de l'inhibiteur dans le cas de l'enzyme active et dénaturée sont normalisées par rapport à l'intensité du pic de l'étalon interne. De ce fait, une différence trop importante d'ionisation entre l'inhibiteur et l'étalon interne pourrait engendrer des imprécisions. Dans le cas cette analyse, les intensités des pics correspondants au D-cellobiose pour les expériences d'IF et d'IH présentent une grande différence ($I_{D\text{-}cellobiose}$ (IF) > 7000 et $I_{D\text{-}cellobiose}$ (IH) < 300). Aucun étalon interne avec une intensité similaire aux deux cas de figure, n'ayant été déterminé, nous avons alors sélectionné deux étalons internes différents à savoir l'isotope du C_{13} du rhamnose (m/z 188) et le raffinose (m/z 527). Par ailleurs, l'analyse MALDI étant une technique semi-quantitative du fait d'une faible répétabilité des dépôts, six dépôts de chaque solution ont été analysés afin de moyenner les résultats et de soustraire d'éventuelles valeurs aberrantes.

Des exemples d'empreintes spectrales représentatives des expériences de l'IF et de l'IH ainsi que les résultats de ces expériences sont présentés en Figure II-21, 22 et 23.

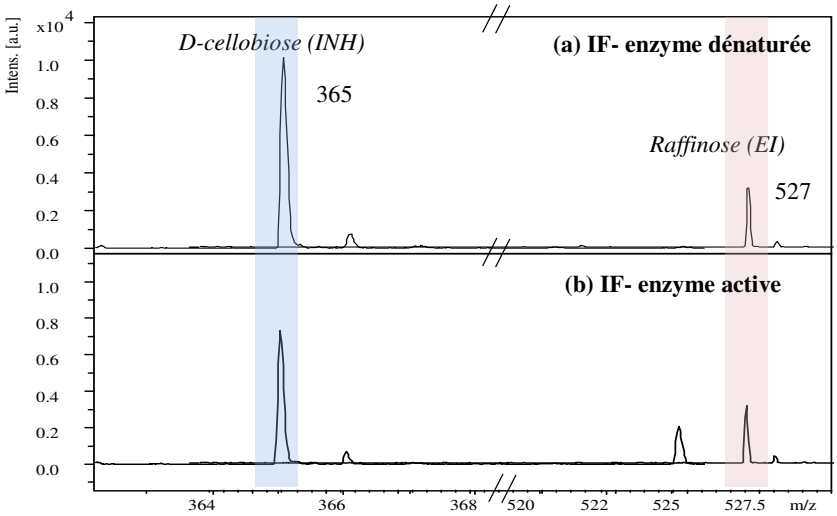


Figure II-21 - Approche d'IF-ENALDI : comparaison des spectres de masse d'un mélange de D-cellobiose (inhibiteur, m/z 365) et de raffinose (étalon interne, m/z 527) obtenus avec l'enzyme CBH II active et dénaturée (référence). Analyses réalisées par MALDI-TOFMS (Bruker Ultraflex).

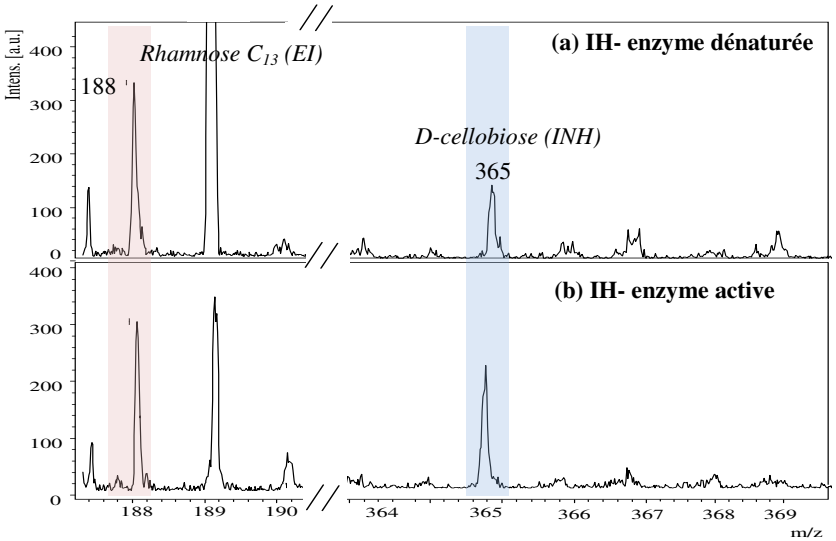


Figure II-22 -Approche d'IH-ENALDI : comparaison des spectres de masse d'un mélange de D-cellobiose (inhibiteur, m/z 365) et de rhamnose (étalon interne, m/z rhamnose C_{13} 188) obtenus avec l'enzyme CBH II active et dénaturée (référence). Analyses réalisées par MALDI-TOFMS (Bruker Ultraflex).

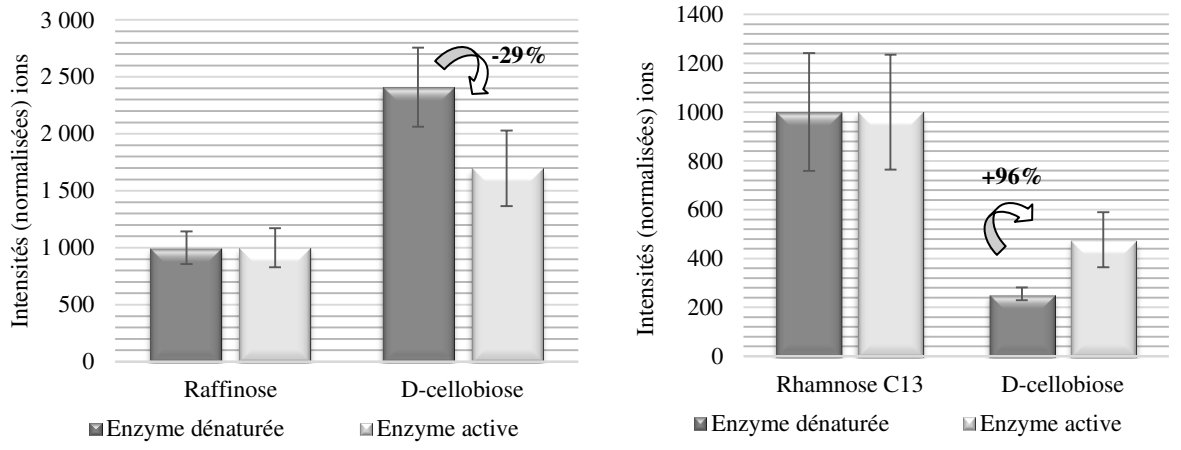


Figure II-23 - Résultats des expériences d'IF et d'IH-ENALDI pour le mélange de (a) D-cellobiose (inhibiteur) et de raffinose (étalon interne) et (b) D-cellobiose et rhamnose (étalon interne).

L'expérience d'Ion Fading montre une diminution de l'intensité du signal de D-cellobiose de 29% entre la solution contenant l'enzyme active et la solution d'enzyme dénaturée. Bien que les barres d'erreurs soient proches, elles ne se croisent pas.

Ce résultat a été confirmé par l'expérience d'Ion Hunting. Après les différents lavages de l'enzyme immobilisée, les molécules ne présentant pas d'interactions spécifiques ont été éliminées avant l'étape de dénaturation de l'enzyme. Ainsi, les molécules analysées dans la solution d'Ion Hunting présentent des interactions spécifiques avec le site actif de l'enzyme. Une augmentation de 96% du signal du D-cellobiose a été détectée.

Ainsi, la combinaison des deux expériences d'Ion Fading et d'Ion Hunting permet de confirmer la présence d'interactions spécifiques entre le D-cellobiose et l'enzyme. Il est important de noter qu'une expérience d'Ion Fading seule ne permettrait pas de conclure à un tel résultat du fait de la présence possible d'interactions non spécifiques avec le support. Cette expérience est réalisée comme confirmation du résultat obtenu pour l'expérience d'Ion Hunting.

Cette étude a prouvé la compatibilité de l'enzyme immobilisée CBH II avec les approches IF et IH pour la détection du caractère inhibiteur du D-cellobiose. Ainsi, cette enzyme immobilisée sur billes magnétiques pourra être utilisée dans le cadre de l'étude de faisabilité de l'approche TLC-ENALDI.

L'ouverture à l'étude de l'enzyme CBH II, proposée dans cette partie, permettra d'évaluer le potentiel de ce support pour l'étude des interactions enzymes-substrats et enzymes-inhibiteurs. Ce potentiel sera évalué par couplage de la TLC avec les approches IH et IF. Cette méthodologie sera nommée TLC-ENALDI.

2. Etude simultanée des interactions enzyme-substrat et enzyme-inhibiteur du maltohexaose et du D-cellobiose par TLC-ENALDI

2.1.1. Principe de l'approche

Lors de ce projet de recherche, la technique TLC-ENALDI a été évaluée pour l'étude d'interactions enzyme-substrat et enzyme-inhibiteur. A cette fin, l'enzyme immobilisée sur le support magnétique, active et dénaturée, est placée en présence d'une solution contenant un substrat et un inhibiteur. Le schéma du principe de la TLC-ENALDI est présenté en Figure II-24.

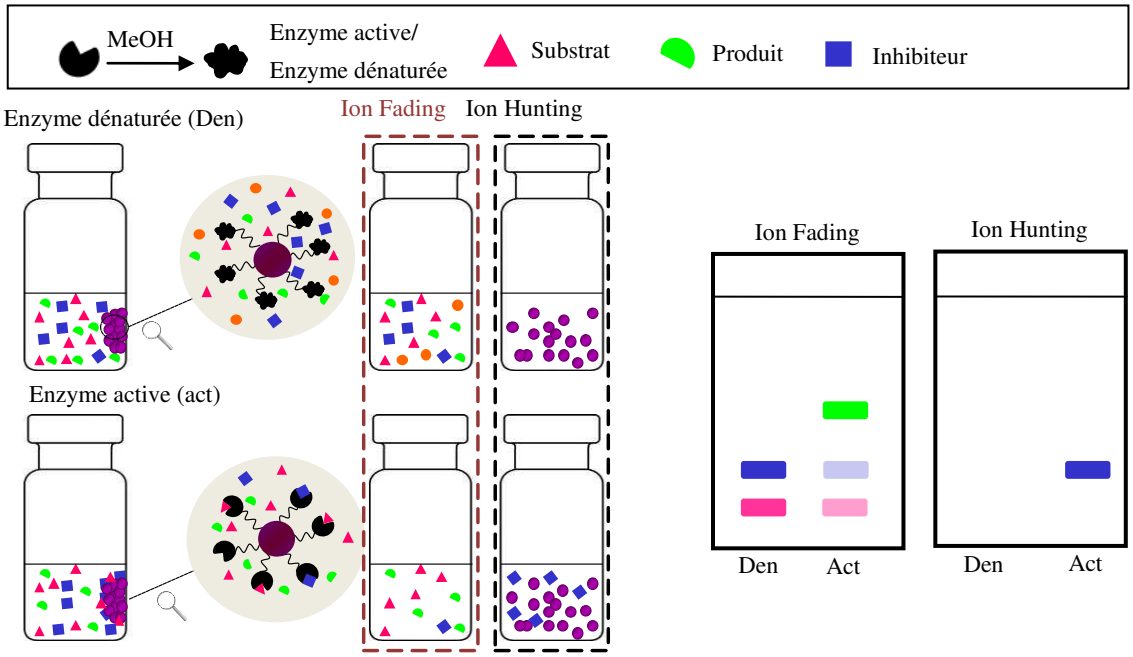


Figure II-24 - Principe général de la méthodologie TLC-ENALDI.

Dans le cas de l'enzyme active, les molécules inhibitrices présentes en solution sont piégées dans le site actif de l'enzyme tandis que les enzymes non inhibées vont initier la conversion du substrat en produit. Le surnageant de la solution, nommé solution Ion Fading, s'appauvrit donc en inhibiteur et en substrat pour s'enrichir en produit. Après isolement de l'enzyme immobilisée et étape de dénaturation, l'inhibiteur est libéré en solution. Par conséquent, après dépôts sur plaque TLC des solutions, la solution d'IF présente une sous-expression des taches correspondant à l'inhibiteur et au substrat combiné à une sur-expression de la tache du produit en comparaison des solutions contrôles. La solution d'IH, quant à elle, présente une sur-expression de la tache traduisant la présence de l'inhibiteur. Cette méthodologie a été appliquée au cas de l'étude de l'enzyme CBH II.

2.1.2. Etude de l'activité substrat et inhibiteur par TLC-ENALDI

L'étude simultanée de l'effet substrat du maltohexaose et l'effet inhibiteur du D-cellobiose a été réalisée selon le procédé présenté précédemment.

a. Conditions réactionnelles

Une solution de 15 µL de maltohexaose à 1 mM, 15 µL de D-cellobiose à 10 mM et 15 µL de CBH II immobilisées actives et dénaturées a été placée 3 heures à 50°C dans un bloc chauffant. L'enzyme est ensuite isolée du reste de la solution (IF) et lavée trois fois afin d'éliminer tout composé présentant des interactions non spécifiques ($AcNH_4$, 50 mM, pH = 5). L'enzyme immobilisée est ensuite dénaturée par une solution de 45 µL de MeOH à 50°C pendant 30 minutes (IH). Le même protocole a été réalisé avec l'enzyme immobilisée.

Remarque : les concentrations en maltohexaose et en D-cellobiose, utilisées pour l'étude de faisabilité de la technique TLC-ENALDI, sont bien supérieures aux concentrations de l'approche ENALDI. Effectivement, la technique TLC présente une sensibilité de détection moindre que l'analyse MALDI. Les fortes concentrations permettent de se placer dans des conditions optimales afin de détecter des sur- et des sous-expressions de taches.

b. Analyses TLC-UV des solutions réactionnelles

Cinq µL de la solution de surnageant (IF) et 15 µL de la solution d'enzyme après dénaturation (IH) ont été déposés sur plaque de silice60 F_{254} en bandes de 8 mm à une vitesse de dépôt de 4s/µL. Après migration avec une phase mobile ACN/H_2O 80/20 (v/v), la plaque a été dérivée par immersion dans une solution d'acide 4-aminobenzoïque puis par chauffage (15 minutes) à 130°C dans une étuve (protocole détaillé lors de la validation de méthodes présentée dans le chapitre II du manuscrit). La dernière solution de lavage a été également analysée, aucune libération de molécule n'a été détectée.

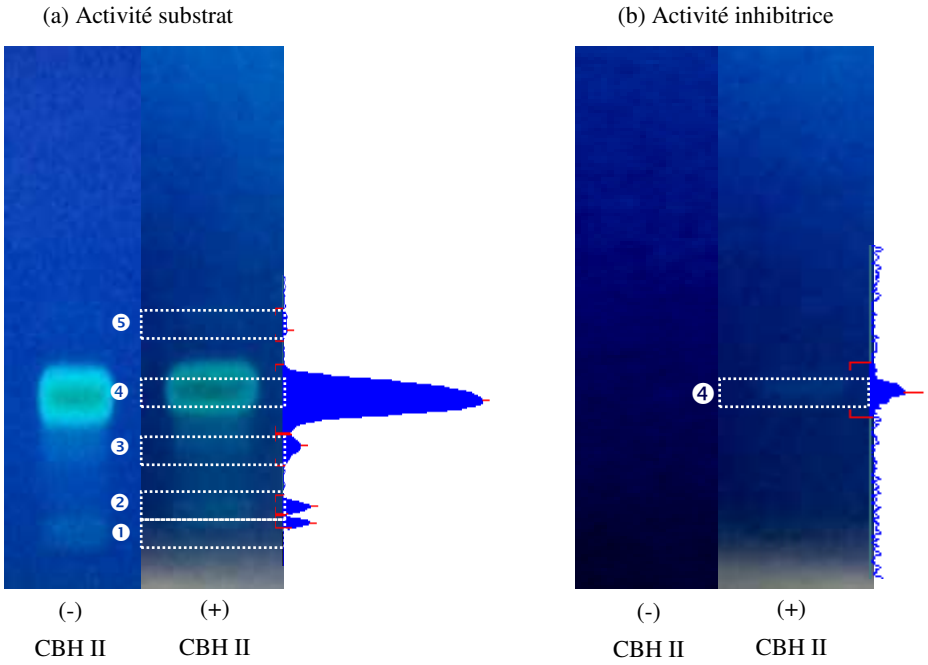


Figure II-25- Plaques TLC, profils densitométriques des solutions IF et IH.

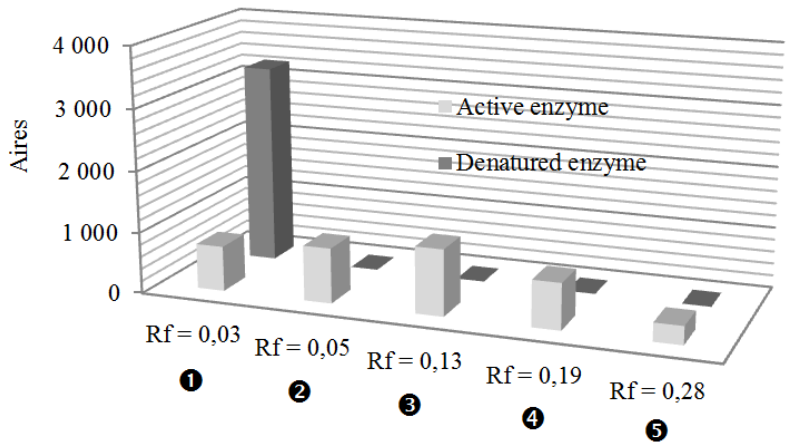


Figure II-26- Histogramme des aires des taches détectées des solutions d'IF et d'IH.

D'après la Figure II-26, la plaque TLC du surnageant des solutions d'enzyme dénaturée et active montre une hydrolyse du maltohexaose en différents produits de réaction. Les aires des différents composés situés aux R_F = 0,03, R_F = 0,05, R_F = 0,13 et R_F = 0,28 représentent les aires des composés dans la solution de surnageant (IF). Les aires des composés situés au R_F = 0,19 correspondent aux solutions après dénaturation de l'enzyme (IH).

L'aire du composé situé au facteur de retardement R_F = 0,03 diminue fortement dans le cas de l'enzyme active. Ce composé est donc le maltohexaose, substrat de la réaction. Les aires des différents composés situés aux R_F = 0,05, R_F = 0,13 et R_F = 0,28 étant nulles dans le cas de l'enzyme dénaturée et apparaissant après réaction enzymatique avec l'enzyme active, ces composés sont les produits de la réaction de l'enzyme CBH II avec le maltohexaose.

Dans le cas de l'étude de l'activité inhibitrice, une apparition de tache à R_F = 0,19 est visible. Ce composé, libéré pendant l'étape de dénaturation de l'enzyme après réaction enzymatique, correspond au D-cellobiose (valeur de R_F vérifiée par le dépôt de standard). Cette zone n'étant pas présente dans le cas de l'enzyme dénaturée, cette observation ne provient pas de la détection d'un faux positif. Ainsi, en une seule analyse, nous avons pu mettre en évidence l'activité substrat de l'enzyme CBH II par hydrolyse du maltohexaose ainsi que l'effet inhibiteur du D-cellobiose.

Afin de mener l'analyse de mélanges complexes, les plaques des solutions IF et IH pourraient être couplées à l'analyse MALDI pour une identification rapide des produits et de l'inhibiteur de la réaction. Dans le but d'évaluer cette faisabilité, l'ionisation d'un mélange de dix standards allant du monosaccharide au maltoheptaose a été étudiée par couplage TLC-MALDI TOFMS.

2.1.3. Etude de faisabilité d'ionisation de polysaccharides par TLC-MALDI TOFMS

Quinze µL d'un mélange de dix standards (maltoheptaose, maltohexaose, maltopentaose, maltotetraose, maltotriose, raffinose, saccharose, galactose, glucose et fructose) à 100 ppm chacun ont été déposés en double sur la plaque TLC pour réaliser l'analyse TLC-MALDI TOFMS. Les conditions expérimentales de migration, de dérivation et d'analyse TLC-MALDI TOFMS ont été menées selon les procédures appliquées précédemment.

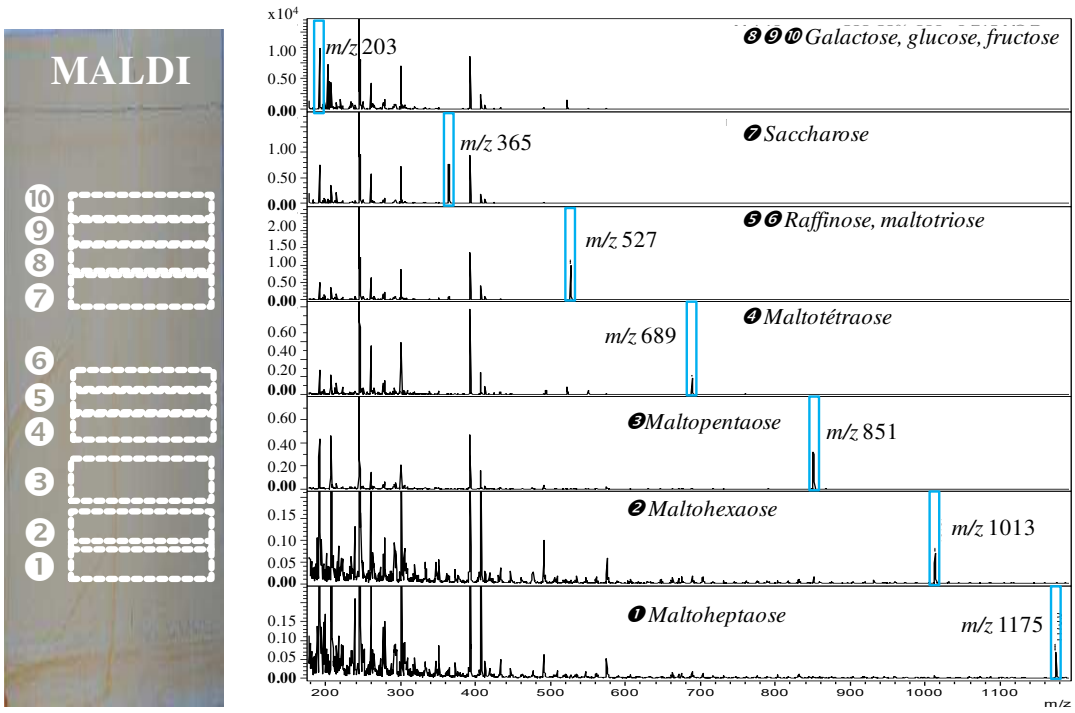


Figure II-27- Empreintes spectrales et plaque TLC associée d'un mélange de 10 sucres standards.

Les oses du mélange sont détectés selon leur facteur de retardement : maltoheptaose (*m/z* 1175, M = 1152 g/mol), maltohexaose (*m/z* 1013, M = 990 g/mol, maltopentaose (*m/z* 851, M = 828 g/mol), maltotetraose (*m/z* 689, M = 666 g/mol), raffinose et maltotriose (*m/z* 527, M = 504 g/mol), saccharose (*m/z* 365, M = 342 g/mol) et monosaccharides fructose, glucose et galactose (*m/z* 203, M = 180 g/mol). Le couplage TLC-MALDI-TOFMS est donc compatible avec l'analyse d'oses de différents degrés de polymérisation (large gamme de masse moléculaire) et indique une sensibilité satisfaisante (détection à 100 ppm).

Cette expérience montre le potentiel du couplage TLC-MALDI TOFMS pour la séparation et la détection d'une large gamme de sucres de degrés de polymérisation variés. Cette étude ouvre la possibilité d'une identification simultanée des inhibiteurs et des produits de réaction pouvant présenter une isomérie.

Bien que cette application reste une ouverture au cas de l'étude de l'enzyme CBH II, cette preuve de concept ouvre de nombreuses opportunités pour des champs d'investigations variés. Cette expérience montre la faisabilité d'études simultanées d'interactions enzymes-substrats et enzymes-inhibiteurs grâce à la synergie de différentes méthodologies (immobilisation d'enzymes, approches Ion Fading et Ion Hunting, couplage TLC-MALDI TOFMS). Il serait alors intéressant d'approfondir cette approche dans le cas de l'étude d'échantillons plus complexes pour tendre vers une étude de cas réel d'hydrolyse de cellulose

.

Conclusions

Les travaux présentés dans ce chapitre ont eu pour but de montrer le potentiel du support TLC couplé à la spectrométrie de masse pour l'étude d'interactions enzymes-substrats au sein de milieux complexes. Dans le contexte de cette étude, l'enzyme invertase a été utilisée comme enzyme modèle pour les développements méthodologique de criblage de l'hydrolyse de sucres au sein de milieux complexes tels que les extraits de plantes (matrices modèles). Ces travaux, détaillés en trois parties, ont eu pour objectifs de :

- mettre en place une méthodologie de caractérisation de l'invertase par détection directe en TLC-UV des produits de conversion, pour pallier aux imprécisions de l'approche colorimétrique,
- montrer l'apport de la méthodologie du couplage TLC-MALDI TOFMS pour l'étude d'activité de l'invertase au sein d'extraits de plantes,
- d'ouvrir cette technique à l'étude d'une autre hydrolase de sucres, la cellobiohydrolase II. Cette étude a montré le potentiel de ce couplage dans le cadre d'interaction enzymes-ligands (enzymes-substrats et enzymes-inhibiteurs) et d'analyse de milieux complexes (mélanges d'oligoglucose).

Une première partie de l'étude a eu pour vocation à rechercher à d'optimiser les conditions d'analyses TLC-UV et TLC-MALDI TOFMS afin de valider nos conditions opératoires. Cette étude nous a confortés dans la volonté d'employer ces méthodologies pour l'étude de l'activité de l'invertase. Deux résultats majeurs en découlent.

<u>Les optimisations des conditions en TLC-UV</u> : la validation de la séparation et de la quantification des trois sucres d'intérêts (saccharose, glucose et fructose) a été réalisée, avec un critère d'erreur fixé à 20%, selon le texte d'harmonisation des méthodes de validation ICH Q2(R1). Cette validation a représenté le support de notre développement de caractérisation de l'activité de l'invertase par TLC-UV grâce à sa garantie de fiabilité, de robustesse et de précision de l'approche. Par ailleurs, l'étude relative aux ajouts dosés de ces trois sucres (de l'extrait de réglisse) a permis de confirmer les détections possibles de quantités ajoutées et donc de sur- et de sous-expressions de taches. A travers l'évaluation de l'effet matrice, des seuils d'erreurs de 5,7% et de 27,3% ont été fixés pour l'estimation de plus de deux fois de la quantité de glucose et de fructose ajoutées à l'extrait.

<u>Les optimisations des conditions en TLC-MALDI TOFMS</u> : cette étude a permis d'évaluer la faisabilité d'ionisation des sucres par couplage TLC-MALDI TOFMS. Suite à l'étude de comparaison de la matrice organique DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) et de la matrice inorganique de nanoparticules (MPs), cette dernière a été sélectionnée. La faible présence de pics interférents présents sur l'empreinte spectrale dans la région des basses masses en ont fait une matrice de choix. L'analyse ciblée des trois sucres d'intérêts au sein de l'extrait de réglisse, par TLC-MALDI TOFMS, a révélé le potentiel de cette matrice inorganique à la fois en terme d'ionisation des sucres au sein d'un mélange complexe mais aussi en terme de compatibilité avec l'analyse TLC-UV (aucune influence sur la

séparation et la détection après dérivation possible). Ces optimisations ont été mises à profit pour l'étude des trois parties de ce chapitre.

La mise en place de la caractérisation de l'activité de l'invertase par l'étude de l'hydrolyse du saccharose, constitue la première partie de ce travail. Le support TLC s'est révélé comme une technique de choix pour la mise en place de cette caractérisation par TLC-UV. Les avantages de ce développement se sont révélés multiples :

- mise en place d'une méthodologie rapide (analyses simultanées), précise (faibles LD et LQ) et fiable (validation de méthode) se rapprochant des conditions d'analyses colorimétriques,
- mise en place d'une caractérisation par suivi direct de la conversion du substrat en produits (contrairement à la méthode colorimétrique où les produits sont dosés par apparition d'un co-facteur),
- la dimension séparative offre une spécificité de détection des produits de réaction. Elle permet ainsi de pallier aux imprécisions du dosage colorimétrique dans le cas de l'analyse de sucres à plus haut degré de polymérisation.

Il est important de noter que cette méthodologie n'a pas pour vocation à remplacer l'analyse colorimétrique mais permet d'accroître le panel analytique dans ce domaine. L'objectif est d'améliorer la précision de la détermination des paramètres cinétiques et la compréhension mécanistique de l'action d'hydrolyse grâce au suivi spécifique des produits libérés. Par ailleurs, bien que cette étude de caractérisation n'ait été réalisée que dans le cas de l'hydrolyse du saccharose (présentant deux produits de réaction co-migrés), elle pourrait être facilement transposable pour l'étude de sucres alternatifs (de type raffinose ou stachyose) où seul le monosaccharide formé serait quantifié (gain en précision).

La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à l'étude de faisabilité du criblage de substrats de l'invertase au sein de milieux complexes tels que les extraits de plantes. Bien que cette expérience ait été menée sur cinq extraits de plantes, seuls trois extraits sont présentés dans l'intérêt de l'étude. Cette approche a été menée en deux temps :

- mise en place de l'approche différentielle par TLC-UV ayant permis un criblage rapide des substrats et des produits par détection de sous- et de sur-expressions de taches,
- confirmation voire l'identification de la nature des molécules d'intérêts réalisée par le couplage TLC-MALDI TOFMS.

L'étude des extraits de réglisse et de LV1784 n'a montré aucune influence de l'effet matrice sur la détection de sur- et de sous-expresions de taches. Par ailleurs, bien que la forte présence de glucose et de fructose au sein de l'extrait de mangoustan empêche la détection de sur-expression, l'hydrolyse du substrat a pu être mise en évidence par la détection de la sous-expression de la tache d'intérêt. Cette étude valide ainsi l'approche différentielle du criblage de substrats et de produits par TLC-UV. Par la suite, l'identification de ces molécules a été confirmée par une analyse ciblée des zones d'intérêts par couplage TLC-MALDI TOFMS. A cette fin, le support TLC s'est révélé parfaitement compatible. Cette analyse rapide, précise (conservation de la dimension spatiale de la TLC), d'une gamme

dynamique de concentrations inconnues, a permis par l'association des rapports frontaux et des valeurs de masses, d'apporter un meilleur taux de confiance quant à l'identification des molécules d'intérêts.

La troisième et dernière partie s'est concentrée sur l'ouverture à l'application de ces méthodologies à l'étude simultanée d'interactions enzyme-inhibiteur et enzyme-substrat. Pour ce faire, une autre hydrolyse de sucre, la cellobiohydrolase II, a été sélectionnée dans le cas de la mise en place d'une preuve de concept. Cette méthodologie a été menée à bien grâce à l'immobilisation de l'enzyme sur des billes magnétiques. Les deux types d'interactions ont pu être visuellement observés lors d'une seule analyse à travers le couplage de la méthodologie TLC et celle de l'ENALDI. Par ailleurs, l'analyse TLC-MALDI TOFMS d'un mélange de standard de sucres de différentes tailles (de n= 1 à n = 7) ouvre la possibilité d'identifier une large gamme de substrats et de produits d'hydrolyse de sucres dans le cas de l'analyse de milieux gagnant en complexité (biomasse). Ainsi, la synergie de ces approches (immobilisation d'enzymes, couplage TLC-MALDI TOFMS) souligne leur potentiel dans la volonté d'études toujours plus complexes (interactions enzymes-substrats et enzymes inhibiteurs, milieux complexes).

Toujours dans ce domaine d'étude de conversion enzymatique, le prochain chapitre ne s'intéressera plus à une seule mais à plusieurs étapes de conversion dans le cas de figure d'un suivi de réactions en cascade. Ces approches sont extrapolées dans le prochain chapitre pour l'étude de plusieurs étapes de conversions à travers du suivi de réactions en cascade. Pour mener à bien cet objectif, le chapitre III de ce manuscrit introduira une étude de cascade de phosphorylations de nucléotides dans le cadre de la recherche de nouveaux agents antiviraux. Bien que le couplage TLC-MALDI ait fait ses preuves pour l'étude d'interactions enzymes-substrats, les nucléotides présentent une faible ionisation par source MALDI. D'après les éléments de la littérature, une source électrospray apparaît comme étant plus adaptée.

Dans ce contexte, le suivi de cascade de phosphorylations sera développé par analyse on-line par (LC)-ESI-QTOF HRMS, au moyen de la méthodologie de l'immobilisation d'enzyme. La mise en place de ce développement fera donc l'objet du dernier chapitre de ce manuscrit.

Références

[1] M. E. Light, *S. Afr. J. Bot*., 75 **(2009)** 383-385.
[2] E. K. Lim, D. Bowles, *Curr. Opin. Biotechnol*., 23 **(2012)** 271-277.
[3] J. Marcy A. Balunas, *Life Sciences*, 78 **(2005)** 431-441.
[4] C. Tomelleri, D. Pellegrina, *Cell Prolif.* , 43 **(2010)** 130-138.
[5] I. M. Abu-Reidah, M. S. Ali-Shtayeh, R. M. Jamous, D. Arraez-Roman, A. Segura-Carretero, *Food Chem.*, 166 **(2015)** 179-191.
[6] L. F. Wu, K. F. Wang, X. Mao, W.Y. Liang, W. J. Chen, S. Li, Q. Qi, Y.P. Cui, L. Z. Zhang, *Molecules*, 21 **(2016)** 1-15.
[7] R. Campos-Olivas, *Curr Top Med Chem*. , 11 **(2011)** 43-67.
[8] C. A. Lepre, *Methods Enzymol*., 493 **(2011)** 219-239.
[9] S. Agatonovic-Kustrin, D. W. Morton, A. P. Yusof, *Mod Chem appl*, 3 **(2015)**.
[10] R. Kawai, K. Igarashi, M. Kitaoka, T. Ishii, M. Samejima, *Carbohydr. Res*., 339 **(2004)** 2851-2857.
[11] L. Gu, T. Wu, Z. Wang, *JFST*, 42 **(2009)** 131-136.
[12] I. M. Choma, E. M. Grzelak, *J. Chrom. A.*, 1218 **(2011)** 2684-2691.
[13] E. Gattavecchia, D. Tonelli, PaolaBosco, *Anal. Chim. Acta*, 196 **(1987)** 259-265.
[14] S. Belaz, T. Rattier, P. Lafite, P. Moreau, F.H. Routier, F. Robert-Gangneux, J.P. Gangneux, R. Daniellou, *Carbohydr Res*, 415 **(2015)** 31-38.
[15] J. A. Barnett, *Microbiology*, 149 **(2003)** 557-567.
[16] U. Andjelkovic, N. Jovic, Jovicic, P. Bajt, Z. Mojovic, Z. Vujcic, D. Jovanovic, *Food Chem*, 168 **(2015)** 262-269.
[17] S. M. Kotwal, V. Shankar, *Biotechnol. Adv.,* 27 **(2009)** 311-322.
[18] S. Kulshrestha, P. Tyagi, V. Sindhi, K.S. Yadavilli, *J. Pharm.Res.,* 7 **(2013)** 792-797.
[19] T. Hura, M. Dziurka, K. Hura, A. Ostrowska, K. Dziurka, *J. Plant Physiol.*, 202 **(2016)** 1-9.
[20] A. Sturm, *Plant Physiol*., 121 **(1999)** 1-7.
[21] T. Roitsch, M. C. Gonzalez, *Trends Plant Sci*., 9 **(2004)** 606-613.
[22] G. L. Miller, *Anal. Chem*., 31 **(1959)** 426-428.
[23] F. Zhong, W. S. Tong, S. S. Zhou, K. M. Yip, S. L. Li, Z. Z. Zhao, J. Xu, H. B. Chen, *J. Food Drug Anal.*, **(2017)**.
[24] Xiaodong Sen, H. Perreault, *J. Chrom. A*, 811 **(1998)** 47-59.
[25] D. HongYu, Shi-Fen Mou, Petr Jandik, Jun Cheng, *J. Chrom. A*, 966 **(2002)** 89-97.
[26] X. Liu, N. Ai, H. Zhang, M. Lu, D. Ji, F. Yu, J. Ji, *Carbohydr Res*., 353 **(2012)** 111-114.
[27] F. J. Moreno, R. Lopez-Fandino, A. Olano, *Chromatographia*, 53 **(2001)** 525-528.
[28] A.I. Ruiz-Matute, O. Hernandez-Hernandez, S. Rodriguez-Sanchez, M.L. Sanz, I. Martinez-Castro, *J. Chrom. B*, 879 **(2011)** 1226-1240.
[29] G. L. Sassaki, L. M. Souza, R. V. Serrato, T. R. Cipriani, P. A. Gorin, M. Iacomini, *J. Chrom. A*., 2008 **(2008)** 215-222.
[30] A. Rojas-Escudero E, Elizalde-Galván P, Rojo-Callejas F., *J. Chrom. A*, 1027 **(2004)** 117-120.
[31] G. E. Morlock, *J. Liq. Chromatogr. Relat Technol*., 34 **(2011)** 902-919.
[32] J. Dutta, A. Biswas, *J. Chromatogr*, 173 **(1979)** 379-387.
[33] S. N. Fedosov, J. Brask, X. Xu, *J. Chrom. A*., 1218 **(2011)** 2785-2792.
[34] L. Morschheuser, S. Mukusch, M. Riedner, H. Seitz, S. Rohn, *J. Chrom. B*., 1008 **(2016)** 198-205.
[35] S. Misra, A. K. R. Dutta, A. Ghosh, J. Dutta, *J. Chromatogr.*, 280 **(1983)** 313-320.
[36] K. Nimptsch, R. Suss, T. Riemer, A. Nimptsch, M. Schnabelrauch, J. Schiller, *J. Chrom. A.*, 1217 **(2010)** 3711-3715.
[37] C. P. Fu, S. Lirio, W. L. Liu, C. H. Lin, H. Y. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 888 **(2015)** 103-109.
[38] C. Su, *Anal. Chem*., 79 **(2007)** 1626-1633.
[39] M. Ghebregzabher, B. Monaldi, M. Lato, *J. Chromatogr.*, 127 **(1976)** 133-162.
[40] R. D. Fell, Comp. *Biochem. Physiol*, 95A **(1990)** 539-544.

[41] *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*, **(2005)**.
[42] M. H. Motisariya, K. G. Patel, P. A. Shah, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 51 **(2013)** 233-241.
[43] A. Pyka, M. Budzisz, M. Dolowy, *BioMed Res. Int*., 2013 **(2013)** 545703.
[44] S. Guimarães, A. F. Somera, H. F. Terenzi, M. Polizeli, J. A. Jorge, *Process Biochem*., 44 **(2009)** 237-241.
[45] C. Li, *Enzyme Microb. Technol.*, 64-65 **(2014)** 24-32.
[46] R. Schindler, B. Lendl, R. Kellner, *Vibrational spectroscopy*, 16 **(1998)** 127-135.
[47] D. Kehlbeck, M. T. Turnbull, S. J. Kohler, *J. Chem. Educ*, 91 **(2014)** 734-738.
[48] F. Exnowitz, B. Meyer, T. Hackl, B*iochim. Biophys. Acta,* 1824 **(2012)** 443-449.
[49] G. P. Maitan-Alfenas, E. M. Visser, V. M. Guimarães, *Curr. Opin. Food Sci*., 1 **(2015)** 44-49.
[50] K. Lahjouji, R. Storms, Z. Xiao, K. B. Joung, Y. Zheng, J. Powlowski, A. Tsang, L. Varin, *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 75 **(2007)** 337-346.
[51] M. Takahashi, H. Takahashi, Y. Nakano, T. Konishi, R. Terauchi, T. Takeda, *Appl. Environ. Biotechnol.*, 76 **(2010)** 6583-6590.
[52] R. den Haan, H. Kroukamp, D. van Zyl, W. H. van Zyl, *Process Biochem*., 48 **(2013)** 1-12.
[53] V. P. Gruno M, Pettersson G, Johansson G., *Biotechnol Bioeng*. , 86 **(2004)** 503-511.
[54] A. Salwinski, D. Da. Silve, R. Delépée, B. Maunit, *JASMS*, 25 **(2014)** 538-547.

Table des figures

FIGURE II-1 - SCHEMA GENERAL DE L'HYDROLYSE DU SACCHAROSE PAR L'INVERTASE. 95

FIGURE II-2 - REACTION DE L'ACIDE 3,5-DINITROSALICYLIQUE EN PRESENCE D'UN SUCRE REDUCTEUR. 98

FIGURE II-3- SCHEMATISATION DE LA DETERMINATION DE LA SPECIFICITE : ETUDE DES FACTEURS DE RETARDEMENTS A TROIS POSITIONS (DEBUT, MILIEU ET FIN) ENTRE LES MOLECULES DEPOSEES INDIVIDUELLEMENT ET EN MELANGE..... 104

FIGURE II-4 - RESULTATS DU TEST DE ROBUSTESSE : EXPERIENCE AVEC LES CONDITIONS ALTEREES (FI), CONDITIONS NIVEAU HAUT (+), NIVEAU BAS (-). MOYENNE DES VALEURS DES FONCTIONS REPONSES POUR UN PARAMETRE ALTERE (N = 6) (YI), LES EFFETS DE CHAQUE FACTEUR (EI), (A) EVALUATION DE L'EFFET DES FACTEURS (EI) POUR CHAQUE EXPERIENCE (FI) ET (B) GRAPHE DE LA LOI NORMALE DE DEMI-PROBABILITE DES EFFETS POUR LE GLUCOSE. 110

FIGURE II-5 - PLAQUE DIVISEE APRES DEPOT ET MIGRATION. (A) DETECTION DES ZONES D'INTERETS APRES REVELATION UV, (B) REPORT DES ZONES SUR LA PLAQUE MALDI, (C) INSERTION DE LA PLAQUE TLC NON REVELEE SUR LE SUPPORT POUR L'ANALYSE PAR COUPLAGE TLC-MALDI-TOFMS. 113

FIGURE II-6 - MELANGE DE SACCHAROSE, GLUCOSE ET FRUCTOSE DERIVES SUR (A) PLAQUE NON IMMERGEE DANS LA SOLUTION DE MATRICE ET (B) PLAQUE IMMERGEE AVANT MIGRATION. DETECTION A 366 NM. 114

FIGURE II-7 - SPECTRES OBTENUS APRES DETECTION TLC-MALDI-TOFMS D'UN EXTRAIT DE REGLISSE. 115

FIGURE II-8 - (A) COURBE D'ETALONNAGE DU GLUCOSE (▪, $Y = -552.14X^2 + 6823.1X + 1297.5$, $R^2 = 0.9945$) ET FRUCTOSE (•, = $-300.54X^2 + 3999.2X + 1069.4$, $R^2 = 0.9922$) (N = 6, DERIVATION A L'ACIDE 4-AMINOBENZOÏQUE, λ = 366 NM) ET (B) PLAQUE TLC DES MOLECULES STANDARDS 118

FIGURE II-9 - DROITE D'ETALONNAGE DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE PAR DETECTION SPECTROPHOTOMETRIQUE (λ = 540NM) APRES DERIVATION DNS. 118

FIGURE II-10 - CINETIQUES DE PRODUCTION (A) DU GLUCOSE (CARRES, $Y = 27.66X + 359.33$, $R^2 = 0.993$) ET DU FRUCTOSE (RONDS, $Y = 19.337X + 251.93$, $R^2 = 0.9867$) DETECTEES PAR TLC-UV ET (B) DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE PAR DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE ($Y = 0,0016X - 0,0398$, $R^2 = 0,9992$) APRES HYDROLYSE DU SACCHAROSE CATALYSEE PAR L'ENZYME BFRA. LES DONNEES REPRESENTEES SONT MOYENNEES PAR 4 REPLICATS BIOLOGIQUES. 119

FIGURE II-11 - PLAQUE TLC ET PROFIL DENSITOMETRIQUE DE L'EXPERIENCE DE MICHAELIS-MENTEN DE L'HYDROLYSE DU SACCHAROSE CATALYSEE PAR L'ENZYME BFRA, APRES DERIVATION SOUS 366 NM. DETECTIONS DU SACCHAROSE (R_F = 0,10), DU GLUCOSE (R_F = 0,16) ET DU FRUCTOSE (R_F = 0,22) (RHAMNOSE, R_F = 0,33). 121

FIGURE II-12 - (A) COURBES DE MICHAELIS-MENTEN DE L'HYDROLYSE DU SACCHAROSE PAR L'ENZYME BFRA AVEC DETECTIONS DU GLUCOSE (▪) ET DU FRUCTOSE (•), (TLC-UV, N = 5) (B) COURBES DE MICHAELIS-MENTEN DE L'HYDROLYSE DU SACCHAROSE PAR L'ENZYME BFRA PAR DETECTION D'UN MELANGE DE GLUCOSE ET DE FRUCTOSE (ABSORBANCE DIVISEE PAR 2, N = 3). COURBES OBTENUES AVEC LE LOGICIEL GRAPHPAD PRISM 5.0, EXTRAPOLEES PAR L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN. 122

FIGURE II-13 - SUCRES HYDROLYSES PAR L'ENZYME BFRA : SACCHAROSE (N = 2), RAFFINOSE (N = 3), STACHYOSE (N = 4) ET INULINE (N= INCONNU). 124

FIGURE II-14 - (A) SPECIFICITE DE SUBSTRATS DE L'ENZYME BFRA. REPRESENTATION DES AIRES NORMALISEES DES PRODUITS OBTENUS APRES HYDROLYSE (N = 3), (B) PLAQUES TLC DE L'HYDROLYSE DES SUBSTRATS SOUS 366 NM. T1-T4 : HYDROLYSE DU SACCHAROSE, RAFFINOSE, STACHYOSE ET INULIN. 124

FIGURE II-15 - DROITES DE CALIBRATION DU GLUCOSE, FRUCTOSE, GALACTOSE, MANNOSE, MALTOSE, LACTOSE ET SACCHAROSE PAR DETECTION SPECTROPHOTOMETRIQUE APRES DERIVATION AU DNS. 125

FIGURE II-16 - SCHEMA RECAPITULATIF DU PROTOCOLE DE RECHERCHE DE SUBSTRATS DE L'INVERTASE DANS DES EXTRAITS DE PLANTES PAR TLC-MALDI TOFMS. 128
FIGURE II-17 - PLAQUES TLC ET DENSITOGRAMMES DES SOLUTIONS DE REFERENCE ET D'HYDROLYSES AVEC A) REGLISSE, B) LV 1784, C) MANGOUSTAN APRES DERIVATION VISIBLE A 366 NM. SC : SOLUTION DE L'EXTRAIT DE REFERENCE, S_R : SOLUTION DE L'EXTRAIT APRES REACTION ENZYMATIQUE. VALEURS DE hR_F CORRESPONDANTES A LA VALEUR DE R_F MULTIPLIEE PAR 100. . 130
FIGURE II-18 - GRAPHES DES INTENSITES NORMALISEES DE CHAQUE ZONE D'INTERET AVANT (▪) ET APRES REACTION ENZYMATIQUE (▪) POUR LES EXTRAITS DE A) REGLISSE, B) LV 1784 ET C) MANGOUSTAN (N=3). 132
FIGURE II-19 - PLAQUES TLC IMPREGNEES DE SOLUTION DE MATRICE MPS. SOLUTIONS DE REFERENCES ET SOLUTIONS APRES REACTION ENZYMATIQUE POUR LES EXTRAITS DE REGLISSE, LV 1784 ET DE MANGOUSTAN. (A) : PREMIERE PARTIE DE PLAQUE TLC APRES DERIVATION AVEC L'ACIDE 4-AMINOBENZOÏQUE (Λ = 366 NM), (B) : DEUXIEME PARTIE DE PLAQUE DEDIEE A L'ANALYSE MALDI. S_C : SOLUTIONS DE REFERENCE, S_R : SOLUTION APRES REACTION ENZYMATIQUE. 133
FIGURE II-20 - SPECTRES DE MASSES DES EXTRAITS AVANT REACTION ENZYMATIQUE ASSOCIEES AUX ZONES D'INTERETS EN TLC. ... 135
FIGURE II-21 - APPROCHE D'IF-ENALDI : COMPARAISON DES SPECTRES DE MASSE D'UN MELANGE DE D-CELLOBIOSE (INHIBITEUR, M/Z 365) ET DE RAFFINOSE (ETALON INTERNE, M/Z 527) OBTENUS AVEC L'ENZYME CBH II ACTIVE ET DENATUREE (REFERENCE). ANALYSES REALISEES PAR MALDI-TOFMS (BRUKER ULTRAFLEX). 142
FIGURE II-22 -APPROCHE D'IH-ENALDI : COMPARAISON DES SPECTRES DE MASSE D'UN MELANGE DE D-CELLOBIOSE (INHIBITEUR, M/Z 365) ET DE RHAMNOSE (ETALON INTERNE, M/Z RHAMNOSE C_{13} 188) OBTENUS AVEC L'ENZYME CBH II ACTIVE ET DENATUREE (REFERENCE). ANALYSES REALISEES PAR MALDI-TOFMS (BRUKER ULTRAFLEX). 142
FIGURE II-23 - RESULTATS DES EXPERIENCES D'IF ET D'IH-ENALDI POUR LE MELANGE DE (A) D-CELLOBIOSE (INHIBITEUR) ET DE RAFFINOSE (ETALON INTERNE) ET (B) D-CELLOBIOSE ET RHAMNOSE (ETALON INTERNE). 143
FIGURE II-24 - PRINCIPE GENERAL DE LA METHODOLOGIE TLC-ENALDI. 144
FIGURE II-25- PLAQUES TLC, PROFILS DENSITOMETRIQUES DES SOLUTIONS IF ET IH. 145
FIGURE II-26- HISTOGRAMME DES AIRES DES TACHES DETECTEES DES SOLUTIONS D'IF ET D'IH. 146
FIGURE II-27- EMPREINTES SPECTRALES ET PLAQUE TLC ASSOCIEE D'UN MELANGE DE 10 SUCRES STANDARDS. 147

Table des tableaux

TABLEAU II-1 - SPECIFICITE DE LA METHODE ANALYTIQUE, CV % (ΔR_F) (MELANGE/STANDARDS), (*N = 3). 104
TABLEAU II-2 - SPECIFICITE DE LA METHODE ANALYTIQUE, CV % (ΔR_F) (EXTRAIT DE REGLISSE), (*N = 3)..... 105
TABLEAU II-3- PARAMETRES ANALYTIQUES DE LA METHODE TLC (N = 3). 105
TABLEAU II-4 - FIDELITES INTRA- ET INTER-JOUR DE LA METHODE TLC (*N = 3). 106
TABLEAU II-5 - CONDITIONS ALTEREES UTILISEES DANS LE TEST DE ROBUSTESSE, LES FACTEURS AVEC LES NIVEAUX ASSOCIES..... 107
TABLEAU II-6 - MATRICE EXPERIMENTALE (2^3) POUR LE TEST DE ROBUSTESSE. 109
TABLEAU II-7 - TEST DE L'EXACTITUDE DE LA METHODE TLC POUR LA QUANTIFICATION DU SACCHAROSE, GLUCOSE ET FRUCTOSE DANS UN EXTRAIT DE PLANTE. 111
TABLEAU II-8 – CONDITIONS EXPERIMENTALES DE REALISATION DES DROITES D'ETALONNAGE PAR TLC-UV ET PAR DOSAGE COLORIMETRIQUE. 117
TABLEAU II-9 - CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE LINEARITE PAR TLC-UV ET PAR DOSAGE COLORIMETRIQUE..... 119
TABLEAU II-10 - CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE MICHAELIS-MENTEN PAR TLC-UV ET PAR DOSAGE COLORIMETRIQUE. 120
TABLEAU II-11 - PARAMETRES CINETIQUES OBTENUS LORS DE L'HYDROLYSE DU SACCHAROSE PAR L'ENZYME BFRA POUR LE GLUCOSE ET LE FRUCTOSE..... 122
TABLEAU II-12 – CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE L'HYDROLYSE DE SUBSTRATS ALTERNATIFS. 124
TABLEAU II-13 - TABLEAU RECAPITULATIF DES VALEURS D'INTENSITES TROUVEES POUR LES SOLUTIONS DE REFERENCES (REGLISSE, LV 1784, MANGOUSTAN) OBTENUES PAR ANALYSES MALDI ET DENSITOMETRIQUES..... 130
TABLEAU II-14 - TABLEAU RECAPITULATIF DU NOMBRE DE ZONES INTENSIFIEES ET DIMINUEES ET D'APPARITIONS ASSOCIEES AUX VALEURS DE FACTEURS DE RETARDEMENT SUR LES PLAQUES TLC APRES REACTION ENZYMATIQUE. 131
TABLEAU II-15- RECAPITULATIF DES VALEURS DE M/Z DETECTEES EN FONCTION DES FACTEURS DE RETARDEMENTS LORS DE L'ANALAYSE DES TROIS EXTRAITS DE PLANTES PAR TLC-MALDI TOFMS..... 133
TABLEAU II-16 - TABLEAU RECAPITULATIF DES VALEURS M/Z TROUVEES PAR TLC-MALDI-TOFMS..... 134

CHAPITRE III. Étude de phosphorylation de nucléosides pyrimidiques par spectrométrie de masse haute résolution

SOMMAIRE

CHAPITRE III. ÉTUDE DE PHOSPHORYLATION DE NUCLEOSIDES PYRIMIDIQUES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION 157

PARTIE I. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE 161

1. Contexte de l'étude 161

1.1. Objectifs de l'étude 161

1.2. Analogues de nucléosides comme agents antiviraux 162

1.3. Voie d'activation des analogues de nucléosides 163

1.3.1. Analogues de nucléosides 167

1.3.2. Nucléosides phosphonates acycliques 167

1.4. Test d'activité des kinases par spectrophotométrie : « détection indirecte » 173

1.5. Exemples d'autres méthodologies de mesure d'activité : « détection directe » 174

1.5.1. Tests radiométriques 174

1.5.2. Chromatographie en phase liquide 175

1.5.3. Electrophorèse capillaire 175

1.6. Description des enzymes étudiées dans ce travail 176

1.6.1. Thymidine Kinase 1 humaine (hTK1) 176

1.6.2. Thymidylate Monophosphate Kinase humaine (hTMPK) 178

1.6.3. Nucléoside Diphosphate Kinase humaine (hNDPK) 179

1.7. La production et la purification de l'enzyme hTMPK 181

1.7.1. Protocole de production de l'enzyme hTMPK 182

1.7.2. Détermination de la quantité de protéine produite : test de Bradford 184

1.7.3. Contrôle de la production et de la purification par électrophorèse sur gel (SDS page) 184

2. Mise en place d'une étude de caractérisation d'activité des kinases par FIA-HRMS 185

2.1. Optimisation des conditions opératoires 187

2.1.1. Evaluation de l'ionisation des molécules d'intérêts par spectrométrie de masse 187

2.1.2. Méthode basée sur la spectrométrie de masse 191

2.1.3. Etude de l'influence des concentrations en ATP et $MgCl_2$ 191

3. Etude de la faisabilité de la caractérisation de l'activité de l'enzyme hTMPK par FIA-HRMS 193

3.1. Caractérisation par FIA-HRMS 194

3.2. Droite d'étalonnage 194

3.3. Test d'activité enzymatique- linéarité 195

3.4. Détermination des paramètres cinétiques : étude de Michaelis-Menten 196

3.5. Caractérisation par spectrophotométrie UV 199

3.6. Caractérisation par électrophorèse capillaire-UV (EC-UV) 201

3.6.1. Appareillage 201

3.6.2. Méthodes de séparation 201

3.6.3. Détermination des paramètres cinétiques : étude de Michaelis-Menten 201

3.7. Caractérisation des enzymes libres hTK1 et hNDPK 202

3.7.1. Caractérisations par FIA-HRMS 203

3.7.2. Etude de l'influence des concentrations en ATP/$MgCl_2$ sur l'activité des enzymes hTK1 et hNDPK par EC-UV. 206

3.8. Etude d'activité des lots d'enzymes immobilisées par FIA-HRMS 207
3.8.1. Immobilisation des enzymes sur support 207
3.8.2. Caractérisations des lots d'enzymes immobilisés : étude de Michaelis-Menten 208
4. Conclusion 210
PARTIE II. DEVELOPPEMENT DE PREUVES DE CONCEPTS DU SUIVI DE CASCADES DE CONVERSIONS ENZYMATIQUES 213
1. Etude off-line de la cascade de phosphorylation par Injection en Flux continu couplé à la Spectrométrie de Masse Haute résolution (FIA-HRMS) 213
1.1. Etude des réactions individuelles 214
1.2. Etude de la cascade de phosphorylation 219
1.2.1. Protocole de l'approche avec les enzymes libres 219
1.2.2. Protocole de l'approche avec les enzymes immobilisées 220
1.2.3. Résultats de la cascade off-line de phosphorylation 220
1.3. Conclusion 222
2. Etude on-line de la cascade enzymatique par Chromatographie d'Affinité Frontale couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution (FAC-HRMS). 223
2.1. Principe de la méthodologie FAC-HRMS pour le suivi de cascade de phosphorylation 224
2.2. Optimisations du système FAC 225
2.2.1. Système fluidique FAC 225
2.2.2. Remplissage des bioréacteurs 229
2.3. Etude d'activité, d'efficacité de conversion et de stabilité des bioréacteurs hTMPK et hNDPK 231
2.3.1. Matériel 231
2.3.2. Méthode 231
2.3.3. Protocole d'immobilisation d'enzymes 232
2.3.4. Etude de l'activité de la Thymidylate monophosphate kinase humaine (hTMPK) 232
2.3.5. Etude de l'activité de la nucléoside diphosphate kinase humaine (hNDPK) 235
2.3.6. Etude de stabilité des bioréacteurs remplis des enzymes hTMPK et hNDPK 237
2.4. Etude de la cascade on-line de phosphorylation 238
PARTIE III. APPLICATION DES PREUVES DE CONCEPT DE FIA-HRMS ET FAC-HRMS POUR L'ETUDE DE SPECIFICITE DE CONVERSION DE NUCLEOTIDES PHOSPHONATES ACYCLIQUES AU REGARD DE L'ENZYME TMPK DE SOUCHES HUMAINE ET VIRALE 241
1. Contexte de l'étude : l'importance de la spécificité pour la recherche de nouveaux agents antiviraux. 241
1.1. Virus de la vaccine 242
1.2. Molécules actives spécifiquement à l'enzyme hTMPK 242
1.3. Production et la caractérisation de l'enzyme TMPK virale (vvTMPK) 243
1.3.1. Test d'activité enzymatique : étude de Michaelis-Menten 243
2. Etude de la spécificité par analyse en mode off-line par FIA-HRMS 245
3. Etude de la spécificité par analyse on-line par FAC-HRMS 249
4. Etudes complémentaires : analyse d'un mélange de substrat en FAC-HRMS 255
CONCLUSIONS 257
REFERENCES 259
TABLE DES FIGURES 262
TABLE DES TABLEAUX 266

PARTIE I. Caractérisation de l'activité enzymatique

1. Contexte de l'étude

1.1. Objectifs de l'étude

Le travail présenté dans ce chapitre a été initié par une collaboration inter-équipes du laboratoire entre l'équipe « Hétérocycles, Nucléosides et Agents d'Imagerie » et l'équipe « Stratégies Analytiques, Affinités et Bioactifs ».

Le domaine de recherche de l'équipe de synthèse s'inscrit dans le contexte des thérapies antivirales pour le développement et la synthèse de nouveaux agents antiviraux de types phosphonates acycliques.

Les travaux de cette collaboration se sont donc focalisés sur la mise en place d'une technique basée en spectrométrie de masse permettant une sélection rapide et fiable des molécules les plus prometteuses. Cette étude est étroitement liée à la capacité d'un agent antiviral à être multi-phosphorylé par voie enzymatique. C'est pourquoi, un développement méthodologique de suivi de cascade de phosphorylations via une méthodologie on-line, par Chromatographie d'Affinité Frontale couplée à un spectromètre de masse haute résolution (FAC-HRMS) a été réalisé pour répondre à cette problématique. En effet, cette méthodologie aura pour objectif de suivre, par une mesure directe, les étapes de phosphorylation et en particulier le passage d'un nucléotide monophosphate Nu-MP au nucléotide triphosphate Nu-TP. Pour ce faire, une approche d'immobilisation des différentes enzymes clés (hTMPK et hNDPK) a été réalisée afin de fabriquer des bioréacteurs pour l'approche de Chromatographie d'Affinité Frontale. Néanmoins, ce type de développement méthodologique par FAC-HRMS nécessite une étude intermédiaire permettant d'évaluer :

- l'influence de l'immobilisation sur l'activité des enzymes,
- la faisabilité de la cascade enzymatique.

Ce chapitre sera divisé en trois parties. Une première partie, réalisée en off-line par FIA-HRMS, sera dédiée à l'étude de l'influence d'une immobilisation enzymatique à travers la comparaison des constantes d'activités entre les enzymes libres et celles immobilisées.

A l'issue de ces résultats, la deuxième partie portera sur l'étude de faisabilité de la cascade en conditions statiques par utilisation d'enzymes immobilisées. Bien que le développement par FAC-HRMS soit concentré sur deux étapes de phosphorylation (passage du Nu-MP au Nu-TP), la cascade a été ouverte à la première étape de conversion en mode FIA.

Par la suite, la mise en place de l'approche d'intérêt de suivi de la cascade enzymatique en mode on-line par FAC-HRMS sera présentée. Pour mener à bien ces différents développements off-line et on-

line, les études de phosphorylations ont toutes été réalisées avec l'endogène naturel (comme élaboration de la preuve de concept).

Finalement, dans la troisième partie de ce chapitre, ces méthodologies seront appliquées et évaluées avec l'étude de conversion de nucléotides de type phosphonates acycliques synthétisés par l'équipe «Hétérocycles, nucléosides et agents d'imagerie».

C'est pourquoi nous présenterons de façon succincte le rôle ainsi que la voie d'activation d'analogues et des enzymes impliquées dans notre étude dans la partie ci-dessous.

1.2. Analogues de nucléosides comme agents antiviraux

Les nucléosides et leurs analogues présentent un grand intérêt dans les traitements de différentes maladies humaines. Ils sont spécialement développés dans le cadre de thérapies antivirales pour l'étude d'infections :

- du virus de l'herpès simplex (HSV) [1],
- du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [2],
- du virus de l'hépatite B (HBV) [3],
- du virus de l'hépatite C (HCV) [4],
- cytomegalo (CMV) [5].

Depuis les années 1960, de nombreux dérivés de nucléosides ont été développés comme agents antiviraux [6]. Prédire et synthétiser des ligands présentant une forte affinité à une enzyme se révèlent être de véritables enjeux. Parmi les différentes méthodologies de synthèse, de nouveaux analogues de nucléosides actifs ont été étudiés à travers différentes modulations : de la base et du sucre, par modulation de la liaison entre le sucre et le groupement phosphate ainsi que par protection des groupements polaires, selon le schéma présenté en Figure III-1 [7]. Ces stratégies ont permis d'optimiser la biodisponibilité des molécules ainsi que les interactions enzymes-ligands.

Deux grandes classes d'analogues de nucléosides/nucléotides se sont révélées biologiquement intéressantes comme agents antiviraux : les analogues de nucléosides et les nucléosides phosphonates acycliques. En vue d'une meilleure compréhension de l'utilité de synthèse de ces pro-drogues, nous expliquerons succinctement leur voie d'activation avant d'introduire les deux familles d'antiviraux rencontrées dans ce chapitre.

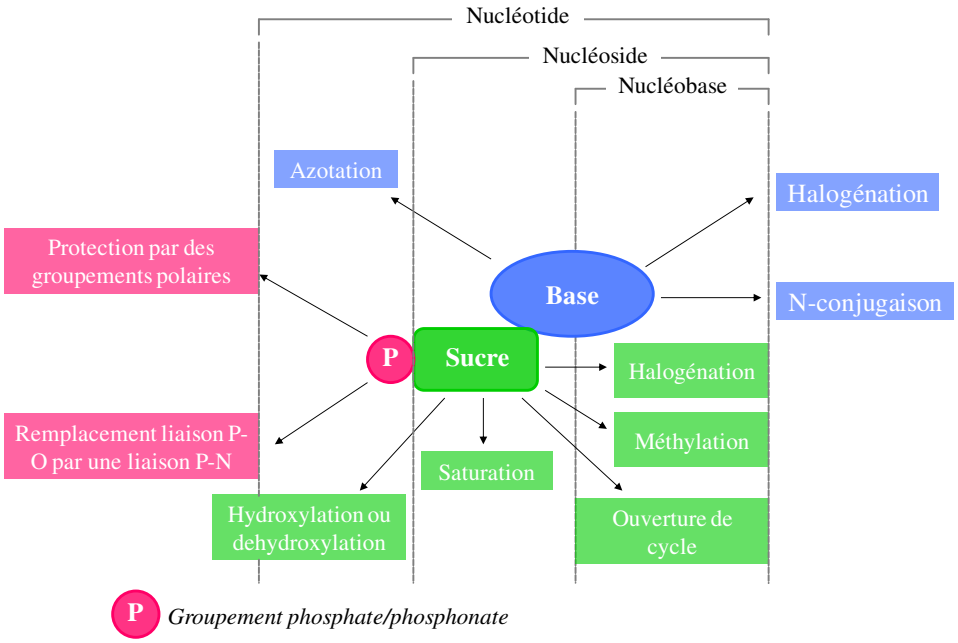


Figure III-1 - Structure générale et modifications chimiques des analogues de nucléosides/nucléotides pour la recherche de nouvelles molécules antivirales. Figure inspirée de la publication « Nature reviews drug discovery, 2013, 447-464 ».

1.3. Voie d'activation des analogues de nucléosides

Lors de l'étape de réplication de l'ADN, les formes actives, généralement les analogues de nucléotides triphosphatés, s'incorporent dans l'ADN viral pour agir comme terminaison de chaîne. La polymérase virale, dont le rôle est d'assurer la synthèse d'un brin d'ADN ou d'ARN, est inhibée par ce terminateur de chaine triphosphaté. Cette inhibition engendre un arrêt de la synthèse d'ADN viral et donc une diminution de la prolifération du virus dans l'organisme. Les formes actives triphosphatées ne peuvent pas être administrées directement sous leur forme active de par leur forte polarité (molécule chargée négativement) responsable d'un passage difficile de la membrane cellulaire et donc d'une faible biodisponibilité. Ces molécules sont alors délivrées dans l'organisme sous forme de pro-drogue (nucléoside ou nucléotide fonctionnalisé : molécule non chargée) qui sera alors métabolisée au sein de la cellule. A l'intérieur de celle-ci, ces pro-drogues sont successivement phosphorylées par différentes kinases cellulaires et/ou virales pour être converties sous la forme, mono-, di- puis tri-phosphate comme présenté en Figure III-2 [8-11].

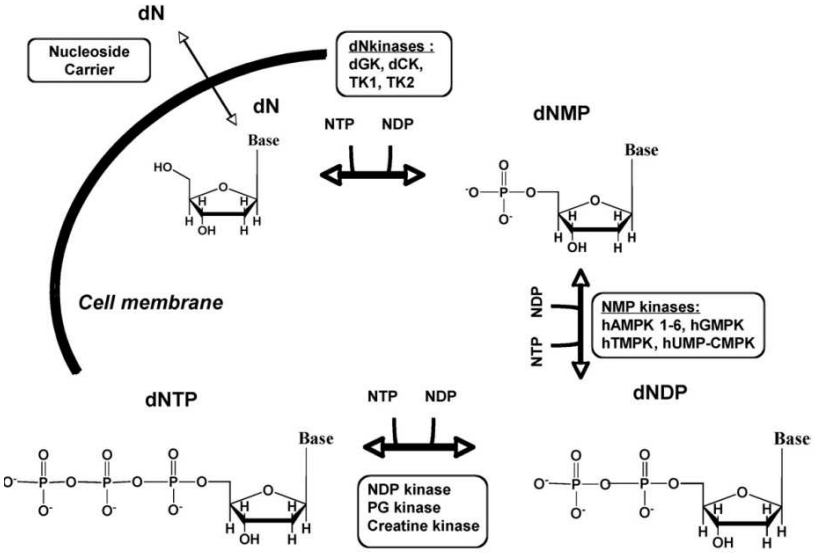


Figure III-2 - Voie de phosphorylation des nucléosides naturels chez l'Homme. Antiviral Research, 2010, 101-120. dN : nucléoside, dNMP : nucléoside monophosphate, dNDP : nucléoside diphosphate et dTTP : nucléoside triphosphate.

L'ensemble des kinases, présentées en Figure III-2, catalyse le transfert d'un groupement phosphate d'un groupement donneur, souvent le γ-phosphate de l'ATP, vers un accepteur, soit le groupement 5'-OH d'un nucléoside ou le groupement α- ou β-phosphate d'un nucléotide (Figure III-3).

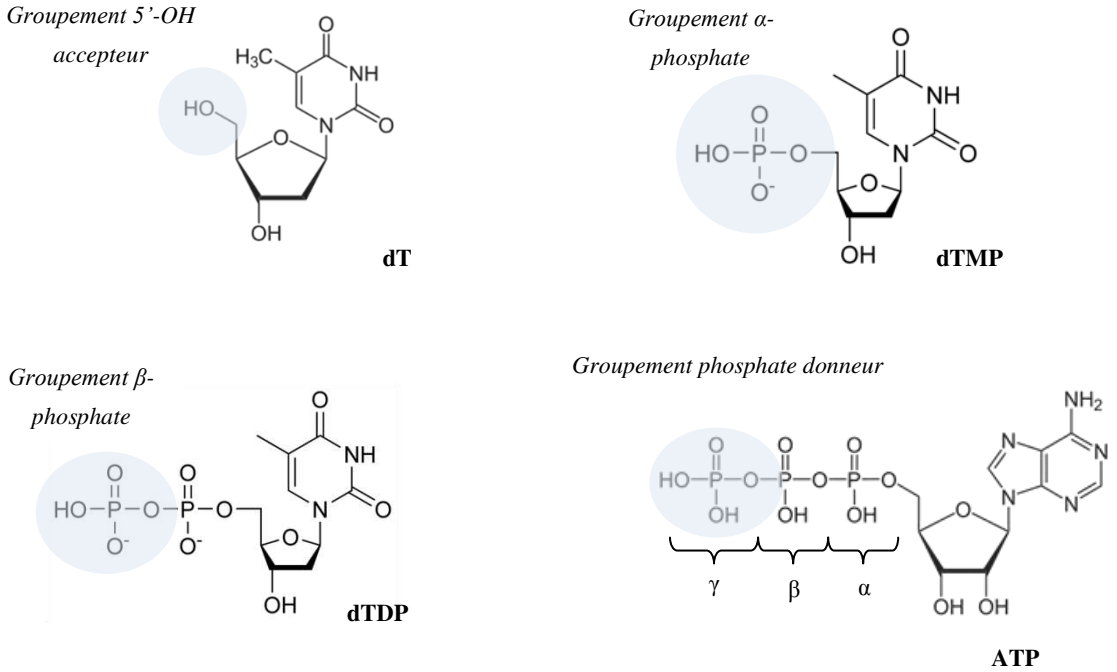


Figure III-3- Formules des substrats thymidine, thymidine monophosphate et thymidine diphosphate. Groupements accepteurs : 5'-OH du dT ou α- ou β-phosphate du dTMP et dTDP Formule du phosphodonneur ATP. Groupement donneur : γ-phosphate.

Par conséquent, l'activation de ces molécules pro-drogues repose sur leur capacité de phosphorylation et donc sur l'anabolisme des précurseurs nucléosidiques/nucléotidiques. Les trois étapes de phosphorylations sont assurées par trois grandes catégories de kinases cellulaires, essentielles pour la réplication in-vivo de l'ADN :

- Les désoxynucléosides kinases (dNKs) assurent le passage du nucléoside (Nu) au nucléotide monophosphate (Nu-MP),
- Les nucléosides monophosphates kinases (NMPKs) catalysent la conversion des formes monophosphatées en diphosphatées (Nu-MP en Nu-DP),
- Les nucléosides diphosphates kinases (NDPKs), phosphoglycérate kinases PGK et la créatine kinase CK pour la dernière étape de phosphorylation (Nu-DP en Nu-TP).

Ces enzymes présentent des spécificités plus ou moins prononcées de substrats selon les types de nucléotides. Ainsi, comme présenté dans le Tableau III-1, les dNKs et les NMPKs, assurant les deux premières étapes de phosphorylation, présentent des spécificités liées à la base. Les enzymes de la 3ème étape de phosphorylation présentent une plus large reconnaissance de substrats [12]. Les deux premières étapes de phosphorylation sont décrites dans la littérature comme étant les étapes limitantes du cycle d'activation [13, 14]. Les enzymes de la famille des dNKs, responsables de la première étape de la phosphorylation, se sont révélées être des catalyseurs médiocres de par leur haute spécificité de substrat, par une faible énantiosélectivité ainsi que des faibles efficacités catalytiques [12, 15]. La deuxième étape de conversion est également présentée comme une étape limitante du fait de la spécificité de substrat des enzymes de la famille NMPKs.

Ainsi, la synthèse de nouveaux agents antiviraux révèle de multiples challenges, à savoir la synthèse de molécules :

- perméables à la membrane cellulaire,
- **présentant une affinité pour trois familles de kinases et donnant lieu à la forme active triphosphatée,**
- présentant une activité d'inhibition de l'ARN polymérase.

Au regard de ces différents aspects, notre travail collaboratif s'est focalisé sur le développement d'une méthode directe, rapide et fiable permettant d'évaluer la conversion de différents analogues synthétisés. Cette étude permettra de faciliter l'identification des molécules présentant les meilleurs potentiels de phosphorylation et d'acquérir une meilleure compréhension des voies d'activation.

Les résultats des tests in-vivo sur les molécules synthétisées par l'équipe « Hétérocycles, nucléosides et agents d'imagerie » permettent de définir leur capacité inhibitrice de l'ARN polymérase. Une molécule présentant une inhibition est, par conséquent, di- ou triphosphorylée avec succès. Concernant les molécules ne présentant aucune inhibition, il est cependant difficile de conclure quant à l'absence d'une étape de phosphorylation ou à la faible capacité inhibitrice de la forme triphosphatée. Ainsi, une décomposition des différentes étapes de phosphorylation apporterait une meilleure compréhension des mécanismes d'activations de ces molécules.

Etape de phosphorylation	Nombre EC	Enzyme	Nom	Substrat naturel	Location sub-cellulaire	Réf.
		dN →		dN P		
Désoxynucléosides kinases dNK	EC 2.7.1.21	TK1	thymidine kinase 1	dT, dU	Cytosol	[16]
	EC 2.7.1.21	TK2	thymidine kinase 2	dT, dU, dC	Mitochondrie	[17]
	EC 2.7.1.113	dGK	deoxyguanosine kinase	dG, dA	Mitochondrie	[18]
	EC 2.7.1.74	dCK	deoxycytidine kinase	dC, dG, dA	Cytosol	[19]
		dN P →		dN P P		
Monophosphate kinases NMPK	EC 2.7.4.3	AMPK 1, 2	adenylate kinase 1, 2	(d)AMP	(1) Cytosol (2) Mitochondrie	[20]
	EC 2.7.4.8	GMPK	guanylate kinase	(d)GMP	Cytosol	[21]
	EC 2.7.4.9	TMPK	thymidylate kinase	TMP dUMP	Cytosol	[22]
	EC 2.7.4.14	UMP-CMPK	uridylatecytidylate kinase	(d)UMP (d)CMP	Cytosol	[23]
		dN P P →		dN P P P		
Nucléosides diphosphates kinases	EC 2.7.4.6	NDPK A	NDP kinase-A	(d)NDP	Cytosol Noyau	[24]
		NDPK B	NDP kinase-B	(d)NDP	Noyau	
Phosphoglycérate kinase	EC 2.7.2.3	PGK1 PGK2	Phosphoglycerate kinase	ADP, l-CDP	Cytosol	[25]
Créatine kinase	EC 2.7.3.2	CK	Creatine kinase	ADP	Cytosol	[26]

Tableau III-1- Enzymes kinases réparties dans les trois familles dNKs, NMPKs et NDPKs : spécificité de substrat (selon le type de base) et leur location dans la cellule.

Deux grandes catégories d'analogues de nucléosides ont prouvé leur efficacité comme **agents antiviraux**. Il s'agit des analogues de nucléosides et les **nucléosides phosphonates acycliques**, (famille moléculaire synthétisée par l'équipe « Hétérocycles, nucléosides et agents d'imagerie ». Nous présenterons ci-dessous ces deux catégories.

1.3.1. Analogues de nucléosides

Différents types d'analogues de nucléosides de type guanosine, thymidine, cytosine et adénosine, tels que ceux présentés dans le Tableau III-2 ont été approuvés par l'agence Food and Drug Administration (FDA) pour leur fort potentiel dans le traitement de maladies virales [27]. L'obtention d'une forme active antivirale de ces analogues de nucléosides est atteinte selon les trois étapes de phosphorylations discutées précédemment.

Des molécules dérivées de ces agents antiviraux ont été développées afin d'en améliorer leur biodisponibilité dans l'organisme. De par leur nature polaire, la pénétration de ces molécules au sein de la cellule est limitée. Ainsi, des groupements protecteurs non chargés ont été additionnés dans le but de masquer les charges des molécules. Une fois à l'intérieur de la cellule, ces molécules sont ensuite métabolisées par l'organisme pour retrouver leur forme pro-active. Cette protection a permis d'augmenter l'efficacité, la biodisponibilité et de faciliter l'ingestion orale de ces composés. Ainsi, la valacyclovir, forme estérifiée de l'acyclovir, présentée dans Tableau III-3 a permis une augmentation de la biodisponibilité orale de 30% à 40%.

1.3.2. Nucléosides phosphonates acycliques

Cependant, vers la fin des années 1970, à la suite d'un symposium sur les nucléosides synthétiques et polynucléotides à l'Institut Max Planck, une collaboration entre Erik De Clerq (Regate Institute, Leuven, Belgique) et Antonin Holy (Prague, République Tchèque) a marqué le début de la recherche d'une nouvelle classe d'antiviraux : les nucléosides phosphonates acycliques [6]. Certains analogues de nucléosides présentent une première étape de phosphorylation par les dNKs très limitée. De ce fait, l'objectif de cette collaboration a été de développer des dérivés de phosphonates dont l'activité ne nécessite que deux étapes de phosphorylations. En outre, cette classe de molécules doit présenter certaines caractéristiques comme :

- une isopolarité (pour faciliter le passage de la membrane cellulaire),
- une stabilité au sein du milieu cellulaire (notamment aux hydrolases),
- une isostérie pour le maintien de l'activité antivirale.

Des phosphonates comportant un groupement ester (=P-O-C) ont été remplacés par une liaison ether phosphonométhyle (=P-C-O). Ces molécules présentent une isostérie de par l'inversion de l'emplacement de deux atomes (maintien de l'activité) avec une liaison P-C plus stable aux hydrolases cellulaires que la liaison P-O. Cette nouvelle classe d'agents antiviraux nommées ANPs est devenue

l'une des classes d'agents antiviraux les plus importantes. Différents agents ont été approuvés par la FDA comme l'adéfovir (PMEA), le cidofovir (HPMPC) ou le ténofovir (HPMPA) présentés dans le Tableau III-2. La présence de charge négative ne permet pas la pénétration des phosphonates dans la cellule. Une vectorisation, similaire à celle réalisée pour les analogues de nucléosides, a été développée afin d'améliorer leur biodisponibilité. Ainsi, des formes protégées ont été synthétisées comme l'adéfovir dipivoxil (HBV, pro-drogue de l'adéfovir) ou le ténofovir disoproxil furamate (TDF, pro-drogue du ténofovir).

Comme mentionné précédemment, de nouveaux travaux de recherche de l'équipe « Hétérocycles, nucléosides et agents d'imagerie » ont été dédiés à la synthèse de nouveaux phosphonates acycliques. Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer le potentiel de la spectrométrie de masse dans le cadre d'un développement méthodologique permettant la valorisation et/ou la recherche de méthodes permettant une identification rapide de l'efficacité de phosphorylation des ANPs. En effet, cette méthodologie doit permettre une visualisation du potentiel de phosphorylation de ces nucléosides phosphonates (Nu-MP) de synthèse. Bien que l'objectif de l'étude réside dans la valorisation des nucléosides phosphonates acycliques, le panel de la méthodologie a été ouvert à l'étude de nucléosides, et de ce fait, à la première étape de phosphorylation. Ce développement de suivi on-line de la cascade enzymatique requiert une étape d'immobilisation des enzymes cibles. C'est pourquoi il a été nécessaire d'évaluer, dans une étude intermédiaire, l'influence de cette immobilisation sur l'activité des différentes enzymes. Avant de présenter les résultats de cette étude, nous présenterons succinctement chaque enzyme utilisée dans le cadre de ces travaux, puis nous exposerons un bref descriptif des approches de caractérisations employées.

Type	Nom commun	Date mise en vente	Formules	Maladies	Réf.
Analogues Thymidine	Brivudine (BVDU)	1979		Herpès	[28]
	Zidovudine (AZT)	1987		HIV-1	[29]
	Stavudine (d4T)	1994		HIV-1	[30]
	Idoxuridine (IDU)	< 1982		Herpès CMV	[31]

Nucléoside acyclique	Acyclovir (ACV)	1982		Herpès CMV	[32]
	Ganciclovir (DHPG)	1994		Herpès CMV	[33]
Nucléoside phosphonate acyclique	Adéfovir (PMEA)	2003		Hépatite B	[34]
	Cidofovir (HPMPC)	1996		CMV, HSV-1, HSV-2	[6]

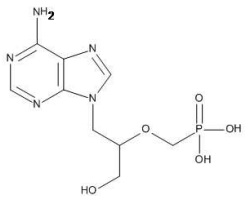
	Ténofovir((s)-HPMPA)			HIV, hépatite B	[35]

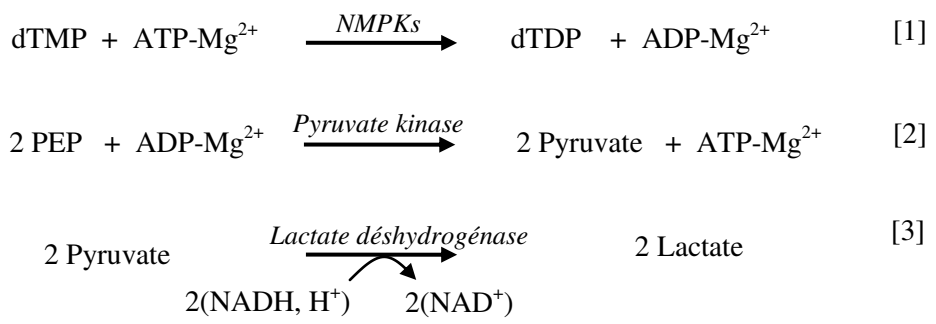
Tableau III-2- Exemples d'agents antiviraux approuvés par la FDA : date de mise sur le marché et maladies ciblées.

Nom commun	Formule	Nom commun pro-drogue	Formule	Réf.
Acyclovir (ACV)		Valacyclovir		[36]
Penciclovir		Famciclovir		[37]
Adéfovir		Adéfovir dipivoxil		[38]
Ténofovir		Ténofovir disoproxil furamate		[39]

Tableau III-3- Exemples de pro-drogue, protection des groupements polaires.

1.4. Test d'activité des kinases par spectrophotométrie : « détection indirecte »

Classiquement, l'évaluation de l'activité enzymatique des kinases est réalisée par spectrophotométrie, en détection indirecte, selon le mécanisme décrit en Figure III-4.



dTMP : désoxythymidine monophosphate
dTDP : désoxythymidine diphosphate
dTTP : désoxythymidine triphosphate
ATP : adénosine triphopshate
ADP : adénosine diphopshate
Mg^{2+} : ion magnesium
PEP : phosphoenolpyruvate
NAD/NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

Figure III-4 - Test tri-enzymatique spectrophotométrique utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique de kinases.

Le produit formé est quantifié par couplage de l'ADP produit à la disparition du NADH, par l'intermédiaire d'une réaction tri-enzymatique [40, 41] selon le protocole montré sur la Figure III-4. La présence d'ion magnésium Mg^{2+} est indispensable pour l'étape de phosphorylation catalysée par les enzymes kinases. Cet ion permet, par chélation, d'écranter les charges électriques négatives du ligand ATP, favorisant ainsi la substitution nucléophile et donc le transfert d'un groupement phosphate. La cinétique de réaction est réalisée à 340 nm afin de suivre la disparition du co-facteur NADH de la dernière réaction du système tri-enzymatique.

Ce test est fréquemment utilisé pour la caractérisation d'activité des kinases grâce à ses nombreux avantages :

- rapidité de mesure de l'absorbance,
- possibilité d'analyses simultanées (gain de temps),
- dimension quantitative,
- protocole universel, indépendant du type de nucléoside/nucléotide analysé.

Bien qu'il présente de nombreux avantages, ce dernier ne permet qu'une mesure indirecte d'activité d'une seule étape de phosphorylation, par détection d'apparition d'un co-facteur issu de la combinaison de trois réactions enzymatiques (réaction [1]). Dans le cas du suivi de plusieurs étapes de phosphorylations successives (passage du Nu-DP au Nu-TP), ce test tri-enzymatique ne permet pas

d'observer spécifiquement chaque produit de réactions issu des étapes de phosphorylations. Ce test apparaît alors comme incompatible avec une étude de cascade enzymatique.

Remarque : les tests d'activités et de caractérisations des enzymes kinases sont réalisés avec de fortes concentrations en phosphodonneur (ATP) et en agent chélatant ($MgCl_2$) de l'ordre du mM. Cette observation sera importante dans le développement de méthodologies de suivi de phosphorylation par spectrométrie de masse. Ces concentrations devront être optimisées afin d'être compatibles avec ce type de détecteur.

1.5. Exemples d'autres méthodologies de mesure d'activité : « détection directe »

De nombreuses méthodologies ont été développées pour l'étude voire la caractérisation enzymatique des kinases par suivi direct du produit de phosphorylation. Les techniques les plus couramment décrites dans la littérature englobent les approches radioisotopiques, de chromatographie en phase liquide ainsi que d'électrophorèse capillaire. L'ensemble de ces méthodologies, basées sur des techniques séparatives, présente l'avantage d'une quantification directe du produit de la réaction enzymatique. Le Tableau III-4 présente des exemples non exhaustifs d'études de phosphorylations par quantification directe du produit de la réaction. Une brève description du principe de ces méthodes est proposée ci-dessous.

1.5.1. Tests radiométriques

Les tests radiométriques, basés sur l'analyse de molécules marquées, ont été développés sous différentes approches. Parmi ces dernières, certains travaux sont basés (i) sur le marquage du substrat de réaction alors que d'autres (ii) sur le marquage du groupement γ-phosphate du phosphodonneur.

(i) Dans le premier cas, l'activité est déterminée par mesure de la formation de nucléotides provenant du substrat respectif marqué. Ce marquage est dépendant du type de nucléosides et de nucléotides analysés (^{14}C, ^{3}H). Une étude récente de 2014, réalisée par Naguib et al., a permis la caractérisation d'activité de trois kinases (déoxyriboside kinase, uridine kinase, cytidine kinase) par détermination des paramètres cinétiques K_M et V_{max}. Ces caractérisations ont été appliquées à l'étude de compétition de différents [^{14}C] nucléosides ([^{14}C] (uridine, cytidine, 2'-deoxycytidine, 2'-deoxyuridine, thymidine)) [42]. La quantification des produits formés, nécessite avec ce type de marquage, une séparation des produits et des substrats. Ces procédés de séparations sont réalisés selon différentes méthodologies comme la séparation sur colonne [43], la séparation par TLC [42] ou par une extraction liquide-liquide [44]. Les spots ou solutions d'intérêts sont ensuite analysés par scintillation pour quantifier le produit formé.

(ii) La seconde approche consiste en l'utilisation de phosphodonneur marqué. Le phosphodonneur ATP marqué γ-[^{32}P]-ATP [45] réagit avec le substrat en lui fournissant le groupement

phosphate marqué. Le produit phosphaté marqué peut être détecté et quantifié par un détecteur à scintillation.

Ces tests radioisotopiques permettent une mesure directe et quantitative du produit de réaction. Cependant, dans le cas de nucléoside/nucléotide marqués dont la synthèse peut se révéler difficile, d'autres méthodologies séparatives comme la chromatographie en phase liquide ou l'électrophorèse capillaire ont permis d'augmenter le panel analytique pour le suivi direct de phosphorylation.

1.5.2. Chromatographie en phase liquide

Des approches séparatives en HPLC sont également privilégiées pour la quantification et la caractérisation enzymatique de par la possibilité de dosage direct du produit de conversion [46-48]. Cette technique chromatographique, couplée à la spectrométrie de masse ou à une détection UV (HPLC/MS/MS, HPLC-UV) a été développée pour la quantification d'activité et la caractérisation enzymatique de kinases (détermination des paramètres cinétiques K_M, V_{max} et k_{cat}) [49-51]. Cette technique a notamment permis une étude d'efficacité de l'activité de l'enzyme hTMPK en fonction de l'utilisation de différents agents de chélation (Mg^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}). Un gain d'efficacité enzymatique par utilisation des ions Mg^{2+}et Co^{2+} à une concentration de l'ordre du mM a été observé.

D'autres techniques, telles que l'électrophorèse capillaire, sont également appréciées pour le suivi de phosphorylation catalysée par les enzymes kinases.

1.5.3. Electrophorèse capillaire

Des méthodologies d'électrophorèse capillaire couplées à une détection UV ou en spectrométrie de masse ont également été développées pour le suivi de conversion catalysée par des enzymes kinases. Cette méthodologie a été développée selon deux procédés par l'étude off-line et la réaction in-situ dans le capillaire.

- Les études off-line réalisées en électrophorèse capillaire ont permis le suivi qualitatif d'une étape de phosphorylation [52, 53], la quantification directe [54] et indirecte (par mesure indirecte de l'ADP formé) du produit formé [55] et la caractérisation d'activité enzymatique (détermination des paramètres cinétiques) [56]. Une étude a également permis d'étudier l'influence de la concentration en agent chélatant $MgCl_2$ sur l'efficacité de la réaction enzymatique catalysée par une thymidine kinase (TK). Les résultats ont mis en avant une efficacité optimale de conversion obtenue à partir de 5 mM en $MgCl_2$ [56].
- La seconde approche consiste à réaliser la réaction enzymatique dans le capillaire alors, utilisé comme nano-réacteur et capillaire de séparation. Cette méthodologie a permis le suivi d'une étape de phosphorylation [57, 58].

Les méthodes séparatives présentées ci-dessus, couplées à une détection UV, permettent une quantification fiable et directe du produit de la réaction enzymatique. Cependant, dans le contexte d'un suivi des étapes de phosphorylations de divers composés, il nous a semblé intéressant de s'abstenir d'une approche séparative, au profit d'un détecteur spécifique tel que le spectromètre de masse. Ce type de détection permettra d'obtenir une méthode rapide, sensible et spécifique.

Type d'approche	Réaction enzymatique		Séparation	Détection	Réf.
	Enzymes	Substrats			
TLC, radioisotopique	Pyruvate kinase	[^{14}C]Phosphoenolpyruvate	TCL (cellulose) Colonne HA-ultragel	Scintillation	[43]
TLC, radioisotopique	Deoxyriboside, uridine et cytidine kinases	[^{14}C]Uridine, [^{14}C]Cytidine, [14C]thymidine, [^{14}C]2'-deoxyuridine, [^{14}C]2'-deoxycytidine	TLC (silica gel)	Scintillation	[42]
Radioisotopique	Sphingosine kinase	[^{3}H]Sphingosine	Extraction liquide-liquide	Scintillation	[44]
HPLC	Thymidine kinase 1	3'-deoxy-3'-fluorothymidine	Colonne aquasil C18	ESI-MS	[49]
HPLC	Thymidylate kinase	Désoxythymidine monophopshate, 5-bromo-2'-deoxyuridine (5BrdU), 5-CldU, AZT	Colonne sephasil C18	UV (260 nm)	[50]
HPLC	Nucléoside diphosphate kinase	Désoxyadénosine diphosphate	Colonne échangeuse d'ions Partisil SAX	UV (254 nm)	[51]
CE	Thymidine kinase	Thymidine, ACV, GCV, BVDU	Capillaire de silice recouvert de de polyacrylamine	UV (210 nm)	[56]
CE	Thymidine kinase, thymidylate kinase	Thymidine, thymidine monophosphate	Capillaire de silice nue	UV (267 nm)	[54]

Tableau III-4- Exemples de techniques directes et indirectes pour la caractérisation enzymatique des enzymes kinases.

1.6. Description des enzymes étudiées dans ce travail

Suite à la présentation non exhaustive des principales méthodologies directes et indirectes pour le suivi et/ou la caractérisation d'activité des enzymes kinases, nous présenterons succinctement les trois enzymes sélectionnées dans le cadre de ces travaux. Une enzyme de chacune des familles dNKs, NMPKs, NDPKs a été sélectionnée à savoir :

- la thymidine kinase humaine 1 (**hTK1**, famille dNKs)
- la thymidylate kinase humaine (**hTMPK**, famille NMPKs)
- la nucléoside diphosphate kinase humaine (**hNDPK**, famille NDPKs).

1.6.1. Thymidine Kinase 1 humaine (hTK1)

L'enzyme hTK1 assure la première étape de phosphorylation selon l'équation de réaction présentée en Figure III-5. Elle catalyse, en présence de sels chélatant (Mg^{2+}), la conversion de

nucléosides en nucléotides monophosphates par transfert du groupement γ-phosphate d'un phosphodonneur tel que l'ATP.

$$\text{Nu} + \text{ATP} \underset{}{\overset{\text{hTK1, MgCl}_2}{\rightleftharpoons}} \text{Nu-MP} + \text{ADP}$$

Figure III-5 - Réaction de conversion d'un nucléoside catalysée par l'enzyme hTK1via le transfert d'un groupement γ-phosphate de l'ATP.

Cette enzyme est un tétramère, contrairement aux autres dNKS (dimères), dont chaque sous-unité est constituée de deux domaines : 1 grand domaine α/β et un domaine plus restreint contenant un ion zinc. Le site actif de cette enzyme est placé entre ces deux domaines [59].

- Domaine α/β : contient 6 feuillets β parallèles compris entre une hélice α et une boucle flexible d'une part et trois hélices α plus courtes d'autre part.
- Domaine restreint : contient une structure en forme de lasso qui recouvre le site du déoxynucléoside. Ce domaine contient également deux rubans perpendiculaires connectés par l'ion métallique Zn^{2+}.

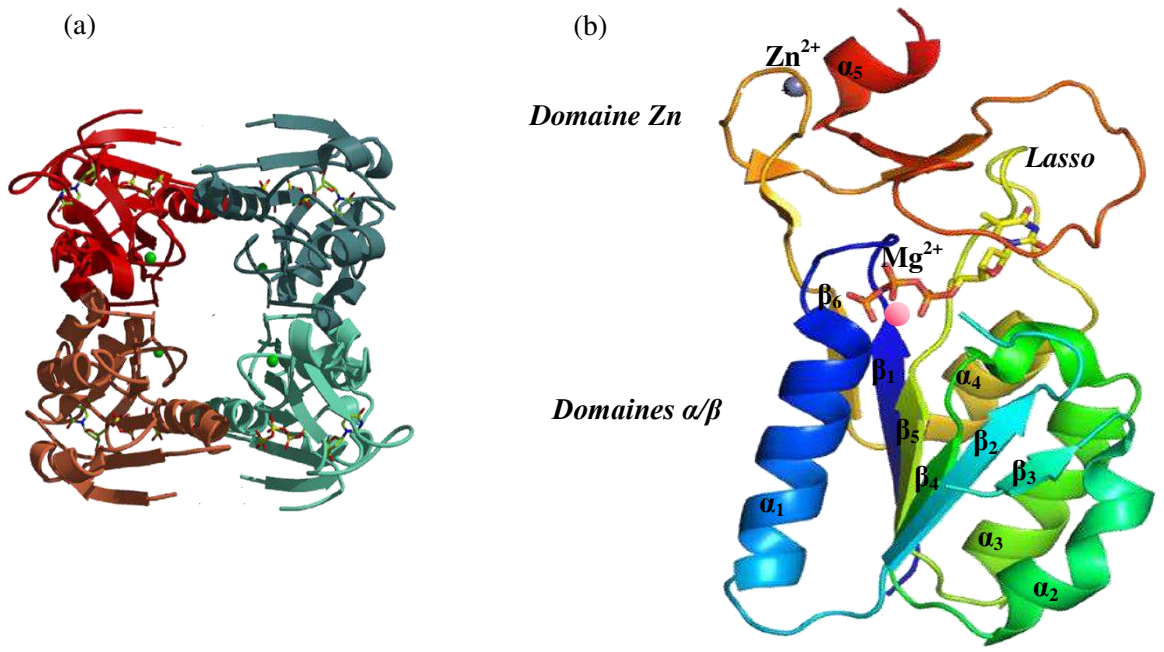


Figure III-6- (a) Structure tridimensionnelle de l'enzyme hTK1 (tétramère) et (b) structure secondaire : sous-unité du tétramère. J. Mol. Biol, 2007, 369, 129-11.

Lors de la conversion du nucléoside en nucléotide monophosphate, le donneur (ATP) et l'accepteur (nucléoside) s'attachent à deux sites distincts de l'enzyme de manière désordonnée (sans ordre d'attachement). L'ATP se lie à un domaine exposé, compris dans le domaine α/β, tandis que les déoxynucléosides se lient à un site moins accessible, dans un creux entre les domaines α/β et lasso. Le transfert du groupement phosphate est initié quand l'oxygène nucléophile du groupement 5'-OH du motif sucre attaque l'atome γ-phosphore du donneur.

Comme représenté en Figure III-7, le processus prend place « en-ligne », afin que le donneur et l'accepteur soient correctement positionnés. Cette réaction implique un changement conformationnel de l'enzyme et du groupement γ-phosphate passant d'une conformation tétraédrique à une conformation trigonale planaire [12].

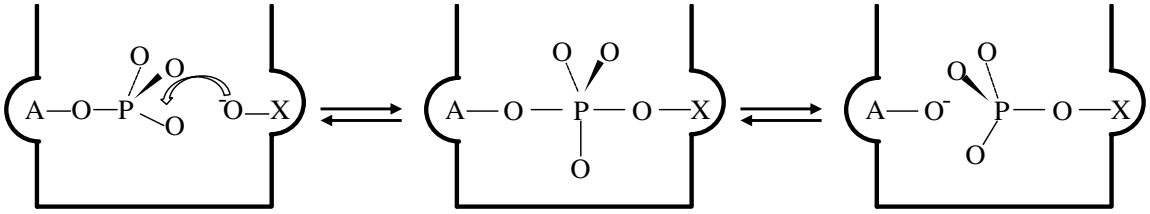


Figure III-7- Processus « en-ligne » du transfert du groupement γ-phosphate de l'ATP au groupement 5'-OH d'un nucléoside catalysé par l'enzyme hTK1.Figure inspirée de la thèse du Docteur Dimitri TOPALIS.

<u>Remarque</u> : il est important de noter que les enzymes dNKs sont généralement inhibées par les produits finaux dNTPs. Ces derniers jouent un rôle de bi-substrat par interactions entre les sites liant aux déoxynucléosides et au phosphodonneur [59]. Dans le cadre de l'étude de la cascade de phosphorylation d'un nucléoside en nucléotide triphosphate, il sera important de veiller à ne pas placer l'enzyme hTK1 en présence de dNTPs. Dans ce contexte, la méthodologie de l'immobilisation d'enzyme reflète un intérêt de plus pour le suivi de cascade de phosphorylation. Cette immobilisation permettra de réaliser les réactions successives par retrait de chaque enzyme avant la réaction suivante et donc d'éviter tout risque de réaction compétitive d'inhibition.

1.6.2. Thymidylate Monophosphate Kinase humaine (hTMPK)

L'enzyme hTMPK intervient dans la deuxième étape de phosphorylation. Elle assure la conversion des nucléotides monophosphates en nucléotides diphosphates selon le schéma de réaction présenté en Figure III-8. Cette enzyme est la cible principale de nos collaborateurs pour l'étude de la phosphorylation de phosphonates acycliques.

$$\text{Nu-MP} + \text{ATP} \underset{}{\overset{\text{hTMPK, } MgCl_2}{\rightleftharpoons}} \text{Nu-DP} + \text{ADP}$$

Figure III-8 - Réaction de conversion d'un nucléotide monophosphate catalysée par l'enzyme hTMPK via le transfert d'un groupement γ-phosphate de l'ATP.

<u>Remarque</u> : dans le cadre de ce projet, les enzymes hTMPK et vvTMPK ont été produites et purifiées à partir des plasmides respectifs au sein de notre laboratoire, en collaboration avec l'équipe « GlycoBio&Chimie » du Pr Richard Daniellou et du MCU Pierre Lafite.

La famille des NMP kinases regroupe quatre enzymes différenciées selon leur préférence et spécificité de base du substrat. La thymidylate kinase (TMPK), montre une spécificité pour les nucléotides analogues de thymidine et d'uridine. Cette enzyme, de structure homodimérique, présente deux sous-unités constituées d'un domaine CORE central. Composé de 5 feuillets β parallèles entourés de 9

hélices α, le domaine CORE contient trois domaines principaux essentiels à l'activité enzymatique [12, 22, 60, 61] :

- P-loop : cette boucle permet de lier et de positionner les groupements α- et β-phosphates du phosphodonneur (ATP) et d'interagir avec le groupement phosphate du substrat.
- Domaine liant au substrat : boucle cruciale pour la liaison avec l'agent chélatant complexé avec l'ATP (Mg^{2+}). Elle agit semblablement à une pince pour lier le donneur (ATP) et l'accepteur (Nu-MP) via une interaction entre le groupement phosphate du substrat (Nu-MP) et le groupement γ-phosphate du phosphodonneur (ATP).
- Domaine LID **:** domaine très flexible, se refermant sur l'ATP lié à la première boucle. Ce domaine permet de générer les résidus catalytiques de la réaction enzymatique.

Ainsi, durant la réaction enzymatique, cette enzyme est soumise à de nombreux changements conformationnels en passant d'une conformation ouverte (sans présence de substrat) à une conformation fermée contenant substrat et phosphodonneur.

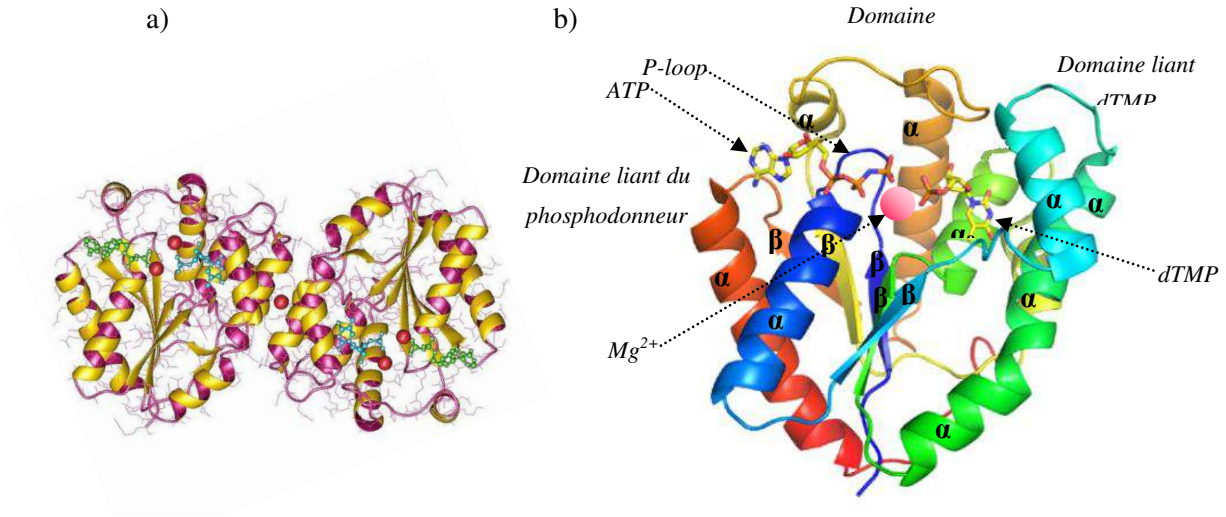


Figure III-9 - (a) Structure tridimensionnelle de la thymidylate kinase humaine et (b) structure secondaire complexée avec le substrat dTMP, le phosphodonneur ATP et l'agent chélatant (Mg^{2+}). Domaine CORE central contenant les trois domaines principaux essentiels à l'activité enzymatique : P-loop, domaine LID et le domaine liant au substrat.

1.6.3. Nucléoside Diphosphate Kinase humaine (hNDPK)

L'enzyme hNDPK assure la dernière étape de phosphorylation catalysant la conversion des nucléotides diphosphates en leur forme triphosphatée selon l'équation de réaction présentée en Figure III-10 [62, 63].

$$\text{Nu-DP} + \text{ATP} \underset{}{\overset{\text{hNDPK, } MgCl_2}{\rightleftharpoons}} \text{Nu-TP} + \text{ADP}$$

Figure III-10 - Réaction de conversion d'un nucléotide diphosphate catalysée par l'enzyme hNDPK via le transfert du groupement γ-phosphate de l'ATP.

Les Nucléosides diphosphates kinases sont des homoexamères dont les sous-unités sont constituées d'un domaine α/β comprenant 4 feuillets β anti-parallèles et 4 hélices α.

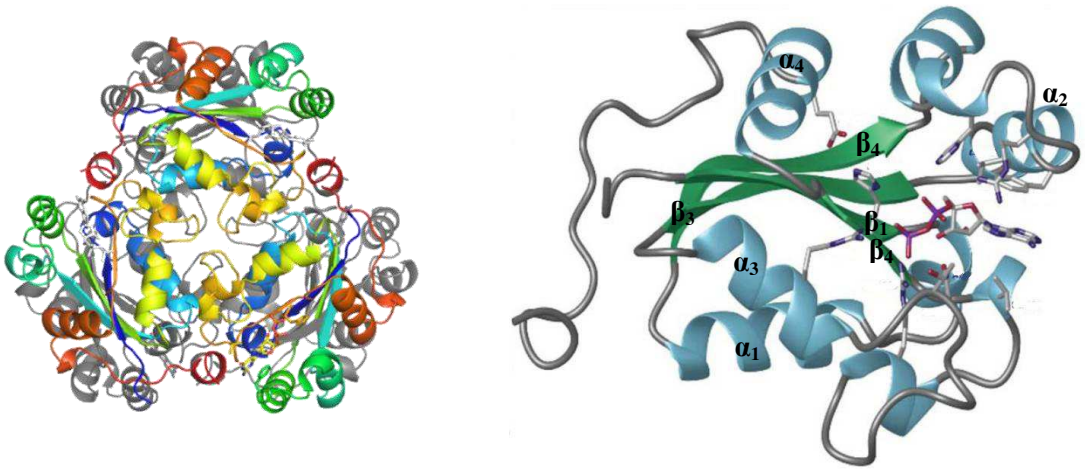


Figure III-11- (a) Structure tridimensionnelle de l'enzyme hNDPK (homoxamère) et (b) structure secondaire : sous-unité de l' homoexamère. Org Biomol Chem, 2007, 627-635.

Cette enzyme présenterait une plus large reconnaissance de substrats grâce à une réaction base non-spécifique contrairement aux enzymes des deux premières étapes de phosphorylations. Ne possédant qu'un seul site de fixation pour le donneur et l'accepteur, elle présente un mécanisme d'action peu usuel. Bien que la majorité des kinases transfère un groupement phosphate d'un donneur à un accepteur, la réaction avec la hNDPK implique deux réactions successives via un mécanisme dit « ping-pong » présenté en Figure III-12. Cette réaction engendre un intermédiaire covalent Phosphate-NDPK dans lequel l'enzyme est phosphorylée sur un groupement histidine situé à l'intérieur de la poche dite liante. Ensuite le transfert du groupement phosphate sur le substrat se réalise de manière successive.

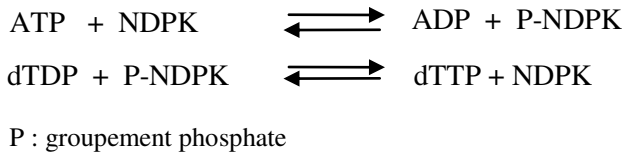


Figure III-12 - Mécanisme « ping-pong » de transfert du groupement phosphate par l'enzyme nucléoside diphosphate humaine.

Le phosphodonneur rentre dans la poche du site actif par les groupements phosphates tandis que la base se lie à une cavité à la surface de la protéine par interactions hydrophobes. Bien que la nature de la base affecte l'activité catalytique de la réaction, ce mécanisme d'action explique la plus large reconnaissance de bases de cette enzyme. La nature du sucre apparaît plus discriminante que la nature de la base. Le complexe enzyme-nucléotide est notamment stabilisé par la présence d'une liaison hydrogène entre le groupement 3'-OH du sucre et le ß-phosphate ainsi qu'avec deux résidus du site

actif (lysine Lys-16 et asparagine Asn-119). Ainsi, les nucléotides ne possédant pas ce groupement voient leur activité considérablement diminuer. Cette information sera à prendre en compte dans le cadre de l'analyse de phosphonates acycliques ne possédant pas de motif sucre.

Après clivage de l'ATP entre les groupements ß et γ-phosphate, le groupement γ-phosphate de l'ATP reste lié à l'histidine du site actif de l'enzyme pour former l'intermédiaire P-NDPK. Cet intermédiaire est stable pendant 1h en l'absence de substrat [12].

Remarque : d'après la description de l'ensemble de ces trois kinases, nous avons pu mettre en avant les différents changements conformationnels des enzymes lors de la réaction. Qu'en sera-t-il de ce changement de conformation après immobilisation covalente de l'enzyme sur support solide ? L'enzyme sera-t-elle rigidifiée pendant le processus d'immobilisation entrainant une baisse d'activité ? Afin de répondre à ces interrogations, il sera nécessaire d'évaluer l'activité des lots d'enzymes immobilisées.

Cette première partie du chapitre III a permis de situer le contexte de l'étude par description :

- des mécanismes des voies de métabolisations des analogues de nucléosides,
- des approches directes et indirectes de suivi de phosphorylation et/ou de caractérisation d'activité décrites dans la littérature,
- des enzymes impliquées dans cette étude.

Préalablement à la mise en place du suivi de phosphorylation off-line par FIA-HRMS puis on-line par FAC-HRMS, divers études préliminaires ont été entreprises, à savoir :

- la faisabilité d'un suivi de phosphorylation par détection en spectrométrie de masse,
- la caractérisation des lots d'enzymes libres et immobilisées, qui constituera le premier volet de notre développement méthodologique.

Il est important de rappeler que l'objectif de ces développements est l'analyse des nucléosides phosphonates acycliques. Notre travail s'est donc focalisé sur les conversions des Nu-MP en Nu-TP catalysées par les enzymes hTMPK et hNDPK. L'étude de la cascade a été ouverte au cas de l'étude de conversion d'un Nu en Nu-MP, catalysée par l'enzyme hTK1.

Le contexte et les objectifs de l'étude ayant été définis, nous présenterons les étapes de production et de purification de l'enzyme hTMPK puis la caractérisation de l'activité de chaque enzyme d'intérêt hTK1, hTMPK et hNDPK sous leur forme libre puis immobilisée.

1.7. La production et la purification de l'enzyme hTMPK

Les plasmides correspondant aux gènes codant pour chaque enzyme d'intérêt nous ont été gracieusement donnés par l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC, Paris VI). L'objectif initial de cette étude a été d'initier la production de chaque enzyme dans le but de travailler avec du matériel fiable et fraichement produit. Cependant, de par l'ancienneté du lot de plasmide de l'enzyme hTK1 et

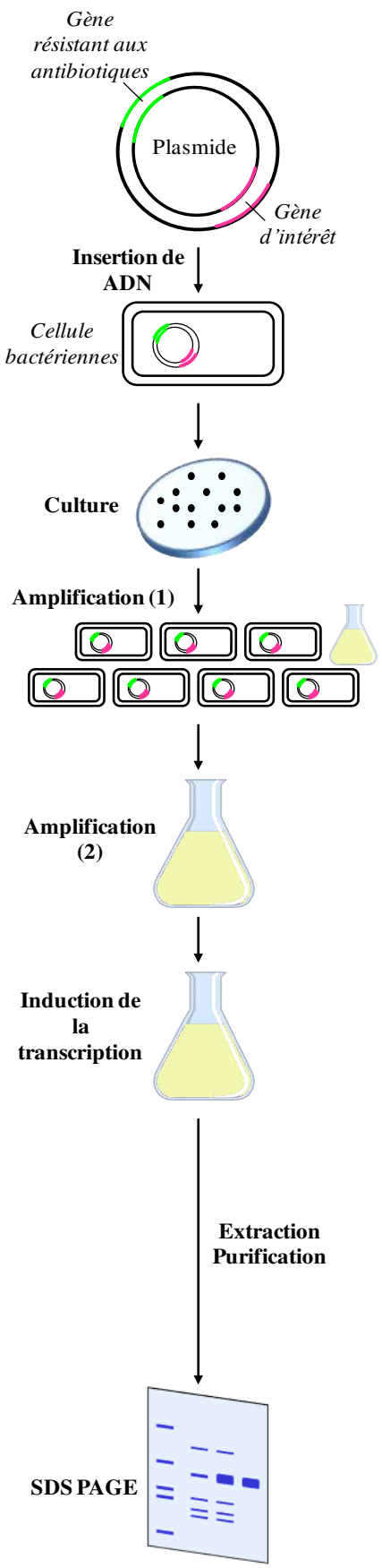
de la complexité de purification de l'enzyme hNDPK, seules les enzymes hTMPK de souches humaine (h) et virale (vv) ont pu être exprimées et purifiées efficacement. Ainsi, les développements méthodologiques présentés ci-contre ont été réalisés avec des enzymes fraiches hTMPK et vvTMPK et des anciens lots de hTK1 et hNDPK fournis par l'UPMC. Les enzymes hTK1 et hTMPK présentent une spécificité pour les bases de types thymine et uracile. Par conséquent, les développements méthodologiques ont été réalisés dans un premier temps par étude de phosphorylation de nucléoside ou nucléotide contenant une base thymine.

Les étapes de production et de purification de l'enzyme hTMPK (identiques à celles de l'enzyme vvTMPK) seront présentées dans la partie suivante.

1.7.1. Protocole de production de l'enzyme hTMPK

L'expression et la purification de cette protéine ont été réalisées suivant le protocole décrit par S. Pochet *et al*. [64] et sont présentées en Figure III-13.

<u>Remarque</u> : à chaque étape clé de la production et de la purification de l'enzyme hTMPK, des aliquots de solutions ont été conservés à -80°C en vue d'être analysés par électrophorèse sur gel de type SDS-PAGE. Ces aliquots, au nombre de 6 (T_0, T_{3h}, S_N, N_R, E et E_D) sont cités dans le schéma récapitulatif présenté en Figure III-13. Ils seront ensuite analysés afin de valider le protocole de production et de purification.



Plasmides pHL50-7 contenant l'ADN codant pour l'enzyme hTMPK ainsi qu'un gène résistant aux antibiotiques kanamycine et chloramphénicol. Vecteur pET28.

Transformation de cellules bactériennes par le plasmide : entrée de l'ADN recombinant dans une cellule bactérienne compétente *Escherichia Coli* de la souche BL21, Rosetta par fragilisation de la membrane par choc thermique (température 4°C, 42°C pendant 45 sec, 4°C).

Culture : mise en culture à 37°C pendant une nuit, dans un milieu de culture sélectif. Présence d'antibiotiques (kanamycine, chloramphénicol) inefficaces sur le plasmide d'intérêt permettant uniquement la culture des bactéries transformées.

Amplification (1) : la suspension bactérienne a été utilisée pour ensemencer une pré-culture en milieu LB contenant 30 µg/mL de kanamycine et 34 µg/mL de chloramphénicol.

Amplification (2) : 10 mL de pré-culture utilisés pour ensemencer 1L en milieu nutritif *lysogeny broth* (LB, 30 µg/mL de kanamycine, 34 µg/mL de chloramphenicol). Amplification PCR à 37°C, sous agitation 250 rpm pendant 6h40 pour atteindre une densité optique suffisante : E^{600} = 0,602 **(T_0).**

Induction de la transcription : Ajout de l'isopropyl thio-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) à une concentration finale de 400 µM. Incubation à 30°C, 250 rpm pendant 3h. Cellules récoltées par centrifugation 4255 g, 4°C, 30 min. Re-suspension dans 20 mL de tampon de lyse (Tris-HCl 100 mM, pH = 8, dTT 2 mM) **(T_{3h}).**

Extraction : re-suspension avec Tris-HCl (50 mM, pH = 8), 1 µM de dTT, 1 µM de lysozyme et 1% de PMSF (v/v). Homogénéisation 20 minutes, 4°C. Extraction des protéines par 3 chocs thermiques (azote -196°C/bain chauffant 37°C) puis 6 cycles de sonication à 4°C (6 x 30), cycle actif 50% **(S_N)**.

Purification : passage manuel sur colonne Ni-NTA (Nickel-nitrilotriacetic acid). Rétention par interactions entre les ions nickel et les histidines de la protéine. Elution de la protéine avec une solution à 200 mM d'imidazole **(E)**.

Test de Bradford : 30 mg de protéines produites. Solution protéique diluée à 2 mg/mL (lyse/glycérol 50/50 (v/v), conservée à -80°C **(E_D)**

SDS-PAGE (14% acrylamide) : Séparation et visualisation des étapes d'expression et de purification avec coloration directe au bleu de Coomassie.

Figure III-13- Procédé d'expression et de purification de l'enzyme hTMPK. L'enzyme vvTMPK a été produite selon le même protocole.

1.7.2. Détermination de la quantité de protéine produite : test de Bradford

La quantité de protéines obtenues a été déterminée par test de Bradford. Ce test, basé sur la colorimétrie, est particulièrement utilisé pour des mesures de concentrations en protéines en solutions. La méthodologie employée est basée sur le test développé par M. Bradford en 1976 [65].

Il permet de doser la concentration en protéines dans une solution de par un changement de couleur du réactif de bleu de Coomassie. Le réactif, de couleur rouge sous forme libre (anionique), présente une valeur d'absorbance maximale à λ = 470 nm. En présence de protéines, il forme des liaisons avec les acides aminés basiques (tel que l'arginine) et avec les groupements hydrophobes des protéines. Le bleu de Coomassie devient alors bleu et présente un maximal d'absorption à λ = 595 nm. La concentration en protéine est alors proportionnelle au changement d'absorbance à λ = 595 nm. Le protocole de dosage est résumé dans le Tableau III-5.

Droite de calibration	Dosage de matière protéique
• 10 µL de 7 solutions (de 0 à 0,5 µg/mL) de protéine modèle BSA (albumine de sérum bovin) • 200 µL de réactif bio-rad 1X	• 10 µL de 6 solutions de hTMPK (6 dilutions différentes : 1, 2, 4, 10, 20 et 40) • 200 µL de réactif bio-rad 1X
5 minutes de réaction, agitation douce, mesure d'absorbance à 595 nm	

Tableau III-5- Conditions expérimentales du dosage protéique de l'enzyme hTMPK par test de Bradford.

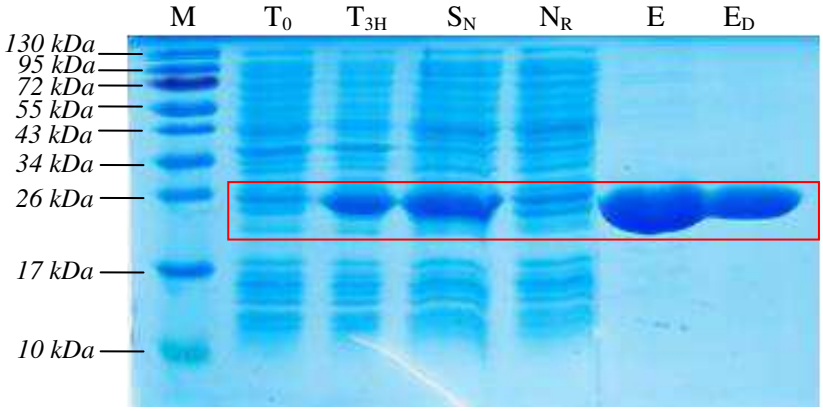
Nous avons déterminé un total de 30 mg de matière protéique produite constituant ainsi une production très acceptable. Afin de valider et de contrôler la production, une électrophorèse sur gel de type SDS page a été réalisée.

1.7.3. Contrôle de la production et de la purification par électrophorèse sur gel (SDS page)

Pour une vérification du bon déroulement de la production et de la purification, différents points de contrôles ont été prélevés (T_0, T_{3h}, S_N, N_R, E, E_D) et analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec dodécyl-sulfate de sodium (SDS-PAGE).

Cette technique est très utilisée en biochimie pour séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. La séparation est réalisée sur gel de polyacrylamide dont la teneur est adaptée à la taille des protéines à analyser (un gel en forte teneur de polyacrylamide présentera des pores plus petits et donc une plus faible migration des protéines). Pour l'analyse de l'enzyme hTMPK, d'une masse moléculaire de 23,8 kDa attendue d'après la littérature, [12] un pourcentage de 14% en polyacrylamide a été fixé. Les séparations sont réalisées en conditions dénaturantes par l'ajout d'un détergent SDS. Ce dernier possède une partie hydrocarbonée hydrophobe interagissant avec la protéine ainsi qu'une extrémité chargée négativement, l'empêchant de se replier sur elle-même. A la suite de la séparation par application d'une tension (200 V, 1h), le gel est immergé dans le colorant bleu de

Coomassie entre 30 minutes à 1 heure. Le gel est finalement lavé à l'eau par chauffage aux micro-ondes (2 cycles de 2 min à 600 W).



M : Marqueurs de poids moléculaire (Prestained Protein Ladder 06P-0111)
T_0 : Solution avant induction à l'IPTG
T_{3H} : Solution après induction
S_N : Surnageant avant purification
N_R : Volume non retenu lors de la purification
E : Solution de protéine après purification
ED : Solution de protéine diluée

Figure III-14 - Expression de la protéine hTMPK : contrôle par électrophorèse sur gel de type SDS-PAGE (14% acrylamide) de l'induction de la surexpression et de la pureté de la protéine.

Le gel présenté en Figure III-14 confirme le bon déroulement des étapes d'expression et de purification de la protéine. Nous pouvons noter une surexpression de la bande située entre 17 et 26 kDa (hTMPK 23,8 kDa) avant (T_0) et après l'étape d'induction à l'IPTG (T_{3h}), étape permettant l'expression des protéines recombinantes. Le volume non retenu lors de la purification (N_R) ne montre aucune perte de protéine. Pour finir, l'enzyme obtenue en fin de cycle paraît bien purifiée ((E) et (E_D)).

L'ensemble de ces manipulations a permis d'obtenir une enzyme hTMPK fraichement produite et purifiée. Afin de vérifier son fonctionnement et de quantifier son activité, cette dernière a été caractérisée par étude de Michaelis-Menten.

2. Mise en place d'une étude de caractérisation d'activité des kinases par FIA-HRMS

Comme mentionné précédemment, les tests couramment employés pour mesurer l'activité des enzymes kinases sont des tests colorimétriques de détection indirecte. De par les avantages de la spectrométrie de masse (suivi direct de phosphorylation et rapidité d'analyse), nous avons étudié la possibilité d'une étude cinétique de caractérisation d'enzymes kinases par injection en flux continu, couplé à la spectrométrie de masse haute résolution (FIA-HRMS).

La faisabilité de la caractérisation par FIA-HRMS a été réalisée dans un premier temps par caractérisation de l'enzyme hTMPK, lot fraichement produit, qui nous a permis de nous référer de façon plus fiable aux valeurs d'activités trouvées dans la littérature.

Cependant, les conditions usuelles de réactions enzymatiques utilisées pour l'étude de l'activité des kinases sont apparues dans un premier temps peu compatibles avec une détection en spectrométrie de masse. Les fortes concentrations en $MgCl_2$ (non volatil) et en ATP (de l'ordre du millimolaire) ainsi que le type de tampon utilisé (tris/HCl, non volatil) peuvent engendrer des saturations du détecteur, des contaminations de l'analyseur ainsi que de la suppression ionique lors de la détection. Ces différents propos ont été observés lors des développements expérimentaux.

L'influence d'une concentration de 200 µM de $MgCl_2$ sur l'ionisation de l'ATP et du substrat dTMP a été évaluée. D'après l'histogramme présenté en Figure III-15, cette concentration provoque une baisse de 45% d'intensité de l'ATP et de 23% d'intensité du dTMP. Bien que le $MgCl_2$ soit indispensable pour l'étape de phosphorylation, il engendre une forte suppression ionique des molécules d'intérêts. Dans ce contexte, il sera impossible de travailler à des concentrations en sels de l'ordre du mM. Nous devrons donc évaluer si cette concentration en µM représentera un frein pour l'étude de l'activité des kinases par détection en spectrométrie de masse.

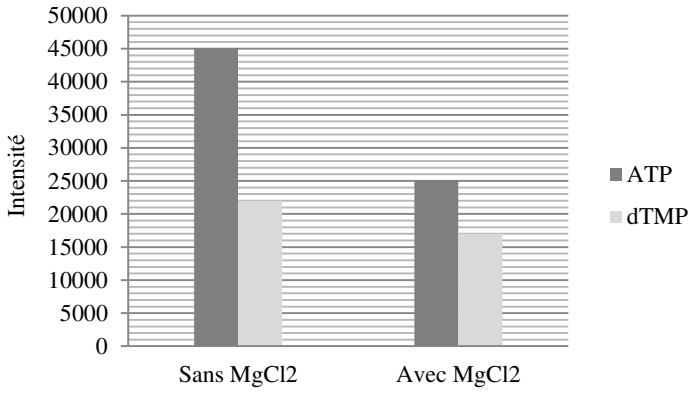


Figure III-15- Influence du $MgCl_2$ (200 µM) sur l'ionisation de l'ATP et du dTMP par FIA-HRMS ([ATP] = 150 µM, [dTMP] = 50 µM).

L'acétate d'ammonium, (tampon volatil) compatible avec des analyses par spectrométrie de masse, a été choisi dans le cadre de cette étude au détriment du tampon tris/HCl.

L'étude de caractérisation d'activité des trois enzymes kinases reflète plusieurs objectifs :

- le développement d'une approche FIA-HRMS pour la caractérisation d'activité des enzymes d'intérêts,
- une étude de l'influence des concentrations de l'ordre du µM en phosphodonneur et en agent chélatant sur l'activité enzymatique,
- une connaissance des paramètres cinétiques enzymatiques (K_M, V_{max}, k_{cat}) des enzymes libres et immobilisées.

Pour répondre à l'ensemble de ces objectifs, l'approche de caractérisation FIA-HRMS a été réalisée sur l'enzyme fraichement produite hTMPK. Les techniques directes d'électrophorèse capillaire et

indirecte par spectrophotométrie ont été employée en complément. Cette étude multi-approches a permis de confirmer la faisabilité et la robustesse de notre méthodologie FIA-HRMS.

Comme précisé précédemment, la détection par spectrométrie de masse pour la caractérisation des enzymes kinases a nécessité deux types d'optimisations :

- Paramètres d'ionisation : optimisation des paramètres de source d'ionisation en vue de favoriser l'ionisation (et donc la détection) des composés d'intérêts et de diminuer la fragmentation en source du groupement phosphate des nucléotides. Cette fragmentation pourrait apporter une incertitude sur le nombre de phosphorylation subi par le substrat.
- Concentrations en phosphodonneur ([ATP]) et en chélatant ([$MgCl_2$]) en µM : les concentrations usuellement utilisées pour la caractérisation d'activité des enzymes kinase de l'ordre du mM ne sont pas compatibles avec une détection en spectrométrie de masse. Seule la caractérisation de ces enzymes dans ces conditions permettra d'évaluer l'influence de ces concentrations.

2.1. Optimisation des conditions opératoires

2.1.1. Evaluation de l'ionisation des molécules d'intérêts par spectrométrie de masse

Cette étude a pour objectif de trouver des paramètres d'ionisation permettant :

- une ionisation optimale des nucléotides,
- une faible fragmentation des composés multiphosphatés.

Pour ce faire, l'évaluation d'ionisation ainsi que de la fragmentation de nucléotides a été réalisée sur les molécules modèles endogènes dTMP et dTDP, dont nous possédons les standards mono- et diphosphatés.

L'évaluation de l'ionisation du composé dTMP a été réalisée selon l'étude d'influence de 5 paramètres :

- la tension du capillaire,
- le débit de gaz séchant,
- la pression du nébuliseur
- l'énergie de la cellule de collision.

L'étude de fragmentation du dTDP en dTMP a été évaluée selon deux paramètres : la tension du capillaire et l'énergie de la cellule de collision.

a. Tension du capillaire

La tension du capillaire représente le potentiel électrique appliqué entre la pointe du capillaire métallique par lequel l'échantillon en solution est introduit, et le cône d'échantillonnage servant de

contre-électrode. Cette différence de potentiel induit la formation des gouttelettes. Cette tension a été évaluée sur l'ionisation du dTMP et dTDP ainsi que sur la fragmentation du dTDP en dTMP, par variation d'une valeur de 1,5 kV à 4kV. Les aires des Chromatogrammes d'extraction d'ions (EIC) des deux composés en fonction de la tension du capillaire sont représentées en Figure III-16. Sur cette figure est également représentée l'aire du pic de dTMP issu de la fragmentation du dTDP.

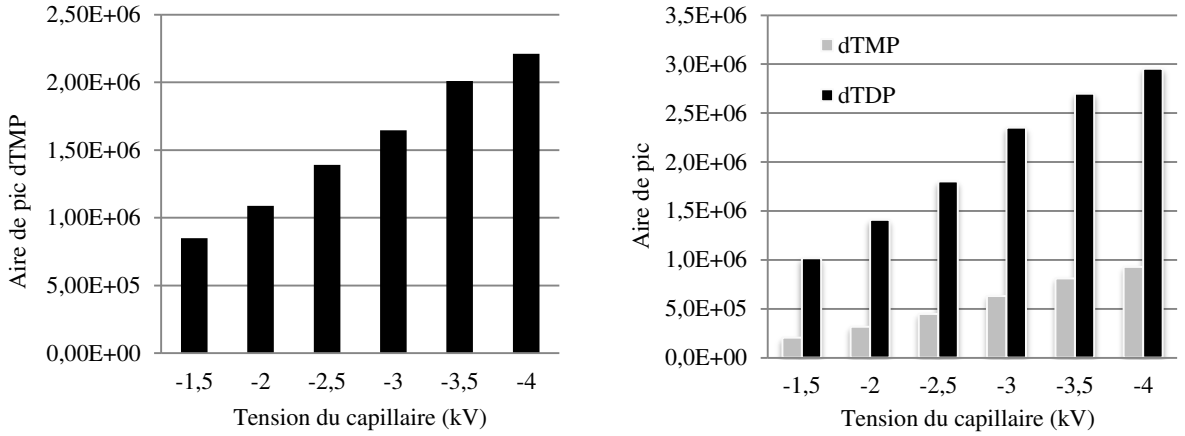


Figure III-16 – Influence de la tension du capillaire sur l'ionisation des composés dTMP et dTDP et sur la fragmentation du dTDP en dTMP.

L'ionisation des composés dTMP et dTDP apparaît plus efficace avec une tension de capillaire d'autant plus élevée. Cette tension aide à la formation des gouttelettes chargées. De ce fait, plus la tension sera élevée et plus la charge de la gouttelette sera importante et donc meilleur sera le signal. Par ailleurs, il est également possible de constater une hausse de la fragmentation du dTDP en dTMP avec la tension du capillaire. Bien que cette hausse de fragmentation soit visible, le gain d'ionisation du dTMP en dTDP apparaît plus intéressant. De ce fait, une tension de capillaire -4 kV a été fixée.

b. Débit de gaz séchant

Le gaz séchant d'azote aide à la désolvatation des gouttelettes par un flux à contre sens du flux d'entrée de l'échantillon. Ce débit est un paramètre important à adapter. En effet, son flux doit être fixé afin de concilier désolvatation des gouttelettes et entrée des ions dans la source. Un débit de gaz séchant trop élevé pourrait empêcher l'entrée des analytes.

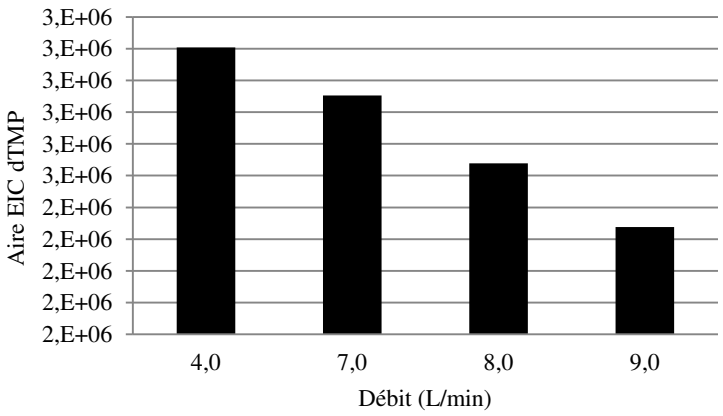


Figure III-17- Influence du débit de gaz séchant sur l'ionisation du dTMP.

D'après la Figure III-17, l'aire des EIC du dTMP diminue avec une augmentation du débit de gaz séchant. Ce phénomène provient de l'impossibilité des analytes à entrer dans la source de par un fort débit de gaz à contre-sens. En vue de trouver un compromis entre la désolvatation et l'ionisation de ces composés, un débit de 7 L/min a été fixé.

c. Pression du nébuliseur

Cette pression est à adapter en fonction de la nature et du débit du solvant d'élution. Plus le solvant sera aqueux et plus il sera nécessaire de déssolvater. L'ionisation du dTMP a été évaluée pour une pression allant de 0,4 bar à 1,5 bar. L'histogramme de la Figure III-18, représente l'aire du Chromatogrammes d'extraction d'ions (EIC) du dTMP en fonction de la pression du nébuliseur.

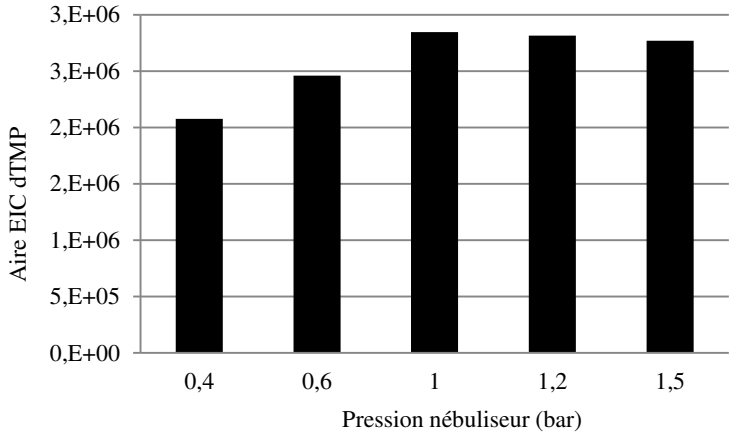


Figure III-18- Influence de la pression du nébuliseur sur l'ionisation du dTMP.

Nous pouvons constater que cette pression ne présente pas une grande influence sur l'ionisation du composé. Ainsi, une pression de 0,6 bar a été sélectionnée.

d. Energie de la cellule de transfert

Les ions traversant la cellule de transfert sont soumis à une différence de potentiel entre l'entrée et la sortie de la cellule. Ce potentiel permet de transmettre les ions vers l'ion cooler. Ce potentiel doit être suffisamment élevé pour engendrer une migration des ions tout en évitant une trop forte fragmentation. L'influence de l'énergie de tranfert a été évaluée par variation de 5 eV à 12 eV.

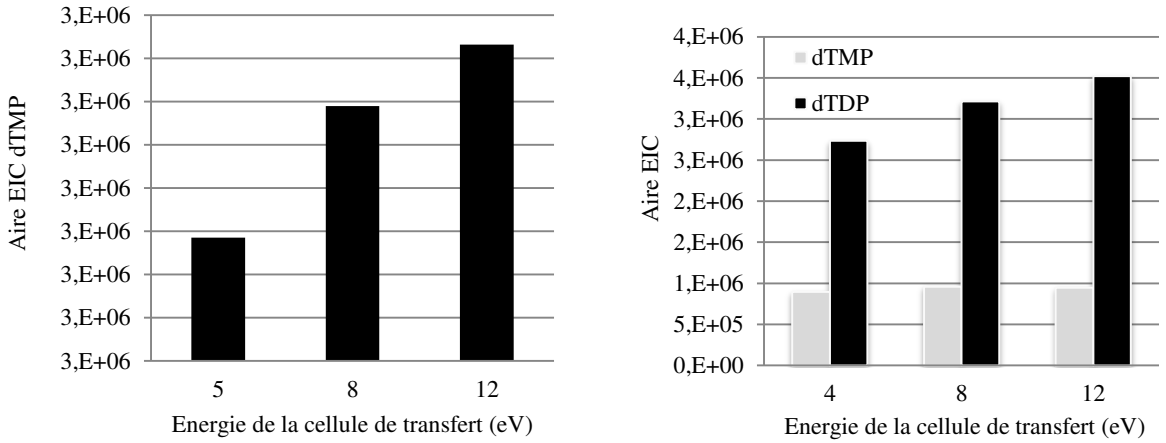


Figure III-19 – Influence de l'énergie de la cellule de transfert sur l'ionisation du dTMP et sur la fragmentation du dTDP en dTMP.

Une forte énergie appliquée à la cellule de transfert permet une meilleure efficacité de transmission des ions d'intérêts. Par ailleurs, cette énergie ne semble pas influer sur la fragmentation du dTDP en dTMP. De ce fait, une énergie de 12 eV a été fixée.

Suite à l'étude de l'influence de ces différents paramètres sur l'ionisation ainsi que sur la fragmentation des molécules d'intérêts, les taux de fragmentations du dTTP en dTDP et du dTDP en dTMP ont été estimés respectivement à 20% et 50%, pour une gamme de masse allant de 5 µM à 70 µM. Ces fragmentations sont illustrées sur les empreintes spectrales des composés dTTP et dTDP présentées en Figure III-20-21.

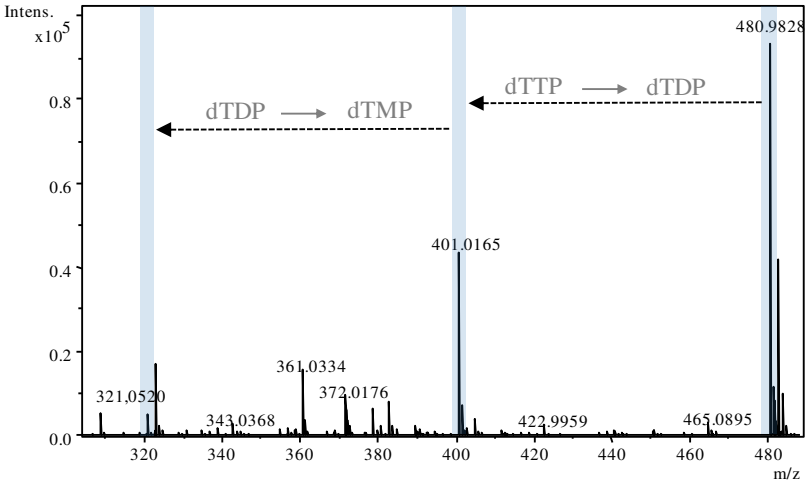


Figure III-20 – Spectre de masse du composé dTTP obtenu par FIA-HRMS.

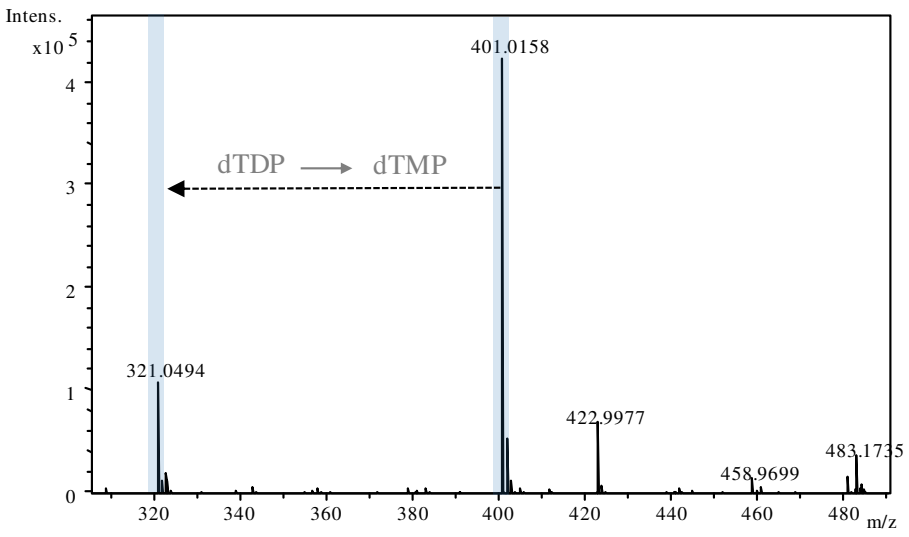


Figure III-21 – Spectre de masse du composé dTDP obtenu par FIA-HRMS.

Ainsi, ces taux de fragmentation seront à prendre en compte lors de l'évaluation de l'efficacité de conversion enzymatique.

2.1.2. Méthode basée sur la spectrométrie de masse

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées sur un spectromètre de masse de marque Bruker® maXis UHR-Q-TOF (Bremen, Allemagne) en mode négatif. Le spectromètre de masse est couplé en-ligne à une chaîne Dionex UltiMate 3000 RSLC (système de chromatographie liquide ultra haute performance, Germering, Allemagne.)

Avant chaque analyse, l'étalonnage est réalisé à l'aide d'un tuning mix ES-TOF (Agilent). La tension du capillaire est fixée à -4 kV, la pression du nébuliseur à 0,6 bar, le gaz d'azote à 7,0 L/min, chauffé à 200°C. Un µL d'échantillon est injecté en mode injection en flux continu à 200 µL/min avec une phase mobile constituée de H_2O/ACN 65/35 (v/v).

Les spectres de masses sont enregistrés dans une gamme de masses comprise entre 50 et 1350. Les chromatogrammes d'extraction d'ions (EIC) de la thymidine (dT, *m/z* 241.0838, $[M-H]^-$), de la thymidine monophosphate (dTMP, (*m/z* 321.0500, $[M-H]^-$) et de la thymidine triphosphate (dTTP, *m/z* 480.9831, $[M-H]^-$) sont tracés avec une précision de ± 0.005. Les données sont analysées et traitées *via* le logiciel DataAnalysis 4.4 (Bruker®).

2.1.3. Etude de l'influence des concentrations en ATP et $MgCl_2$

Le protocole de l'étude de l'influence des concentrations en ATP et en $MgCl_2$ est résumé dans le *Tableau III-6*.

<u>Remarque</u> : ayant constaté une faible activité de l'enzyme hTK1, la concentration de cette enzyme est plus élevée (0,48 g/L) que celles sélectionnées pour les enzymes hTMPK et hNDPK (0,04 g/L).

	Etude de l'influence [ATP] [$MgCl_2$] = 200 µM	Etude de l'influence [$MgCl_2$] [ATP] = 150 µM
Substrats : [dT], [dTMP], [dTDP] = 25 µM	[ATP] = 50 µM	[$MgCl_2$] = 25 µM
Enzymes : [hTK1] = 0,48g/L [hTMPK] = 0,04g/L [hNDPK] = 0,04g/L	[ATP] = 150 µM	[$MgCl_2$] = 200 µM
	[ATP] = 350 µM	[$MgCl_2$] = 400 µM
Conditions de réactions	$AcNH_4$ 50 mM, pH = 7,0, réaction 30 min, 37°C	
Analyses FIA-HRMS	1 µL d'injection, ACN/H_2O 35/65 (v/v), 200 µL/min	

Tableau III-6- *Conditions expérimentales de l'étude de l'influence des concentrations en ATP et $MgCl_2$ (µM) sur l'efficacité des trois étapes de phosphorylation.*

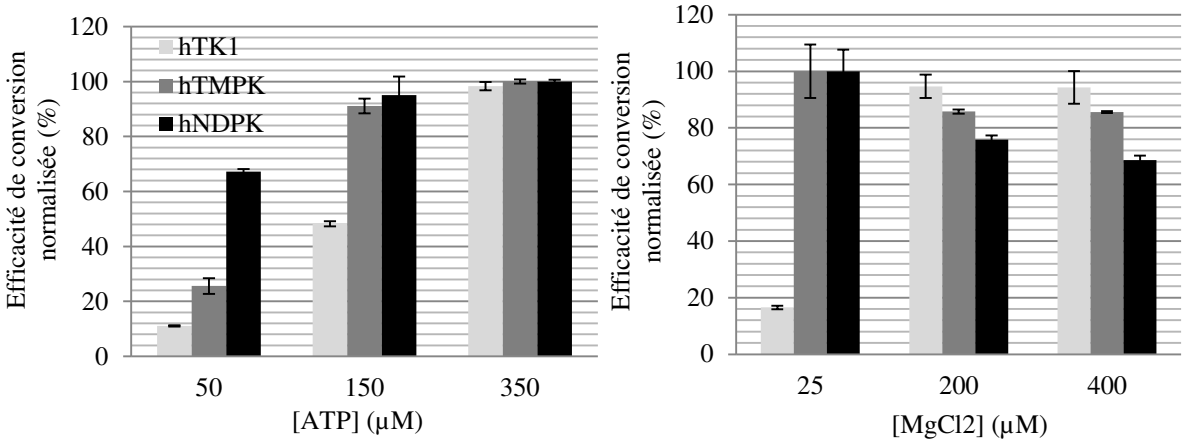


Figure III-22 - Influence de la concentration en ATP (50, 150 et 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM) et en $MgCl_2$ (25, 200 et 400 µM, [ATP] = 150 µM) sur l'efficacité de conversion des enzymes humaines TK1, TMPK et NDPK. Chaque valeur et écart-type sont représentatifs d'une moyenne de trois expériences biologiques.

Après détermination de l'efficacité de conversion maximale trouvée pour une condition de concentrations ATP et en $MgCl_2$ (représentant 100% d'efficacité), nous avons pu déterminer des efficacités relatives pour les autres concentrations en phosphodonneur et en agent chélatant. Les efficacités relatives en fonctions des concentrations en ATP et en $MgCl_2$ sont représentées sur les diagrammes de la Figure III-22.

Pour chacune des trois enzymes, la réaction est significativement améliorée avec une augmentation de la concentration en ATP. Une concentration de 50 µM d'ATP dans le milieu engendre des efficacités relatives de conversion inférieures à 30% pour les enzymes hTK1 et hTMPK. En augmentant la concentration à 150 µM, l'enzyme hNDPK a atteint son maximum de potentiel de conversion tandis que hTK1 montre une efficacité relative inférieure à 50%. Enfin, le meilleur taux pour les trois enzymes est obtenu à une concentration de 350 µM d'ATP.

Le comportement des trois kinases au regard de la concentration en chélatant est sensiblement différent. L'enzyme hTK1 semble être plus sensible à la quantité de $MgCl_2$ dans le milieu que les deux autres enzymes avec une conversion normalisée inférieure à 20% avec 25 µM de Mg^{2+} dans le milieu de réaction. Les taux maximums de conversion ont été trouvés pour des concentrations de 200 µM et 400 µM. Le meilleur compromis, entre ionisation des molécules et efficacité de réaction, a été fixé à 200µM.

Cette première partie de l'étude a permis de fixer les conditions d'ionisation et de concentrations en [ATP] et [$MgCl_2$] (fixées respectivement à 350 µM et 200 µM). Dans un second temps, la caractérisation enzymatique de l'enzyme hTMPK par FIA-HRMS sera réalisée.

Dans ces conditions, la technique FIA-HRMS semble être adaptée avec le suivi d'étapes de phosphorylations. Néanmoins, il reste nécessaire d'évaluer l'influence de ces concentrations et d'une approche d'injection en flux continu sur les mesures d'activités ainsi que sur la détermination des paramètres cinétiques des enzymes. C'est dans ce contexte que l'analyse par FIA-HRMS a été évaluée pour la caractérisation des kinases d'intérêts.

3. Etude de la faisabilité de la caractérisation de l'activité de l'enzyme hTMPK par FIA-HRMS

Afin de valider notre méthodologie FIA-HRMS pour l'étude de caractérisation des kinases, plusieurs paramètres seront à prendre en compte dans l'interprétation des résultats :

- Les réactions enzymatiques sont réalisées en présence de concentrations en ATP et $MgCl_2$ de l'ordre du µM afin de rendre compatible les conditions de réaction avec la détection en spectrométrie de masse. Dans la littérature, les études d'activités enzymatiques étant réalisées avec des concentrations de l'ordre du mM. Une baisse d'activité peut alors être observée. Ainsi, nous sommes en mesure de nous interroger sur l'influence de ces faibles concentrations en ATP et $MgCl_2$ sur le fonctionnement de l'enzyme hTMPK.
- La méthodologie FIA-HRMS peut apporter certaines incertitudes dans la quantification des produits de réaction du fait des variations d'ionisation et de la présence de fragmentations en source des groupements phosphates.

De cette manière, la validation de la méthodologie de caractérisation enzymatique des enzymes kinases par FIA-HRMS a été réalisée par l'utilisation de deux autres méthodologies pour la caractérisation de l'enzyme hTMPK :

- <u>méthode UV dite « indirecte »</u> : ce test a été réalisé avec des concentrations en ATP et $MgCl_2$ de l'ordre du µM et du mM. Ces deux expériences permettront de valider la possibilité de suivi de phosphorylation avec des faibles concentrations en phosphodonneur et en agent chélatant,
- <u>technique d'électrophorèse capillaire avec une détection UV dite « directe »</u> : méthode séparative et quantitative, compatible à de fortes concentrations en sels, ayant déjà fait ses preuves dans le domaine de la caractérisation d'activité enzymatique. Cette étude permettra de valider les paramètres cinétiques K_M et V_{max} trouvés en FIA-HRMS ainsi que d'évaluer l'influence de l'ionisation et des fragmentations sur la quantification du produit obtenu.

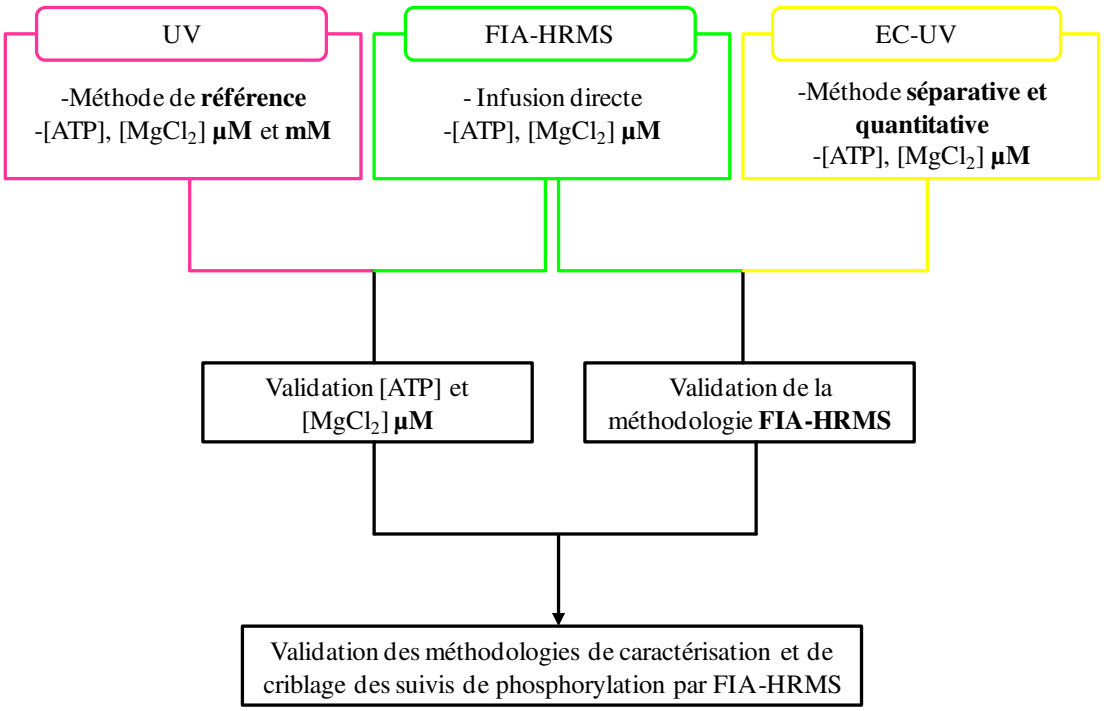


Figure III-23- Méthodologie de validation de caractérisation et de suivi de phosphorylation par FIA-HRMS. Etudes complémentaires réalisées par spectrophotométrie (UV) et par électrophorèse capillaire (UV).

3.1. Caractérisation par FIA-HRMS

La caractérisation de l'enzyme hTMPK a été réalisée par détermination des paramètres cinétiques (K_M, V_{max}, k_{cat}) *via* l'étude de la courbe de Michaelis-Menten, selon le protocole présenté dans le chapitre I. Ces études ayant été réalisées à temps fixe, une étude de linéarité a permis de fixer un temps de réaction (T_r) situé dans la zone de linéarité de la conversion pour la plus faible concentration de substrat ($[S]_0$).

Par la suite, les réactions ont été réalisées en mode off-line, pendant le temps fixé T_r à des concentrations de substrats $[S]_n > [S]_0$. L'ensemble de ces expériences permettront de déterminer les vitesses initiales V_i pour chaque concentration de substrat engagée.

3.2. Droite d'étalonnage

Quatre solutions de dTDP (de 5 à 40 µM) ont été préparées séparément dans une solution d'acétate d'ammonium ($AcNH_4$, 50 mM, pH = 6,9). 200 µM de sel de magnésium ($MgCl_2$) ont été ajoutés à chaque solution afin que les expériences effectuées sur ces dites solutions et celles qui seront effectuées sur les différents substrats soient réalisées dans les mêmes conditions.

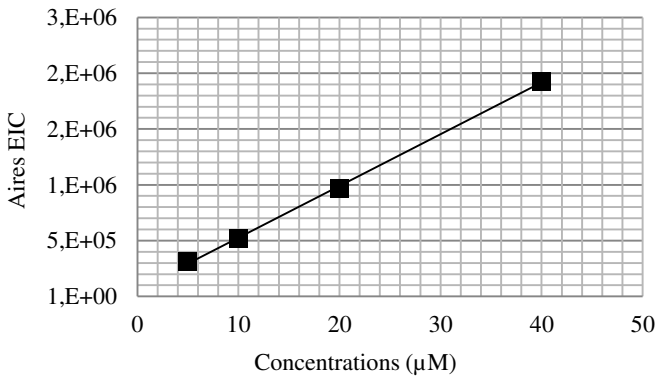


Figure III-24 - Droite d'étalonnage du produit dTDP de la réaction, m/z 401,0145 (carrés, y = 46403x + 60855, R^2 = 0,999).

La droite d'étalonnage présentée en Figure III-24 montre une relation linéaire entre les concentrations et l'aire du signal des chromatogrammes d'extraction d'ions (EIC) pour le composé dTDP. Cette droite nous permettra par la suite de déterminer les quantités de dTDP produit lors de la réaction catalysée par l'enzyme hTMPK.

3.3. Test d'activité enzymatique- linéarité

Une étude cinétique de conversion a été préalablement réalisée de manière à trouver les concentrations d'enzymes libres et de substrat adéquates pour l'étude de Michaelis-Menten. Le suivi cinétique de conversion, dont le protocole est montré en Figure III-25, a été effectué par des injections automatiques successives rapides en mode FIA. 12 injections de 1 µL ont été programmées sur une période de 5,2 min. Grâce à la programmation de l'injecteur éliminant tout lavage d'aiguille entre deux injections, 1 µL de solution peut être injecté toutes les 30 secondes.

Aucun effet mémoire n'a été détecté entre chaque injection, confirmant l'absence de contamination inter-analyse. Ce type d'injection nous a permis d'obtenir des points de cinétiques proches et, par conséquent, une meilleure représentation de la zone linéaire.

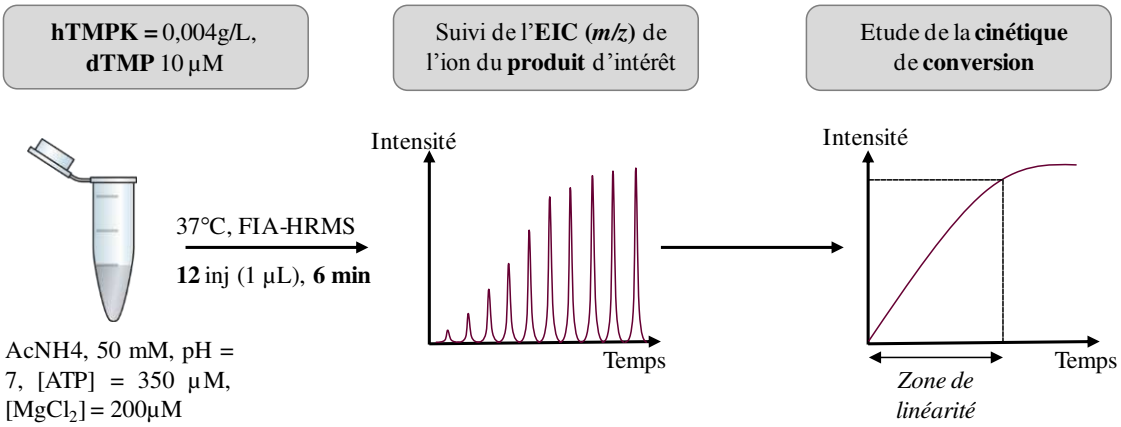


Figure III-25- Protocole d'étude de linéarité de l'enzyme hTMPK par FIA-HRMS.

La droite représentative de la production du produit dTDP en fonction du temps est présentée en Figure III-26. L'activité de l'enzyme hTMPK aux concentrations d'enzymes et de substrats données, montre une tendance linéaire sur un temps supérieur à 5 minutes de réaction. Par conséquent, le temps d'incubation pour les études de Michaelis-Menten a été fixé à 5 minutes afin de calculer la vitesse initiale de chaque réaction.

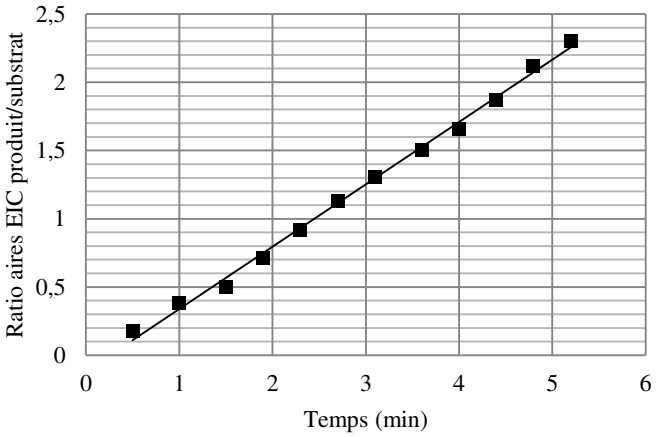


Figure III-26 - Cinétique de production du dTDP par l'enzyme hTMPK (y = 0.4566x - 001185, R² = 0.996) détecté par FIA-HRMS.

<u>Remarque</u> : différentes concentrations en enzyme hTMPK ont été testées afin d'obtenir une zone de linéarité dans un temps convenable (ni trop court pour faciliter la mise en place de la réaction, ni trop long pour un gain de temps). La concentration de 0,004 g/L de hTMPK sélectionnée a permis d'obtenir un compromis en terme de temps de réaction.

3.4. Détermination des paramètres cinétiques : étude de Michaelis-Menten

Le protocole ainsi que les conditions opératoires de l'expérience de Michalie-Menten sont schématisés en Figure III-27.

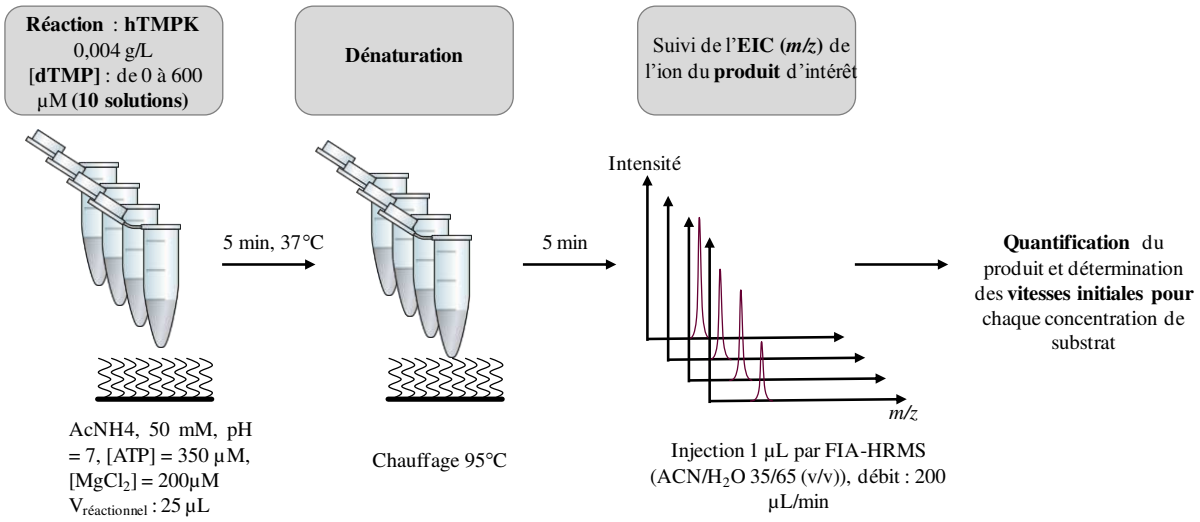


Figure III-27- Protocole et conditions expérimentales de l'étude de Michaelis-Menten de l'enzyme hTMPK par FIA-HRMS.

La Figure III-28 présente un exemple d'empreinte spectrale de conversion du dTMP en dTPD, catalysée par l'enzyme hTMPK.

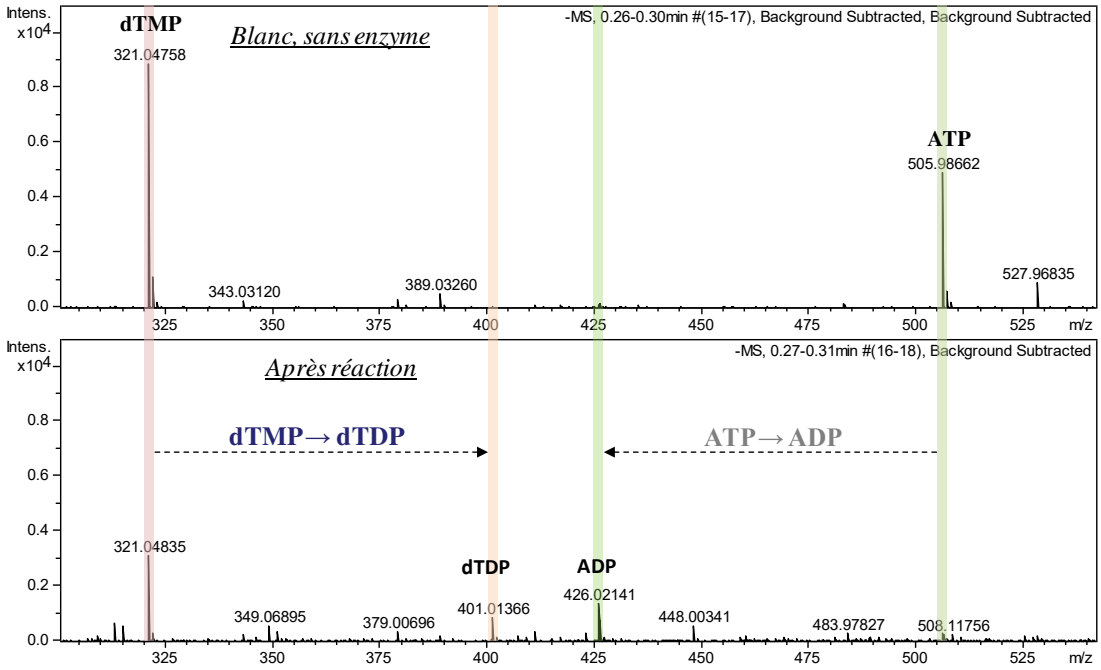


Figure III-28- Exemple de spectre de masse de conversion du dTMP en dTDP obtenu par FIA-HRMS (ESI Q TOF MS).

L'empreinte spectrale de l'analyse du blanc ne montre que la présence du substrat dTMP (*m/z* 321,04758) et du phosphodonneur ATP (*m/z* 505,98682) sans présence de produit dTDP. A la suite de la réaction enzymatique, la diminution de l'intensité de signal de dTMP est combinée à l'apparition du pic de dTDP (*m/z* 401,01366). Par ailleurs, dans cet exemple de cas, l'ATP a été complètement consommé et converti en ADP (*m/z* 426,02141).

La courbe de Michaelis-Menten de la conversion du dTMP en dTDP catalysée par l'enzyme hTMPK est représentée en Figure III-29.

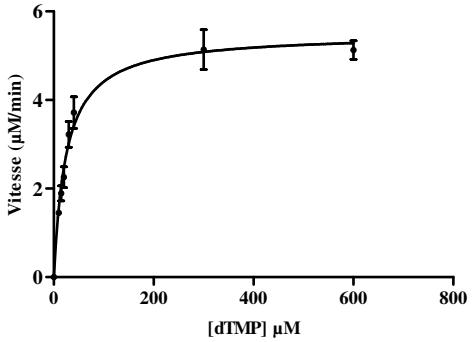


Figure III-29- (a) Courbe de Michaelis-Menten de l'enzyme hTMPK ([ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM) obtenue par analyse FIA-HRMS. Chaque valeur est représentative de la moyenne de trois expériences biologiques. La courbe a été obtenue via le logiciel GraphPad Prism 5.0 et extrapolée par l'équation de Michaelis-Menten.

	FIA-HRMS				Littérature
	K_M (µM)	V_{max} (µM/min)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})
hTMPK	34.43 ± 5.05	6.86 ± 0.51	42.60 ± 3.00	$0{,}21.10^5$	$1{,}5.10^5$

Tableau III-7- Paramètres cinétiques (K_M, V_{max}, k_{cat}) de l'enzyme hTMPK déterminés par FIA-HRMS ([ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM).

Les constantes d'activités K_M (constante d'affinité), V_{max} (vitesse maximale de réaction), k_{cat} (« turnover number ») et k_{cat}/K_M (efficacité catalytique) ont été déterminées *via* la courbe extrapolée par l'équation de Michaelis-Menten. Ces valeurs sont résumées dans le Tableau III-7**.** Il est rappelé que la constante d'affinité K_M croît proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de substrat nécessaire à une activité importante de l'enzyme. Ce phénomène traduit, en général, une faible affinité de l'enzyme pour son substrat.

La valeur V_{max} représente la vitesse de conversion maximale de l'enzyme pour des fortes concentrations en substrat. La valeur k_{cat} représente le maximum de conversion de molécules de substrat catalysée par site catalytique et par seconde pour une concentration totale d'enzyme. Le rapport k_{cat}/K_M est représentatif de l'efficacité catalytique de la réaction.

Les paramètres cinétiques de l'enzyme hTMPK déterminés par la méthodologie FIA-HRMS ont été comparés aux valeurs présentées dans la littérature par étude spectrophotométrique. L'efficacité catalytique de l'enzyme hTMPK est similaire à ces valeurs avec un facteur égal à 7,5 pour l'efficacité catalytique entre la valeur déterminée par FIA-HRMS et les valeurs présentées dans la littérature. Il est cependant important de rappeler que les expériences rencontrées dans la littérature sont réalisées avec des concentrations en ATP et $MgCl_2$ de l'ordre du mM. Ainsi, la valeur d'efficacité catalytique trouvée en FIA-HRMS n'est, à première vue, pas directement comparable aux valeurs de la littérature.

L'influence des concentrations en ATP et $MgCl_2$ a donc été étudiée à travers le test d'activité spectrophotométrique UV présenté ci-dessous. Ce test indirect permettra de :

- valider la faisabilité de réaction avec des concentrations en phosphodonneur et en agent chélatant de l'ordre du µM,
- comparer les paramètres cinétiques déterminés par FIA-HRMS et par spectrophotométrie UV.

3.5. Caractérisation par spectrophotométrie UV

Rappel : la caractérisation de l'activité de l'enzyme hTMPK a été réalisée par test spectrophotométrique en UV (défini comme méthode de référence) afin de valider la faisabilité du suivi de phosphorylation avec des concentrations de l'ordre du µM. Ce test a été effectué avec des concentrations en phosphodonneur et agent chélatant de l'ordre du mM et du µM afin de comparer les paramètres cinétiques. L'activité de l'enzyme hTMPK a donc pu être comparée dans ces deux conditions.

L'activité de l'enzyme hTMPK a été étudiée par suivi de la production d'ADP dans un système tri-enzymatique comprenant les enzymes hTMPK, pyruvate kinase et lactate déhydrogenase. Le mélange réactionnel a été réalisé avec du tampon Tris/HCl (50 mM, pH=7,4), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM (ou $MgCl_2$ 200 µM), NADH 0,2 mM, dithiothreitol 1 mM, phosphoenolpyruvate 1 mM, pyruvate kinase 4U, lactate déhydrogénase 4U, ATP 5 mM (ou 350 µM). La réaction a été initiée à 37°C par ajout de l'enzyme hTMPK à une concentration finale de 0,004 g/L et du substrat dTMP à 9 concentrations de 2 mM à 500 mM (ou 10 concentrations de 1 à 500mM). La vitesse initiale a été calculée sur la base de la production d'une entité ADP durant la réaction et exprimée en $\mu mol.L^{-1}.min$. L'extrapolation de la courbe a été réalisée par l'équation de Michaelis-Menten à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0. Les résultats obtenus pour les expériences réalisées à des concentrations en ATP et $MgCl_2$ sont représentées respectivement sur la Figure III-30.

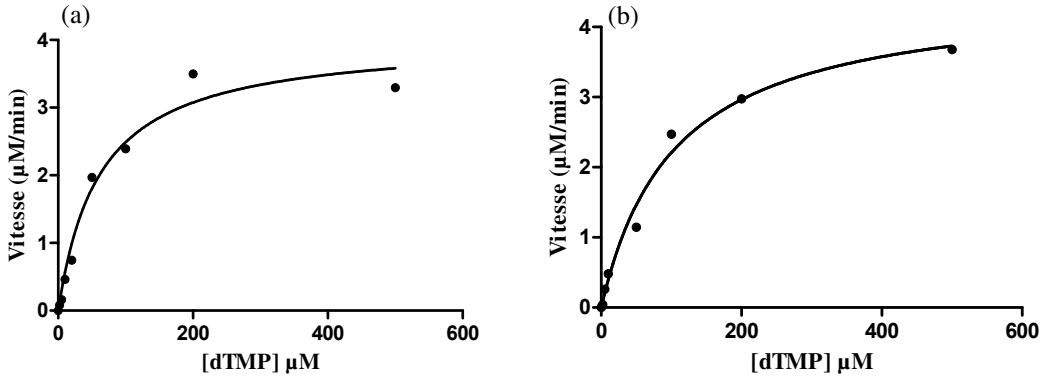


Figure III-30- Courbes de Michaelis-Menten de l'enzyme hTMPK (a) [ATP] = 5 mM, [$MgCl_2$] = 10 mM, (b) [ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM. Courbes obtenues par analyse spectrophotométrique (λ=340 nm). La courbe a été obtenue via le logiciel GraphPad Prism 5.0 et extrapolée par l'équation de Michaelis-Menten.

	UV								*FIA-HRMS*
	[ATP], [MgCl$_2$] mM				*[ATP], [MgCl$_2$] µM*				*[ATP], [MgCl$_2$] µM*
	K_M (µM)	V_{max} (µM/min)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})	K_M (µM)	V_{max} (µM/min)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})
hTMPK	61,8	4,0	25,0	0,07.10^5	104,1	4,5	28,0	0,05.10^5	0,2.10^5

Tableau III-8- Paramètres cinétiques (K_M, V_{max}, k_{cat}) de l'enzyme hTMPK déterminés par spectrophotométrie UV ([ATP] = 5 mM, [MgCl$_2$] = 10 mM et ([ATP] = 350 µM, [MgCl$_2$] = 200 µM).

Les valeurs des constantes cinétiques, résumées dans le Tableau I-8, obtenues pour K_M, V_{max} et k_{cat} pour les deux expériences sont similaires. La constante d'affinité, pour les faibles concentrations en ATP et MgCl$_2$, apparait légèrement plus élevée ($K_{M(mM)}$ = 61,8 µM et $K_{M(\mu M)}$ = 104,1 µM). Les valeurs des efficacités catalytiques sont similaires avec $k_{cat}/K_{M(mM)}$ = 0,07.10^5 M^{-1}.s^{-1} et $k_{cat}/K_{M(mM)}$ = 0,05.10^5 M^{-1}.s^{-1}.

Cette expérience prouve la possibilité de suivi de phosphorylation avec de faibles concentrations en agent chélatant (MgCl$_2$) et en phosphodonneur (ATP) de l'enzyme hTMPK. Bien que la réaction semble légèrement moins efficace avec une constante K_M plus élevée et une efficacité catalytique sensiblement plus faible, il semblerait possible d'étudier les suivis de phosphorylation ainsi que les cascades enzymatiques avec des concentrations en MgCl$_2$ et ATP respectivement égales à 200 µM et 350 µM.

Les résultats obtenus avec la méthodologie directe FIA-HRMS pour la caractérisation de l'enzyme hTMPK ont été comparés à ceux obtenus par le test usuel spectrophotométrique indirect. Nous pouvons constater que les efficacités catalytiques obtenues par les deux méthodes sont similaires avec $k_{cat}/K_{M(UV)}$ = 0,05.10^5 M^{-1}.s^{-1} et $k_{cat}/K_{M(FIA\text{-}HRMS)}$ = 0,2.10^5 M^{-1}.s^{-1}.

Cette première étude témoigne de :

- la faisabilité de suivi de phosphorylation avec de faibles concentrations en ATP et MgCl$_2$ (compatibles avec une détection par spectrométrie de masse),
- une première faisabilité de caractérisation enzymatique de l'enzyme hTMPK par FIA-HRMS.

Dans le but de finaliser la validation de notre approche FIA-HRMS pour la caractérisation enzymatique, les résultats obtenus par cette méthodologie ont été comparés à ceux obtenus par une approche séparative permettant un dosage directe, à savoir par électrophorèse capillaire avec une détection UV (EC-UV).

La méthodologie FIA-HRMS peut amener des imprécisions découlant de l'absence de séparation des composés, de la fluctuation d'ionisation du détecteur et de la fragmentation en source des groupements phosphates. Il apparait judicieux de réaliser cette même caractérisation par une méthodologie directe, séparative et quantitative par EC-UV.

3.6. Caractérisation par électrophorèse capillaire-UV (EC-UV)

3.6.1. Appareillage

Les expériences ont été réalisées en électrophorèse capillaire sur l'instrument Beckman Coulter PA 800+ équipé d'un système de détection de photodiode (Beckman-Sciex, San Jose, CA, USA). L'acquisition des analyses et le traitement des données ont été réalisés à l'aide du logiciel 32 Karat.

3.6.2. Méthodes de séparation

Des capillaires de silice nue de 60 cm de longueur totale (50 cm de longueur effective de détection), 50 µm de diamètre interne et 375 µm de diamètre externe ont été utilisés pour la séparation des nucléotides d'intérêts. Le tampon de séparation a été préparé par mélange d'ammoniaque et d'acide acétique dans de l'eau afin d'obtenir un tampon à 80 mM et pH = 9. Avant séparation, le capillaire est lavé 10 minutes avec une solution de soude 1M puis est conditionné 30 minutes avec les tampons de séparation à une pression de 50 psi. Il est important de noter que le tampon de séparation est préparé tous les jours et est régulièrement changé pour réaliser les différentes analyses. Les composés sont injectés à 0,5 psi pendant 10 secondes (~ 9 nL) et la séparation effectuée en tension positive +15 kV. Les composés sont détectés par absorption de la lumière UV à 254 nm, lors de leur passage devant la fenêtre de détection.

3.6.3. Détermination des paramètres cinétiques : étude de Michaelis-Menten

Neuf solutions de dTMP (de 0 à 800 µM) ont été mises en contact de l'enzyme hTMPK à une concentration finale de 0,004 g/L hTMPK ([ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM). Chaque solution a été placée dans un bloc chauffant thermostaté à 37°C pendant 5 minutes. Les réactions sont arrêtées par chauffage à 95°C pendant 5 minutes. L'injection des solutions et la séparation des composés ont été réalisées suivant le protocole décrit dans le paragraphe précédent. La courbe de Michaelis-Menten obtenue est présentée en Figure III-31. Les valeurs de K_M et V_{max} ainsi que k_{cat} pour n=2 réplicats sont résumés dans le Tableau III-9.

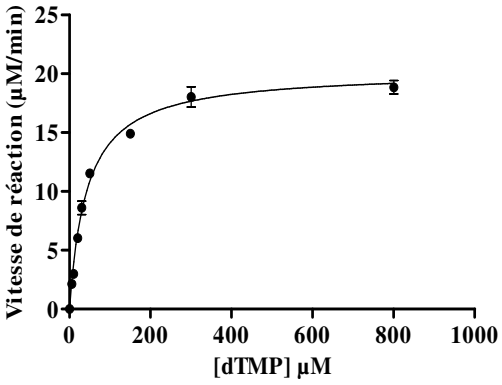


Figure III-31 - Courbe de Michaelis-Menten de l'enzyme libre hTMPK ([ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM) par EC-UV. Chaque valeur est représentative de la moyenne de deux expériences biologiques. Les courbes ont été obtenues à partir du logiciel GraphPad Prism 5.0 et extrapolées à partir de l'équation de Michaelis-Menten.

	EC-UV				FIA-HRMS	Littérature
	K_M (µM)	V_{max} (µM/min)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})
hTMPK	43.3 ± 2.3	20.2± 0.3	126,0 ± 1,8	$0{,}48.10^5$	$0{,}2.10^5$	$1{,}5.10^5$

Tableau III-9 - Paramètres cinétiques (K_M, V_{max}, k_{cat}) de l'enzyme hTMPK déterminés par EC-UV ([ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM).

Les paramètres cinétiques déterminés en EC-UV montrent une tendance similaire à la méthodologie FIA-HRMS. Les ordres de grandeurs des constantes catalytiques sont similaires. Les valeurs obtenues en EC-UV pour la constante d'affinité de l'enzyme hTMPK sont identiques avec celles trouvées en détection FIA-HRMS. Concernant l'EC-UV une mesure de V_{max} trois fois plus élevée a été obtenue. Cet écart pourrait provenir soit d'une saturation du détecteur en spectrométrie de masse ou d'une meilleure efficacité de conversion (meilleure agitation) lors de l'expérience en EC-UV. Malgré tout, la valeur d'efficacité catalytique trouvée, étant en adéquation avec la technique FIA-HRMS, cette expérience confirme la faisabilité de la méthodologie FIA-HRMS pour la caractérisation d'activité de phosphorylation.

Les différentes expériences effectuées en FIA-HRMS, par spectrophotométrie UV et par EC-UV ont validé :

- la faisabilité de la caractérisation enzymatique et du suivi de phosphorylation par FIA-HRMS,
- la possible utilisation de concentrations en ATP et $MgCl_2$ de l'ordre du µM pour le suivi de phosphorylation.

L'enzyme hTMPK montre des paramètres cinétiques similaires à ceux relatés dans la littérature. Elle pourra être alors utilisée pour le développement de suivi de phosphorylation et de la cascade enzymatique. Par la suite, les caractérisations des deux autres enzymes d'intérêts hTK1 et hNDPK ont été effectuées par FIA-HRMS.

3.7. Caractérisation des enzymes libres hTK1 et hNDPK

Comme il a été mentionné précédemment, les enzymes hTK1 et hNDPK n'ont pu être produites du fait de l'ancienneté des lots de plasmide de l'enzyme hTK1 et de la difficulté de purification de l'enzyme hNDPK (non marquée His-tag). Les développements méthodologiques ont ainsi été réalisés grâce à l'utilisation d'anciens lots de protéines. Préalablement à l'étude de suivi de phosphorylation et de cascade enzymatique, l'activité de ces deux anciens lots a été testée afin de vérifier leur possible utilisation. L'expérience précédente a montré que la méthodologie FIA-HRMS est adaptée à la caractérisation enzymatique de kinases. Cette méthodologie a été appliquée dans le cadre de la caractérisation des enzymes hTK1 et hNDPK.

3.7.1. Caractérisations par FIA-HRMS

Le protocole appliqué pour la caractérisation de l'activité des enzymes hTK1 et hNDPK est identique à celui développé pour l'enzyme hTMPK. Le temps de réaction a été fixé à la suite d'une étude de linéarité.

a. Droites d'étalonnage

Quatre solutions dTDP (de 5 à 40 µM) et cinq solutions dTTP (de 5 à 50 µM) ont été préparées séparément dans une solution d'acétate d'ammonium ($AcNH_4$, 50 mM, pH = 6,9, 200 µM $MgCl_2$).

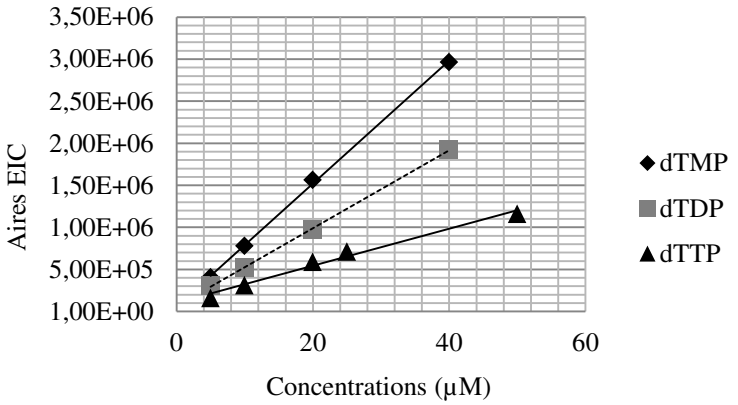


Figure III-32- Droites d'étalonnage des trois produits de réaction dTMP, m/z 321.0482 (losanges, y = 73164x + 55415, R^2 = 0,999), dTDP, m/z 401,0145 (carrés, y = 46403x + 60855, R^2 = 0,999) et dTTP, m/z 480,9808 (triangles, y = 21986x + 102720, R^2 = 0,982).

Les droites d'étalonnage présentées en Figure III-32 montrent une relation linéaire entre les concentrations et l'aire du signal EIC pour les composés dTMP et dTTP. Le tracé de la droite de calibration du produit dTDP a été ajouté en vue de comparer les efficacités d'ionisation des trois composés.

Il est intéressant de noter qu'à même concentration, l'intensité de l'extraction d'ion décroît avec l'augmentation du nombre de groupements phosphate de la molécule (notamment pour les composés dTDP et dTTP). Ce phénomène reflète l'effet de fragmentations en source des groupements phosphates. Il apporte une limite à prendre en considération concernant la détection de faibles concentrations en dTDP et dTTP

b. Test d'activité enzymatique- linéarité

Les études de linéarités ont été réalisées selon le protocole présenté précédemment. Les conditions opératoires sont présentées dans le Tableau III-10.

Etude de linéarité	
hTK1	**hNDPK**
[hTK1] = 0,0875 g/L dT = 10 µM	[hNDPK] = 0,002 g/L dTDP = 2 µM
$AcNH_4$ 50 mM, pH = 7,0, réaction à 37°C	

Tableau III-10- Conditions expérimentales de l'étude de linéarité des enzymes hTK1 et hNDPK par FIA-HRMS.

Remarque : les concentrations des enzymes hTK1 et hNDPK ainsi que les concentrations de substrats dT et dTDP ont été étudiées et définies afin d'obtenir un temps de réaction acceptable (dans la zone de linéarité).

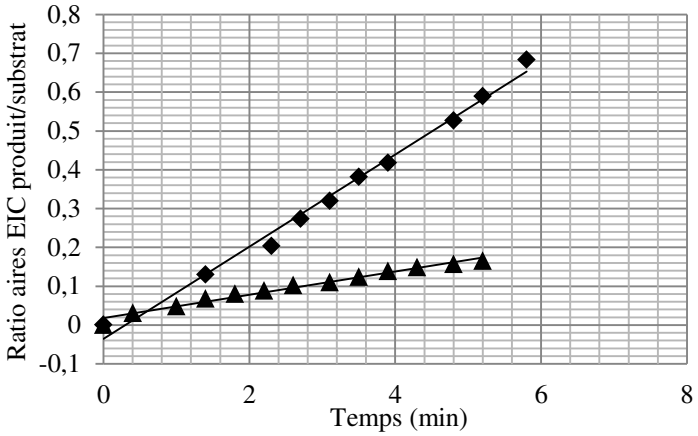


Figure III-33- Cinétique de production du dTMP (▲, y = 0.03x + 0.0181, R^2 = 0.9795) et du dTTP (▪, y = 0.1187x - 0.0357, R^2 = 0.990) détectés par FIA-HRMS.

Cette étude cinétique a permis l'obtention de deux droites, présentées en Figure III-33, représentatives de la production des produits dTMP et dTTP en fonction du temps. Similairement à l'expérience réalisée pour l'enzyme hTMPK, le temps d'incubation pour les études de Michaelis-Menten a été fixé à 5 minutes pour les enzymes hTK1 et hNDPK.

c. Détermination des paramètres cinétiques : étude de Michaelis-Menten

Le protocole des études de Michaelis-Menten des enzymes hTK1 et hTMPK par FIA-HRMS est résumé dans le Tableau III-11.

Etude de Michaelis-Menten : FIA-HRMS		
	hTK1	**hNDPK**
Conditions de concentrations	[hTK1] = 0,0875 g/L [dT] = 0-15 000 µM 9 solutions	[hNDPK] = 0,002 g/L [dTDP] = 0-500 µM 10 solutions
Conditions de réaction	AcNH4, 50 mM pH = 7,0, 5 min de réaction à 37°C	
Analyse par FIA-HRMS	1 µL d'injection, ACN/H_2O 35/65 (v/v), 200 µL/min	

Tableau III-11- Conditions expérimentales de l'étude de Michaelis-Menten des enzymes hTK1 et hNDPK par FIA-HRMS.

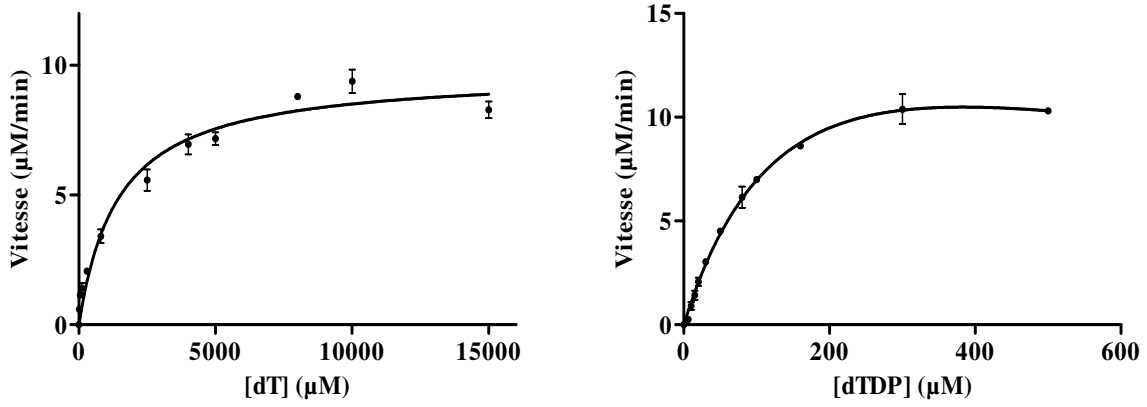


Figure III-34- Courbes de Michaelis-Menten des enzymes hTK1 et hNDPK ([ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM) obtenue par analyse FIA-HRMS. Chaque valeur est représentative de la moyenne de trois expériences biologiques. La courbe a été obtenue via *le logiciel GraphPad Prism 5.0 et extrapolée par l'équation de Michaelis-Menten.*

	FIA-HRMS				Littérature
	K_M (µM)	V_{max} (µM/min)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})	k_{cat}/K_M (M^{-1} s^{-1})
hTK1	1451.00 ± 205.00	9.74 ± 0.33	3.00 ± 0.01	$0{,}03.10^3$	$8{,}00.10^6$
hNDPK	92,75 ± 12,80	13,01 ± 1,27	111.2 ± 16.80	$0{,}20.10^5$	$1{,}00.10^6$

Tableau III-12- Paramètres cinétiques (K_M, V_{max}, k_{cat}) des enzymes hTK1 et hNDPK déterminés par FIA-HRMS ([ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM).

Les paramètres cinétiques des enzymes hTK1 et hNDPK, résumés dans le Tableau III-12, déterminés par la méthodologie FIA-HRMS ont été comparés aux valeurs présentées dans la littérature. Bien que les paramètres de l'enzyme hNDPK soient sensiblement différents aux valeurs rencontrées dans la littérature (facteur de 50 pour l'efficacité catalytique entre la valeur trouvée par FIA-HRMS et les valeurs décrites dans la littérature), ces paramètres varient considérablement pour l'enzyme hTK1 (facteur de plus de 10^3). La méthodologie FIA-HRMS ayant été validée par étude de l'activité de l'enzyme hTMPK, deux paramètres sont à prendre en compte dans l'interprétation de ces résultats :

- L'ancienneté des enzymes peut apporter une baisse d'activité.
- Les faibles concentrations en phosphodonneur (ATP) et en agent chélatant ($MgCl_2$) peuvent engendrer une baisse d'activité dans le cas des enzymes hTK1 et hNDPK.

L'influence des faibles concentrations en ATP et $MgCl_2$ sur l'activité des enzymes hTK1 et hTMPK a été évaluée par EC-UV, technique de détection directe permettant de travailler à de fortes concentrations en sels contrairement à la spectrométrie de masse.

3.7.2. Etude de l'influence des concentrations en ATP/$MgCl_2$ sur l'activité des enzymes hTK1 et hNDPK par EC-UV.

Afin d'étudier l'influence de la concentration en ATP et en $MgCl_2$ sur l'activité enzymatique, des expériences de Michaelis-Menten pour les enzymes hTK1 et hNDPK ont été réalisées avec des concentrations en ATP et $MgCl_2$ de l'ordre du mM (concentrations usuellement utilisées pour des tests d'activités) et de l'ordre du µM. Les conditions expérimentales sont résumées dans le Tableau III-13. Chaque solution a été injectée et les composés séparés suivant le protocole décrit dans le paragraphe précédent. Les valeurs de K_M, V_{max} ainsi que k_{cat} sont résumées dans le Tableau III-14

	EC-UV	
	[ATP] = 350 **µM**, [$MgCl_2$] = 200 **µM**	[ATP] = 5 **mM** [$MgCl_2$] = 10 **mM**
hTK1 (0,0875 g/L)	8 solutions (de 50 µM à 5000 µM)	6 solutions (de 10 µM à 5000 µM)
hNDPK (0,002 g/L)	8 solutions (de 20 µM à 500µM)	7 solutions (de 10µM à 5000 µM)
$AcNH_4$ 50 mM, pH = 7,0, réaction 5 min à 37°C		

Tableau III-13- Conditions expérimentales de l'étude de Michaelis-Menten des enzymes hTK1 et hNDPK par EC-UV ([ATP] = 5 mM, [$MgCl_2$] = 10 mM, [ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM).

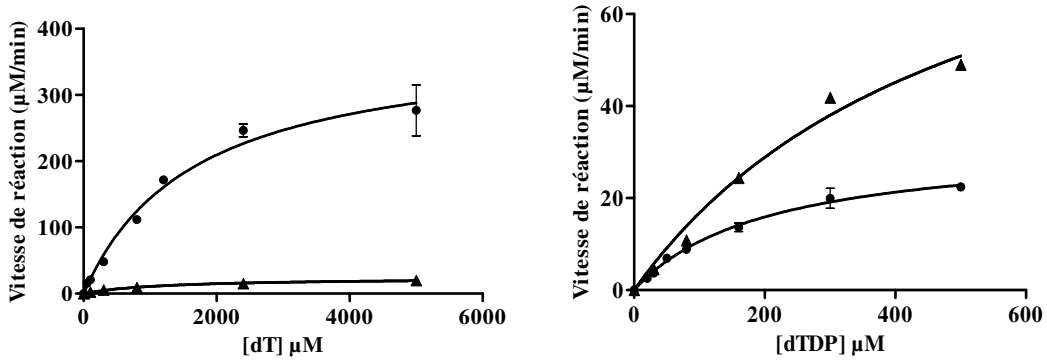


Figure III-35- Courbes de Michaelis-Menten des enzymes libres hTK1 et hNDPK ([ATP] = 5 mM/[MgCl2] = 10 mM et ([ATP] = 350 µM/[$MgCl_2$] = 200 µM. Les courbes ont été obtenues à partir du logiciel GraphPad Prism 5.0 et extrapolées à partir de l'équation de Michaelis-Menten.

	EC-UV						**Littérature**
	[ATP], [$MgCl_2$] µM			**[ATP], [$MgCl_2$] mM**			**[ATP], [$MgCl_2$] mM**
	K_M (µM)	V_{max} (µM/min)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}.s^{-1}$)	K_M (µM)	V_{max} (µM/min)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}.s^{-1}$)
hTK1	1592,0 ± 207,0	27,0± 1,1	$0,09.10^3$	1125	314,6	$1,55.10^3$	$8,0.10^6$
hNDPK	205,0 ± 18,9	32,2 ± 1,4	$0,15.10^5$	517,1	103,5	$0,2.10^5$	$1,0.10^6$

Tableau III-14- Résumé des paramètres cinétiques de la thymidine kinase (hTK1) et de la nucléoside diphopshate kinase (hNDPK) par suivi en EC-UV ([ATP] = 5 mM, [MgCl2] = 10 mM et [ATP] = 350 µM et [$MgCl_2$] = 200 µM).

D'après les valeurs des paramètres cinétiques résumées dans le Tableau III-14, l'augmentation de la concentration en co-facteur semble avoir une forte influence sur les vitesses des deux réactions. Cet effet est particulièrement prononcé pour l'enzyme hTK1 qui présente une vitesse maximale de conversion V_{max} multipliée par près d'un facteur 12. La constante d'affinité K_M pour cette enzyme

variant très peu avec une augmentation des co-facteurs ($K_{M(hTK1,\ \mu M)}$ = 1592,0 µM et $K_{M(hTK1,\ mM)}$ = 1125 µM), l'efficacité catalytique est d'autant plus élevée pour de fortes concentrations en co-facteur.

Cependant, de fortes concentrations en phosphodonneur et en agent chélatant ne permettent pas de retrouver les valeurs d'efficacités catalytiques présentées dans la littérature. Ainsi, il est important de noter que les anciens lots d'enzymes hTK1 et hNDPK possèdent une activité réduite (particulièrement pour l'enzyme hTK1). Les développements méthodologiques utilisant ces enzymes ne seront alors pas optimisés en terme d'activité enzymatique. Le temps de réaction sera donc maximisé dans le cadre de l'étude de phosphorylation en off-line par FIA-HRMS.

Cette première partie de l'étude a permis de valider l'utilisation des concentrations en ATP et $MgCl_2$ de l'ordre du µM ainsi que la méthodologie FIA-HRMS pour le suivi de phosphorylation et de caractérisation de l'activité enzymatique des enzymes hTK1, hTMPK et hNDPK.

Rappelons que l'objectif de notre étude est le suivi de la cascade de phosphorylation par un développement basé sur la méthodologie de l'enzyme immobilisée en FAC-HRMS. L'activité des trois lots d'immobilisation a été étudiée par étude de Michaelis-Menten. Cette étude sera présentée dans le paragraphe suivant.

3.8. Etude d'activité des lots d'enzymes immobilisées par FIA-HRMS

3.8.1. Immobilisation des enzymes sur support

L'immobilisation des trois enzymes hTK1, hTMPK et hNDPK a été réalisée séparément afin d'obtenir trois lots distincts de chaque enzyme immobilisée. Ces immobilisations ont été réalisées selon le protocole présenté dans le chapitre I. Chaque enzyme a été placée avec une solution de nanoparticules magnétiques ou MPs (tampon phosphate, 50 mM, pH = 6,8) à 4 g/L afin d'obtenir trois solutions de concentrations finales respectives à 0,96 g/L de hTK1, à 0,3 g/L de hTMPK et 0,3 g/L de hNDPK. Les trois solutions ont été homogénéisées par agitation magnétique pendant 7 heures à 4°C puis placées avec 1mM de glycine à 4°C toute une nuit. Les nanoparticules ont ensuite été lavées avec du tampon acétate d'ammonium afin d'éliminer les enzymes libres restant en solution. L'activité des étapes de lavage a été évaluée jusqu'à ne plus observer de conversion enzymatique. Chaque solution a ensuite été re-suspendue dans une solution d'acétate d'ammonium (50 mM, pH = 7). La non-activité du dernier lavage de chaque lot d'enzyme immobilisée a été testée.

<u>Remarque</u> : il est important de noter que les taux de fixations des enzymes sur support n'ont pas été déterminés. Ainsi, les concentrations d'enzymes immobilisées présentées dans la suite du manuscrit ont été déterminées à partir de la concentration initiale d'enzyme engagée lors de l'immobilisation en admettant que 100% des enzymes aient été immobilisées. Il parait évident, après test des lavages d'immobilisations, que l'immobilisation n'est pas totale pour les trois enzymes.

L'étude de caractérisation des enzymes immobilisées réalisée ci-dessous permettra de connaître l'activité de nos lots d'immobilisation, à la concentration théorique initiale (admettant 100% de fixation).Cette étude nous permettra de comparer l'activité de ces lots immobilisés avec les activités des enzymes libres à « même » concentration. En aucun cas, cette caractérisation reflètera la perte d'activité de l'enzyme due à sa désactivation lors de l'immobilisation. Cette expérience confirmera l'activité de nos lots ainsi que leur possible utilisation pour le suivi de phosphorylation ou pour l'étude de la cascade en modes off-line et on-line.

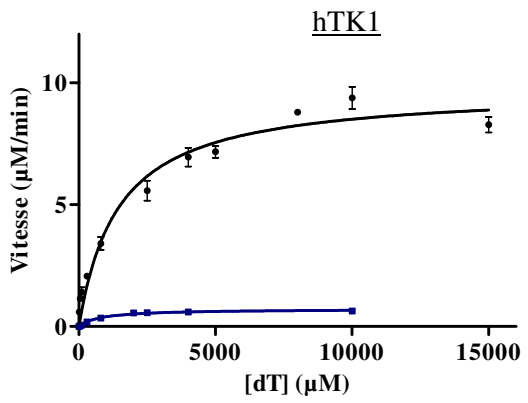
3.8.2. Caractérisations des lots d'enzymes immobilisés : étude de Michaelis-Menten

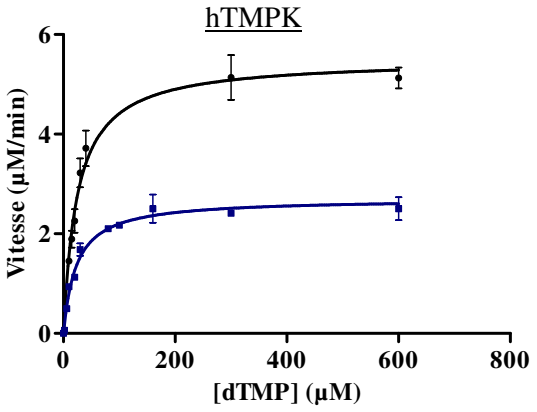
Préalablement à l'étude de la cascade enzymatique, les activités de chaque lot d'enzyme immobilisée ont été déterminées. Cette étude a été réalisée par détermination des paramètres cinétiques (K_M, V_{max}, k_{cat}) de chaque enzyme immobilisée *versus* celles des enzymes libres.

Le protocole de l'expérience de Michaelis-Menten est similaire à celui décrit pour l'étude d'activité des enzymes libres dans la section 3.4. Des expériences préliminaires ont attesté de la plus faible activité des enzymes immobilisées que des enzymes libres. Ainsi, un temps de réaction de 5 minutes (choisi pour l'étude des enzymes libres) permettra de se situer dans la partie linéaire. Les conditions opératoires sont présentées dans le Tableau III-15.

	Etude de Michaelis-Menten		
	hTK1	**hTMPK**	**hNDPK**
Enzymes libres	[hTK1] = 0,0875 g/L [dT] = 0-15 000 µM 9 solutions	[hTMPK] = 0,004 g/L [dTMP] = 0-600 µM 10 solutions	[hNDPK] = 0,002 g/L [dTDP] = 0-500 µM 10 solutions
Enzymes immobilisées	[hTK1] = 0,0875 g/L [dT] = 0-10 000 µM 7 solutions	[hTMPK] = 0,004 g/L [dTMP] = 0-600 µM 10 solutions	[hNDPK] = 0,002 g/L [dTDP] = 0-500 µM 9 solutions
	AcNH4 50 mM, pH = 7,0, réaction à 37°C		

Tableau III-15- Conditions expérimentales de l'étude de Michaelis-Menten des enzymes libres et immobilisées hTK1, hTMPK et hNDPK par FIA-HRMS ([ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM).





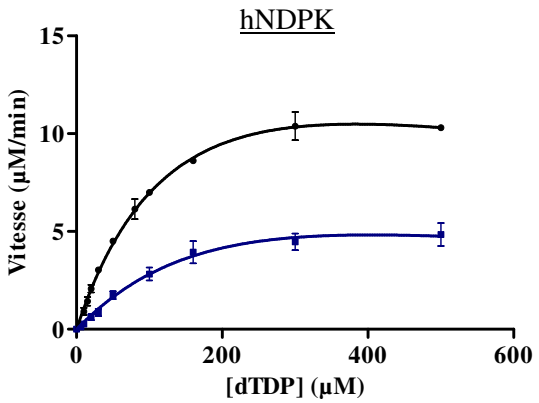


Figure III-36 - Courbes de Michaelis-Menten des enzymes libres (•, noir) et immobilisées (▪, bleu) hTK1, hTMPK et hNDPK. Chaque valeur est représentative de la moyenne de trois expériences biologiques. Les courbes ont été obtenues à partir du logiciel GraphPad Prism 5.0 et extrapolées avec l'équation de Michaelis-Menten.

	Enzyme libre		**Enzyme immobilisée**	
	K_M (µM)	V_{max} (µM/min)	K_M (µM)	V_{max} (µM/min)
hTK1	1451.00 ± 205.00	9.74 ± 0.33	791.00 ± 116.50	0.72 ± 0.03
hTMPK	34.43 ± 5.05	6.86 ± 0.51	27.92 ± 4.14	2.94 ± 0.17
hNDPK	92,75 ± 12,80	13,01 ± 1,27	132.90 ± 18.50	6.41 ± 0.36

Tableau III-16 - Paramètres cinétiques (K_M, V_{max}, k_{cat}) de la thymidine kinase (hTK1), thymidylate kinase (hTMPK) et nucléoside diphosphate kinase (hNDPK) libres et immobilisées. Analyses réalisées par FIA-HRMS

<u>Remarque</u> : les valeurs de k_{cat} « turnover number » ainsi que d'efficacité catalytique k_{cat}/K_M ne sont pas présentées ici. Ces valeurs étant dépendantes de la concentration en enzyme engagée, celles obtenues pour les enzymes immobilisées ne seraient pas représentatives de l'activité enzymatique.

Les essais de Michaelis-Menten ont été réalisés pour les trois enzymes libres et immobilisées. Les valeurs de K_M et V_{max} sont résumées dans le Tableau III-16. Les lots d'enzymes immobilisées montrent des constantes d'affinité (K_M) similaires aux enzymes libres. Cette observation confirme que l'étape d'immobilisation n'engendre pas de changement de mode d'activité des enzymes. Les lots d'enzymes immobilisées hTMPK et hNDPK montrent une vitesse de réaction plus faible que celle des enzymes libres (valeurs de V_{max} divisées par 2). Comme mentionné précédemment, cette perte d'activité proviendrait probablement d'une fixation non totale de l'enzyme lors de l'étape d'immobilisation. Ces lots semblent suffisamment actifs pour la mise en place de nos méthodologies.

Le lot d'enzyme hTK1 immobilisée a montré une grande perte d'activité, avec une valeur de V_{max} divisée par 15. La répétabilité de l'immobilisation de cette enzyme a été étudiée sur trois lots d'immobilisation. Cette expérience a confirmé que cette perte d'activité provient de l'étape d'immobilisation de cette enzyme. La courbe des Michaelis-Menten moyennée pour les trois lots d'immobilisations est présentée en Figure III-37.

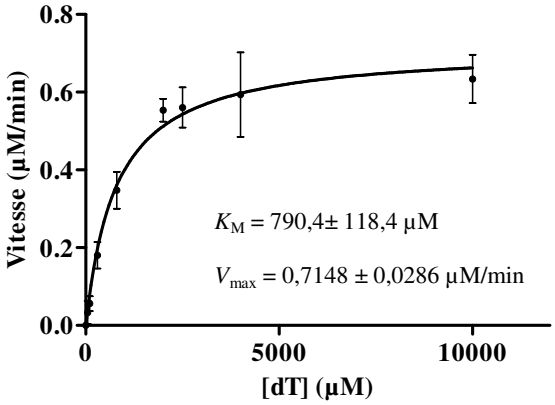


Figure III-37 - Courbe de Michaelis-Menten de l'enzyme hTK1 obtenue pour trois lots d'immobilisations (n = 3). La courbe est obtenue à partir du logiciel GraphPad Prism 5.0 et extrapolée avec l'équation de Michaelis-Menten.

Les constantes cinétiques K_M et V_{max} des trois lots d'enzyme hTK1 immobilisée sont similaires. Cette forte perte d'activité provient probablement du processus d'immobilisation de l'enzyme pouvant induire :

- une géométrie d'attachement inappropriée (et donc une désactivation de celle-ci),
- un faible taux de fixation de l'enzyme au support.

Ainsi, les activités des trois lots d'enzymes immobilisées sont vérifiées. Nous présenterons par la suite l'étude de la cascade de phosphorylation par FIA-HRMS en enzymes libres et immobilisées.

Remarque : bien que le lot d'enzyme immobilisée hTK1 perde une grande partie de sa vitesse de réaction, son activité résiduelle semble suffisante pour l'étude de la cascade de phosphorylation en tant que preuve de concept. Rappelons que l'objectif principal de notre étude est le suivi de deux étapes de phosphorylation (et de cascade) d'un nucléoside monophosphate en nucléoside triphosphate. La première étape de phosphorylation est introduite dans ce chapitre en tant qu'ouverture à l'étude de la cascade de triphosphorylation.

4. Conclusion

Il a été montré dans cette partie, la compatibilité d'une analyse FIA-HRMS dans le cadre du suivi de phosphorylation. Pour ce faire, certaines conditions ont dû être évaluées telles que :

- l'impact de la quantité de $MgCl_2$ sur l'ionisation des nucléotides,
- les conditions de sources afin de limiter la fragmentation,
- les proportions de concentrations en phosphodonneur et en chélatant en vue d'une réaction enzymatique efficace et d'une compatibilité avec la détection par spectrométrie de masse.

Ces optimisations nous ont amené à la mise en place d'une approche de caractérisation enzymatique directe par spectrométrie de masse des enzymes libres et immobilisées afin d'évaluer l'activité de ces dernières pour le développement FAC. C'est dans ce contexte que l'apport de la méthodologie FIA-HRMS, comparée à des techniques de références, telles que la spectrophotométrie UV ou l'EC-UV, a

été évalué. Cette étude a validé la possibilité de mesures de paramètres cinétiques enzymatiques des kinases par FIA-HRMS

La faisabilité d'étude cinétique par FIA-HRMS

La méthodologie FIA-HRMS, présentée dans cette partie, semble offrir de nombreux avantages pour le suivi direct de phosphorylation ainsi que pour la caractérisation enzymatique. Grâce à la programmation de l'injecteur et à une haute sensibilité d'analyse, les cinétiques enzymatiques peuvent être réalisées rapidement avec une grande précision (rapprochement en termes de temps des points dans la zone d'intérêt), un faible temps d'analyse d'un point de réaction (1 minute), et d'une faible consommation de produits (volume d'injection de 1 µL)).

De plus, grâce à la détection spécifique de chacun des composés par spectrométrie de masse, aucune séparation des produits au-préalable n'est nécessaire. Le suivi des chromatogrammes d'extraction d'ions permet la détection spécifique d'une molécule (produit) permettant d'augmenter le potentiel d'injection de molécules (rapidité, versatilité). En effet, les études cinétiques, réalisées généralement en chromatographie, nécessitent des optimisations de séparation des substrats, produits et co-facteurs de réaction.

En plus du temps de séparation pouvant être conséquent, ces méthodologies présentent une faible versatilité nécessitant de nouvelles optimisations de séparation à chaque analyse de nouvelles molécules. Les essais cinétiques réalisés en FIA-HRMS présentent :

- une bonne répétabilité d'analyse (faible coefficient de variation),
- une forte sensibilité de détection (de l'ordre du micro-molaire),
- une faible consommation (volume d'injection de 1 µL)
- une détection directe de la conversion enzymatique (contrairement au test colorimétrie).

Cette technique présente cependant certaines limites comme la présence de fragmentations en source et une variation d'ionisation pouvant engendrer une quantification moins fiable et robuste que les méthodes chromatographiques. La détection par spectrométrie de masse présente également une incompatibilité avec les fortes concentrations en sels. L'analyse sans dimension séparative, bien que rapide et versatile, ne permet pas l'étude de molécules isomériques. Dans ces cas d'études, il serait intéressant de coupler une colonne de courtes dimensions à notre système.

La faisabilité de suivi d'une étape de phosphorylation catalysée par les trois enzymes hTK1, hTMPK et hNDPK libres et immobilisées par FIA-HRMS a été prouvée par la caractérisation de leur activité.

L'utilisation de faibles concentrations en phosphodonneur et en agent chélatant

Cette étude d'activité a confirmé la faisabilité de suivi de conversions de phosphorylation avec de faibles concentrations en ATP et $MgCl_2$ par FIA-HRMS. Bien que l'utilisation de ces faibles concentrations engendre une diminution de la vitesse de réaction pour les enzymes hTK1 et hNDPK,

elles ne semblent pas avoir d'influence sur l'affinité de l'enzyme pour son substrat et donc sur son mode de fonctionnement. Il apparait donc possible de travailler dans ces conditions en FIA-HRMS pour l'étude de la cascade de phosphorylation.

La caractérisation des enzymes libres et immobilisées par FIA-HRMS

Les enzymes libres hTMPK et hNDPK ont montré une activité proche des valeurs rencontrées dans la littérature. Quant à eux, les lots immobilisés ont révélé une baisse de moitié de la vitesse de réaction, provenant probablement d'une fixation non totale des enzymes sur support.

Les activités de ces deux enzymes libres et immobilisées sembleraient ainsi appropriées pour la suite de nos développements méthodologiques. Dans la perspective d'ouvrir cette étude de cascade à la première étape de phosphorylation, l'enzyme hTK1 a été également caractérisée sous forme libre et immobilisée.

La forme libre a montré une activité bien inférieure aux activités décrites dans la littérature. Le lot immobilisé a montré une forte baisse de la vitesse de réaction. Ainsi, bien que l'activité de ces deux formes ne semble ni optimale ni idéale pour le suivi de la cascade, cette enzyme a été introduite dans le développement FIA-HRMS en ouverture, afin de montrer la faisabilité de la méthodologie.

Ainsi, après avoir démontré la possibilité de d'analyse par spectrométrie de masse de conversions de phosphorylation ainsi que l'activité des lots d'enzymes immobilisées, la première partie de ce chapitre sera consacrée à l'étude de la cascade de phosphorylation off-line et on-line.

PARTIE II. Développement de preuves de concepts du suivi de cascades de conversions enzymatiques

Les activités des trois enzymes d'intérêts sous forme libres et immobilisées ont été déterminées afin de mieux appréhender nos futurs développements méthodologiques. Cette caractérisation a prouvé la faisabilité du suivi de phosphorylation *via* l'utilisation des enzymes immobilisées. Dans le but de développer la cascade de phosphorylation on-line par FAC-HRMS, la faisabilité de cette cascade a été étudiée par une méthodologie off-line en FIA-HRMS. La cascade a été catalysée par les enzymes libres et immobilisées. Cette méthodologie statique en off-line offre la possibilité d'optimiser les conditions de réactions (temps, concentrations d'enzyme, agitation). Cette pré-étude a été développée pour introduire l'approche dynamique en ligne par FAC-HRMS.

1. Etude off-line de la cascade de phosphorylation par Injection en Flux continu couplé à la Spectrométrie de Masse Haute résolution (FIA-HRMS)

Cette partie sera principalement consacrée à l'étude de la faisabilité de la cascade enzymatique d'un Nu-MP en Nu-TP par utilisation de l'enzyme immobilisée pour le suivi de phosphorylation de phosphonates acycliques. Une ouverture sur le suivi de la première étape de phosphorylation d'un Nu en Nu-MP sera également présentée et discutée. La faisabilité et la mise en place de cette approche ont nécessité une première optimisation de chaque étape de conversion (temps de réaction, concentrations d'enzymes, connaissance des efficacités de conversion). Une fois ces paramètres déterminés, l'étude de la cascade par FIA-HRMS a été réalisée selon deux approches, par utilisation (1) d'enzymes libres et (2) d'enzymes immobilisées.

La première partie est consacrée à l'étude de faisabilité du suivi de conversions d'un nucléotide monophosphate (Nu-MP) en nucléotide triphosphate (Nu-TP) catalysées par les enzymes immobilisées hTMPK et hNDPK. Bien que l'enzyme immobilisée hTK1 ait montré une faible activité, le passage du nucléoside (Nu) en nucléotide monophosphate (Nu-MP) est présenté ici en ouverture pour la valorisation de cette méthodologie. Cependant, il est important de noter que cette réaction n'est pas une étape clé de notre développement.

Le mode d'analyse statique en off-line, a été réalisé en tant qu'étude préliminaire au développement FAC-HRMS afin :

- d'apporter de la flexibilité sur les conditions de réaction (temps, concentration d'enzymes),
- de comparer ce suivi de cascade *via* les enzymes libres et enzymes immobilisées. Cette étude permettra de confirmer la pertinence d'une approche d'immobilisation d'enzyme pour le suivi de la cascade enzymatique.

Afin de se placer dans des conditions de réaction favorable au développement de l'étude, l'endogène thymidine (dT) a été choisi comme molécule modèle pour le développement de la preuve de concept.

L'utilisation de cette molécule nous offre la possibilité d'analyser chaque standard (disponible commercialement) correspondant aux produits de chaque étape de conversion (dTMP, dTDP et dTTP), et ce, contrairement aux nucléotides phosphonates acycliques de synthèse. Ces analyses nous ont permis d'évaluer les taux de fragmentations en source et donc d'apporter une dimension quantitative à notre étude. Dans ce volet seront présentés en parallèle les résultats obtenus pour les enzymes libres et immobilisées pour évaluer la faisabilité voire l'apport de la méthodologie d'immobilisation d'enzyme pour l'étude de cascade enzymatique.

1.1. Etude des réactions individuelles

Une première étude de la cinétique de conversion des enzymes libres a été réalisée pour estimer le temps de chaque étape de conversion. Les efficacités de conversions de chaque étape ont été déterminées. Les conditions opératoires sont résumées dans Tableau III-17.

	Etude de cinétique en enzymes libres		
	hTK1	**hTMPK**	**hNDPK**
Concentrations d'enzymes	0,48 g/L	0,04 g/L	0,04 g/L
Concentration de substrats	[dT] = 25 µM	[dTMP] = 25 µM	[dTDP] = 25 µM
Conditions d'incubation	AcNH4 50 mM, pH = 7,0, 37°C, [ATP] = 350 µM, [MgCl2] = 200 µM, incubation sans agitation		
Analyse par FIA-HRMS	Injections de 1 µL, ACN/H_2O 35/65 (v/v). 22 points d'injection espacés de 30 secondes puis 8 points toutes les minutes		

Tableau III-17- Conditions expérimentales de l'étude cinétique des enzymes hTK1, hTMPK et hNDPK libres par FIA-HRMS.

<u>Remarque</u> : les concentrations d'enzymes fixées pour l'étude de la cascade sont supérieures à celles mises en jeu lors de la caractérisation enzymatique. Ces fortes concentrations engendrent des vitesses et des efficacités de conversion plus élevées qui ont permis d'évaluer plus facilement la faisabilité de l'étude de la cascade enzymatique. L'enzyme hTK1 ayant montré une faible activité, sa concentration est dix fois supérieure aux concentrations des enzymes hTMPK et hNDPK.

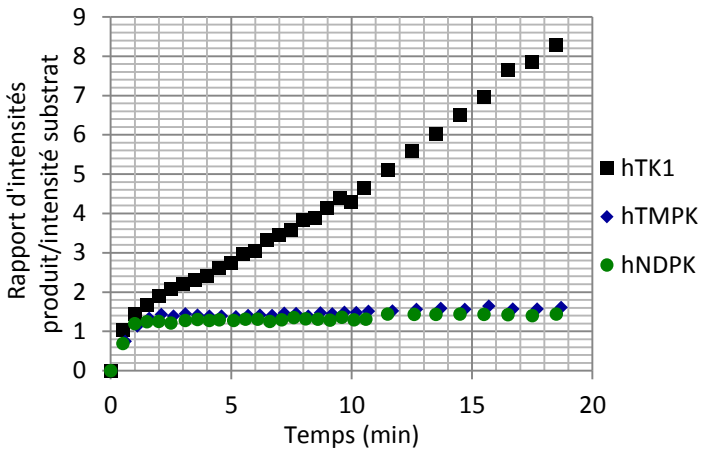


Figure III-38 - Cinétiques de conversions des trois substrats dT, dTMP et dTDP (25 µM) catalysées respectivement par les enzymes libres hTK1 (0,48 g/L), hTMPK (0,04 g/L) et hNDPK (0,04g/L) par analyse FIA-HRMS.

La Figure III-38 représente l'apparition de chaque produit de réaction (dTMP, dTDP et dTTP) en fonction du temps. Cette apparition est montrée sur le graphique sous la forme du rapport de l'intensité des produits sur l'intensité des substrats correspondants (I_{dTMP}/I_{dT}, I_{dTDP}/I_{dTMP} et I_{dTTP}/I_{dTDP}) afin de pallier les effets de variations d'ionisation en fonction du temps.

D'après cette étude, les réactions catalysées par les enzymes hTMPK et hNDPK engagées à même concentration, sont très rapides. Le palier de conversion est atteint au bout de deux minutes de réaction. En outre, la conversion catalysée par l'enzyme hTK1 semble suivre une fonction linéaire croissante. Dans l'objectif d'atteindre des plateaux de conversions du dTMP et du dTDP, chaque étape de la cascade enzymatique, en enzymes libres, sera réalisée par des réactions successives de 30 minutes. La première étape de phosphorylation, plus lente, sera étudiée en terme d'ouverture à la cascade de triphosphorylation.

L'étude de caractérisation des trois lots d'enzymes immobilisées a montré une vitesse de réaction deux fois plus faibles pour les lots d'enzymes hTMPK et hNDPK immobilisées. D'après l'étude cinétique réalisée en enzyme libre, un temps de réaction fixé à 30 minutes devrait permettre d'atteindre le plateau de conversion. Concernant l'enzyme hTK1 immobilisée, un temps de réaction a été fixé à une valeur deux fois plus élevée, à savoir 1 heure.

Les temps de réactions de chaque étape de phosphorylation étant fixés, les taux de conversion de chaque enzyme libre et immobilisée ont été évalués. Les conditions opératoires de ces expériences sont résumées dans le Tableau III-18.

		Etude des taux de conversion		
		hTK1	**hTMPK**	**hNDPK**
[Enzymes]		[hTK1] = 0,48 g/L	[hTMPK] = 0,04 g/L	[hNDPK] = 0,04 g/L
[Substrat]		[dT] = 50 µM	[dTMP] = 50 µM	[dTDP] = 50 µM
Temps de réactions	*Enzymes libres*	30 minutes	30 minutes	30 minutes
	Enzymes immobilisées	1 heure		
Conditions d'incubation		AcNH4 50 mM, pH = 7,0, 37°C, [ATP] = 350 µM, [MgCl2] = 200 µM, incubation sans agitation		
Analyse par FIA-HRMS		Injections de 1 µL, ACN/H_2O 35/65 (v/v). 22 points d'injection espacés de 30 s puis 8 points toutes les minutes		

Tableau III-18- Conditions expérimentales de l'étude des taux de conversions des enzymes libres et immobilisées hTK1, hTMPK et hNDPK par FIA-HRMS.

D'après les résultats présentés en Figure III-39, chaque réaction individuelle, catalysée par les enzymes libres, montre de fortes efficacités de conversion avec 99.6% pour l'enzyme hTK1, 88,6% pour hTMPK et 76,3 % pour NDPK. Ces conditions semblent donc appropriées pour l'étude de la cascade de phosphorylation.

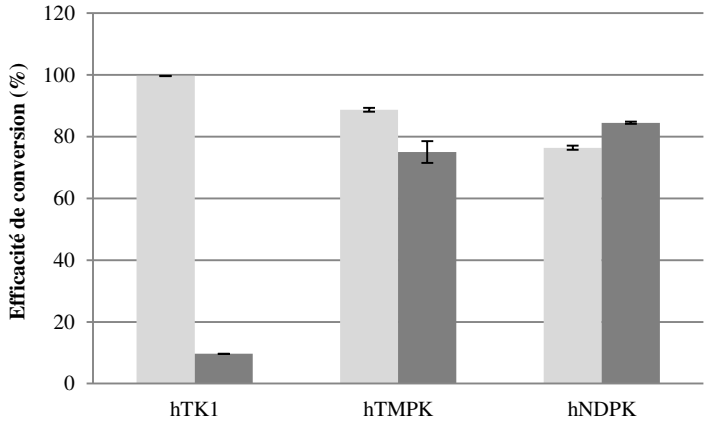


Figure III-39 - Représentation de l'efficacité de conversion pour les trois réactions individuelles catalysées par hTK1, hTMPK et hNDPK libres (gris clair) et immobilisées (gris foncé). Analyse en FIA-HRMS (n = 3).

D'après la Figure III-39, l'étude de l'efficacité des réactions individuelles catalysées par les enzymes immobilisées hTMPK et hNDPK montre également de fortes efficacités de réactions. Ces efficacités sont similaires aux efficacités trouvées pour les enzymes libres avec 75% de conversion du dTMP en dTDP et 85% pour la conversion du dTDP en dTTP. Cette observation confirme que le temps de réaction fixé à 30 min permet d'atteindre le plateau de conversion de ces enzymes immobilisées. Ainsi, ces deux étapes ne se révèlent pas limitantes concernant l'efficacité de la réaction et semblent donc compatibles à l'étude de la cascade enzymatique.

L'enzyme hTK1 immobilisée montre une faible activité avec seulement 10% de conversion. Cette première étape de conversion sera alors limitante pour l'étude de la cascade enzymatique dans le cas des enzymes immobilisées.

Rappelons que l'objectif de ce développement est l'étude de suivi de la cascade de phosphorylation du dTMP en dTTP afin de montrer :

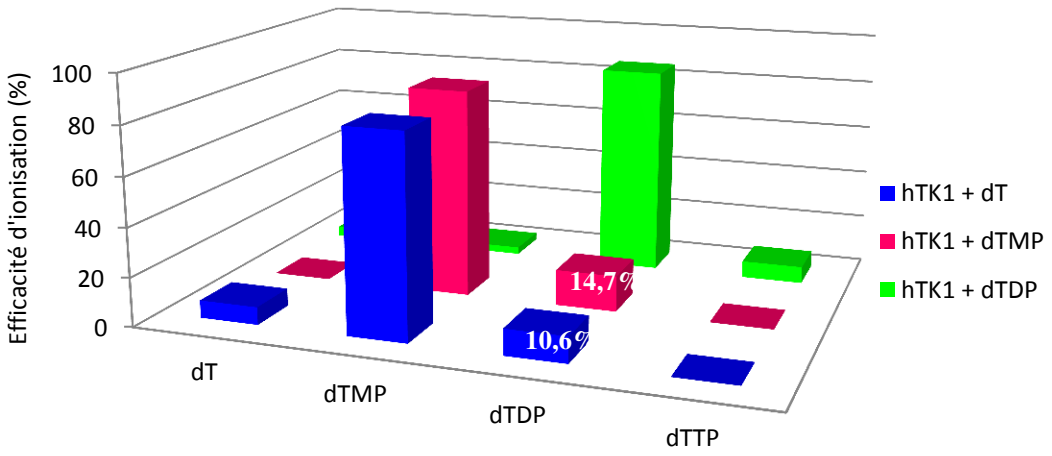
- la faisabilité de la méthode par utilisation d'enzymes immobilisées,
- l'apport de la méthodologie d'immobilisation d'enzyme pour le suivi de cascade de phosphorylation.

Pour ce faire, le taux de produit final dTTP obtenu pour une même concentration de substrat initial dTMP engagée, a été déterminé, dans le cas des enzymes libres et immobilisées. Notre volonté étant d'ouvrir l'étude à la faisabilité de la première étape de phosphorylation, nous avons fixé des concentrations initiales de substrat dT différentes dans le cas des enzymes libres et immobilisées afin d'obtenir une même concentration de produit dTMP.

Ainsi, dans le cas de l'enzyme immobilisée hTK1, une concentration de 500 µM de dT engagée après 1 heure de réaction a permis d'obtenir 50 µM de produit dTMP (10% de conversion) représentant la quantité de produit obtenue dans le cas de l'enzyme libre.

L'étude de la cascade a été réalisée par ajout successif d'enzymes dans le milieu réactionnel. Dans le cas de réactions non totales catalysées par les enzymes libres, la solution finale comportera les trois substrats de réaction (dT, dTMP et dTDP) en présence des trois enzymes (hTK1, hTMPK et hNDPK). L'étude de la spécificité de chaque enzyme pour son substrat correspondant est alors nécessaire en vue d'éviter la détection de faux positif.

Ainsi, chaque substrat (dT, dTMP et dTDP) à 50 µM a été mis en contact avec chaque enzyme libre hTK1 (0,48 g/L), hTMPK (0,04 g/L) et hNDPK (0,04 g/L) pendant 30 minutes à 37°C. Les efficacités de conversion inférieures à 15% représentées sur la Figure III-40 sont considérées comme étant non représentatives d'une conversion enzymatique (présence d'ions interférents). Les conversions non spécifiques, ayant des taux de moins de 10%, ne sont pas mentionnées dans les graphiques suivants.



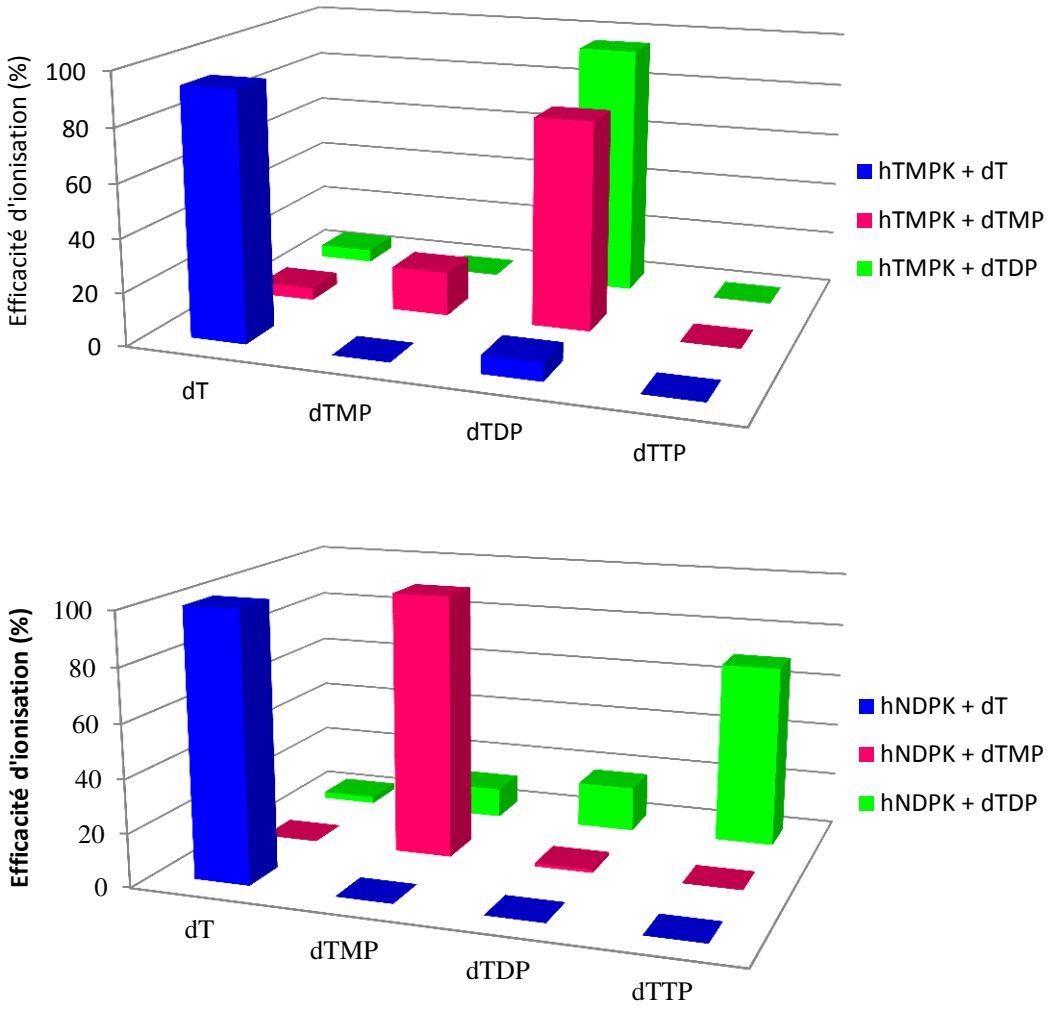


Figure III-40 - Etude de spécificité de réaction des trois enzymes hTK1 (0,48 g/L), hTMPK (0,04 g/L) et hNDPK (0,04 g/L) avec les trois substrats dT, dTMP et dTDP (50 µM), [ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM. Temps de réaction de 30 minutes à 37°C. Analyses par FIA-HRMS.

La réaction de l'enzyme hTK1 apparaît spécifique à la conversion du substrat dT. Dans le cas de la réaction avec les substrats dT et dTMP, 10% et 15% de dTDP sont visibles. Cependant, ces taux étant inférieurs ou égaux à 15%, les conversions sont considérées étant spécifiques (présence possible d'ions interférents provenant de la haute sensibilité de la détection).

Les étapes de di- et de triphosphorylation sont également spécifiques avec des taux de conversions non spécifiques inférieurs à 10%. La présence de dTMP lors de la réaction du dTDP avec l'enzyme hNDPK provient de la fragmentation du dTTP en dTDP et du dTDP en dTMP. Ainsi, dans les conditions de réactions données, chaque étape de phosphorylation est apparue spécifique sans conversion parasite visible. Il est alors possible de mettre en contact les trois enzymes sans risque de réactions non-spécifiques et donc de détection de faux-positifs (produit de phosphorylation non lié à la réaction).

Cette étude préliminaire confirme la spécificité de chaque enzyme pour son substrat correspondant et de fixer les conditions enzymatiques (temps de réaction, concentrations d'enzymes et de substrats) adéquates afin d'obtenir une bonne conversion des substrats en produits de réaction. La mise en place du suivi de phosphorylation off-line par FIA-HRMS a donc été réalisable.

1.2. Etude de la cascade de phosphorylation

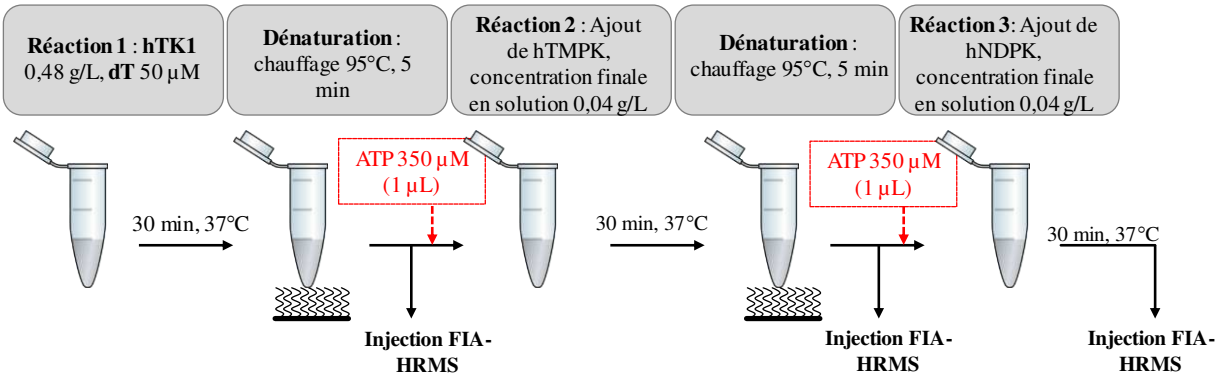
L'étude précédente a défini le temps et l'efficacité de réaction optimum pour chaque étape de phosphorylation. La cascade de phosphorylation a été entreprise à travers l'étude des enzymes libres et immobilisées.

Comme mentionné précédemment, les produits triphosphorylés Nu-TP présentent un effet d'inhibition sur l'enzyme hTK1. Il est donc important de veiller à ne pas initier la réaction par ajout unique en solution des trois enzymes hTK1, hTMPK et hNDPK, sous risque de stopper la première étape de phosphorylation. La cascade doit être réalisée par réactions successives et non simultanées.

D'après la littérature, les réactions enzymatiques catalysées par les enzymes kinases sont décrites comme nécessitant une concentration d'ATP en excès dans le milieu réactionnel (concentration de l'ordre du mM). Nous avons montré la possibilité de travailler avec une concentration de 350 µM pour le suivi d'une étape de phosphorylation. Cependant, d'après l'étude de l'influence de la concentration en ATP sur l'efficacité de réaction cette concentration d'ATP semble faible pour l'étude de cascade de phosphorylation. Le suivi des trois étapes de phosphorylations, catalysées par les enzymes hTK1, hTMPK et hNDPK libres et immobilisées pour la conversion du dT en dTTP a été évalué avec et sans ajout d'une quantité constante d'ATP (350 µM) avant chaque étape de conversion.

1.2.1. Protocole de l'approche avec les enzymes libres

Le procotole de l'étude de la cascade de phosphorylation par FIA-HRMS est schématisé en Figure III-41.



AcNH4, 50 mM, pH = 7, [ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200µM, $V_{initial}$ = 50 µL

Figure III-41- Protocole et conditions expérimentales du suivi de phosphorylation catalysé par les enzymes libres hTK1, hTMPK et hNDPK. Etude par FIA-HRMS.

1.2.2. Protocole de l'approche avec les enzymes immobilisées

La méthodologie d'immobilisation d'enzymes a permis d'extraire facilement chaque enzyme après réaction avant d'initier la réaction suivante. Seul le surnageant réactionnel a été engagé pour l'étape suivante de conversion.

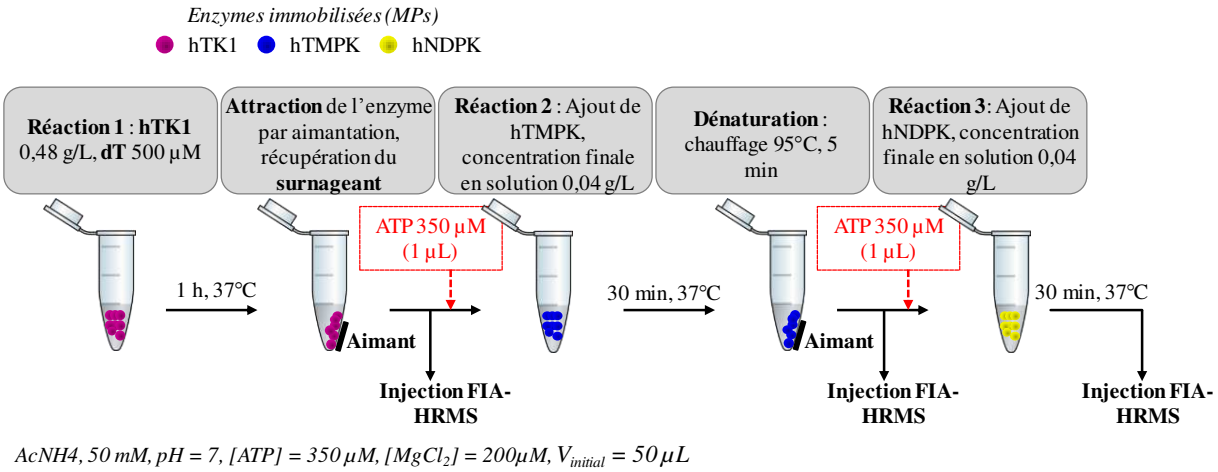


Figure III-42- Protocole et conditions expérimentales du suivi de phosphorylation catalysé par les enzymes immobilisées hTK1, hTMPK et hNDPK. Etude par FIA-HRMS.

1.2.3. Résultats de la cascade off-line de phosphorylation

Les Figure III-43-4 présentent l'efficacité des taux de conversions de la cascade de triphosphorylation pour les enzymes libres et immobilisées, avec et sans ajout d'ATP.

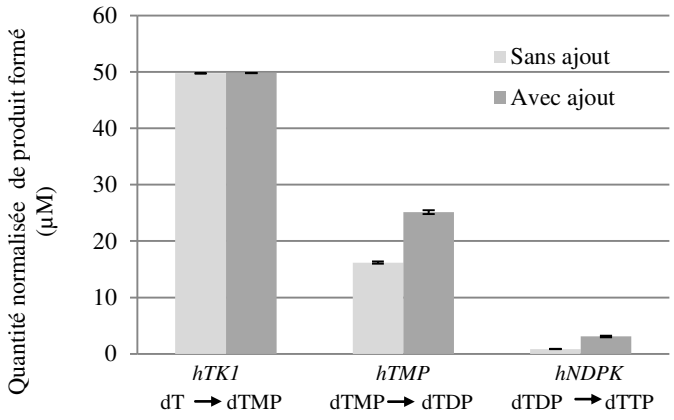


Figure III-43- Quantités normalisées de produit formé (µM) pour les réactions successives catalysées par les enzymes libres hTK1, hTMPK et hNDPK. Gris clair : sans ajout d'ATP, gris foncé : avec ajout d'ATP (350 µM). Les résultats sont représentatifs de trois expériences biologiques. Analyses réalisées en FIA-HRMS.

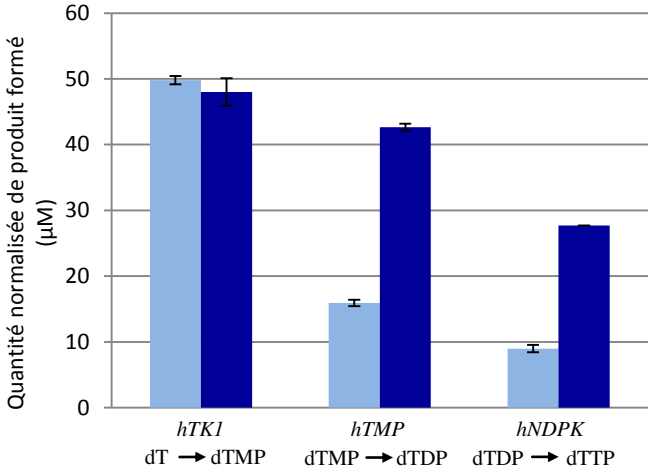


Figure III-44 - Quantités normalisées de produit formé (µM) pour les réactions successives catalysées par les enzymes immobilisées hTK1, hTMPK et hNDPK. bleu clair : sans ajout d'ATP, bleu foncé : avec ajout d'ATP (350 µM). Les résultats sont représentatifs de trois expériences biologiques. Analyses réalisées en FIA-HRMS.

La première étape de conversion du dT en dTMP

Rappelons que les conditions de réaction en enzymes libres et immobilisées de la première étape de phosphorylation ont été fixées afin d'obtenir la même quantité de produit dTMP. Cette première étape de conversion présente des efficacités similaires aux réactions individuelles (respectivement 99,5% et 9,6%). Du fait des quantités de substrat dT initialement engagées (50 µM et 500 µM), des quantités équivalentes de produits dTMP ont été obtenues en utilisant des enzymes libres et immobilisées (49,7 µM et 48 µM).

Bien que l'enzyme hTK1 perde une grande partie de son activité lors de l'immobilisation, une augmentation de la concentration en substrat et du temps de réaction ont permis d'obtenir une quantité suffisante de produit pour réaliser les étapes de phosphorylations suivantes. Les efficacités des deux étapes de phosphorylation catalysées par les enzymes hTMPK et hNDPK sous leur forme libre et immobilisée peuvent être alors comparées.

Cascade de phosphorylation du dTMP en dTTP

Ces deux étapes successives présentent des efficacités de conversions plus faibles que les réactions individuelles. L'ajout d'ATP avant chaque réaction permet d'améliorer les efficacités des deux étapes de phosphorylation. Dans le cas de l'utilisation d'enzymes libres, bien que la cascade semble plus efficace avec ajout d'ATP, la conversion en produit final reste très limitée avec obtention de 3,1 µM de dTTP (correspondant à une efficacité de conversion de dTMP de 6,2%). Cette faible conversion présente un frein à l'étude de molécules synthétiques dont l'activité peut être significativement plus faible que celle de l'endogène.

L'utilisation des enzymes immobilisées semble améliorer l'efficacité de conversion de cette cascade de diphosphorylation avec obtention de 26,0 µM de dTTP, équivalent à une efficacité de 52%.

La faible efficacité observée en enzyme libre pourrait provenir de la forte concentration en protéine dans la solution finale. La présence des trois enzymes dans la solution d'injection peut créer une compétition d'ionisation et ainsi masquer l'ionisation des molécules d'intérêts. Cette observation montre l'avantage de la méthodologie d'immobilisation d'enzyme à savoir :

- l'élimination du tampon de stockage (glycérol, tris-HCl) pouvant masquer l'ionisation,
- l'extraction facile de l'enzyme du milieu réactionnel avant l'analyse du surnageant.

La méthodologie de l'enzyme immobilisée apparaît adéquate et judicieuse pour le suivi de cascade de phosphorylations par FIA-HRMS. Bien que la première étape soit limitante, la production de produit final dTTP est visible et significative grâce à des conversions efficaces catalysées par les enzymes hTMPK et hNDPK. Cette expérience confirme donc la faisabilité du suivi de phosphorylations successives catalysées par les enzymes immobilisées hTMPK et hNDPK par FIA-HRMS. Par la suite, ces enzymes immobilisées seront utilisées dans le cadre d'un développement on-line par FAC-HRMS.

1.3. Conclusion

L'étude des réactions individuelles a permis de confirmer la possibilité du suivi d'une étape de phosphorylation avec les enzymes libres et immobilisées. L'utilisation de ces deux formes présente pour chacune des avantages et des inconvénients résumés dans le tableau présenté ci-dessous.

	Enzymes libres	Enzymes immobilisées
Avantages	• Simple d'utilisation • Similaire aux analyses de références en UV • Lot présentant une meilleure activité	• Elimination du tampon de stockage, meilleure ionisation en MS • Retrait aisé de l'enzyme pour l'étude d'une cascade • Possibilité d'utilisation en mode on-line
Inconvénients	• Environnement biologique pouvant masquer l'ionisation en MS • Retrait non possible pour l'étude d'une cascade • Pas de possibilité d'analyse on-line	• Lots immobilisés moins actifs • Possible modification tridimensionnelle pendant l'immobilisation • Temps de l'étape d'immobilisation (1 jour et demi).

Tableau III-19 –Avantages et inconvénients de l'utilisation des enzymes libres et immobilisées pour le suivi de phosphorylation off-line et on-line.

Au regard de ces différents avantages et inconvénients que présente l'utilisation des enzymes libres et immobilisées, la forme libre semble être à privilégier pour l'étude d'une étape de phosphorylation alors que la forme immobilisée semble être indiquée pour l'étude de la cascade enzymatique.

Ces travaux montrent l'intérêt de la méthodologie de l'enzyme immobilisée pour le suivi d'étapes successives de phosphorylation de la thymidine monophosphate, catalysées respectivement par les enzymes hTMPK et hNDPK. La faisabilité de la cascade de phosphorylation a été étudiée pour la première fois par injection en flux continu (mode FIA) couplé à une détection de spectrométrie de masse haute résolution au moyen d'enzymes libres et immobilisées.

L'utilisation des enzymes immobilisées pour l'étude de conversion du dTMP en dTTP a été prouvée possible et efficace. Cette méthodologie sera alors appliquée au cas de l'étude on-line par FAC-HRMS pour le suivi de conversion du dTMP en dTTP.

2. Etude on-line de la cascade enzymatique par Chromatographie d'Affinité Frontale couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution (FAC-HRMS).

Cette étude a prouvé la faisabilité de la preuve de concept d'un suivi de phosphorylations successives en off-line par FIA-HRMS. Cette dernière a été réalisée à travers le suivi de la conversion de l'endogène dTMP en dTTP, réaction catalysée par deux enzymes hTMPK et hNDPK immobilisées. Elle a permis de confirmer l'utilisation possible des lots immobilisés pour le suivi de simple ou de multi-phosphorylations.

Ainsi, cette première étape a permis d'envisager l'analyse on-line de suivi de phosphorylation par Chromatographie d'Affinité Frontale couplée à la Spectrométrie de Masse Haute Résolution. La méthodologie FAC-HRMS pourrait se révéler d'un grand intérêt pour l'étude de simple ou de multi-phosphorylations du fait de l'ensemble de ses utilisations et de ses avantages. Celle-ci présente les avantages liés à l'utilisation d'enzymes immobilisées telles qu'une possible réutilisation des enzymes packées dans les bioréacteurs et l'élimination de la suppression ionique provenant de l'analyse de macro-molécules et des tampons de stockage des protéines. La méthodologie FAC-HRMS permet une estimation rapide (inférieure à 15 min) du processus de phosphorylation dans le but de réaliser l'analyse de différents types d'analogues de nucléotides. Elle se voudra efficace et versatile concernant les substrats analysés.

Ce développement a présenté plusieurs enjeux :

- limiter la contamination de la chaîne HPLC par les sels de magnésium,
- mettre en place un processus d'automatisation pour le criblage de différents analogues de nucléotides.

De ces problématiques a résulté une optimisation du système FAC-HRMS. A cette fin, un système de boucles alternatives a été developpé.

Une méthodologie par FAC-HRMS pour le suivi de deux étapes de phosphorylations catalysées par les enzymes immobilisées hTMPK et hNDPK sera étayée dans cette partie. Après vérification de leur activité par FIA-HRMS, ces deux enzymes ont été packées dans deux micro-bioréacteurs placés en série au sein du système LC.

Similairement à l'étude off-line, le développement de cette méthodologie a été réalisé par suivi de phosphorylation de l'endogène naturel dTMP pour l'élaboration de la preuve de concept. Le développement s'articulera en quatre sous-parties. Dans un premier temps, seront présentées les différentes optimisations du système FAC-HRMS pour la mise en place :

- d'un système de boucles alternatives (limiter les contaminations, versatilité du système)
- d'un système de remplissage de bioréacteurs miniaturisés.

L'étude de faisabilité de conversion on-line a été réalisée par le suivi de chaque étape afin d'évaluer les efficacités et les vitesses de conversion. Pour finir, la faisabilité de la cascade on-line a été étudiée.

2.1. Principe de la méthodologie FAC-HRMS pour le suivi de cascade de phosphorylation

Les deux bioréacteurs hTMPK et hNDPK, placés en série au sein d'un four thermostaté du système LC, sont connectés à la source ESI tel que présenté sur la Figure III-45.

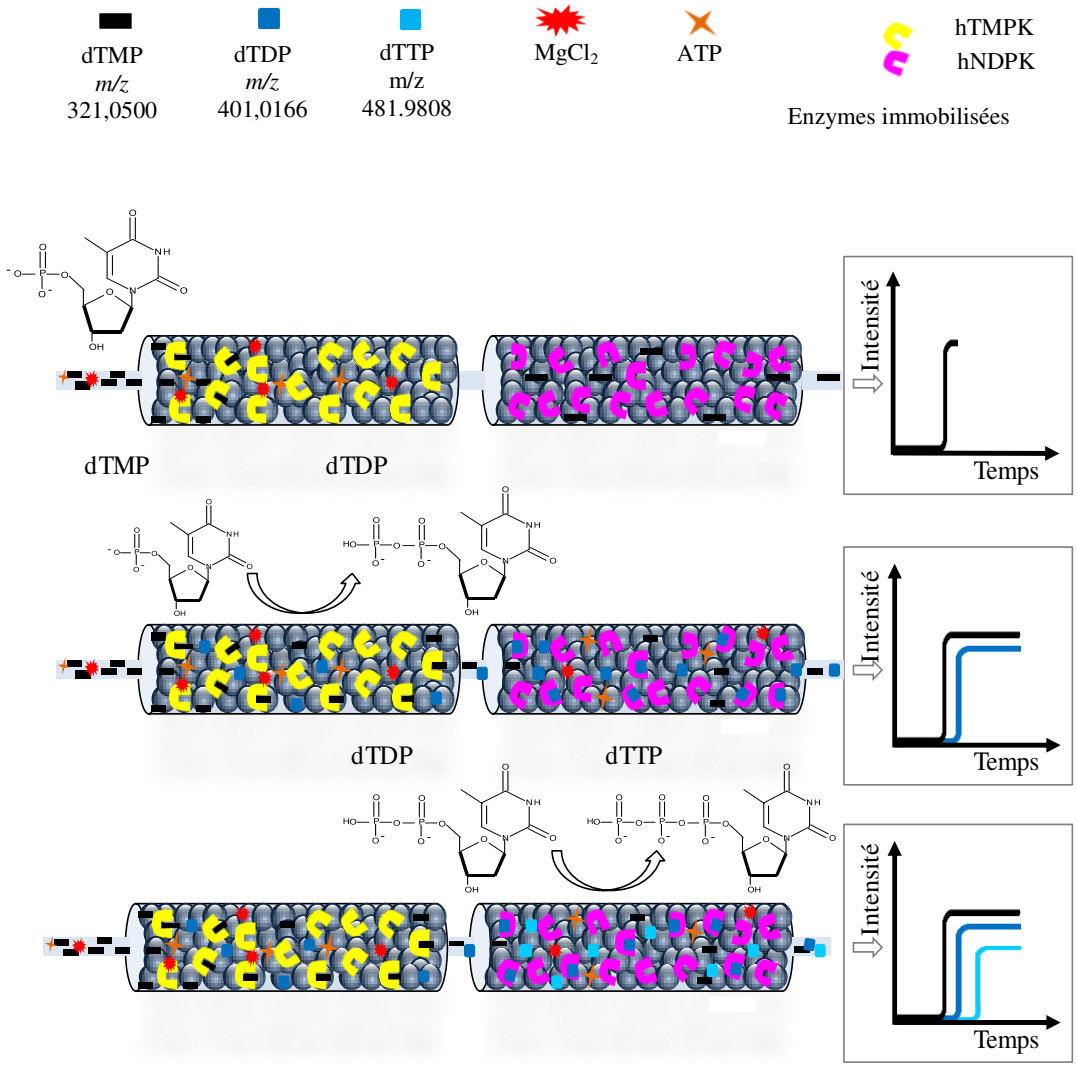


Figure III-45 - Schéma théorique du suivi de phosphorylation en ligne par FAC-HRMS. Le substrat initial dTMP est infusé dans les bioréacteurs hTMPK et hNDPK placés en série (four, 37°C), le suivi de conversion est réalisé par détection des chromatogrammes d'extraction des ions d'intérêts : dTMP, (m/z 321.0500, $[M^-H]^-$), dTDP (m/z 401.0166 $[M^-H]^-$) et dTTP (m/z 480.9831, $[M^-H]^-$).

La solution de substrat (dTMP), contenant l'agent chélatant (Mg^{2+}) ainsi que le phosphodonneur (ATP), est continuellement infusée au travers des bioréacteurs. Durant l'injection continue, le substrat

interagit dans un premier temps avec l'enzyme hTMPK. Après saturation des sites actifs de l'enzyme, le substrat en excès n'est plus retenu dans le bioréacteur hTMPK et passe au travers du deuxième bioréacteur.

D'après l'étude de spécificité réalisée en off-line, le passage du substrat dTMP dans le bioréacteur hNDPK n'engendre aucune interaction spécifique.

Après conversion du substrat dTMP en produit dTDP dans le 1er bioréacteur (hTMPK), le produit dTDP devient à son tour substrat du 2ème bioréacteur (hNDPK) qui sera converti en produit dTTP.

Grâce à la spécificité de détection, il est possible de visualiser l'apparition en direct des ions dTMP, dTDP et dTTP en fonction du temps. Les courbes d'extractions d'ions sont obtenues par extraction de l'intensité des ions d'intérêts de chaque spectre de masse des différentes acquisitions.

Le principe de la méthodologie FAC-HRMS a été présenté dans le contexte de l'étude de la cascade on-line de phosphorylation de l'endogène dTMP en dTTP. Avant d'exposer les manipulations effectuées pour l'étude de la cascade, il convient de décrire les optimisations effectuées sur le système, à savoir la mise en place du système de boucles alternatives et le remplissage des bioréacteurs.

2.2. Optimisations du système FAC

2.2.1. Système fluidique FAC

La Chromatographie d'Affinité Frontale est basée sur l'infusion continue de ligands (ou mélange de ligands) à travers un réacteur contenant la cible immobilisée. Ces ligands sont couramment dilués dans le tampon d'élution, et délivrés par la pompe du système HPLC connectée au réacteur enzymatique [66, 67]. Ce dispositif, bien que simple d'utilisation, comporte certaines contraintes :

- une consommation importante de substrats (purge du système),
- une éventuelle contamination de la chaîne et des voies d'élution selon le type de molécule analysée,
- une faible versatilité (changement de phase mobile et purge du système pour l'analyse de chaque substrat).

Dans le cadre de notre étude, ce type d'infusion n'apparait ni adéquat de par la présence de sels, ni judicieux pour la mise en place d'une stratégie de criblage. Des volontés d'automatisation des systèmes FAC-MS pour le criblage haut débit sont détaillées dans la littérature [68]. C'est dans l'esprit d'atteindre l'analyse à haut débit, que des améliorations ont été apportées au système FAC-HRMS. Ce système, schématisé en Figure III-46, repose sur une vanne 10 ports rassemblant deux boucles alternatives identiques (peek, 320 µL, 1/16 x 0,75 mm) placée en amont des bioréacteurs. Ce système de boucles aura pour vocation :

- de diminuer la consommation des analogues de nucléotides phosphonates acycliques dont la synthèse peut se révéler difficile,
- d'apporter une flexibilité d'analyse de substrats,
- de rendre l'automatisation possible,
- de limiter la contamination de la chaîne HPLC.

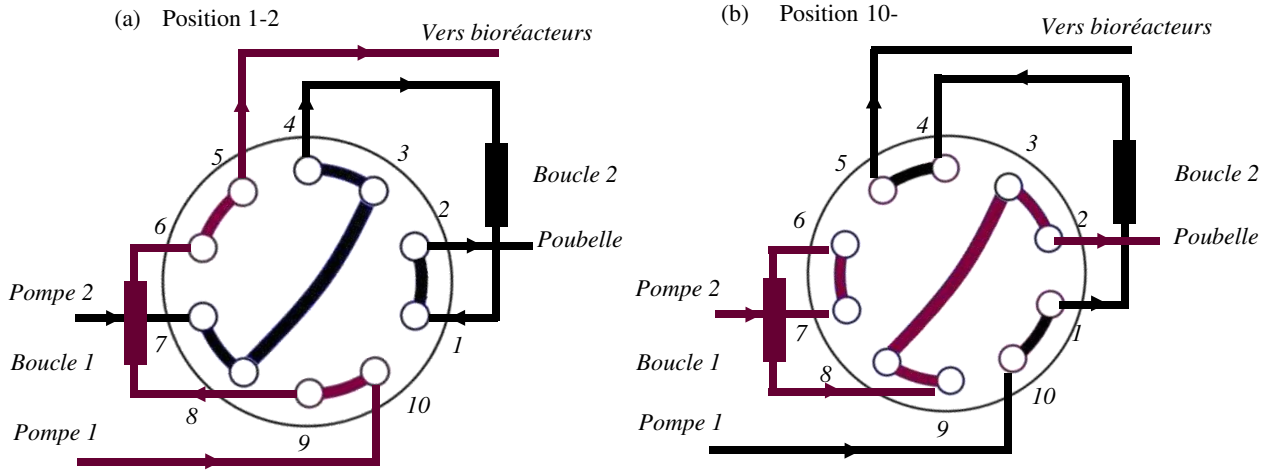


Figure III-46 - Système de boucles alternatives sur vanne 10 ports du système FAC-HRMS. (a) l'infusion d'une première boucle remplie de solution à analyser (boucle 1, V = 320 µL) est réalisée pendant le remplissage de la seconde boucle (boucle 2, de même volume) par la solution à analyser. (b) : une rotation de la vanne est effectuée avant la fin de l'infusion de la première boucle afin d'observer un plateau de conversion sur le suivi des EIC.

Cette vanne est reliée en amont à deux micro-pompes HPLC : une pompe d'infusion (1) et une pompe de remplissage (2). En position 1-2, cette dernière assure l'injection de l'échantillon d'intérêt dans la boucle 2 située en dehors du circuit. Par rotation de la vanne en position 10-1, la boucle est intégrée dans le circuit FAC et le contenu est élué vers les bioréacteurs par la pompe d'infusion (1). Pendant l'infusion, la pompe de remplissage assure l'injection de l'échantillon dans la boucle 1. Une rotation de la vanne en position 1-2 est réalisée avant l'élution totale du contenu de la boucle 2.

Ce protocole, schématisé en Figure III-47, est réalisé en continu afin d'obtenir une infusion continue dans les bioréacteurs placés en série. En sortie de ces bioréacteurs, les solutions sont infusées dans la source électrospray du système HRMS (Q-TOF).

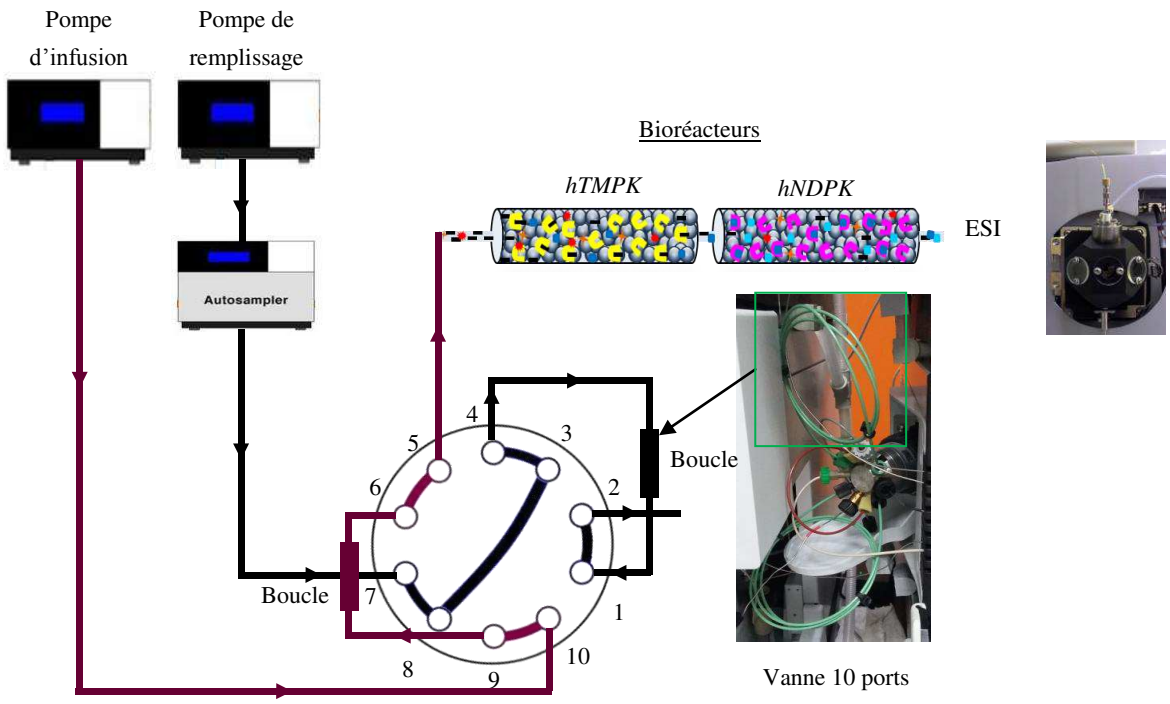


Figure III-47 - Schéma du système FAC-HRMS : deux pompes pour l'infusion et le remplissage du système de boucles alternatives. Les bioréacteurs placés en série sont reliés à la vanne 10 ports et directement à la source électrospray.

Ce développement méthodologique aura pour but de réaliser des études qualitatives et quantitatives de mesures d'efficacités de phosphorylations dans le cas de l'analyse de l'endogène. Afin d'atteindre cette dimension quantitative, le bioréacteur doit être exploité à son maximum d'activité pour les conditions de réactions données (débit, concentrations en substrat, co-facteurs, température). Dans le cadre d'une approche dynamique, l'activité maximale sera observée par apparition d'un plateau d'intensité. Pour ce faire, le système d'infusion continue a nécessité différentes optimisations. Ces optimisations ont été réalisées par infusion d'une molécule modèle dans un bioréacteur de silice vierge. Ce système nécessite :

- un pré-conditionnement des boucles avec le tampon d'élution : cette étape permet de ne visualiser aucune interférence provenant d'un changement d'éluant. Le dépôt de sel évitera également une trop forte adsorption des nucléotides sur les parois en peek des boucles. Sans cette étape de conditionnement, le plateau d'infusion ne peut être observé comme présenté en Figure III-48,
- une configuration des boucles en mode back-flush : cette configuration masque l'effet de dilution lors des étapes de remplissage/infusion des boucles,
- une limite des volumes morts : ces volumes morts entraînent une chute d'intensité du signal lors de la rotation de la vanne, visible sur les extractions d'ions présentées en Figure III-49,
- un temps optimal de rotation de la vanne : une rotation tardive entraîne une libération de nucléotides et donc une hausse du signal. Ce phénomène est visible en Figure III-49.

Sans l'ensemble de ces conditions, la visualisation d'un plateau de diffusion est impossible.

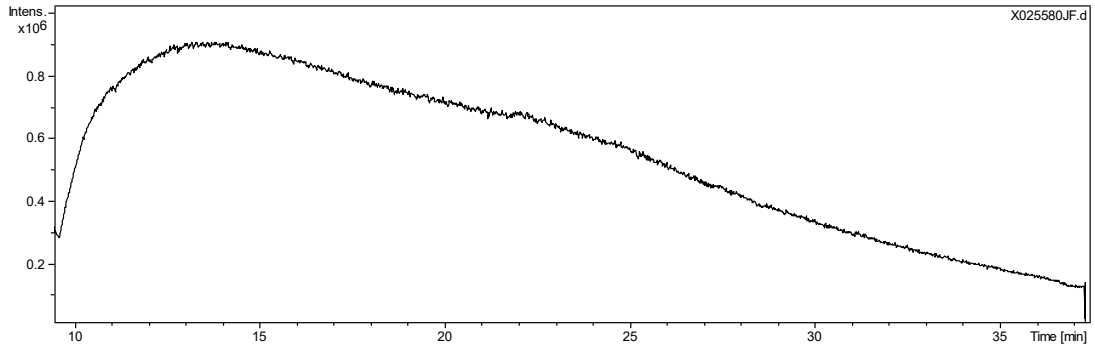


Figure III-48 - Chromatogramme d'extraction d'ions représentant le composé infusé par le système de boucles alternatives sans pré-conditionnement des boucles par le tampon de réaction. Observation d'une diminution de l'intensité du signal.

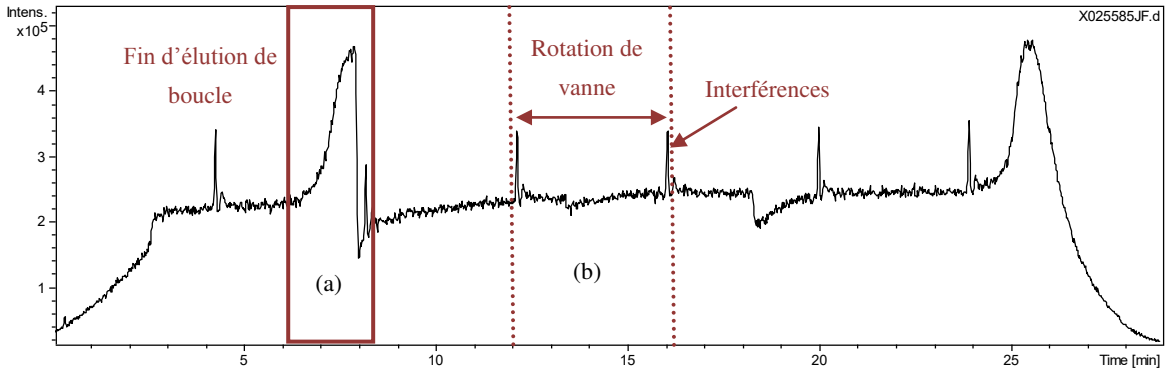


Figure III-49 - Chromatogramme d'extraction d'ions représentant le composé dTMP infusé par le système de boucles alternatives (a) fin d'infusion de la première boucle et (b) interférences dues à la rotation de la vanne.

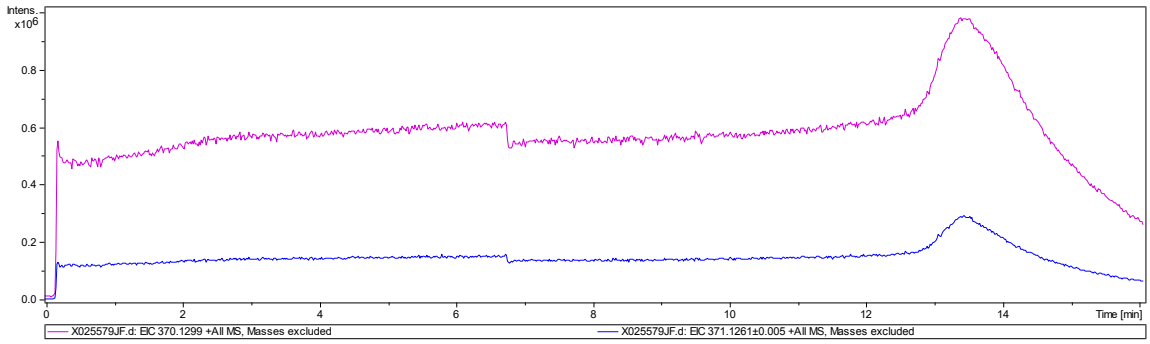


Figure III-50 - Chromatogrammes d'extraction d'ions représentant les composés infusés par le système de boucles alternatives après optimisations des volumes morts et du temps de rotation de la vanne.

<u>Remarque</u> : le volume des boucles a été fixé arbitrairement à 320 µL pour un temps d'élution d'une boucle aux alentours de 5 min (débit compris entre 40 µL/min et 60 µM/min). Ce volume est flexible en fonction du temps d'analyse souhaité. Le développement méthodologique du suivi de conversion de l'endogène a été réalisé par injection manuelle en position 7 de la vanne. Bien que ce type d'injection soit plus commode pour l'optimisation de la méthodologie, l'automatisation d'analyses a été développée en vue d'une étude de criblage des analogues de phosphonates acycliques.

A l'issue de la description du système fluidique FAC-HRMS, nous exposerons le principe de remplissage des bioréacteurs.

2.2.2. Remplissage des bioréacteurs

Comme mentionné précédemment, la méthodologie d'enzyme immobilisée utilisée en Chromatographie d'Affinité Frontale, entraîne une faible consommation d'enzymes découlant de la possibilité de réutilisation des bioréacteurs [69]. Dans ce contexte, les développements effectués par FAC tendent vers une miniaturisation de ces bioréacteurs [70].

Ces derniers ont été introduits au sein du laboratoire lors d'une précédente thèse d'A. Salwinski. Présentés en Figure III-51, ils sont constitués d'une cartouche cylindrique contenant la cible immobilisée (4,6 mm x 1,5 cm, V = 249 µL), placée dans un insert.

Figure III-51 - Support rempli des billes de silice sur lesquelles est immobilisée l'enzyme. A : bioréacteur (diamètre interne : 4,6 mm, longueur 1,5 cm, volume 249 µL), B : support du bioréacteur.

Le remplissage de la cartouche s'effectue par différents ajouts de la solution d'enzymes immobilisées à l'aide d'une propipette, suivi de plusieurs étapes de centrifugation. Dans le contexte de notre étude, ce type de bioréacteur a présenté plusieurs inconvénients,

- un large volume (249 µL) impliquant une grande consommation d'enzymes,
- une étape de remplissage non automatisée.

Par conséquent, nous avons entrepris le développement d'un système de remplissage semi-automatisé de bioréacteurs de plus faibles diamètre (1 mm) et volume (40 µL) mais de plus grandes longueurs (5 cm), pour optimiser le temps de contact entre le substrat et l'enzyme durant l'infusion. Notre choix s'est donc orienté vers l'utilisation de capillaires de dimensions 1mm x 5 cm présentés en Figure III-52.

Figure III-52 - Nouveau type de bioréacteur (inox, diamètre interne : 1 mm, longueur : 5 cm, volume : 40 µL).

La diminution du diamètre interne conjuguée à une augmentation de la longueur du capillaire permet de diminuer le volume du bioréacteur (40 µL contre 249 µL). Il génère ainsi une consommation six fois moindre de quantité de billes packées. Comme présenté sur la Figure III-53, après remplissage des capillaires avec chaque enzyme immobilisée, les deux bioréacteurs (A) sont placés en série via une union en acier (B). A la fin de chaque bioréacteur est placé un fritté (C) afin d'éviter tout passage de la silice dans la partie en aval (notamment dans la source d'ionisation).

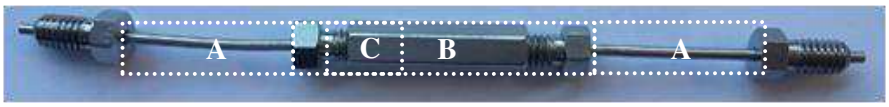


Figure III-53 - Système de deux bioréacteurs mis en série (A), liés par une union (B) contenant un fritée en sortie de capillaire (C).

Chaque bioréacteur est rempli individuellement *via* l'utilisation d'une pompe HPLC. Le système de remplissage des capillaires est schématisé en Figure III-54.

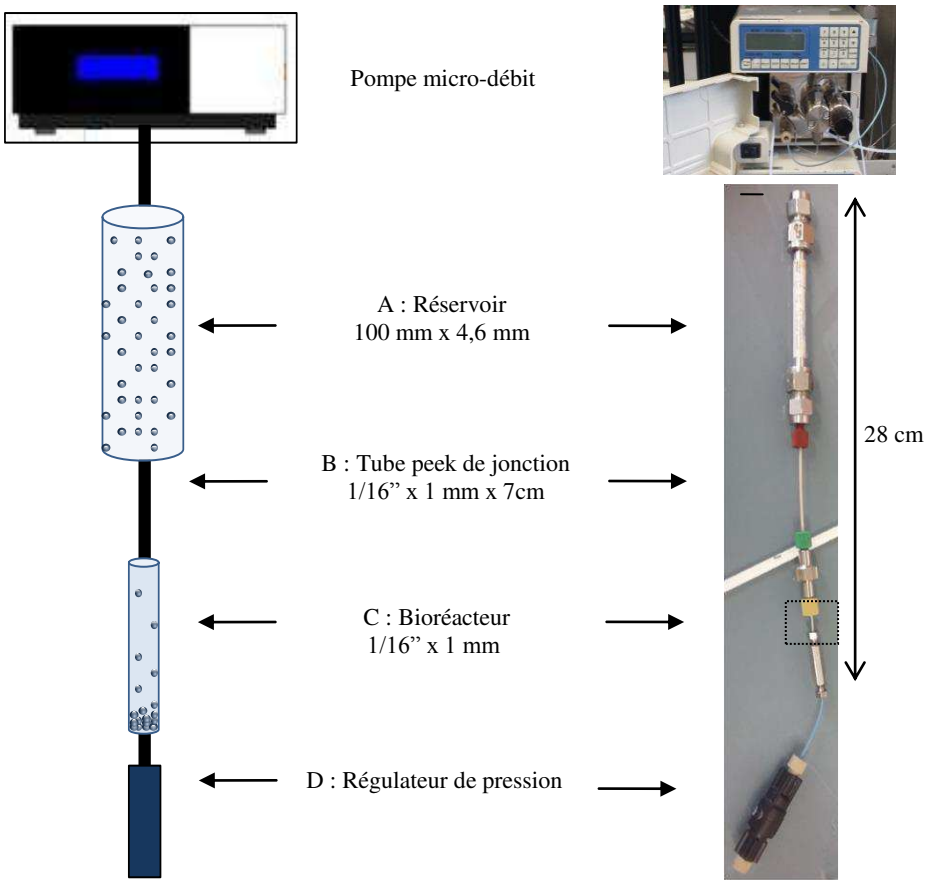


Figure III-54 - Système de remplissage des bioréacteurs. L'enzyme immobilisée, placée dans un réservoir (A), est éluée par une pompe micro-débit vers le bioréacteur (C) via un tube de jonction (B). La silice est retenue dans le bioréacteur par un fritté placé en fin de système. Un régulateur de pression (D) est placé en fin de remplissage pour finaliser le remplissage.

Une solution de 30 mg de billes de silice sur laquelle est immobilisée l'enzyme, est préalablement placée dans un réservoir (4,6 mm x 100 mm) lié au bioréacteur (capillaire en acier, 1/16", 0,040" x 5 cm) par un capillaire en peek (1/16" x 1 mm) et d'une union.

Le volume important du réservoir (830 µL) permet de placer l'intégralité de la solution d'enzyme immobilisée. L'élution en continu de tampon ($AcNH_4$, 50 mM, pH = 7) à travers le réservoir (pompe HPLC, Jasco PU-2085 Plus) permet l'écoulement de la silice du réservoir vers le capillaire. Un fritté est placé dans l'union en fin de bioréacteur afin de retenir les billes de silice. Le débit initial est fixé à

10 µL/min puis est augmenté progressivement pour obtenir une pression ne dépassant pas les 30 bars. Après élution de 3 volumes de réservoir (soit environ 1 h d'élution) le capillaire est considéré rempli.

Le remplissage de la phase stationnaire est ensuite finalisé par une montée en pression (ne dépassant pas les 50 bars) grâce à l'ajout d'un régulateur de pression placé à la fin du système. Le succès du remplissage est vérifié par la présence de silice aux deux extrémités du bioréacteur. Chaque bioréacteur est ensuite conservé dans une solution tampon ($AcNH_4$, 50 mM, pH = 7) à 4°C.

Ce procédé, contrairement au remplissage à la propipette, présente l'avantage d'une semi-automatisation et d'une montée en pression permettant un package plus homogène.

Remarque : il est important de noter qu'un remplissage correct nécessite de la vigilance sur plusieurs aspects. Le tube peek reliant le réservoir et le capillaire doit être régulièrement changé pour éviter tout risque d'obstruction. En effet, ayant un diamètre interne de 1 mm, ce tube possède une fine couche de peek ne résistant pas à plusieurs cycles de remplissage (vissages et dévissages endommageant et réduisant le diamètre interne). Chaque volume mort doit être optimisé de manière à limiter les fuites ou l'accumulation de silice dans les unions. Pour finir, après chaque cycle de remplissage, toutes les parties du montage doivent être minutieusement lavées à l'eau distillée.

Comme mentionné précédemment, cette méthodologie a pour objectif d'étudier les étapes de phosphorylation de la thymidine monophosphate en thymidine triphosphate. A la suite de l'optimisation du système FAC et du remplissage des capillaires, nous présenterons l'étude de conversion on-line du dTMP en dTTP. Cependant, avant d'exposer les résultats de cette étude, il convient de détailler les études préliminaires réalisées pour tester la fiabilité et la robustesse du système. Ainsi, ce paragraphe sera consacré à l'étude de chaque bioréacteur avec un focus sur les notions d'activité, d'efficacité de conversion et de stabilité d'activité dans le temps.

2.3. Etude d'activité, d'efficacité de conversion et de stabilité des bioréacteurs hTMPK et hNDPK

2.3.1. Matériel

Les bioréacteurs (1/16" x 0.040" x 5cm), unions en acier, le régulateur de pression et les tubes peek (0.040" and 0.030") ont été achetés chez Cluzeau. L'eau déionisée utilisée dans chaque procédure est purifiée par un système milli-Q.

2.3.2. Méthode

L'instrumentation ainsi que la méthode de spectrométrie de masse ont été décrites précédemment dans la section PARTIE I.2.1.2 de ce chapitre.

2.3.3. Protocole d'immobilisation d'enzymes

La fonctionnalisation des particules de silice a été réalisée selon le procédé décrit dans les précédents travaux de M. A Salwinsky [71]. Les deux enzymes hTMPK et hNDPK ont été immobilisées séparément dans deux lots distincts. 30 mg de silice fonctionnalisées, placés dans 500 µL d'un tampon phosphate (50 mM, pH = 6,8) ont été mises en contact avec les deux enzymes, à des concentrations finales en solution de 0,55 g/L pour hTMPK et 1,8 g/L pour hNDPK. Les solutions ont été agitées pendant 6 heures à 4°C puis placées avec 1 mM de glycine toute la nuit à 4°C. Le lavage de l'enzyme est réalisé lors de l'étape de remplissage du capillaire par élution d'une solution tampon pendant 1h ($AcNH_4$, 50 mM, pH = 7,0).

Remarque : similairement à l'étude off-line, la quantité d'enzymes immobilisées sur support n'est pas connue. Les concentrations d'enzymes engagées lors de l'étape d'immobilisation sont supérieures à celles de l'étude off-line. Ces concentrations permettent d'obtenir un rapport de la quantité d'enzymes sur la quantité de support supérieur afin d'optimiser les chances d'immobilisations et donc d'optimiser l'activité des bioréacteurs.

2.3.4. Etude de l'activité de la Thymidylate monophosphate kinase humaine (hTMPK)

L'étape de remplissage a été réalisée selon la procédure présentée dans la section 2.2.2 de cette partie. Avant analyse, le bioréacteur contenant l'enzyme hTMPK est placé dans le four HPLC thermostaté à 37°C et conditionné avec une solution tampon d'acétate d'ammonium (50 mM, pH = 7) pendant 15 minutes à un débit de 60 µl/min.

Les interactions entre le phosphodonneur ATP et l'enzyme sont prépondérantes pour initier une étape de phosphorylation. En mode off-line, ces interactions sont favorisées par les conditions d'incubation statique et par un temps d'incubation flexible. L'approche dynamique on-line peut sembler ainsi défavorable. Similairement à l'étude off-line, une étude d'influence de la concentration en ATP sur la vitesse et l'efficacité de la réaction on-line a été réalisée.

Dans cette démarche, 5 solutions de 20 µM de dTMP ($AcNH_4$ 50 mM, pH = 7,0 , [$MgCl_2$] = 200 µM) de différentes concentrations en ATP (10, 25, 50, 150 et 350 µM) ont été infusées à 60 µL/min (P = 10 bar) dans le bioréacteur hTMPK selon la procédure décrite en section 2.2.1. La rotation de la vanne a été réalisée toutes les 3 minutes afin de délivrer continuellement du substrat dans le bioréacteur. Ce procédé est répété jusqu'à obtention d'un plateau de l'extraction d'ion du substrat et du produit de la réaction (*m/z* 321.0500 $[M-H]^-$ pour dTMP et *m/z* 401.0166 $[M-H]^-$ pour dTDP). Le bioréacteur est ensuite lavé et les enzymes régénérées par une solution d'acétate d'ammonium à 100 µL/min jusqu'à complète élimination des ions de substrat et de produit. Entre chaque utilisation, le bioréacteur est stocké dans une solution d'acétate d'ammonium à 4°C.

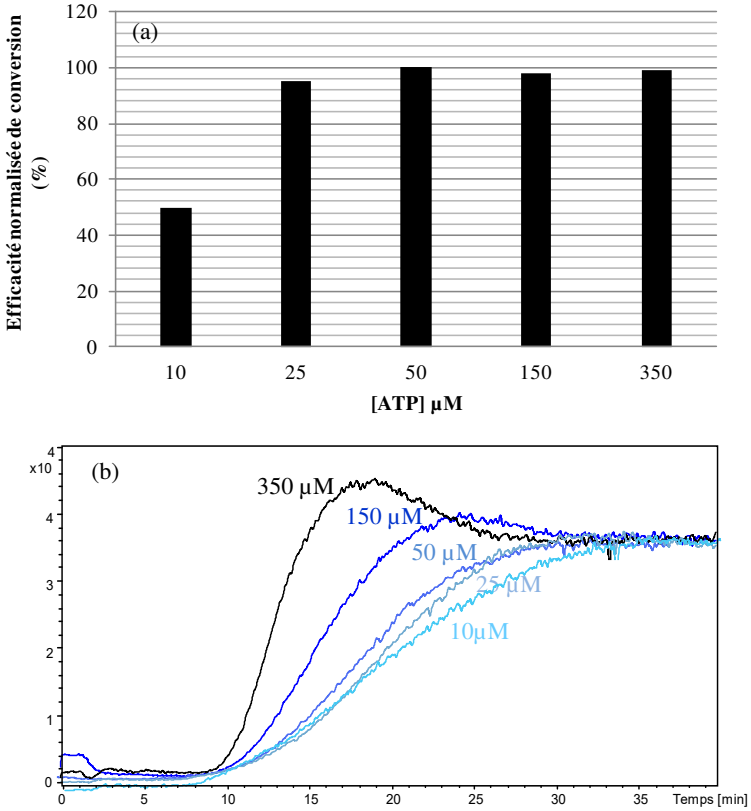


Figure III-55 - (a) Efficacités normalisées (intensité des plateaux d'infusion) et (b) vitesses de conversion du dTMP en dTDP en fonction de la concentration en ATP par infusion dans le bioréacteur hTMPK par FAC-HRMS. (b) chromatogrammes d'extractions d'ions du dTDP (m/z 401,0166 [M-H]⁻.

D'après la Figure III-55, l'infusion continue d'ATP semble compatible avec l'étude de la conversion du dTMP en dTDP. L'ATP semble parvenir à interagir avec l'enzyme pour initier la réaction enzymatique bien que son temps de séjour dans le bioréacteur soit inférieur au cas d'une réaction off-line.

Il apparaît que la concentration en phosphodonneur ait une influence sur l'efficacité et la vitesse de réaction du dTMP en dTDP. L'infusion en continu d'une concentration trop faible (10 µM) ne permet pas un apport assez significatif pour réaliser la conversion de façon optimale.

A partir d'une concentration de 25 µM, l'efficacité de conversion atteint un palier. La normalisation des intensités des extractions d'ions du dTDP *via* le logiciel DataAnalysis permet d'évaluer la vitesse de conversion du produit à travers l'étude de la pente d'apparition des EIC du produit dTDP. Ainsi, la vitesse de réaction semble s'intensifier avec l'élévation de la concentration.

Bien qu'une concentration de 300 µM maximise la vitesse de réaction, la tendance de la courbe de l'extraction d'ion du dTDP en est moins homogène. Il en découle qu'une concentration de 150 µM d'ATP apparaît comme étant le compromis optimal en termes d'efficacité et de vitesse de réaction. Cette étape de conversion étant connue pour être une étape clé de la cascade de phosphorylation, cette concentration en ATP sera utilisée pour la réaction catalysée par l'enzyme hNDPK.

L'activité du bioréacteur hTMPK a été testée par infusion d'une solution de dTMP à 20 µM ([$MgCl_2$] = 200 µM, [ATP] = 150 µM, n = 3) dans les conditions décrites précédemment. Cette expérience a été réalisée par infusion dans un bioréacteur actif et dénaturé (par infusion de méthanol). L'étude comparative a permis d'évaluer la détection de faux positifs.

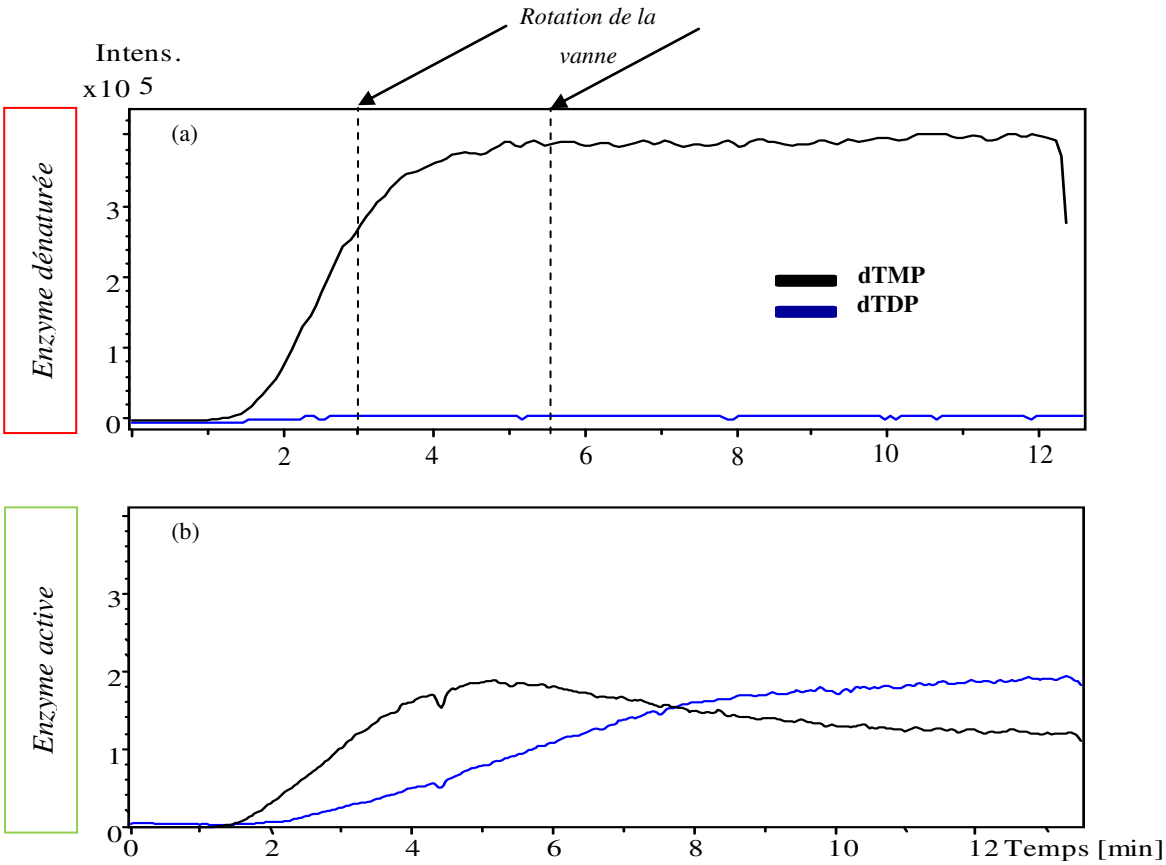


Figure III-56 - Bioréacteur hTMPK; suivi des EIC de dTMP et dTDP (m/z 321.0500 [M-H]-, m/z 401.0166 [M-H]-) pour le bioréacteur (a) dénaturé et (b) actif. Débit = 60 µL/min, phase mobile : acétate d'ammonium (pH = 7, 50 mM), rotation de la vanne toutes les 3 minutes.

Les suivis des extractions d'ions des composés d'intérêts dTMP et dTDP (*m/z* 321.0500 $[M-H]^-$ pour dTMP et *m/z* 401.0166 $[M-H]^-$ pour dTDP) lors de l'infusion des solutions dans les bioréacteurs actifs et dénaturés sont présentés en Figure III-56.

L'enzyme dénaturée ne montre aucune conversion du substrat, seule la détection du substrat dTMP est observée. Le plateau de conversion, rapidement atteint après 4 minutes d'infusion, présente une intensité de 3,8 x 10^5 uma. La pente d'apparition du dTMP (avant détection du plateau) d'une valeur de 3,5 minutes provient des interactions non-spécifiques entre le substrat et le support d'enzymes immobilisées. Cette expérience confirme l'absence de faux positif.

Dans le cas de l'étude de l'enzyme active, la production de dTDP est observée à partir de 2 minutes d'infusion, soit 30 secondes après l'apparition des ions correspondant au substrat dTMP non converti. Une diminution de l'intensité de l'EIC du substrat est visible entre l'enzyme dénaturée et l'enzyme

active (de 3,8 x 10^5 à 1.2 x 10^5 uma). Une pente plus faible ainsi qu'un retard de plateau (de 4 à 8 min) attestent de la conversion du dTMP en dTDP.

Il est important de noter que l'intensité de l'EIC du substrat dTMP provient de la non-conversion du substrat ainsi que de la fragmentation minime en source, par perte d'un groupement phosphate, du dTDP en dTMP. Ainsi, l'intensité de l'EIC ne peut être directement corrélée à la quantité de substrat non converti. La fragmentation en source du produit dTDP a été préalablement estimée par analyse d'une gamme de différentes concentrations du standard dTDP. Les mesures des intensités des ions correspondant aux dTMP et dTDP ont révélé un taux de fragmentation d'environ 20%. Compte tenu de ce taux de fragmentation, l'efficacité de conversion du dTMP en dTDP par le bioréacteur hTMPK est estimée à 67%. La répétabilité de l'analyse a été testée à travers l'étude de trois infusions de solutions de dTMP. Avec un coefficient de variation de 2,42%, la répétabilité de conversion du dTMP en dTDP est considérée acceptable. Bien qu'une légère baisse d'intensité du signal de dTMP soit visible dans le cas de l'enzyme active (4,5 minutes), l'expérience ne montre aucune interférence significative du système de boucles alternatives lors de la rotation de la vanne. Cette première expérience prouve la faisabilité de la conversion on-line du dTMP, catalysée par l'enzyme hTMPK. Cette dernière s'est révélée efficace (67% de conversion) et rapide (apparition du produit à 2 minutes d'infusion). L'activité de ce bioréacteur semble donc compatible au suivi on-line de cascade de phosphorylation. Cette étude valide la première étape de conversion on-line.

De la même manière, nous avons procédé à l'étude d'activité du bioréacteur hNDPK pour le suivi de la deuxième étape de phosphorylation.

2.3.5. Etude de l'activité de la nucléoside diphosphate kinase humaine (hNDPK)

Le remplissage et conditionnement du bioréacteur hNDPK ont été réalisés selon la procédure décrite dans le paragraphe précédent. L'infusion d'une solution de dTDP à 20 µM ([ATP] = 150 µM fixée dans l'étude précédente, [$MgCl_2$] = 200 µM) a été réalisée à un débit de 40 µL/min. Les rotations de vanne ont été fixées à 5 minutes d'infusion. L'analyse est stoppée après obtention de palier de conversion. Après chaque analyse, le bioréacteur est lavé et régénéré par élution de tampon de réaction à un débit de 100 µL/min jusqu'à élimination du substrat et du produit de la réaction enzymatique. Le bioréacteur est ensuite stocké dans une solution de tampon à 4°C.

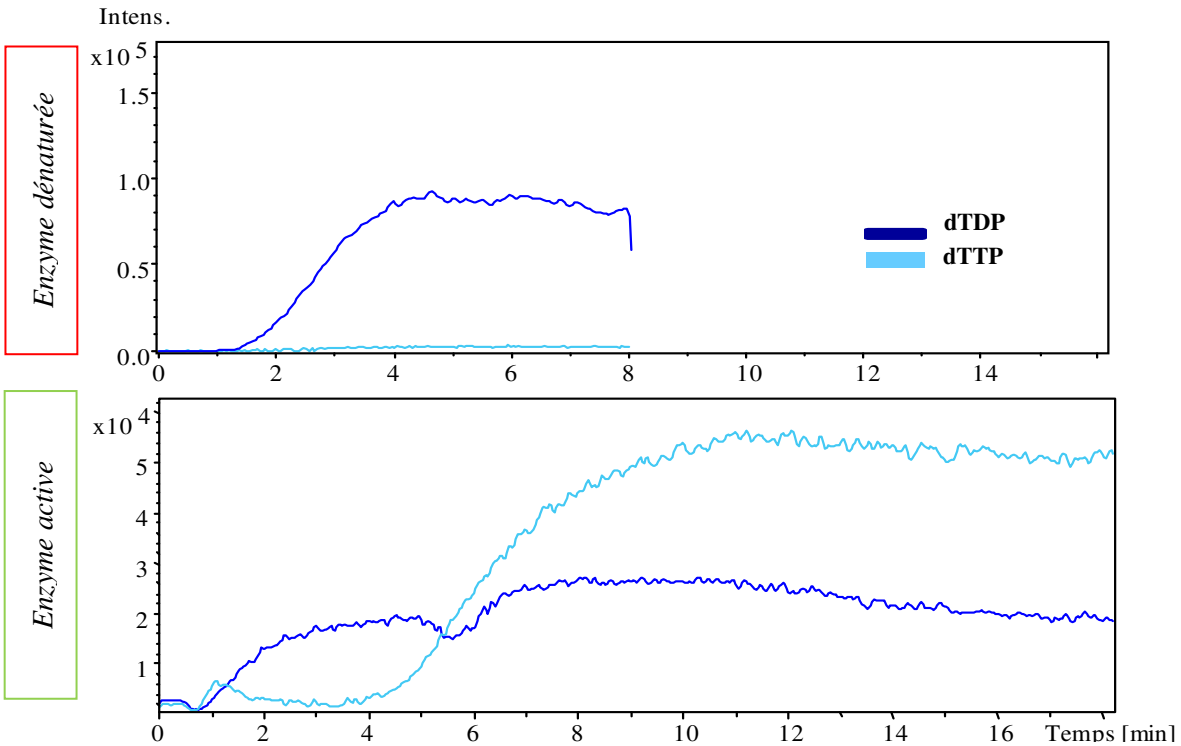


Figure III-57 - Bioréacteur hNDPK; suivi des EIC de dTDP et dTTP (m/z 401.0166 [M-H]-, m/z 480.9831 [M-H]-) pour le bioréacteur (a) dénaturé et (b) actif. Débit = 40 µL/min, phase mobile : acétate d'ammonium (pH = 7, 50 mM), rotation de la vanne toutes les 5 minutes.

D'après la Figure III-57, cette expérience montre des résultats similaires à ceux obtenus pour le bioréacteur hTMPK. La conversion du substrat dTDP en dTTP est visible par infusion dans le bioréacteur actif. Aucun faux positif n'est détecté dans le cas de l'enzyme dénaturée. Cette conversion est considérée totale avec 100% de dTDP convertis en dTTP. La présence de dTDP sur l'extraction d'ions de l'enzyme active provient d'une fragmentation du dTTP en dTDP estimée à hauteur de 50%.

Avec une estimation d'un taux de conversion total, cette étape de conversion apparaît moins limitante que celle catalysée par l'enzyme hTMPK pour l'étude de conversion de l'endogène. La répétabilité de l'analyse a été testée par infusion des trois mêmes solutions de dTDP. Avec un coefficient de variations de 2,36%, cette étape de conversion en ligne est considérée comme répétable.

Les deux étapes de phosphorylation on-line présentent des conversions rapides (< 5 minutes) et efficaces (taux de conversion > 60%). Ces études valident l'activité des bioréacteurs dont dépend le suivi de multi-phosphorylation on-line. Par ailleurs, les faibles coefficients de variations sur les taux de conversion (inférieurs à notre critère d'acceptation de 5%) attestent de la robustesse de notre système. Suite à ces résultats, nous sommes en mesure d'évaluer la cascade on-line de phosphorylation.

Pour rappel, la Chromatographie d'Affinité Frontale, sélectionnée dans le cadre de cette étude, a pour vocation à développer une méthodologie de criblage de suivi de phosphorylation de phosphonates acycliques. L'apport de la méthodologie d'immobilisations d'enzymes sera donc évalué par une étude de réutilisation des bioréacteurs.

2.3.6. Etude de stabilité des bioréacteurs remplis des enzymes hTMPK et hNDPK

Le principe de cette analyse consiste en l'étude de stabilité de chaque bioréacteur en fonction du temps et du nombre d'analyses effectuées. Dans le cadre de cette démarche, les efficacités de conversion des deux étapes de phosphorylation ont été comparées sur plusieurs semaines.

Bioréacteur hTMPK : une solution de 20 µM de dTMP (AcNH4, 50 mM, pH = 7,0, [ATP] = 150 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM) est infusée dans le bioréacteur à un débit de 60 µL/min. Sept mesures d'activité ont été relevées sur 60 jours correspondant à 21 utilisations (13,25 heures à 37°C). Après chaque série d'analyses, le bioréacteur est stocké dans une solution d'acétate d'ammonium à 4°C.

Bioréacteur hNDPK : une solution de 20 µM de dTDP (AcNH4, 50 mM, pH = 7,0, [ATP] = 150 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM) est infusée à un débit de 40 µL/min comme décrit précédemment. Sept mesures d'activités ont également été réalisées sur une période de 68 jours correspondant à 20 utilisations (15,25 heures à 37°C). Le bioréacteur hNDPK est stocké dans les conditions présentées ci-dessus.

L'activité normalisée des bioréacteurs est présentée en Figure III-58. De toute évidence, cette activité décroît en fonction du temps d'utilisation. Le dernier point d'activité du bioréacteur hTMPK présente une activité de 10% après 60 jours de stockage à 4°C (21 utilisations, 13,25 heures d'utilisation). En revanche, le second bioréacteur hNDPK montre une meilleure stabilité avec une activité de 40% après 68 jours de stockage (20 utilisations, 15,25 heures).

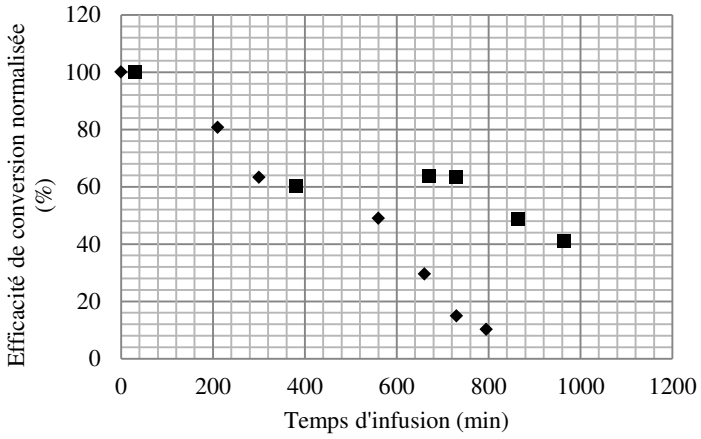


Figure III-58 - Stabilité de l'activité de bioréacteurs hTMPK et hNDPK. Efficacités de conversion normalisées après 21 utilisations de hTMPK (795 minutes, 37°C) sur 60 jours (▲) et 20 utilisations pour hNDPK (915 minutes, 37°C) sur 68 jours (■).

Bien que l'activité des bioréacteurs décroisse en fonction du temps, les études d'activités d'analogues de nucléotides pourront être réalisées par étude de conversion relative à l'endogène dTMP. La capacité du nombre d'analyses (utilisations du bioréacteur) est largement sous-estimée dans ce travail :

- une seule analyse a été réalisée pour chaque point de contrôle d'activité. Par conséquent, les bioréacteurs ont subi différents cycles de changement de température (4°C/37°C) pour un nombre d'analyses restreint, entraînant une dénaturation progressive de l'enzyme,
- l'estimation de l'efficacité de conversion a été réalisée après obtention d'un plateau de conversion significatif (15 minutes). En revanche, lors d'une étude de criblage visant à déterminer la conversion ou non-conversion d'un produit, il serait envisageable de stopper l'analyse dès l'apparition du produit de réaction (entre 3 et 6 minutes) afin d'augmenter la capacité d'analyses.

A l'issue des études préliminaires, les résultats relatifs aux activités, aux efficacités de conversion et à la stabilité des bioréacteurs nous confortent dans notre volonté de développement de criblages de phosphorylation. L'ensemble de ces résultats seront mis à profit pour l'étude de la cascade de phosphorylation on-line du dTMP en dTTP.

2.4. Etude de la cascade on-line de phosphorylation

L'activité et l'efficacité de chaque étape de conversion ont été validées. Par conséquent, nous avons entrepris l'étude de la cascade de phosphorylation du dTMP en dTTP

A cette fin, les deux bioréacteurs contenant les enzymes immobilisées hTMPK et hNDPK sont placés en série dans le four du système HPLC. La solution de dTMP a été préparée selon le protocole décrit dans la section 2.3.4. Le conditionnement des bioréacteurs a été effectué à un débit de 40 µL/min par infusion d'acétate d'ammonium (50 mM, pH = 7, P = 11 bars). L'infusion de la solution de substrat dTMP (20 µM, [ATP] = 150 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM, $AcNH_4$) a été réalisée manuellement, *via* le système de boucles, à un débit de 40 µL/min (rotation de la vanne toutes les 5 minutes). L'analyse a été stoppée après l'obtention d'un plateau des EIC des trois molécules d'intérêts (*m/z* 321,0500 $[M-H]^-$ pour dTMP, *m/z* 401,0166 $[M-H]^-$ pour dTDP et *m/z* 480,9831 $[M-H]^-$ pour dTTP). Le lavage et la régénération des bioréacteurs ont été réalisés par élution d'une solution d'acétate d'ammonium à un débit de 80 µL/min. Le suivi de conversion du dTMP en sa forme di- et tri-phosphate est représenté par les EIC des ions correspondants montrés en Figure III-59.

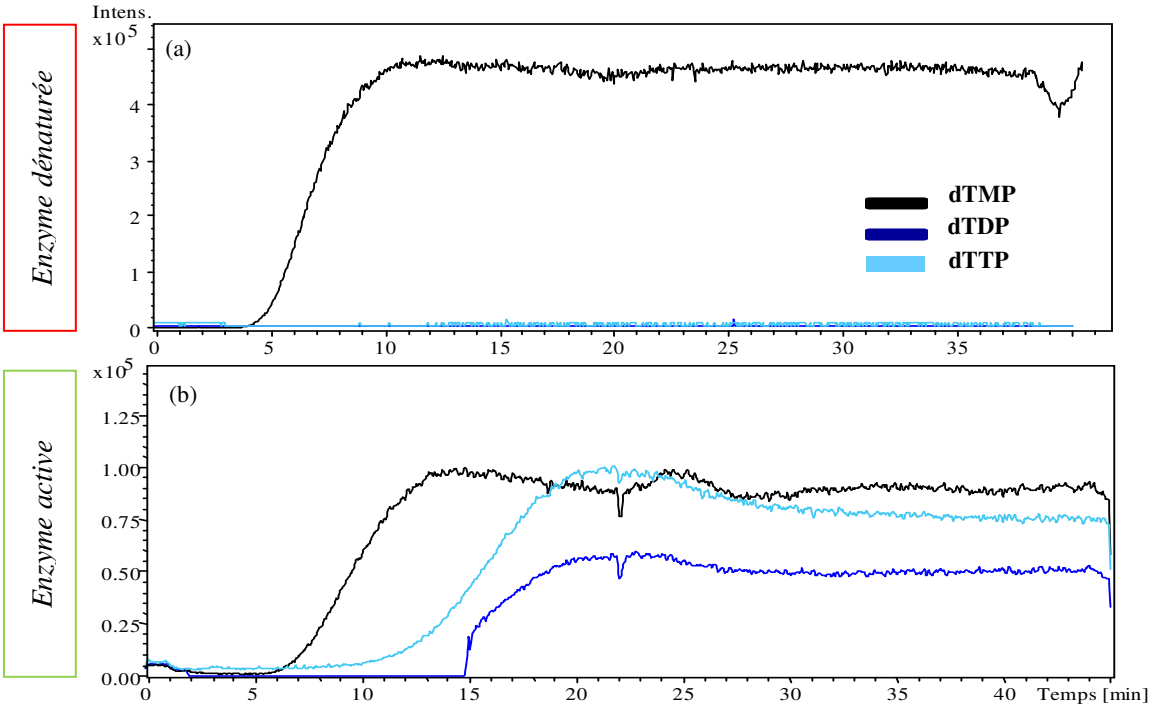


Figure III-59 - Bioréacteurs hTMPK et hNDPK; suivi des EIC de dTMP, dTDP et dTTP (m/z 321.0500 [M-H]-, m/z 401.0166 [M-H]-, m/z 480.9831 [M-H]-) pour les bioréacteurs (a) dénaturé et (b) actif.

Dans le cas de l'utilisation des deux bioréacteurs remplis des enzymes hTMPK et hNDPK actives, le substrat initial dTMP apparaît rapidement après 5 minutes d'infusion. Les produits dTDP et dTTP sont détectés plus tardivement (aux alentours de 10 minutes) pour un plateau de conversion atteint après 20 minutes d'infusion. La haute précision de la mesure de masse (± 0,005) n'a pas permis d'obtenir le début du tracé de l'EIC du dTDP (imprécisions de mesure, présence d'ion interférent). Cette cascade de phosphorylation on-line est montrée rapide et efficace du fait :

- de la détection du produit final après 10 minutes d'infusion,
- d'une estimation de 55% de conversion de dTMP en dTTP.

L'intensité du signal du dTMP découle de la non-conversion de la première étape de phosphorylation ainsi que du phénomène de fragmentation en source du dTDP en dTMP. Ce phénomène est notamment exacerbé par la présence de fragmentation du dTTP. Avec une fragmentation du dTTP en dTDP précédemment estimée à 50%, l'intensité du dTDP provient exclusivement de l'effet de fragmentation en source (conversion totale du dTDP en dTTP).

L'efficacité estimée de la cascade de phosphorylation est concordante avec les efficacités de chaque réaction individuelle avec 55% de conversion du dTMP en dTTP (dont 100% de dTDP en dTTP) pour la cascade contre 67% (hTMPK) et 100% (hNDPK) d'efficacités pour chaque bioréacteur.

La faisabilité de la méthodologie on-line de la preuve de concept de conversion de l'endogène dTMP a été prouvée efficace et rapide. Contrairement à l'étude off-line, il n'a pas été nécessaire d'installer un système d'addition de phosphodonneur entre les deux bioréacteurs. Cette observation résulte :

- de l'infusion constante d'ATP,
- des fortes interactions non-spécifiques entre l'ATP et la phase stationnaire du bioréacteur. Ces fortes interactions permettent d'augmenter le temps de séjour de l'ATP, le rendant hypothétiquement plus disponible pour interagir avec l'enzyme.

Ainsi, le suivi de cascade de phosphorylation par FAC-HRMS a été validé par étude de conversion de l'endogène dTMP en dTTP. Cette méthodologie présente l'avantage d'une analyse efficace, versatile, automatisable ainsi que d'une détection directe. Néanmoins, l'objectif principal de notre développement réside en l'apport de cette technique de criblage en vue d'appuyer les décisions d'études biologiques de phosphonates acycliques synthétisés par l'équipe « Hétérocycles, nucléosides et agents d'imagerie ». Ces synthèses ont pour but de rechercher des molécules présentant des spécificités à la souche humaine (h) ou virale (vv) de l'enzyme TMPK. Dans ce contexte, la troisième partie de ce chapitre se concentrera sur la transposition des techniques off-line et on-line pour l'analyse de phosphonates acycliques.

PARTIE III. Application des preuves de concept de FIA-HRMS et FAC-HRMS pour l'étude de spécificité de conversion de nucléotides phosphonates acycliques au regard de l'enzyme TMPK de souches humaine et virale

Les preuves de concept off-line et on-line développées pour le suivi de phosphorylation ont été validées en termes de fiabilité et de robustesse, *via* l'étude de conversion de l'endogène dTMP. Notre prochain objectif vise à la transposition et à la validation de ces méthodes par l'analyse de molécules de types phosphonates acycliques. Dans cette dernière partie, la voie de phosphorylation des Nu-MP en Nu-DP catalysée par les enzymes TMPK de souches humaine et virale sera appliquée à l'analyse de deux phosphonates acycliques (synthétisés par nos collaborateurs) testés biologiquement. Il est important de noter que ce volet n'aura pas pour vocation à classer l'activité des molécules mais à valider nos approches par détection de spécificité de conversion (détection de faux négatif et de vrai positif) du fait du manque de standards di- et triphosphatés. Cette partie s'articulera autour de trois axes, à savoir la caractérisation d'activité de l'enzyme virale vvTMPK fraichement produite, l'étude de conversion off-line puis on-line. Préalablement à ces études, il convient d'exposer l'importance de l'étude de sélectivité des souches ainsi que de présenter les phosphonates acycliques analysés dans cette partie.

1. Contexte de l'étude : l'importance de la spécificité pour la recherche de nouveaux agents antiviraux

La sélectivité de l'activité des souches enzymatiques est une étape clé dans la mise en place de la thérapie antivirale. La réplication de l'ADN viral se produit dans le cytoplasme de la cellule [72]. Les poxvirus (virus à ADN double brin) possèdent leurs propres enzymes virales, responsables de la synthèse de nucléotides, comme la thymidine kinase ou la thymidylate kinase catalysant les deux premières étapes de phosphorylation. Les stratégies des thérapies antivirales ciblent spécifiquement les enzymes virales avec pour objectif d'inhiber la réplication de l'ADN viral et limiter ainsi la prolifération du virus.

Par conséquent, la sélectivité des thérapies antivirales (spécificité de substrats des enzymes de souches humaines et virales) sont primordiales. L'acyclovir, connue pour être une molécule active contre le simplex virus de l'herpès et contre le virus varicelle-zona [73], est sélective aux cellules infectées découlant de sa spécificité de conversion en acyclovir-monophosphate par la thymidine kinase virale [12].

Bien que les deux étapes de phosphorylation soient catalysées par les enzymes humaines, la forme active triphosphatée n'est pas présente dans les cellules saines du fait de l'absence de la première étape de phosphorylation. De plus, cette forme triphosphatée présente une plus grande activité envers la polymérase virale causant une inhibition de la prolifération du virus.

1.1. Virus de la vaccine

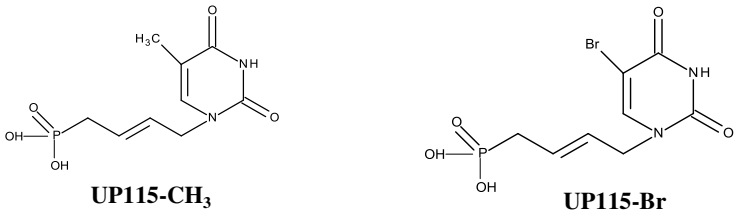
Le virus de vaccine (vv), membre de la famille des poxvirus, est employé comme substitut au virus de la variole pour la recherche de nouvelles molécules actives. Ce virus code pour différentes enzymes dont les enzymes présentant un intérêt pour ces travaux comme la thymidine kinase (vvTK) et la thymidylate kinase (vvTMPK). C'est dans ce contexte que les recherches de l'équipe du Pr L.A Agrofoglio et du MCU V. Roy se sont focalisées sur la recherche de nouvelles molécules antivirales actives de la thymidylate kinase du virus de la vaccine (vvTMPK).

La thymidylate kinase présente une grande similarité de séquence d'amino-acides avec l'enzyme humaine avec 42% d'identité et 64% de similarité. Les structures tertiaires des deux enzymes sont similaires avec la présence des motifs classiques à savoir la P-loop, le domaine liant au dTMP, le domaine liant à l'ATP et le domaine du LID [74]. La large spécificité de substrats de l'enzyme vvTMPK comparativement à la hTMPK découle de son site actif plus large et ouvert qui permet d'accepter des substrats plus volumineux. La vvTMPK phosphoryle des endogènes naturels comme le dTMP, le dUMP, mais aussi le dGMP en dGDP contrairement à la hTMPK. L'objectif des travaux de recherche de nos collaborateurs s'est focalisé sur la recherche de molécules actives spécifiquement à l'enzyme TMPK de souches humaine (h) ou virale (vv).

1.2. Molécules actives spécifiquement à l'enzyme hTMPK

Les molécules de type phosphonates acycliques (motif désoxyribose remplacé par une chaîne aliphatique) avec une base pyrimidique se sont révélées être efficacement activées par les thymidylates kinases humaines et/ou virales. Ainsi, différents dérivés d'uracile ont été synthétisés. Une étude de l'influence de la longueur de la chaîne aliphatique (3,4 et 5 carbones) ainsi que l'influence du type de groupement en position C5 a été menée.

Après réalisation du criblage de l'ensemble de ces substrats, les isomères [E] de l'uracile allylphosphonate ayant un groupement méthyle ou un halogène (Cl, Br) en position C5 ont montré une activité intéressante vis-à-vis de la hTMPK et une activité quasiment inexistante avec la vvTMPK. Ces molécules, nommées UP115-CH_3 et UP115-Br, dont les formules sont montrées en Figure III-60, nous ont été fournies par nos collaborateurs afin de tester leur spécificité. Ces deux molécules ont préalablement été testées in-vivo. Elles ont présenté une inhibition de la polymérase, et donc une conversion en nucléotides diphosphatés dans le cas de l'enzyme TMPK de souche humaine. Aucune inhibition et donc aucune conversion n'ont été détectées par l'enzyme vvTMPK.



UP115-CH_3
m/z 259,0562

UP115-Br
m/z 322,9510

Figure III-60 - Formules des analogues de phosphonates acycliques méthylé et bromé (UP115-CH_3 et UP115-Br).

Dans ce contexte, nos travaux se sont focalisés sur l'étude de la première étape de phosphorylation (conversion du Nu-MP en Nu-TP) catalysée par l'enzyme TMPK de souches humaine et virale. Nous avons donc produit l'enzyme virale à partir du lot de plasmide, selon la procédure décrite pour la souche humaine. Les deux méthodologies i) FIA-HRMS et ii) FAC-HRMS ont été utilisées afin de suivre la spécificité de phosphorylation des enzymes hTMPK et vvTMPK. Avant d'exposer ces travaux, il convient de présenter l'étude de la caractérisation enzymatique de l'enzyme vvTMPK fraichement produite. Cette mesure d'activité nous permettra d'envisager sa possible utilisation pour les tests de spécificité.

1.3. Production et la caractérisation de l'enzyme TMPK virale (vvTMPK)

Le protocole d'expression et de purification de l'enzyme vvTMPK est identique à celui réalisé pour l'enzyme hTMPK. Ce procédé est présenté en Figure III-13. Le dosage réalisé par test de Bradford a permis d'estimer une quantité de 3,66 mg de matière protéique, soit une production dix fois inférieure à celle de l'enzyme hTMPK.

Similairement à l'étude menée sur l'enzyme hTMPK, le bon fonctionnement ainsi que l'activité du lot de vvTMPK fraichement produit ont été vérifiés par étude de Michaelis-Menten par FIA-HRMS. Cette étude confirmera son utilisation possible pour les études de spécificité en off-line et en on-line.

1.3.1. Test d'activité enzymatique : étude de Michaelis-Menten

Une étude cinétique a été réalisée par injections par FIA-HRMS d'une solution de dTMP à 6 µM ($AcNH_4$, 50 mM, pH = 7, [ATP] = 350 µM et [$MgCl_2$] = 200 µM) et d'enzyme vvTMPK à 0,004 g/L. La réaction est effectuée au sein du passeur automatique de la chaine LC, thermostaté à 37°C.

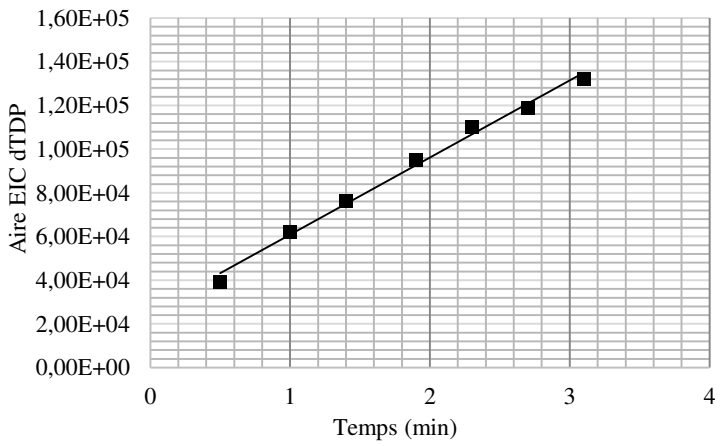


Figure III-61 - Cinétique de production du dTDP (y = 35299x + 25512, R² = 0.993) détectée par FIA-HRMS.

La droite représentative de la production du dTDP en fonction du temps, présentée en Figure III-61, permet de fixer un temps de réaction à 2,45 minutes afin de se situer dans la zone de linéarité de production du produit de réaction. Les conditions expérimentales sont résumées dans le Tableau III-20.

	Etude de Michaelis-Menten
	vvTMPK
Conditions de concentrations	[vvTMPK] = 0,004g/L [dTMP] = 0-160 µM 9 solutions
Conditions de réaction	$AcNH_4$, 50 mM, pH = 7,0, [ATP] = 350 µM, [MgCl2] = 200 µM, 2,45 min de réaction à 37°C
Analyse par FIA-HRMS	1 µL d'injection, ACN/H_2O 35/65 (v/v), 200 µL/min

Tableau III-20- Conditions expérimentales de l'étude de Michaelis-Menten de l'enzyme vvTMPK par FIA-HRMS.

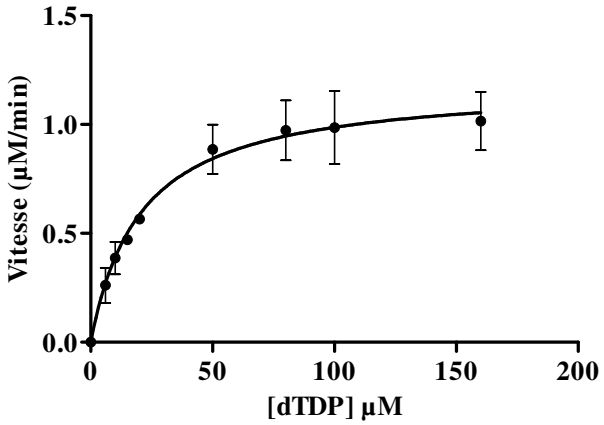


Figure III-62 - Courbes de Michaelis-Menten de l'enzyme vvTMPK libre (n = 3). Les courbes ont été obtenues à partir du logiciel GraphPad Prism 5.0 et extrapolées à partir de l'équation de Michaelis-Menten.

	FIA-HRMS-Enzyme libre				**Littérature**
	K_M (µM)	V_{max} (µM/min)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}.s^{-1}$)
vvTMPK	20,62 ± 3,09	1,19 ± 0,18	6,92 ± 1,04	$0,06.10^5$	$1,00.10^5$

Tableau III-21 - Résumé des paramètres cinétiques de la thymidylate kinase du virus de la vaccine (vvTMPK).

D'après les valeurs des paramètres cinétiques consignées dans le Tableau III-21, l'enzyme vvTMPK libre montre une valeur d'affinité similaire à l'enzyme hTMPK avec $K_{M\ (vvTMPK)}$ = 20,62 ± 3,09 µM contre $K_{M\ (hTMPK)}$ 34,43 ± 5.05 µM. Cependant, la vitesse de conversion du dTMP en dTDP est plus faible avec $V_{max\ (vvTMPK)}$ = 1,19 ± 0,18 µM/min contre $V_{max\ (hTMPK)}$ = 6,86 ± 0,51 µM/min.

L'ensemble de ces paramètres cinétiques a été comparé aux valeurs de la littérature [75]. La constante d'affinité K_M est similaire aux valeurs présentées dans la littérature ($K_{M\ (vvTMPK\ produite)}$ = 20,62 µM et $K_{M\ (vvTMPK\ littérature)}$ = 17 µM. En revanche, l'efficacité catalytique de l'enzyme produite apparait plus faible ($k_{cat}/K_{M\ (vvTMPK\ produite)}$ = 0,06.10^5 $M^{-1}.s^{-1}$ et $k_{cat}/K_{M\ (vvTMPK\ littérature)}$ = 1,00.10^5 $M^{-1}.s^{-1}$). Cette réduction de l'efficacité catalytique reflète une plus faible vitesse réactionnelle provenant probablement des faibles concentrations en ATP et $MgCl_2$. Cette incidence pourra être contre balancée par augmentation du temps de réaction.

La première partie de l'étude a permis de valider l'activité du lot d'enzyme vvTMPK fraichement purifiée. Par conséquent, ce lot pourra être employé dans le cadre des études de spécificité en modes off-line et on-line.

Remarque : l'activité du lot d'enzyme immobilisée vvTMPK n'a pas été étudiée. L'influence de l'immobilisation et le taux de fixation de l'enzyme sur support sont arbitrairement considérés comparables à ceux de l'enzyme hTMPK résultant de la grande similarité des deux enzymes.

2. Etude de la spécificité par analyse en mode off-line par FIA-HRMS

Comme mentionné précédemment, la spécificité de conversion des enzymes TMPK de souches humaine et virale a été étudiée dans un premier temps par la méthodologie off-line par FIA-HRMS. A l'issue des conclusions apportées lors de l'étude de phosphorylation de l'endogène en mode off-line, l'utilisation de l'enzyme libre apparaît plus judicieuse pour l'étude d'une étape de phosphorylation.

L'étude de spécificité off-line a été réalisée par l'usage de l'enzyme libre vvTMPK. Les réactions ont été effectuées pour l'étude de conversion des trois substrats dTMP, UP115-CH_3 et UP115-Br dans le cadre des enzymes libres hTMPK et vvTMPK. Contrairement à l'approche dynamique, cette méthodologie off-line apporte une flexibilité dans la gestion du temps de réaction. Cet aspect est appréciable dans le cadre de criblage de molécules dont l'activité est inconnue. Le temps de réaction a été fixé à une nuit en vue de s'assurer de la potentielle conversion des phosphonates acycliques UP115-CH_3 et UP115-Br. Ce temps nous permettra d'assurer une visibilité de réaction dans le cas du substrat actif.

Les conditions opératoires sont précisées dans le Tableau III-22.

	Etude de spécificité	
Enzymes libres	hTMPK	vvTMPK
Conditions de concentrations	[hTMPK] = 0,04 g/L [dTMP] = [UP115-CH_3] = [UP115-Br] = 25 µM	[vvTMPK] = 0,04 g/L [dTMP] = [UP115-CH_3] = [UP115-Br] = 25 µM
Conditions de réaction	$AcNH_4$ 50 mM, pH = 7,0, [ATP] = 350 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM, réaction sur la nuit, 37°C	
Analyse par FIA-HRMS	1 µL d'injection, ACN/H_2O 35/65 (v/v), 200 µL/min	

Tableau III-22- Conditions expérimentales de l'étude de spécificité de conversion des molécules de synthèse UP115-CH_3 et UP115-Br vis-à-vis des souches humaine et virale de l'enzyme TMPK. Analyses par FIA-HRMS.

Les études de conversion sont présentées dans la Figure III-23. N'ayant pas à notre disposition les molécules de synthèses diphosphatées, ces conversions sont présentées par comparaison des aires de pic des extractions d'ion des masses des molécules mono- et diphosphatés avant et après la réaction. Le standard dTDP étant disponible commercialement, il nous a été possible de le quantifier après réactions. La conversion de l'endogène est alors également présentée sous forme de quantité de dTDP produite.

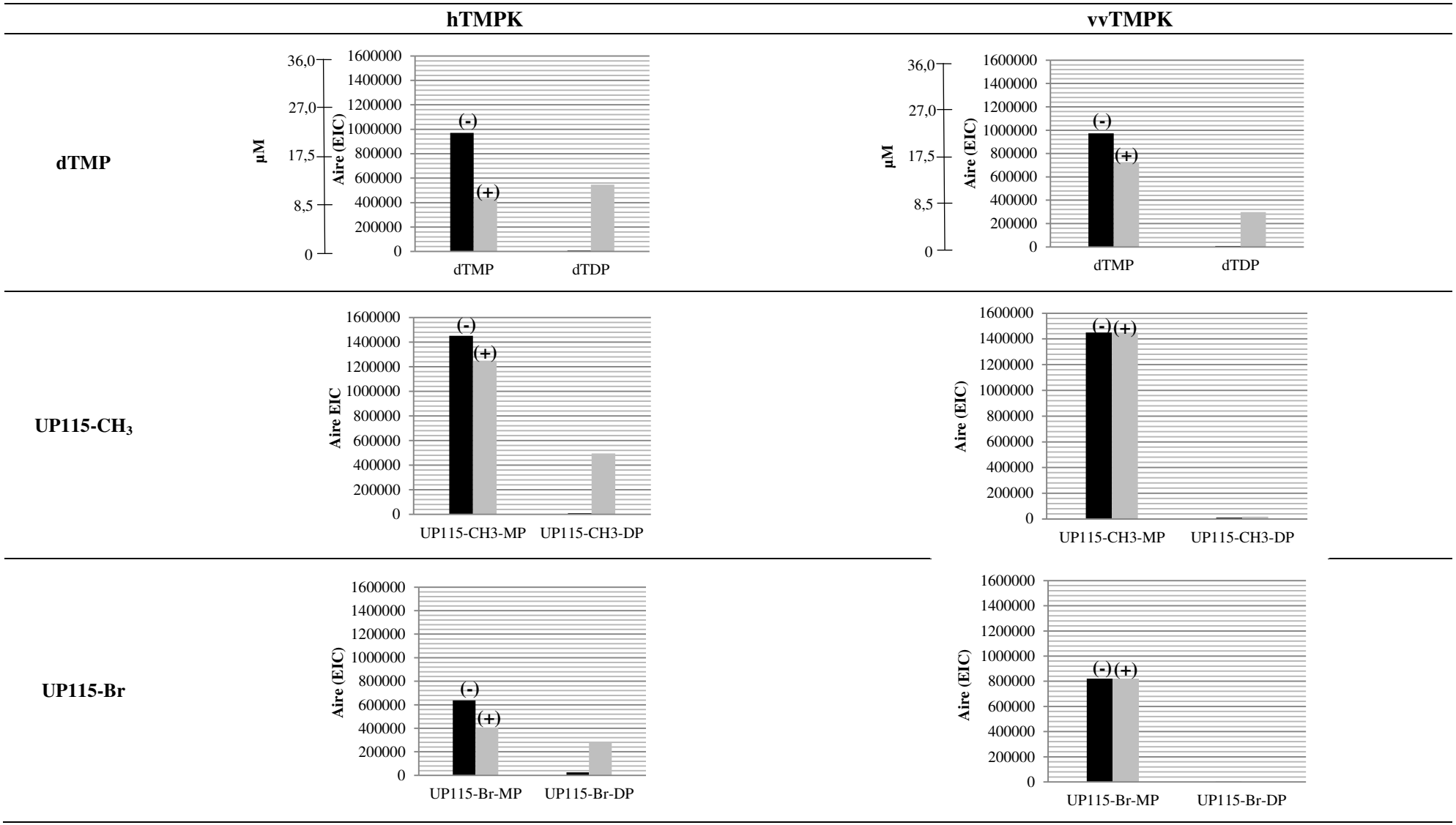


Figure III-23- Représentation des aires des chromatogrammes d'extraction d'ions des molécules dTMP, UP115-CH_3 et UP115-Br avant et après réactions catalysées par les enzymes hTMPK et vvTMPK.

L'étude de spécificité réalisée par FIA-HRMS montre des résultats similaires aux tests biologiques *in-vivo* [76]. L'endogène dTMP est converti par les deux souches humaine et virale de l'enzyme TMPK avec détection d'une conversion plus efficace dans le cas de l'enzyme hTMPK. En revanche, les molécules UP115-CH_3 et UP115-Br présentent une spécificité d'activité pour la hTMPK. Aucune conversion de ces deux molécules n'est observée avec l'enzyme vvTMPK. Par ailleurs, aucun faux positif n'est détecté. Cette observation contribue à la fiabilité de notre technique. Concernant les faux négatifs, cette application montre des disparités d'ionisations selon le type des nucléotides analysés. La molécule UP115-CH_3 présente une ionisation semblable à la molécule endogène dTMP. Par conséquent, la forme diphosphatée de cette molécule présenterait une ionisation similaire au dTDP. De cette manière, la non-détection de forme diphosphatée dans le cadre de l'enzyme vvTMPK ne proviendrait pas d'une faible capacité d'ionisation mais d'une absence de conversion. Il en découle que cette molécule ne présente pas de faux négatif.

En outre, la molécule UP115-Br présente une aire d'EIC près de deux fois plus faible que les molécules dTMP et UP115-CH_3. Conformément à la preuve de concept menée sur l'endogène, il a été montré qu'un nucléotide s'ionise d'autant mieux lorqu'il possède moins de groupements phosphates (fragmentations). Dans le cadre de l'étude de la conversion de la molécule UP115-Br catalysée par l'enzyme virale, nous ne sommes pas en mesure de confirmer l'absence de faux négatif. De toute évidence, il serait intéressant d'effectuer cette étude de spécificité sur un plus large panel d'échantillons, afin de fixer un critère d'acceptation d'ionisation confirmant la présence ou non de produit de réaction. Cette observation met en exergue une des limites de la spectrométrie de masse pour le suivi de phosphorylation, à savoir la disparité d'ionisation des nucléotides.

La cascade de phosphorylation off-line en enzymes immobilisées a également été appliquée à l'étude des molécules synthétiques. La souche virale ne présentant aucune conversion, cette expérience a été effectuée avec les enzymes hTMPK et hNDPK immobilisées selon le protocole validé par la preuve de concept. Les résultats n'ont montré aucune détection de conversion en la forme triphosphatée. Similairement à la démarche suivie pour l'étude de spécificité, cette détection d'absence de conversion peut résulter d'une non-spécificité pour l'enzyme hNDPK ou d'une ionisation trop faible de la forme triphosphatée.

La molécule UP115-CH_3 ne présentant pas de défaut d'ionisation par rapport à l'endogène, l'absence de conversion de ce substrat peut être affirmée. Ainsi, cette étude confirme la présence d'un vrai-négatif provenant d'une spécificité de réaction de l'enzyme hNDPK. En revanche, la détection de la non-conversion de la forme UP115-Br diphosphatée peut provenir soit de la limite de détection de la forme triphosphatée soit d'une spécificité de l'enzyme hNDPK. Conformément à la description de cette enzyme, bien que cette enzyme présente une plus large reconnaissance de substrat (réaction non base spécifique), la détection de l'absence de conversion pourrait hypothétiquement provenir de l'absence de motif sucre (décrit comme étant discriminant pour la réaction). Cependant, il est

nécessaire de rappeler que les tests biologiques se sont révélés positifs pour l'enzyme hTMPK. De toute évidence, ces molécules synthétiques atteignent la forme triphosphatée, inhibitrice de la polymérase. Au regard des résultats obtenus, nous pouvons soumettre l'hypothèse que ces substrats sont phosphorylés par des enzymes de la famille des phosphoglycérates (PGK) ou de la créatine (CK) kinases.

L'application off-line de l'étude de spécificité de phosphonates acycliques par FIA-HRMS a été validée à travers la détection de spécificité de conversion entre les souches humaine et virale de l'enzyme TMPK. Cependant, bien que cette étude ne révèle aucun faux positif, il n'est pas possible de confirmer actuellement la présence de vrai négatif.

A l'issue de cette étude d'application par FIA-HRMS, la faisabilité de l'approche dynamique par FAC-HRMS a été explorée.

3. Etude de la spécificité par analyse on-line par FAC-HRMS

L'étude de la spécificité de la réaction a été étudiée par la méthodologie FAC-HRMS présentée lors de la mise en place de la preuve de concept. Les résultats de l'expérience off-line réalisée précédemment abonde dans le sens de la mise en place de l'étude de spécificité par une approche dynamique. Cette étude a confirmé :

- la faisabilité d'étude de la spécificité des souches humaine et virale de l'enzyme TMPK,
- la conversion des substrats phosphonates acycliques par l'enzyme hTMPK immobilisée.

L'analyse précédente a permis de déterminer les temps de réactions amenant aux conditions optimales de conversion. Néanmoins, la vitesse de conversion de ces molécules peut se révéler être un facteur déterminant pour un suivi on-line. Ainsi, préalablement à l'étude de conversion par FAC-HRMS de ces deux substrats de synthèse, il convient d'évaluer leur vitesse de conversion. Dans cet objectif, une première étude de cinétique de conversion, réalisée avec l'enzyme hTMPK libre, a été réalisée afin d'estimer la vitesse de conversion des substrats UP115-CH_3 et UP115-Br. Les conditions opératoires de cette étude de cinétique sont résumées dans le Tableau III-24.

	Etude de cinétique : FIA-HRMS
Enzyme libre	**hTMPK**
Conditions de concentrations	[hTMPK] = 0,04 g/L [dTMP] = [UP115-CH_3] = [UP115-Br] = 25 µM
Conditions de réaction	AcNH4, 50 mM pH = 7,0, 37°C
Analyse FIA-HRMS	1 µL d'injection, ACN/H_2O 35/65 (v/v), 200 µL/min

Tableau III-24- Conditions expérimentales de l'étude de cinétique de conversion des molécules dTMP, UP115-CH_3 et UP115-Br catalysée par l'enzyme vvTMPK. Analyses par FIA-HRMS.

Les cinétiques des molécules de synthèse ont été comparées à la vitesse d'apparition de l'endogène dTDP. Les cinétiques obtenues, ne présentant pas la même échelle de temps, sont représentées sur deux graphes distincts.

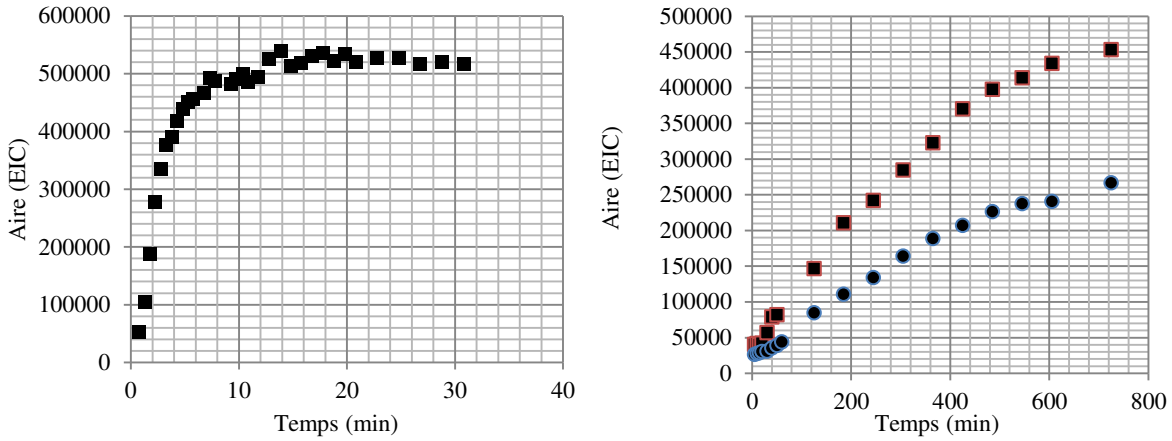


Figure III-63- Cinétiques de conversions des trois substrats dTMP, UP115-CH_3 et UP115-Br (25 µM) catalysées par l'enzyme hTMPK (0,04g/L). Analyse par FIA-HRMS.

A travers l'analyse des résultats obtenus (présentés en Figure III-63), il est observé des faibles vitesses de conversions des molécules de synthèse. Les résultats obtenus pour l'endogène dTMP sont en accord avec l'étude off-line de la preuve de concept. La réaction atteint un plateau de conversion à 5 minutes. En revanche, les conversions des molécules UP115-CH3 et UP115-Br tendent vers un plateau de conversion aux alentours de 700 min (soit près de 12 heures de réaction). Ces faibles vitesses de conversion pourraient présenter une limite à l'application de l'étude de spécificité de l'analyse on-line.

L'étude de la conversion on-line a été réalisée par infusion continue des substrats dTMP, UP115-CH3 et UP115-Br dans les bioréacteurs remplis des enzymes immobilisées hTMPK et vvTMPK. Les protocoles d'immobilisation d'enzymes (hTMPK, vvTMPK), de remplissage des bioréacteurs ainsi que de leur conditionnement ont été réalisés selon le protocole fourni en section 2.2 de la mise en place de la preuve de concept. Les conditions expérimentales sont résumées dans le Tableau III-25.

	Etude de spécificité on-line : FAC-HRMS	
Enzyme immobilisée	**hTMPK**	**vvTMPK**
Conditions de concentrations	[dTMP] = [UP115-CH_3] = [UP115-Br] = 20 µM [ATP] = 150 µM, [$MgCl_2$] = 200 µM	
Tampon de dilution	AcNH4, 50 mM, pH = 7,0	
Analyse FAC-HRMS	Infusion continue, 37°C	

Tableau III-25- Conditions opératoires de l'étude de spécificité de l'activité des molécules dTMP, UP115-CH_3 et UP115-Br au regard des souches humaine et virale de l'enzyme TMPK. Analyses par FAC-HRMS.

	UP115-CH_3	UP115-Br
Enzyme dénaturée		
Enzyme active		

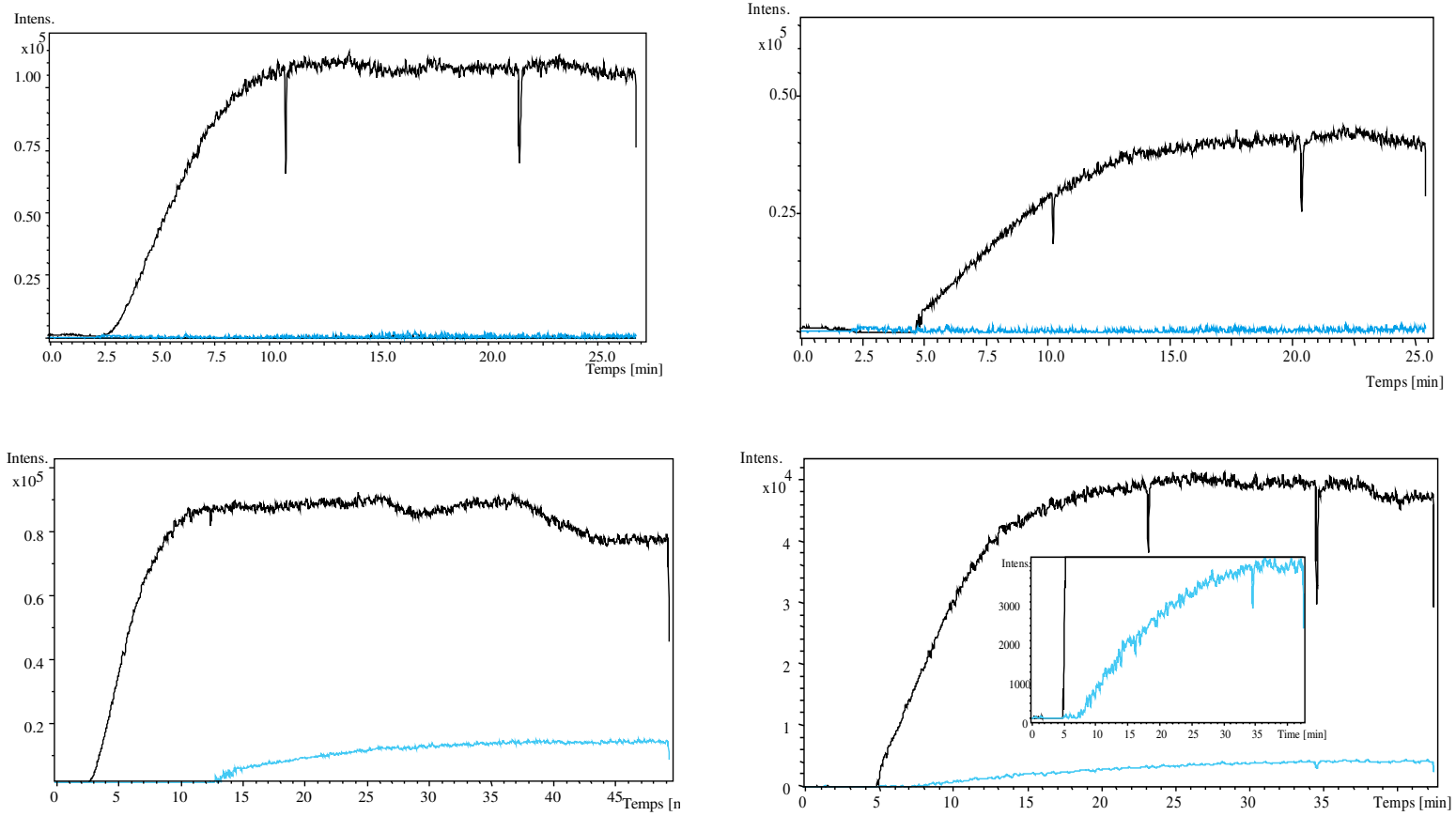


Figure III-64- Bioréacteur hTMPK : suivi des EIC des molécules UP115-CH_3 et UP115-Br (m/z *259,0562 $[M-H]^-$ et* m/z *322,9510 $[M-H]^-$). Bioréacteurs actifs et dénaturés.*

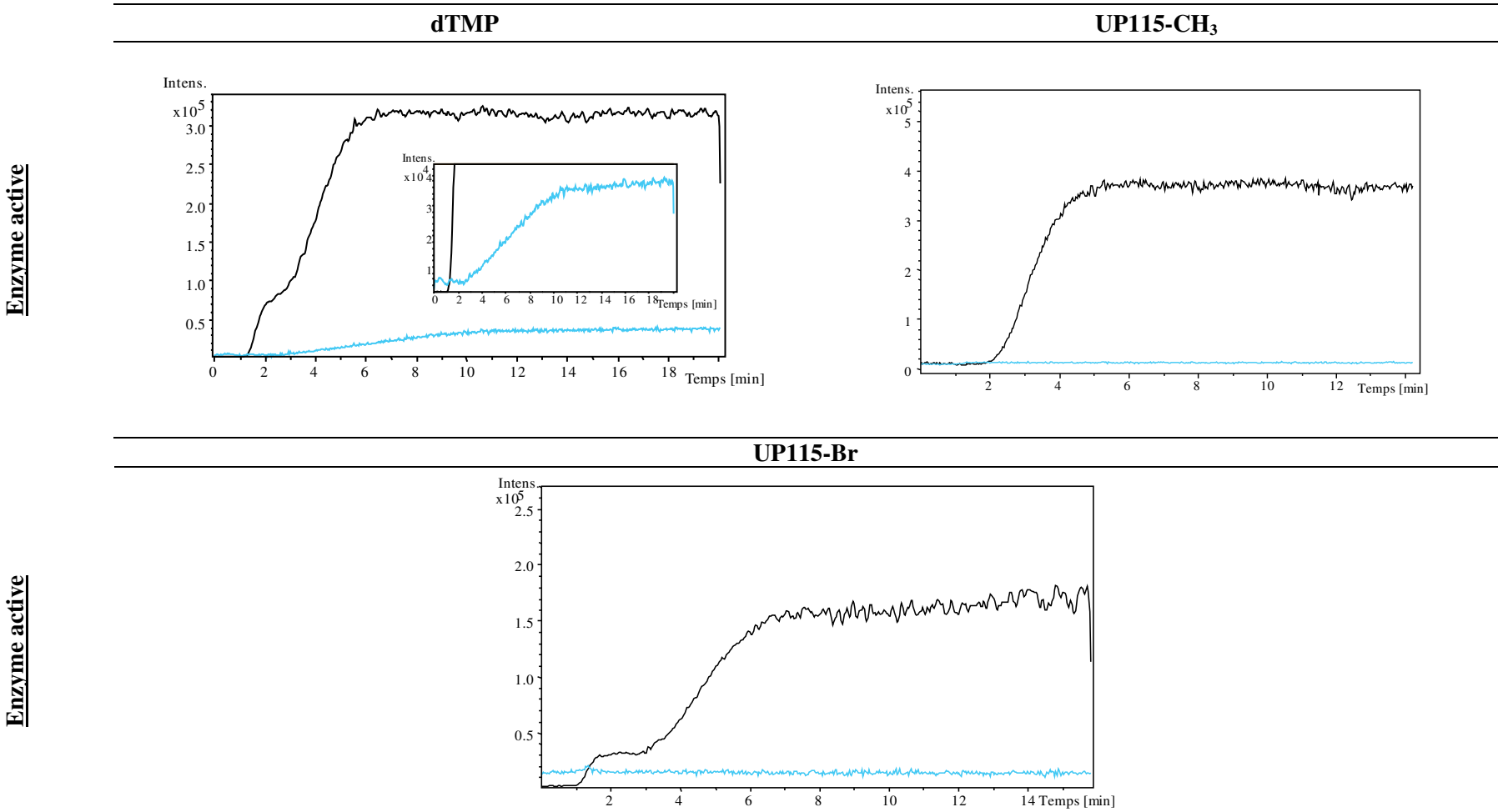


*Figure III-65- Bioréacteur vvTMPK : suivi des EIC des molécules dTMP, UP115-CH_3 et UP115-Br (*m/z *321.0500 [M-H]$^-$,* m/z *259,0562 [M-H]$^-$ et* m/z *322,9510 [M-H]$^-$).*

En Figure III-64 sont exposées les extractions d'ions des molécules UP115-CH_3 et UP115-Br mono- et diphosphatées de la réaction on-line catalysée par l'enzyme hTMPK. La conversion de l'endogène est présentée dans la section PARTIE II.2.3.4 de la mise en place de la preuve de concept. L'analyse on-line des molécules de synthèse montre une conversion des formes monophosphatées en molécules diphosphatées liée à l'apparition des EIC des produits de réaction aux alentours de 15 minutes. Un zoom de l'EIC du produit UP115-Br diphosphaté (de faible intensité) est présenté afin de visualiser la pente d'apparition du produit. Il est rappelé que l'étude cinétique off-line, réalisée en enzyme libre, avait révélé une cinétique lente des conversions des molécules de synthèse (obtention d'un plateau de conversion vers 700 minutes). Cependant, l'infusion continue de ces molécules dans un bioréacteur contenant l'enzyme immobilisée (dont l'étude d'activité des lots présente une plus faible vitesse de réaction) affiche une conversion significative. Ainsi, l'étude menée atteste de l'efficacité de cette approche dynamique.

Il est important de noter que ces analyses n'ont pas pour vocation d'être quantitatives. N'ayant pas la possibilité d'infuser les standards diphosphatés, il nous a été impossible d'évaluer les efficacités de conversion. De cette manière, les intensités des EIC des molécules UP115-CH_3 et UP115-Br diphosphatées n'attestent pas de l'efficacité de conversion de par une disparité d'ionisation. Ces expériences valident l'activité du bioréacteur hTMPK vis-à-vis des deux molécules de synthèse et prouvent également l'absence de la détection de faux-négatif.

Quant à l'étude relative au bioréacteur vvTMPK, dont les résultats sont présentés en Figure III-65, elle révèle une conversion de l'endogène dTMP en dTDP avec apparition de l'EIC du produit de réaction à 4 minutes d'infusion. Cette conversion apparaît comme étant moins efficace que dans le cas de l'analyse on-line catalysée par la souche humaine. Cette observation est en adéquation avec :

- les résultats observés en mode off-line,
- l'étude de caractérisation d'activité de l'enzyme libre dont la vitesse de réaction de la souche virale s'est révélée inférieure à celle de la souche humaine.

L'infusion des molécules de synthèse dans le bioréacteur rempli de l'enzyme vvTMPK n'a montré aucune conversion (pas de faux positif). Ces résultats obtenus sont en accord avec l'expérience off-line ainsi qu'avec les résultats de la littérature. Similairement à l'étude menée en mode off-line, la faible efficacité d'ionisation de la molécule UP115-Br combinée à une possible faible vitesse de conversion peuvent engendrer la détection de faux négatifs. Par conséquent, il serait également souhaitable de réaliser ces expériences sur un plus large panel d'échantillons pour valider l'absence de détection de faux négatifs.

Les expériences menées valident notre méthodologie FAC-HRMS pour l'étude de spécificité de deux molécules de synthèse. Bien que cette technique semble fiable de par l'obtention de résultats attendus,

il sera indispensable de réaliser une application plus poussée sur un plus grand nombre d'échantillons pour estimer les limites de la technique et en étudier sa robustesse.

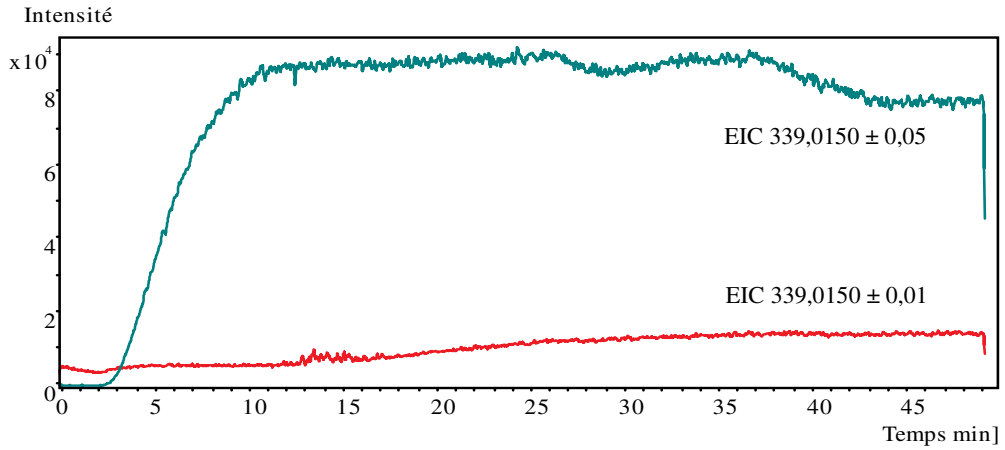
L'étude d'application de la méthodologie FAC-HRMS pour l'analyse de molécules de synthèse nous a permis de mettre en lumière l'intérêt d'une mesure de masse exacte pour le suivi de conversion de phosphorylation. Dans le cadre de notre étude on-line, l'intérêt de l'utilisation de la haute précision en masse réside dans l'analyse de substrats présentant :

- une vitesse de conversion lente,
- une faible ionisation,
- une faible conversion.

Ces caractéristiques de conversion, accompagnées d'une présence possible d'ions interférents, peuvent aboutir à l'analyse de faux positifs.

Cette affirmation est illustrée par la réalisation d'une étude relative au suivi de conversion de la molécule UP115-CH3 par le bioréacteur rempli de l'enzyme hTMPK. La faible vitesse de conversion de ce composé en sa forme diphosphatée entraîne une conversion faible mais visible. L'extraction d'ion correspondant au produit de la réaction a été tracée selon deux précisions de masse : *m/z* 339,0150 ± 0,05 et *m/z* 339,0150 ± 0,01. D'après les chromatogrammes d'extraction d'ions présentés en Figure III-66**,** une précision de mesure de ± 0,05 engendre une continuité du signal.

(a)



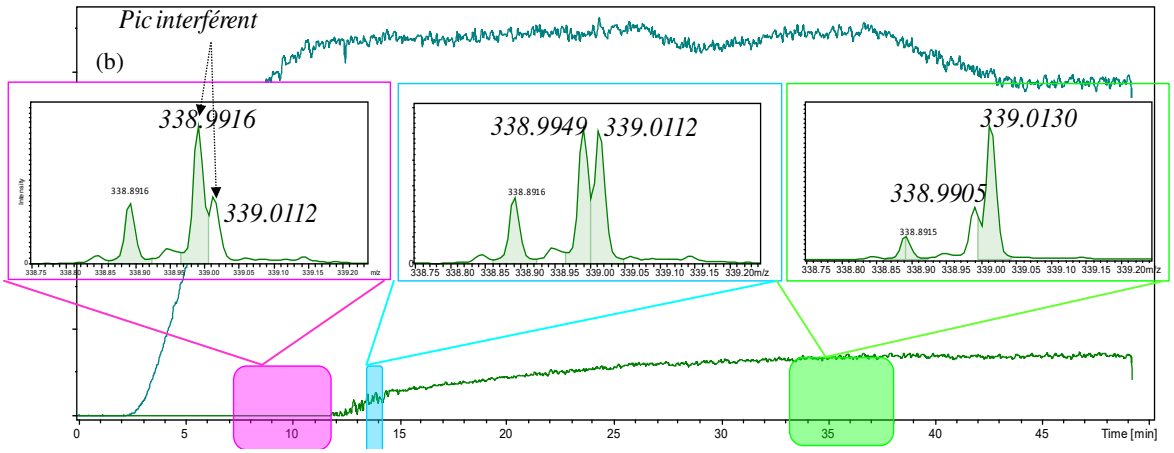


Figure III-66 - Bioréacteur hTMPK; (a) : suivi des EIC de UP115-CH3-MP à deux précisions de masse (m/z 339,0150 ± 0,05 et m/z 339,0150 ± 0,01), (b) spectre de masse à différents temps d'infusion (10, 14 et 22 minutes).

A la lumière de ces résultats, le produit de réaction semblerait déjà présent, avant même la détection du substrat de réaction. Ainsi, dans ces conditions, il est impossible de conclure quant à l'activité de l'enzyme au regard de cette molécule. En revanche, une augmentation de la précision de masse à ± 0,01 permet la détection du produit de réaction à 13 minutes d'infusion. Celle-ci s'accompagne d'une pente d'apparition de la molécule reflétant la réaction de conversion.

Une étude des spectres de masse a révélé la présence d'un ion interférent (*m/z* 338,9916) responsable de cette détection, résultant de la détection d'un faux négatif. Une précision de masse fixée à ± 0,05 implique une sommation des intensités de l'ion interférent (*m/z* 338,9916) et de l'ion du produit (*m/z* 339,0130). Ce phénomène a pour effet d'aplatir la pente de l'EIC lors de la conversion.

Le suivi des spectres de masses en fonction du temps d'infusion du substrat confirme bien l'accumulation du produit de réaction UP115-CH_3-DP en solution par augmentation de l'intensité de l'ion à *m/z* 339,0130. De ce fait, dans le cadre de suivi de conversion de molécules synthétiques présentant une faible vitesse de conversion, il est important d'être en mesure de suivre la masse exacte de l'ion correspondant au produit de réaction.

4. Etudes complémentaires : analyse d'un mélange de substrat en FAC-HRMS

La méthodologie FAC-HRMS a été développée dans ce travail comme méthodologie préliminaire à une étude de criblage de phosphorylation enzymatique (cascade de phosphorylations et étude de spécificité). Jusqu'alors, chaque analyse a été réalisée par injection ou infusion d'un substrat seul dans le but de déterminer sa capacité de phosphorylation enzymatique. Du fait de la spécificité de détection qu'apporte la spectrométrie de masse, aucune étape de séparation n'est nécessaire avant la détection du mélange de substrat, de produit et des co-facteurs de la réaction. Il serait donc intéressant d'étudier la faisabilité de la conversion d'un mélange de substrats par FAC-HRMS afin d'augmenter le potentiel de criblage de cette méthodologie. Cette étude de faisabilité a été réalisée comme ouverture à l'étude de mélanges par FAC-HRMS.

Un mélange de 4 substrats (dTMP, dUMP, UP115-CH_3 et UP115-Br) a été infusé à 40 µL/min ($AcNH_4$ 50 mM, pH = 7, [ATP] = 150 µm, [$MgCl_2$] = 200 µM) dans un bioréacteur contenant l'enzyme hTMPK immobilisée. Grâce à la spécificité de détection, les masses d'intérêts de chaque substrat et produit de la réaction ont été extraites et tracées en fonction du temps (Figure III-67). L'infusion du mélange des 4 substrats dans le bioréacteur dénaturé n'entraine aucune détection de faux positif de conversion. Dans le cas de l'enzyme active, la conversion des 4 substrats de réaction est visible. L'agrandissement réalisé sur les EIC des produits de réaction, présenté en Figure III-67 (b), permet de détecter l'accumulation de produits par augmentation de l'intensité des EIC d'intérêts. Ainsi, en une seule analyse rapide (obtention du plateau à 25 minutes, début de conversion vers 10 minutes), il a été possible de mettre en évidence la conversion des 4 substrats en produits. Bien que cette étude reste qualitative, elle démontre le potentiel de la méthodologie FAC-HRMS pour le criblage de substrats.

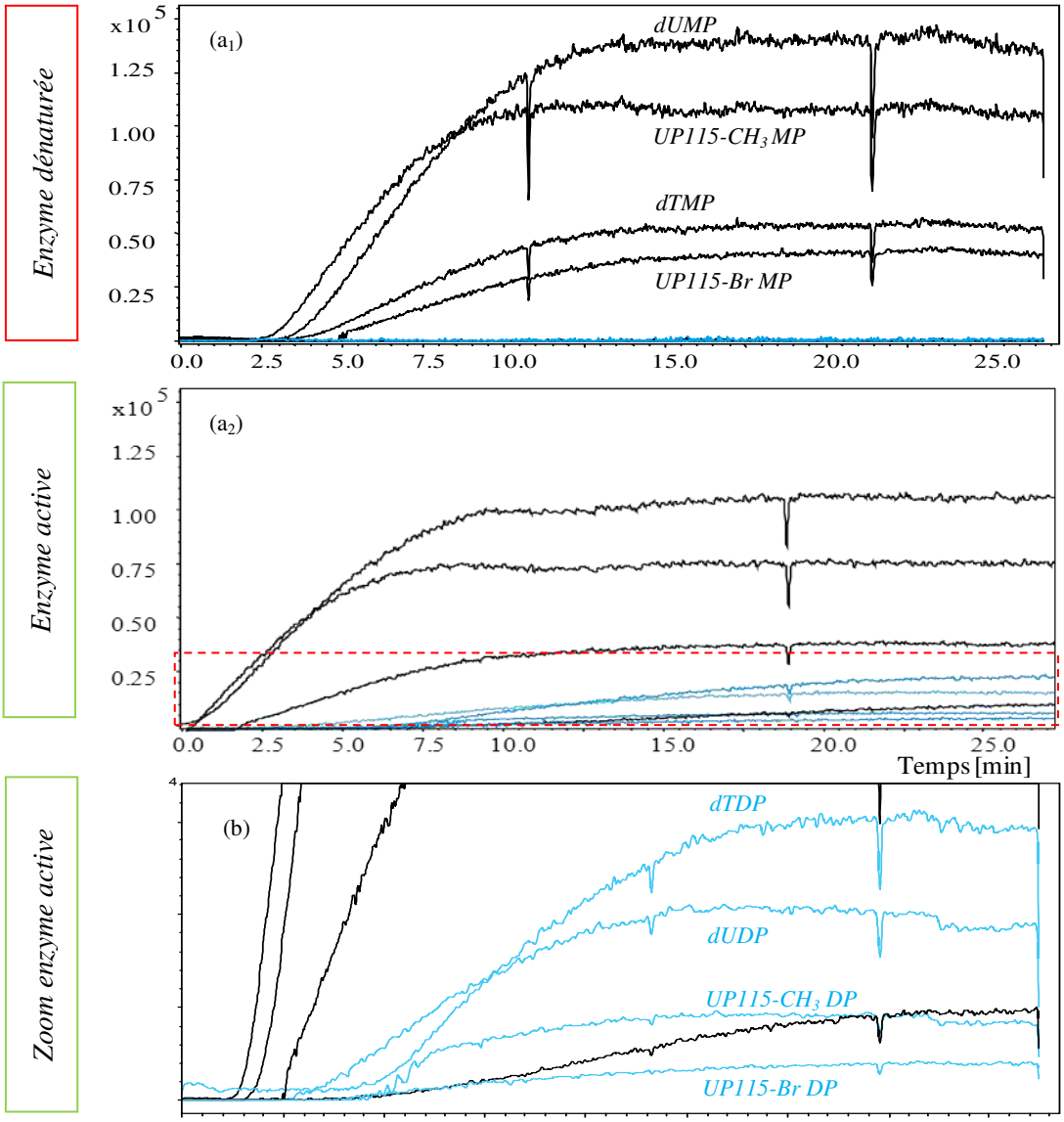


Figure III-67 -Bioréacteur hTMPK : suivi des EIC des molécules monophosphatées (tracé noir) et diphoshatées (tracé bleu) avec (a1) enzyme active et (a2) enzyme dénaturée, (b) agrandissement des EIC des molécules diphosphatées dans le cas de l'enzyme active.

Conclusions

Ce dernier chapitre de thèse s'est inscrit dans le contexte de la recherche de nouvelles molécules antivirales suite à une collaboration inter-équipes. L'objectif principal de notre étude a consisté à mettre en place un développement méthodologique de criblage pour l'étude de conversion de phosphorylation de nucléotides phosphonates acycliques. Dans cette démarche, notre travail s'est focalisé sur l'étude de deux étapes de conversion catalysées par les enzymes TMPK et NDPK permettant d'obtenir la forme triphosphatée.

Préalablement à l'étude d'activités de molécules de synthèse, ces méthodologies ont été développées par étude de conversion de l'endogène dTMP. Notre objectif s'est principalement focalisé sur la mise en place d'une méthodologie on-line par FAC-HRMS. Ce chapitre s'est articulé autour de trois parties d'investigations.

La première partie de ce chapitre est consacrée au développement méthodologique par FIA-HRMS pour la caractérisation des trois enzymes hTK1, hTMPK et hNDPK sous leurs formes libres et immobilisées. La technique FIA-HRMS a montré de nombreux avantages dans ce domaine tels qu'une rapidité d'analyse (1 minute), une sensibilité (concentrations de l'ordre du µM), une faible consommation d'échantillon (1µL) mais surtout la possibilité d'une détection directe de la conversion enzymatique. A la suite de la vérification de ces activités, la faisabilité de la cascade de phosphorylation en enzymes immobilisées a été mise en évidence.

La deuxième partie de ce chapitre est axée sur le développement des méthodologies FIA-HRMS et FAC-HRMS. Le but de ce travail était de montrer la faisabilité du suivi de phosphorylation off-line catalysé par les enzymes hTMPK et hNDPK immobilisées. L'étude de la première étape de phosphorylation catalysée par l'enzyme hTK1 a également été introduite en ouverture pour la valorisation de cette méthodologie.

Cette étude nous a alors confortés dans la mise en place du suivi de conversion on-line. Malgré l'introduction de cette méthodologie FIA-HRMS comme travail préliminaire au suivi on-line, cette étude n'en reste pas moins un développement méthodologique pour la caractérisation d'enzymes kinases ainsi que pour le suivi de mono-phosphorylation ou de cascade de phosphorylations. Deux principales conclusions sur le développement de la preuve de concept ont émergé de nos travaux :

- le suivi off-line d'une étape de phosphorylation doit être préférablement mené par utilisation d'enzymes libres,
- le suivi de cascade de phosphorylation s'est révélé efficace dans le cadre des enzymes immobilisées.

Suite aux résultats encourageants de l'étude off-line, la mise en place de la preuve de concept de conversion on-line du dTMP en dTTP par FAC-HRMS a été réalisée. Même si cette méthodologie souffre des mêmes limites que l'étude off-line (concentrations limitées en sels et impossibilité d'analyse d'isomères), cette technique repose sur une étude :

- directe (spécificité de détection),
- rapide (aux alentours de 5 min),
- efficace,
- versatile (absence de dimension séparative),
- automatisable (optimisation du système).

L'approche dynamique a montré des suivis de conversions efficaces et en adéquation avec l'étude off-line avec près de 50% de dTMP converti en dTTP. L'étude on-line n'en reste pas moins plus rapide (5 minutes contre 1 heure). La preuve de concept de cascade de phosphorylation on-line de l'endogène dTMP a, par conséquent, été validée.

L'ensemble des développements méthodologiques ainsi que les résultats obtenus par les méthodologies off-line et on-line ont été mis à profit pour l'étude de cas réel de l'analyse de molécules de synthèse dans la troisième partie. Afin de vérifier la fiabilité de nos approches, ces deux méthodologies ont été appliquées dans le cas d'étude de spécificité de nucléotides phosphonates acycliques vis-à-vis des souches humaine et virale de l'enzyme TMPK. Bien que cette étude reflète les limites de notre technique (disparité d'ionisation pouvant engendrer la détection de faux positif et l'impossibilité d'analyses d'isomères), elle a permis de valider la fiabilité de nos approches. Ainsi, la spécificité de conversion pour la souche humaine de l'enzyme TMPK a été prouvée en accord avec la littérature. De toute évidence, même si la fiabilité de ces développements a été prouvée, la robustesse de notre approche n'en reste pas moins à valider par la réalisation d'une analyse dotée d'un plus large panel d'échantillons.

Finalement, il est important de noter que ces développements n'ont pas visée à remplacer les tests biologiques réalisés in-vivo. En outre, ils offrent la possibilité d'effectuer une étude de pré-criblage pour l'obtention d'une réponse rapide et fiable quant aux deux étapes de phosphorylation. Ces techniques auront pour vocation d'aider au criblage et aux décisions de synthèse de nouveaux nucléotides.

Références

[1] L. N. D. Reymen, J. Balzarini, A. Holy, H. Dvorakova, E. De Clercq, *Antiviral Res*., 28 **(1995)** 343-357.
[2] C. X. Tan, F. D. Boudinot, *Adv Drug Deliv Rev*., 1999 **(1999)** 117-151.
[3] R. P. Iyer, S. Padmanabhan, G. Zhang, J. D. Morrey, B. E. Korba, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5 **(2005)** 520-528.
[4] O. D. Carroll, *Infect Disord Drug Targets*, 6 **(2006)** 17-29.
[5] K. K. Biron, *Antiviral Res*., 71 **(2006)** 154-163.
[6] E. de Clerq, *Nature Rev*., 4 **(2005)** 928-940.
[7] F. Zoulim, C. Dumontet, *Nat. Rev Drug Discov*., 12 **(2013)** 447-464.
[8] J. Bourdais, S. Sarfati, C. Guerreiro, L. Lascu, J. Janin, M. Véron, *J. Biol. Chem*., 271 **(1996)** 7887-7890.
[9] A. Varga, E. Graczer, L. Chaloin, K. Liliom, P. Zavodszky, C. Lionne, M. Vas, *Eur. J. Pharm. Sci*., 48 **(2013)** 307-315.
[10] T. Cihlar, A. S. Ray, *Antiviral Res.*, 85 **(2010)** 39-58.
[11] A. R. Van Rompay, M. Johansson, A. Karlsson, *Pharmacol. Ther.*, 100 (2003) 119-139.
[12] D. Deville-Bonne, C. El Amri, P. Meyer, Y. Chen, L.A. Agrofoglio, J. Janin, *Antiviral Res*., 86 **(2010)** 101-120.
[13] Y. Zhang, Y. Gao, X. Wen, H. Ma, *AJPS*, 9 **(2014)** 65-74.
[14] A. Lavie, *Medicin. Chem.*, 4 **(2004)** 351-359.
[15] J. Wang, J. Chattopadhyaya, S. Eriksson, *Biochem.*, 38 **(1999)** 16993-16999.
[16] M. Welin, N. E. Mikkelsen, C. Carnrot, C. Zhu, L. Wang, S. Eriksson, B. Munch-Petersen, H. Eklund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 101 **(2004)** 17970-17975.
[17] F. Barroso, T. Flatmark, *Biochem.*, 42 **(2003)** 15158-15169.
[18] K. Johansson, C. Ljungcrantz, W. Knecht, J. Piskur, B. Munch-Petersen, S. Eriksson, H. Eklund, *Nat Struct Biol,* 8 **(2001)** 616-620.
[19] E. Sabini, S. Hazra, M. Konrad, A. Lavie, *J. Med. Chem*., 50 **(2007)** 3004-3014.
[20] I. Von Zabern, R. Untucht-Grau, R. H. Schirmer, E. F. Pai, *Eur J Biochem*, 68 **(1976)** 281-290.
[21]N. Sekulic, L. Shuvalova, O. Spangenberg, M. Konrad, A. Lavie, *J Biol Chem*, 277 **(2002)** 30236-30243.
[22] N. Ostermann, R. Brundiers, M. Konrad, J. Reinstein, T. Veit, R. S. Goody, A. Lavie, *Biochem*., 42 **(2000)** 2568-2577.
[23] D. Segura-Pena, N. Sekulic, S. Ort, M. Konrad, A. Lavie, *J Biol Chem*, 279 **(2004)** 33882-33889.
[24] Y. Chen, S. Gallois-Montbrun, B. Schneider, M. Véron, S. Moréra, D. Deville-Bonne, J. Janin, *J. Mol. Biol*., 332 **(2003)** 915-926.
[25] C. Gondeau, L. Chaloin, P. Lallemand, B. Roy, C. Perigaud, T. Barman, A. Varga, M. Vas, C. Lionne, S.T. Arold, *Nucleic Acids Res*, 36 **(2008)** 3620-3629.
[26] M. Bong, K. H. Nam, K. S. Lee, Y. M. Chi, K. Y. Hwang, *FEBS Lett*, 582 **(2008)** 3959-3965.
[27] E. De Clerq., *Methods Find Exp Clin Pharmacol*., 2 **(1980)** 253-267.
[28] E. De Clercq, *Biochem Pharmacol*, 68 **(2004)** 2301-2315.
[29] R. J. Whitley, *J. Antimicrob. Chemother*, 37 **(1996)** 151-159.
[30] M. Baba, P. Herdewijn, E. De Clercq, J. Desmyter, M. Vandeputte, *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 142 **(1987)** 128-134.
[31] H. E. Kaufman, *Proc Soc Exp Biol Med*, 109 **(1962)** 251-252.
[32] P. Wutzler, *Intervirology,* 40 **(1997)** 343-356.
[33] A. Markham, *Drugs*, 48 **(1994)** 455-484.
[34] R. Pauwels, D. Schols, M. Baba, J. Desmyter, I. Rosenberg, A. Holy, E. De Clercq, *Antimicrob Agents Chemother*., 32 **(1988)** 1025-1030.
[35] M. Nunez, B. Diaz, P. Rios, J. Gonzales-Lahoz, V. Soriano, *AIDS*, 16 **(2002)** 2352-2354.
[36] K. K. Biron, *Antiviral Res*., 71 **(2006)** 154-163.

[37] T. Schacker, D. M. Koelle, J. Zeh, R. Saltzman, R. Boon, M. Shaughnessy, G. Barnum, L Corey, *Ann. Intern. Med*, 128 **(1998)** 21-28.
[38] B. Qaqish, D. J. Ritchie, *Clin. Ther*, 25 **(2003)** 3084-3099.
[39] E. Murakami, M. Tsuge, N. Hiraga, H. Kan, T. Uchida, K. Masaki, T. Nakahara, A. Ono, D. Miki, T. Kawaoka, H. Abe, M. Imamura, H. Aikata, H. Ochi, C.N. Hayes, T. Akita, J. Tanaka, K. Chayama, *J. Infect*., 72 **(2016)** 91-102.
[40] P. Schelling, G. Folkers, L. Scapozza, *Anal. Biochem*, 295 **(2001)** 82-87.
[41] T. Spector, *J. Biol. Chem.*, 250 **(1975)** 7372-7376.
[42] F. N. Naguib, M. H. El Kouni, *Mol. Biochem. Parasitol*, 194 **(2014)** 53-55.
[43] H. R. Kaslow, C. R. Garrison, *Anal. Biochem*., 134 **(1983)** 495-498.
[44] D. A. Vessey, M. Kelley, J. S. Karliner, *Anal. Biochem*., 337 **(2005)** 136-142.
[45] M. H. Hastie, P. Cohen., *Nat Protoc*, 1 **(2006)** 968-971.
[46] C. M. Park, K. Lee, S. H. Jun, S. H. Song, J. Song, *J. Chrom. B*, 1060 **(2017)** 76-83.
[47] X. Peng , K. W. Cheng, B. Chen, F. Chen, M. Wang, *Biomed Chromatogr*., 23 **(2009)** 170-174.
[48] M. Pace, P. Pietta, D. Agnellini., *Anal Biochem*. , 176 **(1989)** 437-439.
[49] M. Faria, M. S. Halquist, E. Kindt, W. Li, H. T. Karnes, P. J. O'Brien, *J. Chrom. B,* 907 **(2012)** 13-20.
[50] P. K. Doharey, M. K. Suthar, A. Verma, V. Kumar, S. Yadav, V. M. Balaramnavar, S. Rathaur, A. K. Saxena, M .I. Siddiqi, J. K. Saxena, *Acta Trop*., 133 **(2014)** 83-92.
[51] G. Pulido-Cejudoa, J. Leclerc, K. Jamison, P.James Gordon, *J. Chrom. B.*, 660 **(1994)** 37-47.
[52] C. C. Liu, J. S. Huang, D. L. Tyrrell, N. J. Dovichi, *Electrophoresis*, 26 **(2005)** 1424-1431.
[53] Y. Qi, Y. Li, J. J. Bao, *Anal. Biochem.*, 506 **(2016)** 31-44.
[54] H. F. Tzeng, H. P. Hung, *Electrophoresis,* 26 **(2005)** 2225-2230.
[55] H. Nehmé, S. Chantepie, J. Defert, P. Morin, D. Papy-Garcia, R. Nehmé, *Anal Bioanal. Chem.*, 407 **(2015)** 2821-2828.
[56] J. Iqbal, L. Scapozza, G. Folkers, C. E. Muller, *J. Chrom. B*., 846 **(2007)** 281-290.
[57] H. Nehme, R. Nehme, P. Lafite, S. Routier, P. Morin, *J. Chrom. A.*, 1314 **(2013)** 298-305.
[58] R. N. H. Nehmé, P. Lafite, S. Routier, P. Morin, *J. Sep. Sci.*, 36 **(2013)** 2151-2157.
[59] M. Welin, U. Kosinska, N.E. Mikkelsen, C. Carnrot, C. Zhu, L. Wang, S. Eriksson, B. Munch-Petersen, H. Eklund, *Proc. Natl. acad. Sci. USA*., 101 **(2004)** 17970-17975.
[60] I. Li de la Sierra, A. M. Gilles, O. Bârzu, M. Delarue, *J Mol Biol*, 311 **(2001)** 87-100.
[61] N. Ostermann, R. Brundiers, M. Konrad, R. S. Goody, A. Lavie, *Structure*, 8 **(2000)** 629-642.
[62] J. Bourdais, S. Sarfati, C. Guerreiro, L. Lascu, J. Janin, M. Véron, *J. Biol. Chem*., 271 **(1996)** 7887-7890.
[63] I. Lascu, *J Bioenerg Biomembr*., 32 **(2000)** 237-246.
[64] S. Pochet, G. Labesse, M. Delepierre, H. Munier-Lehmann, *Chembiochem*, 4 **(2003)** 742-747.
[65] M. M. Bradford, *Anal. Biochem*, 72 **(1976)** 248-254.
[66] L. Toledo-Sherman, J. J. Slon-Usakiewicz, W. Ng, J. Dai, J. E. Foster, P. R. Redden, M. D. Uger, L. C. Liao, A. Pasternak, and N. Reid, J. Med. Chem, 48 **(2005)** 3221-3230.
[67] X. Zheng, Z. Li, S. Beeram, M. Podariu, R. Matsuda, E. L. Pfaunmiller, C. J. White, N. Carter, D. S. Hage, *J. Chrom. B*, 968 **(2014)** 49-63.
[68] W. Ng, J. R. Dai, J. J. Slon-Usakiewicz, P .R. Redden, A. Pasternak, N. Reid, *J. Biol. Screen.*, 12 **(2007)** 167-174.
[69] J. Yin, T. Xu, N. Zhang, H. Wang, *Anal. Chem*., 88 **(2016)** 7730-7737.
[70] K. Kasai, *Proc. Jpn. Acad*., Series B, 90 **(2014)** 215-234.
[71] Aleksander Salwinski, Benoit Maunit, *Rapid Commun. Mass Spectrom*., 25 **(2011)** 3549-3554.
[72] N. Tolonen, S. Schleich, and, J. K. Locker, *Mol. Biol. Cell*., 12 **(2001)** 2031-2046.
[73] G. B. Elion, *Am J Med*. , 73 **(1982)** 7-13.
[74] D. Topalis, C. Gasse, L. Dugué, J. Balzarini, S. Pochet, D. Deville-Bonne, *FEBS J.*, 272 **(2005)** 6254-6265.
[75] D. Topalis, B. Collinet, C. Gasse, L. Dugue, J. Balzarini, S. Pochet, D. Deville-Bonne, *The FEBS journal*, 272 **(2005)** 6254-6265.

[76] D. Topalis, U. Pradere, V. Roy, C. Caillat, A. Azzouzi, J. Broggi, R. Snoeck, G. Andrei, J. Lin, S. Eriksson, J. A. Alexandre, C. El-Amri, D. Deville-Bonne, P. Meyer, J. Balzarini, L. A. Agrofoglio, J. Med. chemistry, 54 **(2011)** 222-232.

Table des figures

FIGURE III-1 - STRUCTURE GENERALE ET MODIFICATIONS CHIMIQUES DES ANALOGUES DE NUCLEOSIDES/NUCLEOTIDES POUR LA RECHERCHE DE NOUVELLES MOLECULES ANTIVIRALES. FIGURE INSPIREE DE LA PUBLICATION « NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 2013, 447-464 »..... 163

FIGURE III-2 - VOIE DE PHOSPHORYLATION DES NUCLEOSIDES NATURELS CHEZ L'HOMME. ANTIVIRAL RESEARCH, 2010, 101-120. DN : NUCLEOSIDE, DNMP : NUCLEOSIDE MONOPHOSPHATE, DNDP : NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE ET DTTP : NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE..... 164

FIGURE III-3- FORMULES DES SUBSTRATS THYMIDINE, THYMIDINE MONOPHOSPHATE ET THYMIDINE DIPHOSPHATE. GROUPEMENTS ACCEPTEURS : 5'-OH DU DT OU A- OU B-PHOSPHATE DU DTMP ET DTDP FORMULE DU PHOSPHODONNEUR ATP. GROUPEMENT DONNEUR : Γ-PHOSPHATE..... 164

FIGURE III-4 - TEST TRI-ENZYMATIQUE SPECTROPHOTOMETRIQUE UTILISE POUR LA MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE KINASES. 173

FIGURE III-5 - REACTION DE CONVERSION D'UN NUCLEOSIDE CATALYSEE PAR L'ENZYME HTK1VIA LE TRANSFERT D'UN GROUPEMENT Γ-PHOSPHATE DE L'ATP..... 177

FIGURE III-6- (A) STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'ENZYME HTK1 (TETRAMERE) ET (B) STRUCTURE SECONDAIRE : SOUS-UNITE DU TETRAMERE. J. MOL. BIOL, 2007, 369, 129-11..... 177

FIGURE III-7- PROCESSUS « EN-LIGNE » DU TRANSFERT DU GROUPEMENT Γ-PHOSPHATE DE L'ATP AU GROUPEMENT 5'-OH D'UN NUCLEOSIDE CATALYSE PAR L'ENZYME HTK1.FIGURE INSPIREE DE LA THESE DU DOCTEUR DIMITRI TOPALIS..... 178

FIGURE III-8 - REACTION DE CONVERSION D'UN NUCLEOTIDE MONOPHOSPHATE CATALYSEE PAR L'ENZYME HTMPK VIA LE TRANSFERT D'UN GROUPEMENT Γ-PHOSPHATE DE L'ATP..... 178

FIGURE III-9 - (A) STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA THYMIDYLATE KINASE HUMAINE ET (B) STRUCTURE SECONDAIRE COMPLEXEE AVEC LE SUBSTRAT DTMP, LE PHOSPHODONNEUR ATP ET L'AGENT CHELATANT (Mg^{2+}). DOMAINE CORE CENTRAL CONTENANT LES TROIS DOMAINES PRINCIPAUX ESSENTIELS A L'ACTIVITE ENZYMATIQUE : P-LOOP, DOMAINE LID ET LE DOMAINE LIANT AU SUBSTRAT..... 179

FIGURE III-10 - REACTION DE CONVERSION D'UN NUCLEOTIDE DIPHOSPHATE CATALYSEE PAR L'ENZYME HNDPK VIA LE TRANSFERT DU GROUPEMENT Γ-PHOSPHATE DE L'ATP..... 179

FIGURE III-11- (A) STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'ENZYME HNDPK (HOMOXAMERE) ET (B) STRUCTURE SECONDAIRE : SOUS-UNITE DE L' HOMOEXAMERE. ORG BIOMOL CHEM, 2007, 627-635..... 180

FIGURE III-12 - MECANISME « PING-PONG » DE TRANSFERT DU GROUPEMENT PHOSPHATE PAR L'ENZYME NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE HUMAINE..... 180

FIGURE III-13- PROCEDE D'EXPRESSION ET DE PURIFICATION DE L'ENZYME HTMPK. L'ENZYME VVTMPK A ETE PRODUITE SELON LE MEME PROTOCOLE..... 183

FIGURE III-14 - EXPRESSION DE LA PROTEINE HTMPK : CONTROLE PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE TYPE SDS-PAGE (14% ACRYLAMIDE) DE L'INDUCTION DE LA SUREXPRESSION ET DE LA PURETE DE LA PROTEINE..... 185

FIGURE III-15- INFLUENCE DU $MgCl_2$ (200 μM) SUR L'IONISATION DE L'ATP ET DU DTMP PAR FIA-HRMS ([ATP] = 150 μM, [DTMP] = 50 μM)..... 186

FIGURE III-16 – INFLUENCE DE LA TENSION DU CAPILLAIRE SUR L'IONISATION DES COMPOSES DTMP ET DTDP ET SUR LA FRAGMENTATION DU DTDP EN DTMP..... 188

FIGURE III-17- INFLUENCE DU DEBIT DE GAZ SECHANT SUR L'IONISATION DU DTMP..... 189

FIGURE III-18- INFLUENCE DE LA PRESSION DU NEBULISEUR SUR L'IONISATION DU DTMP. 189
FIGURE III-19 – INFLUENCE DE L'ENERGIE DE LA CELLULE DE TRANSFERT SUR L'IONISATION DU DTMP ET SUR LA FRAGMENTATION DU DTDP EN DTMP. 190
FIGURE III-20 – SPECTRE DE MASSE DU COMPOSE DTTP OBTENU PAR FIA-HRMS. 190
FIGURE III-21 – SPECTRE DE MASSE DU COMPOSE DTDP OBTENU PAR FIA-HRMS. 191
FIGURE III-22 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ATP (50, 150 ET 350 μM, [$MgCL_2$] = 200 μM) ET EN $MgCL_2$ (25, 200 ET 400 μM, [ATP] = 150 μM) SUR L'EFFICACITE DE CONVERSION DES ENZYMES HUMAINES TK1, TMPK ET NDPK. CHAQUE VALEUR ET ECART-TYPE SONT REPRESENTATIFS D'UNE MOYENNE DE TROIS EXPERIENCES BIOLOGIQUES. 192
FIGURE III-23- METHODOLOGIE DE VALIDATION DE CARACTERISATION ET DE SUIVI DE PHOSPHORYLATION PAR FIA-HRMS. ETUDES COMPLEMENTAIRES REALISEES PAR SPECTROPHOTOMETRIE (UV) ET PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE (UV). 194
FIGURE III-24 - DROITE D'ETALONNAGE DU PRODUIT DTDP DE LA REACTION, M/Z 401,0145 (CARRES, Y = 46403X + 60855, R^2 = 0,999). 195
FIGURE III-25- PROTOCOLE D'ETUDE DE LINEARITE DE L'ENZYME HTMPK PAR FIA-HRMS. 195
FIGURE III-26 - CINETIQUE DE PRODUCTION DU DTDP PAR L'ENZYME HTMPK (Y = 0.4566X - 001185, R^2 = 0.996) DETECTE PAR FIA-HRMS. 196
FIGURE III-27- PROTOCOLE ET CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE MICHAELIS-MENTEN DE L'ENZYME HTMPK PAR FIA-HRMS. 197
FIGURE III-28- EXEMPLE DE SPECTRE DE MASSE DE CONVERSION DU DTMP EN DTDP OBTENU PAR FIA-HRMS (ESI Q TOF MS). 197
FIGURE III-29- (A) COURBE DE MICHAELIS-MENTEN DE L'ENZYME HTMPK ([ATP] = 350 μM, [$MgCL_2$] = 200 μM) OBTENUE PAR ANALYSE FIA-HRMS. CHAQUE VALEUR EST REPRESENTATIVE DE LA MOYENNE DE TROIS EXPERIENCES BIOLOGIQUES. LA COURBE A ETE OBTENUE VIA LE LOGICIEL GRAPHPAD PRISM 5.0 ET EXTRAPOLEE PAR L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN. 198
FIGURE III-30- COURBES DE MICHAELIS-MENTEN DE L'ENZYME HTMPK (A) [ATP] = 5 MM, [$MgCL_2$] = 10 MM, (B) [ATP] = 350 μM, [$MgCL_2$] = 200 μM. COURBES OBTENUES PAR ANALYSE SPECTROPHOTOMETRIQUE (Λ=340 NM). LA COURBE A ETE OBTENUE VIA LE LOGICIEL GRAPHPAD PRISM 5.0 ET EXTRAPOLEE PAR L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN. 199
FIGURE III-31 - COURBE DE MICHAELIS-MENTEN DE L'ENZYME LIBRE HTMPK ([ATP] = 350 μM, [$MgCL_2$] = 200 μM) PAR EC-UV. CHAQUE VALEUR EST REPRESENTATIVE DE LA MOYENNE DE DEUX EXPERIENCES BIOLOGIQUES. LES COURBES ONT ETE OBTENUES A PARTIR DU LOGICIEL GRAPHPAD PRISM 5.0 ET EXTRAPOLEES A PARTIR DE L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN. 201
FIGURE III-32- DROITES D'ETALONNAGE DES TROIS PRODUITS DE REACTION DTMP, M/Z 321.0482 (LOSANGES, Y = 73164X + 55415, R^2 = 0,999), DTDP, M/Z 401,0145 (CARRES, Y = 46403X + 60855, R^2 = 0,999) ET DTTP, M/Z 480,9808 (TRIANGLES, Y = 21986X + 102720, R^2 = 0,982). 203
FIGURE III-33- CINETIQUE DE PRODUCTION DU DTMP (▲, Y = 0.03X + 0.0181, R^2 = 0.9795) ET DU DTTP (▪, Y = 0.1187X - 0.0357, R^2 = 0.990) DETECTES PAR FIA-HRMS. 204
FIGURE III-34- COURBES DE MICHAELIS-MENTEN DES ENZYMES HTK1 ET HNDPK ([ATP] = 350 μM, [$MgCL_2$] = 200 μM) OBTENUE PAR ANALYSE FIA-HRMS. CHAQUE VALEUR EST REPRESENTATIVE DE LA MOYENNE DE TROIS EXPERIENCES BIOLOGIQUES. LA COURBE A ETE OBTENUE VIA LE LOGICIEL GRAPHPAD PRISM 5.0 ET EXTRAPOLEE PAR L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN. . 205
FIGURE III-35- COURBES DE MICHAELIS-MENTEN DES ENZYMES LIBRES HTK1 ET HNDPK ([ATP] = 5 MM/[MGCL2] = 10 MM ET ([ATP] = 350 μM/[$MgCL_2$] = 200 μM. LES COURBES ONT ETE OBTENUES A PARTIR DU LOGICIEL GRAPHPAD PRISM 5.0 ET EXTRAPOLEES A PARTIR DE L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN. 206
FIGURE III-36 - COURBES DE MICHAELIS-MENTEN DES ENZYMES LIBRES (•, NOIR) ET IMMOBILISEES (▪, BLEU) HTK1, HTMPK ET HNDPK. CHAQUE VALEUR EST REPRESENTATIVE DE LA MOYENNE DE TROIS EXPERIENCES BIOLOGIQUES. LES COURBES ONT ETE OBTENUES A PARTIR DU LOGICIEL GRAPHPAD PRISM 5.0 ET EXTRAPOLEES AVEC L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN. 209

FIGURE III-37 - COURBE DE MICHAELIS-MENTEN DE L'ENZYME HTK1 OBTENUE POUR TROIS LOTS D'IMMOBILISATIONS (N = 3). LA COURBE EST OBTENUE A PARTIR DU LOGICIEL GRAPHPAD PRISM 5.0 ET EXTRAPOLEE AVEC L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN. 210

FIGURE III-38 - CINETIQUES DE CONVERSIONS DES TROIS SUBSTRATS DT, DTMP ET DTDP (25 μM) CATALYSEES RESPECTIVEMENT PAR LES ENZYMES LIBRES HTK1 (0,48 G/L), HTMPK (0,04 G/L) ET HNDPK (0,04G/L) PAR ANALYSE FIA-HRMS. 215

FIGURE III-39 - REPRESENTATION DE L'EFFICACITE DE CONVERSION POUR LES TROIS REACTIONS INDIVIDUELLES CATALYSEES PAR HTK1, HTMPK ET HNDPK LIBRES (GRIS CLAIR) ET IMMOBILISEES (GRIS FONCE). ANALYSE EN FIA-HRMS (N = 3). 216

FIGURE III-40 - ETUDE DE SPECIFICITE DE REACTION DES TROIS ENZYMES HTK1 (0,48 G/L), HTMPK (0,04 G/L) ET HNDPK (0,04 G/L) AVEC LES TROIS SUBSTRATS DT, DTMP ET DTDP (50 μM), [ATP] = 350 μM, [$MgCL_2$] = 200 μM. TEMPS DE REACTION DE 30 MINUTES A 37°C. ANALYSES PAR FIA-HRMS. 218

FIGURE III-41- PROTOCOLE ET CONDITIONS EXPERIMENTALES DU SUIVI DE PHOSPHORYLATION CATALYSE PAR LES ENZYMES LIBRES HTK1, HTMPK ET HNDPK. ETUDE PAR FIA-HRMS. 219

FIGURE III-42- PROTOCOLE ET CONDITIONS EXPERIMENTALES DU SUIVI DE PHOSPHORYLATION CATALYSE PAR LES ENZYMES IMMOBILISEES HTK1, HTMPK ET HNDPK. ETUDE PAR FIA-HRMS. 220

FIGURE III-43- QUANTITES NORMALISEES DE PRODUIT FORME (μM) POUR LES REACTIONS SUCCESSIVES CATALYSEES PAR LES ENZYMES LIBRES HTK1, HTMPK ET HNDPK. GRIS CLAIR : SANS AJOUT D'ATP, GRIS FONCE : AVEC AJOUT D'ATP (350 μM). LES RESULTATS SONT REPRESENTATIFS DE TROIS EXPERIENCES BIOLOGIQUES. ANALYSES REALISEES EN FIA-HRMS. 220

FIGURE III-44 - QUANTITES NORMALISEES DE PRODUIT FORME (μM) POUR LES REACTIONS SUCCESSIVES CATALYSEES PAR LES ENZYMES IMMOBILISEES HTK1, HTMPK ET HNDPK. BLEU CLAIR : SANS AJOUT D'ATP, BLEU FONCE : AVEC AJOUT D'ATP (350 μM). LES RESULTATS SONT REPRESENTATIFS DE TROIS EXPERIENCES BIOLOGIQUES. ANALYSES REALISEES EN FIA-HRMS. 221

FIGURE III-45 - SCHEMA THEORIQUE DU SUIVI DE PHOSPHORYLATION EN LIGNE PAR FAC-HRMS. LE SUBSTRAT INITIAL DTMP EST INFUSE DANS LES BIOREACTEURS HTMPK ET HNDPK PLACES EN SERIE (FOUR, 37°C), LE SUIVI DE CONVERSION EST REALISE PAR DETECTION DES CHROMATOGRAMMES D'EXTRACTION DES IONS D'INTERETS : DTMP, (M/Z 321.0500, $[M^-H]^-$), DTDP (M/Z 401.0166 $[M^-H]^-$) ET DTTP (M/Z 480.9831, $[M^-H]^-$). 224

FIGURE III-46 - SYSTEME DE BOUCLES ALTERNATIVES SUR VANNE 10 PORTS DU SYSTEME FAC-HRMS. (A) L'INFUSION D'UNE PREMIERE BOUCLE REMPLIE DE SOLUTION A ANALYSER (BOUCLE 1, V = 320 μL) EST REALISEE PENDANT LE REMPLISSAGE DE LA SECONDE BOUCLE (BOUCLE 2, DE MEME VOLUME) PAR LA SOLUTION A ANALYSER. (B) : UNE ROTATION DE LA VANNE EST EFFECTUEE AVANT LA FIN DE L'INFUSION DE LA PREMIERE BOUCLE AFIN D'OBSERVER UN PLATEAU DE CONVERSION SUR LE SUIVI DES EIC. 226

FIGURE III-47 - SCHEMA DU SYSTEME FAC-HRMS : DEUX POMPES POUR L'INFUSION ET LE REMPLISSAGE DU SYSTEME DE BOUCLES ALTERNATIVES. LES BIOREACTEURS PLACES EN SERIE SONT RELIES A LA VANNE 10 PORTS ET DIRECTEMENT A LA SOURCE ELECTROSPRAY. 227

FIGURE III-48 - CHROMATOGRAMME D'EXTRACTION D'IONS REPRESENTANT LE COMPOSE INFUSE PAR LE SYSTEME DE BOUCLES ALTERNATIVES SANS PRE-CONDITIONNEMENT DES BOUCLES PAR LE TAMPON DE REACTION. OBSERVATION D'UNE DIMINUTION DE L'INTENSITE DU SIGNAL. 228

FIGURE III-49 - CHROMATOGRAMME D'EXTRACTION D'IONS REPRESENTANT LE COMPOSE DTMP INFUSE PAR LE SYSTEME DE BOUCLES ALTERNATIVES (A) FIN D'INFUSION DE LA PREMIERE BOUCLE ET (B) INTERFERENCES DUES A LA ROTATION DE LA VANNE. 228

FIGURE III-50 - CHROMATOGRAMMES D'EXTRACTION D'IONS REPRESENTANT LES COMPOSES INFUSES PAR LE SYSTEME DE BOUCLES ALTERNATIVES APRES OPTIMISATIONS DES VOLUMES MORTS ET DU TEMPS DE ROTATION DE LA VANNE. 228

FIGURE III-51 - SUPPORT REMPLI DES BILLES DE SILICE SUR LESQUELLES EST IMMOBILISEE L'ENZYME. A : BIOREACTEUR (DIAMETRE INTERNE : 4,6 MM, LONGUEUR 1,5 CM, VOLUME 249 μL), B : SUPPORT DU BIOREACTEUR. 229

FIGURE III-52 - NOUVEAU TYPE DE BIOREACTEUR (INOX, DIAMETRE INTERNE : 1 MM, LONGUEUR : 5 CM, VOLUME : 40 µL). 229

FIGURE III-53 - SYSTEME DE DEUX BIOREACTEURS MIS EN SERIE (A), LIES PAR UNE UNION (B) CONTENANT UN FRITEE EN SORTIE DE CAPILLAIRE (C). 230

FIGURE III-54 - SYSTEME DE REMPLISSAGE DES BIOREACTEURS. L'ENZYME IMMOBILISEE, PLACEE DANS UN RESERVOIR (A), EST ELUEE PAR UNE POMPE MICRO-DEBIT VERS LE BIOREACTEUR (C) VIA UN TUBE DE JONCTION (B). LA SILICE EST RETENUE DANS LE BIOREACTEUR PAR UN FRITTE PLACE EN FIN DE SYSTEME. UN REGULATEUR DE PRESSION (D) EST PLACE EN FIN DE REMPLISSAGE POUR FINALISER LE REMPLISSAGE. 230

FIGURE III-55 - (A) EFFICACITES NORMALISEES (INTENSITE DES PLATEAUX D'INFUSION) ET (B) VITESSES DE CONVERSION DU DTMP EN DTDP EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ATP PAR INFUSION DANS LE BIOREACTEUR HTMPK PAR FAC-HRMS. (B) CHROMATOGRAMMES D'EXTRACTIONS D'IONS DU DTDP (M/Z 401,0166 $[M-H]^-$. 233

FIGURE III-56 - BIOREACTEUR HTMPK; SUIVI DES EIC DE DTMP ET DTDP (M/Z 321.0500 [M-H]-, M/Z 401.0166 [M-H]-) POUR LE BIOREACTEUR (A) DENATURE ET (B) ACTIF. DEBIT = 60 µL/MIN, PHASE MOBILE : ACETATE D'AMMONIUM (PH = 7, 50 MM), ROTATION DE LA VANNE TOUTES LES 3 MINUTES. 234

FIGURE III-57 - BIOREACTEUR HNDPK; SUIVI DES EIC DE DTDP ET DTTP (M/Z 401.0166 [M-H]-, M/Z 480.9831 [M-H]-) POUR LE BIOREACTEUR (A) DENATURE ET (B) ACTIF. DEBIT = 40 µL/MIN, PHASE MOBILE : ACETATE D'AMMONIUM (PH = 7, 50 MM), ROTATION DE LA VANNE TOUTES LES 5 MINUTES. 236

FIGURE III-58 - STABILITE DE L'ACTIVITE DE BIOREACTEURS HTMPK ET HNDPK. EFFICACITES DE CONVERSION NORMALISEES APRES 21 UTILISATIONS DE HTMPK (795 MINUTES, 37°C) SUR 60 JOURS (▲) ET 20 UTILISATIONS POUR HNDPK (915 MINUTES, 37°C) SUR 68 JOURS (▪). 237

FIGURE III-59 - BIOREACTEURS HTMPK ET HNDPK; SUIVI DES EIC DE DTMP, DTDP ET DTTP (M/Z 321.0500 [M-H]-, M/Z 401.0166 [M-H]-, M/Z 480.9831 [M-H]-) POUR LES BIOREACTEURS (A) DENATURE ET (B) ACTIF. 239

FIGURE III-60 - FORMULES DES ANALOGUES DE PHOSPHONATES ACYCLIQUES METHYLE ET BROME (UP115-CH_3 ET UP115-BR). . 243

FIGURE III-61 - CINETIQUE DE PRODUCTION DU DTDP (Y = 35299X + 25512, R^2 = 0.993) DETECTEE PAR FIA-HRMS. 244

FIGURE III-62 - COURBES DE MICHAELIS-MENTEN DE L'ENZYME VVTMPK LIBRE (N = 3). LES COURBES ONT ETE OBTENUES A PARTIR DU LOGICIEL GRAPHPAD PRISM 5.0 ET EXTRAPOLEES A PARTIR DE L'EQUATION DE MICHAELIS-MENTEN. 244

FIGURE III-63- CINETIQUES DE CONVERSIONS DES TROIS SUBSTRATS DTMP, UP115-CH_3 ET UP115-BR (25 µM) CATALYSEES PAR L'ENZYME HTMPK (0,04G/L). ANALYSE PAR FIA-HRMS. 250

FIGURE III-64- BIOREACTEUR HTMPK : SUIVI DES EIC DES MOLECULES UP115-CH_3 ET UP115-BR (M/Z 259,0562 $[M-H]^-$ ET M/Z 322,9510 $[M-H]^-$). BIOREACTEURS ACTIFS ET DENATURES. 251

FIGURE III-65- BIOREACTEUR VVTMPK : SUIVI DES EIC DES MOLECULES DTMP, UP115-CH_3 ET UP115-BR (M/Z 321.0500 $[M-H]^-$, M/Z 259,0562 $[M-H]^-$ ET M/Z 322,9510 $[M-H]^-$). 252

FIGURE III-66 - BIOREACTEUR HTMPK; (A) : SUIVI DES EIC DE UP115-CH3-MP A DEUX PRECISIONS DE MASSE (M/Z 339,0150 ± 0,05 ET M/Z 339,0150 ± 0,01), (B) SPECTRE DE MASSE A DIFFERENTS TEMPS D'INFUSION (10, 14 ET 22 MINUTES). 255

FIGURE III-67 -BIOREACTEUR HTMPK : SUIVI DES EIC DES MOLECULES MONOPHOSPHATEES (TRACE NOIR) ET DIPHOSHATEES (TRACE BLEU) AVEC (A1) ENZYME ACTIVE ET (A2) ENZYME DENATUREE, (B) AGRANDISSEMENT DES EIC DES MOLECULES DIPHOSPHATEES DANS LE CAS DE L'ENZYME ACTIVE. 256

Table des tableaux

TABLEAU III-1- ENZYMES KINASES REPARTIES DANS LES TROIS FAMILLES DNKS, NMPKS ET NDPKS : SPECIFICITE DE SUBSTRAT (SELON LE TYPE DE BASE) ET LEUR LOCATION DANS LA CELLULE. 166

TABLEAU III-2- EXEMPLES D'AGENTS ANTIVIRAUX APPROUVES PAR LA FDA : DATE DE MISE SUR LE MARCHE ET MALADIES CIBLEES. 171

TABLEAU III-3- EXEMPLES DE PRO-DROGUE, PROTECTION DES GROUPEMENTS POLAIRES. 172

TABLEAU III-4- EXEMPLES DE TECHNIQUES DIRECTES ET INDIRECTES POUR LA CARACTERISATION ENZYMATIQUE DES ENZYMES KINASES. 176

TABLEAU III-5- CONDITIONS EXPERIMENTALES DU DOSAGE PROTEIQUE DE L'ENZYME HTMPK PAR TEST DE BRADFORD..... 184

TABLEAU III-6- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE L'INFLUENCE DES CONCENTRATIONS EN ATP ET $MGCL_2$ (μM) SUR L'EFFICACITE DES TROIS ETAPES DE PHOSPHORYLATION. 192

TABLEAU III-7- PARAMETRES CINETIQUES (K_M, V_{MAX}, K_{CAT}) DE L'ENZYME HTMPK DETERMINES PAR FIA-HRMS ([ATP] = 350 μM, [$MGCL_2$] = 200 μM)..... 198

TABLEAU III-8- PARAMETRES CINETIQUES (K_M, V_{MAX}, K_{CAT}) DE L'ENZYME HTMPK DETERMINES PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV ([ATP] = 5 MM, [$MGCL_2$] = 10 MM ET ([ATP] = 350 μM, [$MGCL_2$] = 200 μM). 200

TABLEAU III-9 - PARAMETRES CINETIQUES (K_M, V_{MAX}, K_{CAT}) DE L'ENZYME HTMPK DETERMINES PAR EC-UV ([ATP] = 350 μM, [$MGCL_2$] = 200 μM)..... 202

TABLEAU III-10- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE LINEARITE DES ENZYMES HTK1 ET HNDPK PAR FIA-HRMS..... 204

TABLEAU III-11- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE MICHAELIS-MENTEN DES ENZYMES HTK1 ET HNDPK PAR FIA-HRMS. 204

TABLEAU III-12- PARAMETRES CINETIQUES (K_M, V_{MAX}, K_{CAT}) DES ENZYMES HTK1 ET HNDPK DETERMINES PAR FIA-HRMS ([ATP] = 350 μM, [$MGCL_2$] = 200 μM). 205

TABLEAU III-13- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE MICHAELIS-MENTEN DES ENZYMES HTK1 ET HNDPK PAR EC-UV ([ATP] = 5 MM, [$MGCL_2$] = 10 MM, [ATP] = 350 μM, [$MGCL_2$] = 200 μM). 206

TABLEAU III-14- RESUME DES PARAMETRES CINETIQUES DE LA THYMIDINE KINASE (HTK1) ET DE LA NUCLEOSIDE DIPHOPSHATE KINASE (HNDPK) PAR SUIVI EN EC-UV ([ATP] = 5 MM, [MGCL2] = 10 MM ET [ATP] = 350 μM ET [$MGCL_2$] = 200 μM). 206

TABLEAU III-15- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE MICHAELIS-MENTEN DES ENZYMES LIBRES ET IMMOBILISEES HTK1, HTMPK ET HNDPK PAR FIA-HRMS ([ATP] = 350 μM, [$MGCL_2$] = 200 μM). 208

TABLEAU III-16 - PARAMETRES CINETIQUES (K_M, V_{MAX}, K_{CAT}) DE LA THYMIDINE KINASE (HTK1), THYMIDYLATE KINASE (HTMPK) ET NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE (HNDPK) LIBRES ET IMMOBILISEES. ANALYSES REALISEES PAR FIA-HRMS..... 209

TABLEAU III-17- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE CINETIQUE DES ENZYMES HTK1, HTMPK ET HNDPK LIBRES PAR FIA-HRMS. 214

TABLEAU III-18- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DES TAUX DE CONVERSIONS DES ENZYMES LIBRES ET IMMOBILISEES HTK1, HTMPK ET HNDPK PAR FIA-HRMS. 216

TABLEAU III-19 –AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'UTILISATION DES ENZYMES LIBRES ET IMMOBILISEES POUR LE SUIVI DE PHOSPHORYLATION OFF-LINE ET ON-LINE..... 222

TABLEAU III-20- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE MICHAELIS-MENTEN DE L'ENZYME VVTMPK PAR FIA-HRMS..... 244

TABLEAU III-21 - RESUME DES PARAMETRES CINETIQUES DE LA THYMIDYLATE KINASE DU VIRUS DE LA VACCINE (VVTMPK)..... 244

TABLEAU III-22- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE SPECIFICITE DE CONVERSION DES MOLECULES DE SYNTHESE UP115-CH_3 ET UP115-BR VIS-A-VIS DES SOUCHES HUMAINE ET VIRALE DE L'ENZYME TMPK. ANALYSES PAR FIA-HRMS. 246

FIGURE III-23- REPRESENTATION DES AIRES DES CHROMATOGRAMMES D'EXTRACTION D'IONS DES MOLECULES DTMP, UP115-CH_3 ET UP115-BR AVANT ET APRES REACTIONS CATALYSEES PAR LES ENZYMES HTMPK ET VVTMPK. 247

TABLEAU III-24- CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE DE CINETIQUE DE CONVERSION DES MOLECULES DTMP, UP115-CH_3 ET UP115-BR CATALYSEE PAR L'ENZYME VVTMPK. ANALYSES PAR FIA-HRMS. 249

TABLEAU III-25- CONDITIONS OPERATOIRES DE L'ETUDE DE SPECIFICITE DE L'ACTIVITE DES MOLECULES DTMP, UP115-CH_3 ET UP115-BR AU REGARD DES SOUCHES HUMAINE ET VIRALE DE L'ENZYME TMPK. ANALYSES PAR FAC-HRMS. 250

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse est animé par la volonté de façonner et de renforcer le panel des méthodologies analytiques pour le criblage d'interactions enzymes-ligands. L'objectif principal de ce projet s'est focalisé sur le développement de méthodes rapides, fiables et pertinentes quant à l'évaluation de l'activité potentielle de molécules par détection en spectrométrie de masse. Deux familles enzymatiques spécifiques à différents domaines d'applications, ont été sélectionnées pour la mise en place de ces preuves de concepts :

- la famille des glycosides hydrolases de polysaccharides (invertase et cellobiohydrolase II (CBH II)). Ces enzymes sont utilisées dans certains procédés industriels tels que les domaines agroalimentaire et énergétique (chapitre II),
- la famille des kinases (désoxynucléosides kinases dNKs, nucléosides monophosphate kinases NMPK et nucléosides diphosphates kinases NDPK) pour le domaine thérapeutique (chapitre III).

Suite à l'introduction de l'étude bibliographique, les chapitres II et III ont été décomposés en trois parties hiérarchisées selon une structure similaire :

Les premières parties ont été axées sur le développement d'une méthodologie de quantification de l'activité de chaque enzyme. De cette manière, les valeurs des paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) ont été déterminées.

La mise en place de la méthode de criblage basée sur l'interaction enzyme-ligand a été abordée dans un second temps. A travers l'étude des deux familles d'enzymes (glycosides hydrolases et kinases), nous nous sommes intéressés au suivi d'une étape de conversion de substrat en produit, puis d'une étude de plusieurs étapes de conversion par suivi de cascades de réaction.

Les parties finales de ces deux chapitres illustrent une application des méthodologies développées par l'étude :

- d'une enzyme cellobiohydrolase II (CBH II) utilisée lors de la dégradation de biomasse, pour la production de bio-fuel,
- de la capacité d'une molécule de synthèse à être phosphorylée, condition nécessaire pour que cette molécule soit étiquetée comme potentiellement anti-infectieuse ou anti-tumorale.

Le développement du suivi d'une étape de conversion, par utilisation d'une hydrolase de polysaccharides, a nécessité l'étude puis la mise en place d'un couplage TLC-MALDI TOFMS.

La validation de méthode réalisée selon le texte d'harmonisation des méthodes de validation ICH Q2(R1) sur les trois saccharides standards saccharose, glucose et fructose, a permis la mise en évidence directe de l'activité de l'enzyme invertase par TLC-UV. Cette étude a mis en lumière tout le potentiel de la technique TLC dans ce domaine en termes :

- de rapidité : dix points de Michaelis-Menten réalisés en une seule analyse (inférieure à 20 minutes),
- de précision : les détections directes et spécifiques des produits libérés permettent une quantification plus fiable que le test colorimétrique indirect,
- d'informations sur les produits obtenus suite à l'activité de l'enzyme invertase.

Suite à cette étude de caractérisation, une étape de conversion d'hydrolyse de polysaccharides au sein de matrices complexes (extraits de plantes) a été entreprise par couplage TLC-MALDI TOFMS. Malgré les nombreux défis de cette étude tels que le fort effet matrice ainsi que la séparation et la détection d'isomères de faibles masses moléculaires, il a été possible d'identifier différents substrats (raffinose et saccharose) et produits (glucose, fructose mélibiose) parmi trois extraits de plantes (la réglisse, LV 1784 et le mangoustan). Cette étude s'est révélée prometteuse de par la combinaison des avantages de la TLC (lecture visuelle directe, dimension séparative, approche quantitative, dérivation spécifique à la famille moléculaire recherchée et possibilité d'analyses simultanées) et ceux de l'analyse par MALDI TOFMS (matrice MALDI optimisée notamment en terme de « cyt off » sur les basses masses, identification rapide des composés, résolution spatiale (de l'ordre du µm). Cette méthodologie TLC-MALDI TOFMS apparaît de grand intérêt pour des études tant qualitatives que quantitatives sur l'activité enzymatique d'autres enzymes de la famille des glycosides hydrolases impliquées dans l'hydrolyse de polysaccharides d'intérêt.

En vue d'évaluer le potentiel et les limites de notre approche d'étude enzymatique par TLC-MALDI TOFMS, nous avons mené une étude simultanée d'interactions enzymes-substrats et enzymes-inhibiteurs. Cette approche a été réalisée par combinaison d'un panel de méthodologies ; à savoir les approches Ion Fading et Ion Hunting, basées sur l'immobilisation de l'enzyme d'intérêt, et le couplage TLC-MALDI TOFMS. La méthodologie résultante, nommée dans le cadre de cette thèse la TLC-ENALDI est appliquée au suivi d'activité de la cellobiohydrolase II immobilisée, a permis de montrer en une seule analyse le caractère inhibiteur du D-cellobiose et substrat du maltohexaose.

Notre deuxième grande étude a porté sur le suivi de cascades de phosphorylations de nucléotide monophosphate, qui a eu pour finalité de conduire à la forme active triphosphatée du nucléotide. Cette étude a été menée dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules antivirales. Les efficacités des enzymes humaines Thymidine Kinase (hTK1), Thymidylate Monophosphate Kinase (hTMPK) et Nucléoside Diphosphate Kinase (hNDPK) sous leur forme libre et immobilisée ont été réalisées par la méthodologie FIA-HRMS. Pour chacune des trois enzymes, la réaction est significativement améliorée avec une augmentation de la concentration en ATP. A la suite du contrôle de l'efficacité des enzymes immobilisées, la cascade enzymatique a été évaluée par les méthodes « off-line » par FIA-HRMS et « on-line » par FAC-HRMS, utilisant le concept des enzymes immobilisées. L'approche « off-line » a montré le potentiel des enzymes immobilisées pour les suivis de deux, voire de trois étapes de phosphorylation successives. L'étude cinétique des lots de kinases immobilisées a révélé une

activité moindre des deux enzymes immobilisées hTMPK et hNDPK en comparaison de leur forme libre. En outre, l'étude de la cascade de phosphorylation off-line par FIA-HRMS a montré l'intérêt de l'utilisation d'enzymes immobilisées pour le suivi de plusieurs phosphorylations successives.

Une méthodologie rapide, efficace et sensible basée sur des essais enzymatiques « on-line » par FAC-HRMS pour le suivi direct des deux étapes de phosphorylations catalysées par les kinases humaines Thymidylate Kinase (hTMPK) et Nucléoside Diphosphate Kinase (hNDPK) a été développée. Pour ce faire, les enzymes hTMPK et hNDPK ont été immobilisées sur billes de silice avant d'être compactées dans deux micro-bioréacteurs. Préalablement à la mise en place de cette étude de cascade de phosphorylation par FAC-HRMS, la faisabilité de la méthode a été vérifiée grâce à l'étude de l'activité (efficacité, répétabilité et stabilité) de chaque bioréacteur pris individuellement. Nous nous sommes par la suite intéressés à l'étude de la cascade on-line. Avec une détection du produit final après 10 minutes d'infusion et une estimation de 55% de conversion de dTMP en dTTP, cette cascade de phosphorylation on-line a été considérée comme assez rapide et efficace.

Suite à ce développement, réalisé avec la molécule endogène dTMP comme preuve de concept, l'étude d'application a été effectuée dans le cadre d'une étude de spécificité d'activité de nucléotides phosphonates acycliques, vis-à-vis d'une souche enzymatique humaine (h) et une souche virale (vv) de la thymidylate kinase (TMPK). Les résultats de spécificité d'activité des deux phosphonates acycliques au regard de la souche humaine sont en adéquations avec les tests biologiques.

A la suite de ces développements, certaines améliorations sont certainement à apporter à notre système d'étude. Il serait particulièrement intéressant de se focaliser sur l'étape d'immobilisation d'enzyme pour déterminer le taux de fixation et l'orientation spatiale de l'enzyme sur le support solide d'immobilisation, et pour améliorer l'activité de celle-ci et augmenter le taux de réaction. Aussi, afin d'optimiser la conversion du nucléoside en nucléotide monophosphate par l'enzyme hTK1, une étude par modélisation moléculaire des interactions entre l'enzyme et le support fonctionnalisé pourrait apporter de précieuses informations, et ainsi nous orienter vers d'autres voies d'immobilisations sur des supports différents.

Par ailleurs, bien que ces études présentent des limites, telles qu'un taux d'ionisation des nucléotides fluctuant selon leur structure chimique et l'impossibilité de différencier des isomères, elles ouvrent de nombreuses perspectives. Ainsi, en vue de pallier à la limite due à l'isomérie, il serait intéressant de développer un système à deux dimensions, constitué pour la première du bioréacteur « enzymatique » couplé à une cartouche de pré-concentration des nucléotides et pour la deuxième d'une colonne de séparation. Il serait également intéressant d'appliquer ces preuves de concept à l'analyse d'un plus large panel d'échantillons (nucléotides ou nucléosides) afin, d'une part, de valider notre méthodologie en tant que méthode de criblage de plus grande capacité, et, d'autre part, d'être en mesure de fixer un

seuil de confiance d'ionisation, permettant de conclure quant à la phosphorylation ou non d'un nucléotide.

Par la suite, l'ouverture des champs d'investigation par études qualitatives et quantitatives basées sur les interactions enzymes-substrats et enzymes-inhibiteurs serait un apport significatif à notre étude. Ces études complémentaires permettraient :

- d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes de dégradation de substrat particulier,
- de rechercher une famille particulière d'enzyme qui conduirait de façon spécifique à une dégradation d'un substrat d'intérêt,
- de comprendre les voies de biosynthèses ou les mécanismes d'actions dans des domaines aussi variés que l'agroalimentaire, la thérapeutique, la cosmétique, l'environnement.

Nous pourrions envisager de faire un système non pas avec les bioréacteurs en série, comme dans notre étude, mais en parallèle et en augmenter le nombre. La fixation non pas d'une mais de deux voire trois enzymes sur un même support sphérique, tout en s'assurant que leur activité catalytique reste intacte, apporterait une nouvelle dimension de criblage.

Finalement, il pourrait être considéré d'ouvrir la méthodologie FAC, particulièrement développée dans la littérature pour l'étude d'interactions enzymes-inhibiteurs, à l'étude d'inhibition de l'ARN polymérase par les molécules de synthèse. Ainsi, la valorisation de cette méthodologie sera multiple en termes d'étude de cascades de phosphorylations, de spécificité de réaction et d'inhibition de la réplication de l'ARN viral.

◇◇◇

Annexes

Séparation et quantification par TLC-UV - partie expérimentale

Afin de développer le couplage TLC-MALDI-TOFMS pour l'étude de molécules bioactives au sein d'extraits de plantes, le premier objectif a été de développer et de valider une méthode TLC rapide, fiable, robuste et spécifique pour la séparation et la quantification des sucres d'intérêts (à savoir glucose, fructose et saccharose). L'ensemble des recherches effectuées dans la littérature a pu mettre en évidence l'aspect hétérogène des protocoles proposés pour la séparation et la quantification de sucres, en termes de phase stationnaire, de phase mobile, de nombres d'élutions, de dérivation… La première étape a été de déterminer les paramètres adaptés au contexte de notre étude à savoir une séparation et quantification répétable, robuste et rapide, une séparation efficace des produits de réaction et de faibles limites de détection et de quantification. Plusieurs paramètres ont alors été étudiés : pré-traitement de plaque, nature de la phase mobile, nombre de migrations, nature de l'agent de dérivation et influence du temps de dérivation.

La méthode décrite dans cette partie est une nouvelle méthode analytique basée sur des méthodes déjà existantes pour la séparation et la quantification du saccharose, glucose et fructose par TLC. Cette méthodologie ne requiert aucun instrument de haute technologie ce qui en fait une méthode facilement transposable dans tout laboratoire voulant répondre à une problématique biologique.

Pré-traitement du support

Les plaques de gel de silice 60 ont été choisies pour cette étude grâce à leurs utilisations larges et variées dans le domaine de séparation des sucres. Afin d'obtenir la séparation des deux isomères glucose et fructose, un pré-traitement de plaque par des tampons d'imprégnation a été nécessaire. Cette étape a pour objectif d'augmenter la polarité de la surface de la phase stationnaire afin d'améliorer la rétention et donc la séparation des composés. Pour cela, la plaque a été imprégnée dans un mélange de tampons contenant du bisulphate de sodium et du citrate de sodium, d'après les études menées par Fell et al. en 1990. L'étape d'imprégnation a été testée par spray et par immersion des tampons sur la plaque. Après révélation des trois mélanges de saccharose, glucose et fructose à 1,5 mM, le mode spray s'est révélé plus aléatoire avec une pellicule formée à surface de la plaque plus hétérogène que par immersion, entrainant des irrégularités d'élution et donc une faible répétabilité d'analyse comme montré sur la figure A1.

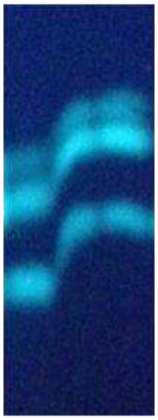


Figure - A1 - Influence du mode de dépôt du tampon d'imprégnation (bisulphate de sodium, citrate) ; spray du tampon. Saccharose, glucose et fructose déposés à 1,5 mM (n = 3) après élutions (ACN/H2O 80/20 (v/v) et dérivation à l'acide 4-aminobenzoïque, visible sous 366 nm.

Phase mobile et migration

De nombreuses phases mobiles sont décrites dans la littérature pour la séparation de sucres par TLC. La phase mobile décrite par G. E. Morlock et al. qui consiste en un mélange de butanol/i-propanol)acide acétique/acide borique (6 : 14 : 1 : 3 v/v/v/v) a été testée en HPTLC sans apporter de séparation satisfaisante du glucose et du fructose avec un temps d'élution conséquent de 2h20. Une bonne séparation ainsi qu'un temps d'élution acceptable (10 minutes) a été obtenu avec une phase mobile constituée d'ACN/H2O 80/20 (v/v). Bien que trois étapes de migration soient préconisées dans la littérature, le nombre de migrations (1, 2 et 3) a été testé pour obtenir la séparation du glucose et du fructose la plus efficace tout en conservant un temps d'analyse raisonnable. Comme montré sur la figure A2, une élution n'est pas suffisante pour visualiser une séparation des deux isomères. De meilleures séparations ont été obtenues avec deux et trois élutions. Cependant, la troisième élution s'est révélée plus aléatoire avec des diffusions de zones importantes ce qui a impacté les répétabilités d'analyses. Le nombre de migrations a donc été fixé à deux afin de trouver un compromis entre séparation et répétabilité.

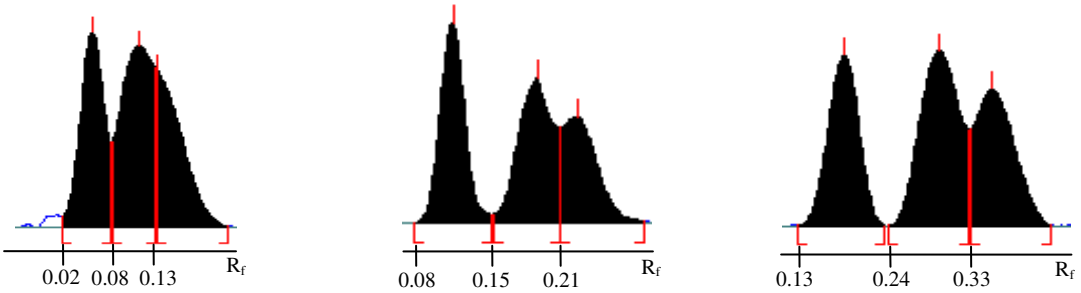


Figure - A2 - Profils densitométriques avec valeurs des facteurs de retardements du saccharose, glucose et fructose après 1 élution (a), 2 élutions (b) et 3 élutions (c), phase mobile ACN/H_2O 80/20 (v/v). Temps moyen d'une élution : 10 min.

Il est important de noter, qu'après chaque développement, la plaque est séchée 1 minute à l'aide d'un sèche-cheveux et la phase mobile est remplacée par une solution fraiche. Un séchage incomplet ainsi que l'utilisation d'une vieille phase mobile peut provoquer des diffusions de zones ainsi qu'une migration variable du front de solvant.

Agent de dérivation

De par l'absence d'un groupement chromophore, les sucres n'absorbent pas en UV. Afin de les rendre détectable au densitomètre, il est nécessaire de réaliser une étape de dérivation. Cette étape consiste, par réaction chimique, à ajouter un groupement chromophore sur le sucre afin de le rendre détectable par détection UV. Dans le contexte de notre étude, l'agent de dérivation doit montrer la meilleure répétabilité, stabilité et sensibilité possible. Trois agents de dérivation les plus décrits dans la littérature ont été testés, à savoir l'acide sulfurique 5%, le p-anisidine et l'acide 4-aminobenzoïque. L'acide sulfurique a montré de faibles répétabilités avec un coefficient de variation inter-analyse sur l'aire des pics de 26%. L'agent p-anisidine, avec un coefficient de variation de 15%, n'a également pas été retenu. L'acide 4-aminobenzoïque a été choisi pour sa bonne répétabilité de dérivation (CV 6,3%).

L'influence du mode de dépôt de l'agent dérivant ainsi que du temps de dérivation ont été étudiés. La figure III 6 montre l'influence du dépôt par spray et par immersion de la solution d'acide 4-aminobenzoïque. La méthode spray montre une large diffusion de zones, entraînant de faibles répétabilités d'analyses. Le mode par immersion permet une dérivation plus homogène.

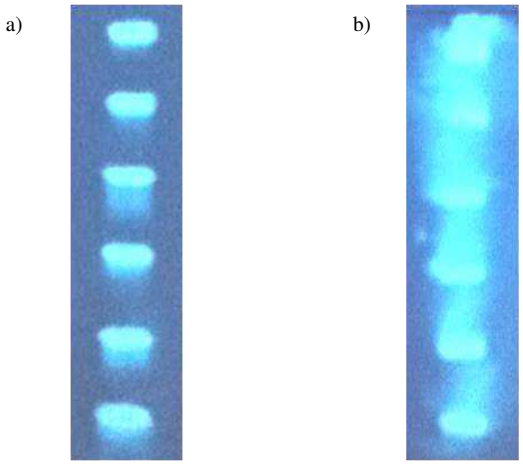


Figure – A3 - Influence du mode de dérivation. 6 dépôts de saccharose à 1,5 mM après révélation à l'acide 4-aminobenzoïque sous 366 nm par (a) immersion et (b) spray

Le temps d'immersion dans la solution dérivante ainsi que le temps de dérivation à l'étuve ont été évalués. Sur la figure A3 sont montrées les aires du pic de saccharose à une concentration de 1,5 mM pour différents temps d'immersion : 0, 2 et 4 secondes. Nous pouvons constater que l'aire des pics est liée au temps d'immersion de la plaque lors de la dérivation avec une aire décroissante avec le temps d'immersion. Cette observation peut être liée à la diffusion voire la perte de produit en solution. Ainsi, une immersion de 0 s (correspondant à un aller-retour) a été conclue comme étant optimale.

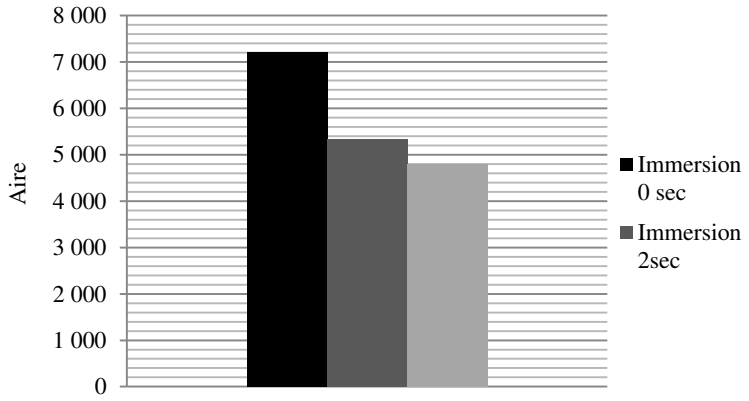


Figure –A4 - Influence du temps d'immersion pour la dérivation : aire des pics de saccharose à 1,5 mM pour trois temps d'immersion (0 s, 2 s et 4 s).

Après immersion dans la solution d'agent de dérivation, la plaque est chauffée à l'étude. Cette étape de chauffage accélère la réaction de dérivation qui permet l'addition d'un groupement chromophore sur les sucres d'intérêts. Cette addition est une réaction de base de Schiff durant laquelle le groupement amine de l'acide 4-aminobenzoïque attaque le groupement aldéhyde du sucre par addition nucléophile selon la réaction présentée en figure A5.

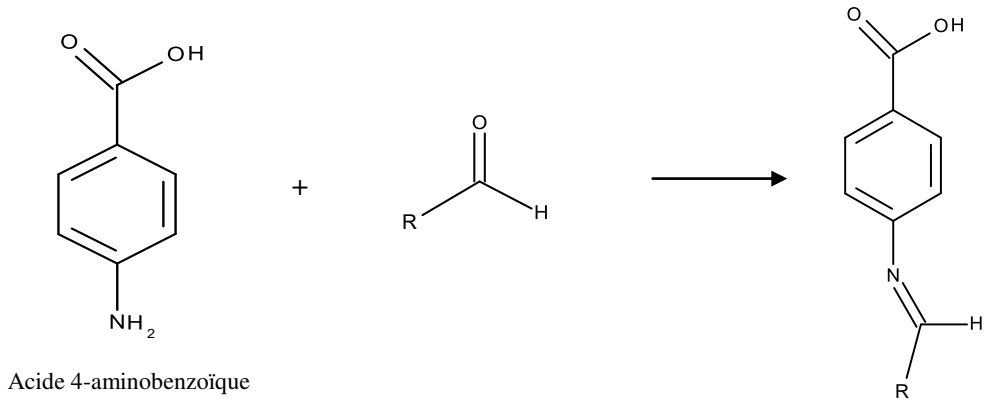


Figure – A5 - Schéma général de la réaction de base de schiff réalisée lors de la dérivation des sucres avec l'acide 4-aminobenzoïque.

Le temps de dérivation optimal par chauffage à 130°C décrit dans la littérature est de 15 min. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a communiqué sur l'influence du temps de dérivation. Afin d'appréhender au mieux notre analyse quantitative nous avons donc étudié l'influence de l'aire des pics du saccharose, glucose et fructose à différents temps de dérivation (5, 10, 15, 30 et 60 minutes). La figure A6 permet de constater que le temps optimal de dérivation est, comme décrit dans la littérature, de 15 minutes mais qu'un temps plus faible ou plus long entraine une diminution de l'aire des différents pics.

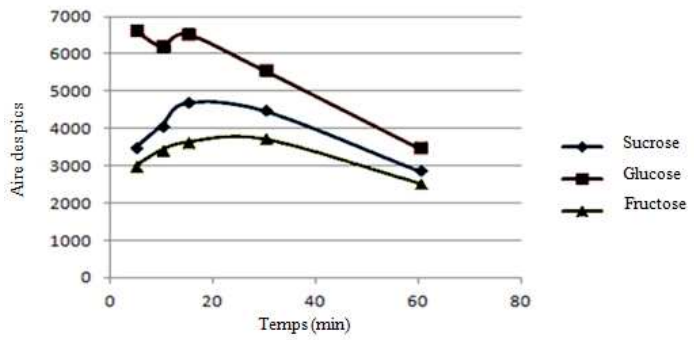


Figure – A6 - Influence du temps de chauffage lors de la dérivation (étuve, 130 °C), évolution de l'aire des pics d'un mélange de saccharose, glucose et fructose (1,5 mM) pour 5 temps de chauffage (5, 10, 15, 30 et 60 min).

Dans le cadre de l'analyse quantitative de sucres, il est donc indispensable de contrôler le temps de dérivation aux risques d'obtenir de faibles répétabilités.

Des conditions optimales (pré-traitement de la plaque, nombre d'élution, dérivation) ont été définies pour la séparation et la détection des sucres impliqués dans la réaction de l'invertase. Afin de mener à bien l'approche différentielle décrite dans le paragraphe introductif, la méthode de séparation et de quantification du saccharose, glucose et fructose a été validée à la fois dans des milieux simples (aqueux) et des milieux complexes (extrait de plante). Cette méthode a été validée en terme de spécificité, de limites de quantification et de détection, précision, robustesse selon le texte d'harmonisation des méthodes de validations ICH Q2(R1).

Journal of Chromatography A, 1477 (2016) 108–113

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Validation of a thin-layer chromatography/densitometry method for the characterization of invertase activity

Justine Ferey*, David Da Silva, Sophie Bravo-Veyrat, Pierre Lafite, Richard Daniellou, Benoît Maunit

Univ. Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, F-45067 Orléans, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 May 2016
Received in revised form
18 November 2016
Accepted 24 November 2016
Available online 25 November 2016

Keywords:
Thin-layer chromatography
Invertase
Michaelis-Menten
Carbohydrates

ABSTRACT

This paper presents a kinetic study of invertase, a specific fructofuranosidase cloned from the *Leishmania major* genome. The kinetic parameters of the β-D-fructofuranosidase from *Leishmania major* (BfrA) were determined using Thin-Layer Chromatography (TLC) and UV-densitometry (TLC@UV) specifically developed for the separation and detection of three carbohydrates namely sucrose, glucose and fructose. Separation was performed on TLC silica gel 60 F254 plates impregnated with sodium bisulphate and citrate and heated prior to development. This fast and easy separation was performed with two successive developments using ACN/H_2O 80/20 (v/v) as mobile phase. Sensitive and repeatable derivatization of sugars was achieved by dipping the plates in a solution of 4-aminobenzoic acid. Quantification was performed by UV-detection. The method was validated according to ICH guidelines Q2(R1) in terms of specificity, limits of detection and quantification, precision and robustness (with n = 3 replicates and CV ≤10%). The characterization of BfrA reaction kinetic was performed by monitoring the accumulation of either glucose or fructose detected by TLC@UV. Hydrolysis of sucrose was described by the Michaelis-Menten kinetic parameters (K_M; V_{max}) respectively equal to 63.09 ± 7.590 mM; 0.037 ± 0.00094 mM/min using glucose production and 83.01 ± 14.39 mM; 0.031 ± 0.0021 mM/min monitoring fructose. Hydrolyses of three alternative substrates, raffinose, stachyose and inulin, were also compared and the regiospecificity of the reaction was characterized. This TLC@UV method is shown to be suitable for the refined kinetic analysis of different reactions related to the hydrolysis of sugars.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

1.1. Background

Invertase, a specific β-D-fructofuranosidase, is a glycoside hydrolase that catalyzes the hydrolysis of the terminal non-reducing β-fructofuranoside residues in sucrose, producing an equimolar mixture of glucose and fructose. This enzyme is widely found among microorganisms and in plants where its role is essential for cell differentiation and for sucrose regulation [1]. In plants, sugars are transported as disaccharides (such as sucrose) from photosynthetic cells to other parts of the plant before being hydrolyzed by invertase into glucose and fructose. Invertase is also one of the most commercially available enzymes because of its numerous uses [2,3] in food processing [4] or ethanol production [5], and in the pharmaceutical industry (blood glucose quantification in diabetes [6]). Although invertases have been historically characterized in enzymology [7–9], improvements in the analytical methods to establish the kinetic parameters (V_{max}, K_M) remain relevant and attractive. Indeed, the model BfrA invertase from *Leishmania major* that is used in this study has been identified recently as a potential therapeutic target to fight leishmaniasis [10].

Usually, the Michaelis-Menten experiment related to invertase is carried out by absorbance detection after the classical 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent test, which is the one most commonly used for the rapid detection and quantification of reducing sugars [11–15]. However, in addition to requiring a large amount of enzyme, neither identification nor quantification of the individual sugar molecules can be performed with the reduction method. Moreover, when comparing invertase activity on polysaccharides with higher degrees of polymerization, DNS reagent can be oxidized by both the monosaccharide and the polysaccharide produced during hydrolysis [16]. In this case, it is essential to set up a fast, reliable, robust and repeatable method for the quantification and the determination of the nature of the sugar for an invertase

* Corresponding author.
E-mail address: justine.ferey@etu.univ-orleans.fr (J. Ferey).

http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.049
0021-9673/© 2016 Published by Elsevier B.V.

kinetics study. This analytical method should be biologically compatible and easily transposable for typical biological tests.

1.2. Quantitative analysis of sugars

Various approaches are used for the quantification of carbohydrates such as HPLC–MS, HPLC-RI, HPLC-ELSD [17–22] GC [23,24], or more recently ^{1}H NMR or FTIR [25–28]. However, in the present study, these techniques were not suitable because of the range of substrate concentrations, which can result in sugar separation failure and a possible enzyme precipitation in the column, especially for chromatographic techniques. TLC, which has been widely developed in the field of sugar separation and quantification, avoids these major drawbacks [29–31]. In 2011, Morlock et al. performed the separation of seven sugars present in food matrices (yogurt, milk, chocolate, praline and butter biscuits) on a pre-treated HPTLC silica plate [32]. This technique, which could complete the analytical panel (chromatographic separations, spectrophotometric techniques, etc.), should become a method of choice for the kinetic study of invertase due to its various advantages: low amount of compound, easy operation, low cost and solvent savings. TLC enables simultaneous analyses, as do classical tests, but with a selective approach due to its separative dimension. Moreover, this technique is compatible with a biological environment with contaminant elution (enzymes) in a non-exploited plate area and the possibility to analyze high substrate concentrations.

In order to develop an invertase kinetic assay and substrate affinity classification, the first objective of our study was to set up and validate a TLC method for the separation and quantification of the sugars of interest (sucrose, glucose and fructose). In view of the heterogeneity of the protocols found in the literature for sugar separation and quantification (plate support, mobile phase, number of elutions, derivatization, etc.), it was first necessary to determine the appropriate parameters for our study in order to obtain reliable results, efficient product separations and low limits of detection and quantification. The method was therefore validated by specificity, detection and quantification limits, precision and robustness. It is important to note that this methodology does not require any high technology TLC instruments and is therefore transposable to any laboratory to address biological issues. This TLC method was then applied to perform kinetic studies on a model invertase enzyme named BfrA [10] by analysis of the Michaelis-Menten curve and substrate activity classification.

2. Materials and methods

2.1. Materials

BfrA invertase was produced and purified as previously described [10]. Acetonitrile, acetone, and glacial acetic acid were of analytical grade and were purchased from VWR. Phosphoric acid and sodium hydroxide were from Fisher Chemical. Sucrose, glucose, fructose, stachyose and raffinose came from Merck and inulin standard was purchased from Carbosynth (UK). 4-aminobenzoic acid, ammonium formate, citric acid monohydrate, DNS, potassium sodium tartrate and trisodium citrate dihydrate were purchased from Sigma-Aldrich. The DNS reagent solution was prepared as described previously [10]. The de-ionized water used in all procedures was purified with a Milli-Q water system.

2.2. Methods

2.2.1. Thin-Layer chromatography instrumentation

Quantitative analysis was carried out using TLC silica gel60 F_{254} 20 × 20 cm aluminum plates (from Merck), with fluorescent indicator F_{254} (layer thickness 200 μm). The spotting device was a CAMAG Linomat IV Automatic Sample Spotter (Camag Muttenz, Switzerland); the syringe, 100 μL (from Hamilton); the developing chamber was a DESAGA HEIDELBERG glass chamber (20 × 20 cm); the densitometer consisted of a CAMAG TLC Scanner 3 linked to winCATS v 3.0 software.

2.2.2. Thin-Layer chromatography method

The plates were pre-washed with methanol (VWR chemicals, HPLC grade) to obtain a stable baseline for the UV detection. Then, the plates were impregnated by rapid immersion (0s, with TLC Dip-Fix 200) in a mixture of 0.1 M sodium bisulphite and 0.01 M citrate buffer and then placed in a drying oven at 100 °C for one hour. To prepare the impregnation solution, the procedure developed by Ghebregzabher et al. and Fell was used [33,34]. 1 μL of each solution was deposited with the CAMAG Linomat IV Automatic Sample Spotter as bands of 5 mm in length at a constant application rate of 4 s/μL, keeping 5 mm space between each band with an x,y-axis position of 10 mm. Plates were then developed twice in the same direction in the elution chamber without pre-conditioning the chamber with the mobile phase. Spots were eluted up to 6.5 cm, using ACN/H_2O 80/20 (v/v) as mobile phase. For derivatization, the plates were dipped in a 4-aminobenzoic acid solution with a TLC Dip-Fix 200 (DESAGA) with a vertical speed of 3 cm/s and no immersion time. Then the plates were heated in a drying oven at 130 °C for 15 min [34]. Quantitative measurements were made by absorbance scanning at a wavelength of 390 nm using a slit length of 6 mm and a slit width of 0.45 mm. Scanning speed and data resolution were 100 μm/step and 10 mm/s, respectively. The measurement type was remission. Integrator parameters were a peak threshold minimum slope value of 5, and a peak threshold minimum area value of 50. All scans were made in the chromatographic development direction and peak areas were used to quantify. Integration was performed with the software winCATS v. 3.0.

2.2.3. Calibration curve

Calibration solutions were prepared in ammonium formate buffer (50 mM, pH = 6.4). For the calibration range, seven solutions of glucose (69 μmol/L, 139 μmol/L, 277 μmol/L, 693 μmol/L, 1.39 mmol/L, 2.77 mmol/L, 5.54 mmol/L) and six solutions of fructose (146 μmol/L, 293 μmol/L, 732 μmol/L, 1.46 mmol/L, 2.93 mmol/L, 5.86 mmol/L) were prepared. Solution depositions, elutions, derivatization and scanning were performed as described in Section 2.2.2.

2.2.4. Enzymatic assay – linearity

A kinetic study was performed in replicate (n = 4) with a constant BfrA invertase final concentration of 0.01 g/L (0.156 μmol/L) diluted in ammonium formate (pH = 6.4, 50 mM) and with a sucrose final concentration of 5 mM. The enzymatic reaction was set up in 0.25 mL thin-wall microtubes containing 60 μL of BfrA and 60 μL of sucrose. The microtubes were placed at different times (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min) in a heating block at a constant temperature of 22 °C. After the corresponding incubation times, tubes were heated at 95 °C for 5 min for enzyme denaturation and were cooled down to 4 °C. Each solution was diluted (v/v) with a mixture of ACN/H_2O 50/50 (v/v). Solution depositions, elutions, derivatization and scanning were performed as described in Section 2.2.2.

2.2.5. Enzymatic assay – kinetic parameters determination

Ten substrate solutions of sucrose (10, 15, 30, 40, 60, 100, 300, 600, 800 and 1000 mM) were prepared in ammonium formate buffer. The enzymatic reaction was performed off-line, by placing 60 μL of BfrA at 0.02 g/L (0.312 μmol/L) and 60 μL of each sucrose solution in thin-wall microtubes. The microtubes were placed in a heating block at a constant temperature of 22 °C. After 20 min the enzyme was denatured as described in Section 2.2.4. Each solution

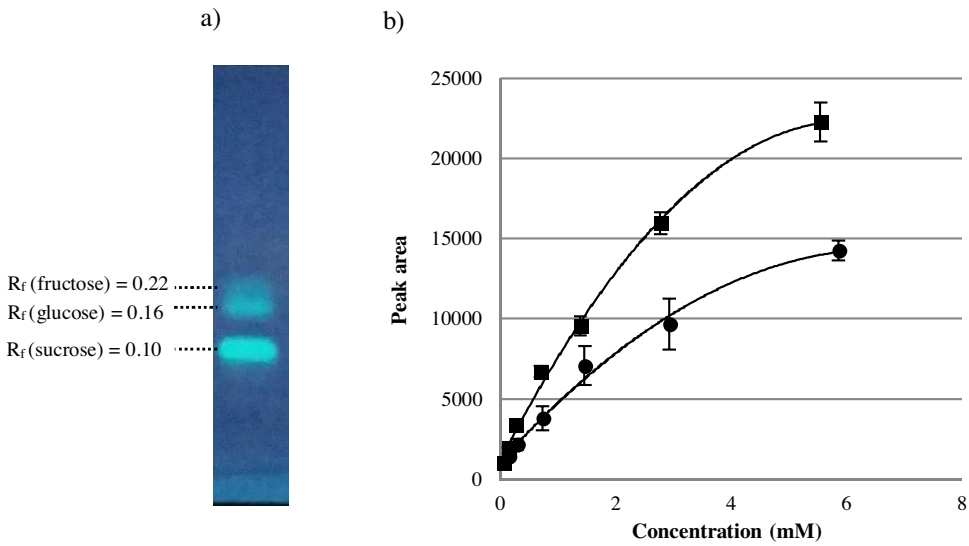


Fig. 1. (a) TLC-record of standards and (b) calibration curve of glucose (black squares, $y = -552.14 \times^2 + 6823.1x + 1297.5$, $R^2 = 0.9945$) and fructose (black circles, $y = -300.54 \times^2 + 3999.2x + 1069.4$, $R^2 = 0.9922$) (n = 6) by TLC@UV.

was diluted (v/v) with a mixture of ACN/H_2O 50/50 (v/v) containing α-L-rhamnose as internal standard. The TLC approach was performed as described in 2.2.2.

For the tests of linearity and determination of kinetic parameters, samples were also used to perform classical quantification by the DNS method [10,16].

2.2.6. Enzymatic assay – alternative substrate hydrolysis

Solutions of sucrose, raffinose and stachyose were prepared at 50 mM and inulin at 5 g/L in ammonium formate. The enzymatic assay was performed as described in Section 2.2.5, with an incubation time of 5 min. The TLC approach was performed as described in Section 2.2.2.

3. Results and discussion

Suitable parameters (plate pre-treatment, elutions, derivatization) were determined to obtain repeatable and robust results, efficient product separations and low limits of detection and quantification (see details of the results in the Supplementary data). The method was validated by specificity, detection and quantification limits, precision and robustness according to ICH guidelines Q2(R1) and according to the guidelines described by Pyka et al. [35]. This TLC method appeared to be highly suitable to perform an invertase kinetic study with a high robustness, specificity, repeatability (CV ≤10%), and low quantification and detection limits (LOD ≤20 ng/spot and LOQ ≤60 ng/spot), making it possible to study a large range of concentrations. Although the glucose and fructose separation was not optimal, it was still sufficient to continue with the kinetic assays.

The calibration curves of fructose and glucose ranging up to 5.86 mM and 5.55 mM, shown in Fig. 1(b), exhibit polynomial trends due to the high amounts of spotted standards, with good coefficients of determination ($R^2 > 0.99$), and a low standard deviation (n = 6), which confirmed the repeatability of the method. BrfA activity rate was found to be linear up to 120 min using either TLC (Fig. 2) or DNS assay (Fig. S8). For the following experiments, an incubation time of 20 min was chosen to calculate the initial velocity, which was a compromise between the product limit of detection in the DNS assay and acceptable spatial resolution between glucose and fructose in TLC@UV.

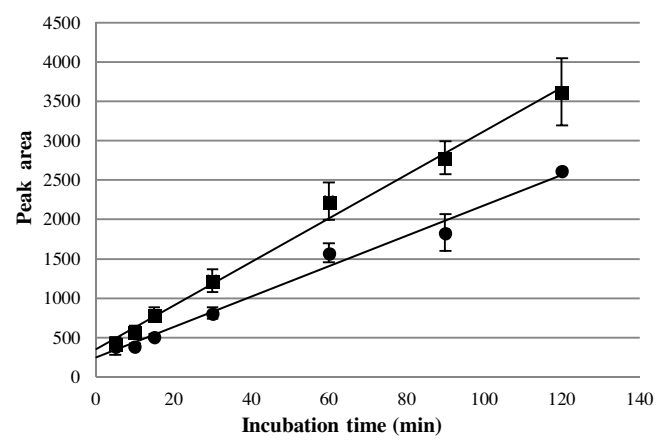


Fig. 2. Time course production of glucose (black squares, $y = 27.66x + 359.33$, $R^2 = 0.993$) and fructose (black circles, $y = 19.337x + 251.93$, $R^2 = 0.9867$) detected by TLC@UV upon sucrose hydrolysis catalyzed by BfrA. Data are represented as mean and standard deviation of 4 independent experiments.

Kinetic assays of sucrose hydrolysis by BfrA were then performed in replicate (n = 5) with ten concentrations of sucrose (see Section 2.2.4). After the enzymatic reaction, solutions were spotted on TLC plates (Fig. 3). Intense spots were obtained with a concentration of sucrose above 150 mM (lanes L_7, L_8, L_9 and L_{10}) with diffusion to the bottom of the plate. However, this diffusion did not affect the densitometric integration of glucose and fructose. The deposition repeatability was confirmed by the constant area of the internal standard (rhamnose). Therefore, the glucose and fructose areas are representative of the enzymatic reaction. Fig. 4(a) shows the Michaelis-Menten plot obtained by monitoring either glucose or fructose production. The average kinetic parameters found for fructose and glucose are summarized in Fig. 4(b). As invertase hydrolyzes sucrose into an equimolar mixture of glucose and fructose, similar kinetic parameters V_{max} and K_M for both should be expected. The K_M constants determined using glucose ($K_M{}^{Glc}$) and fructose ($K_M{}^{Fru}$) were found to be similar with $K_M{}^{Glc} = 63.09 \pm 7.590$ mM and $K_M{}^{Fru} = 83.01 \pm 14.39$ mM. The maximum reaction velocities, V_{max} were also found to be similar with $V_{max}{}^{Glc} = 0.037 \pm 0.00094$ mM/min and $V_{max}{}^{Fru} = 0.031 \pm 0.0021$ mM/min. These maximum velocities gave

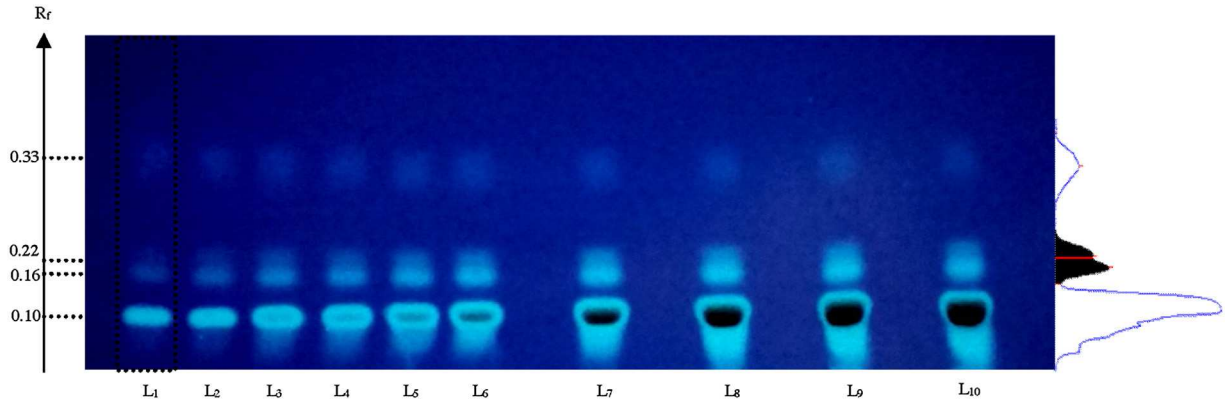
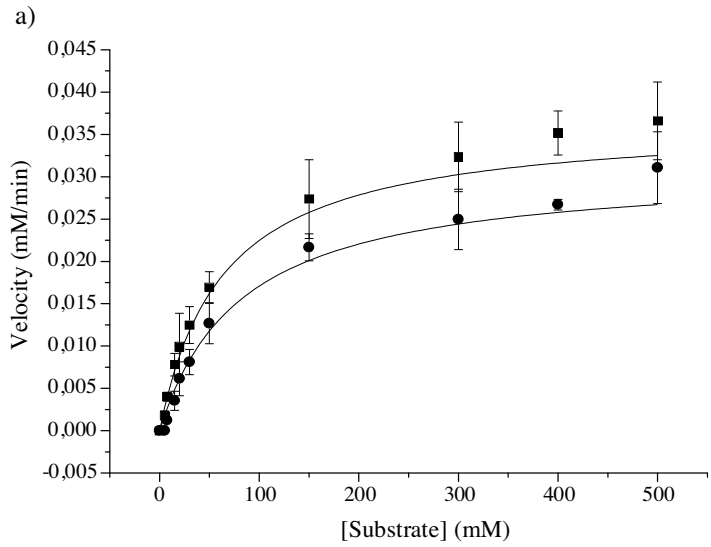


Fig. 3. TLC chromatoplate and densitogram profile of Michaelis-Menten experiment of BfrA-catalyzed sucrose hydrolysis after derivatization, under 366 nm with detection of sucrose (Rf = 0.10), glucose (Rf = 0.16), fructose (Rf = 0.22) and rhamnose as internal standard (Rf = 0.33). Reaction stopped after 20 min of reaction. L1-L10 solutions of enzymatic reaction with sucrose concentrations 5, 7.5, 15, 20, 30, 50, 150, 300, 400 and 500 mM.



b)

Products	K_M (mM)	V_{max} (mM/min)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M s^{-1}. mM^{-1}
Glucose	63.09 ± 7.590	0.037 ± 0.00094	3.91	106.83
Fructose	83.01 ± 14.39	0.031 ± 0.0021	3.30	106.45

Fig. 4. (a) Michaelis-Menten plot of glucose (black squares) and fructose (black circles) production upon sucrose hydrolysis by BfrA. Each value is represented as Mean and Standard deviation over 5 independent experiments. (b) Kinetic parameters of sucrose hydrolysis by BfrA obtained for glucose or fructose detection by TLC@UV. Each value is the mean ± SD for 5 independent experiments. Curve obtained by OriginPro 8, fitted by the Hill equation, power coefficient "n" = 1.

similar catalytic turnovers of $k_{cat}^{Glc} = 3.91\ s^{-1}$ and $k_{cat}^{Fru} = 3.30\ s^{-1}$. Insignificant differences between K_M and V_{max} calculated from the glucose accumulation rate and K_M and V_{max} calculated from the fructose accumulation rate were obtained at the 95% probability level for the *t*-test, with 2.12 < 2.48 and 2.01 < 2.48 respectively for K_M and V_{max}. Similar values were obtained in identical BfrA incubation conditions using classical DNS detection (see Supplementary data, Fig. S9). Moreover, these values are close to those previously reported by other analytical techniques for invertases in the literature with K_M for sucrose ranging from 10 to 100 mM [10,36–43]. More precisely, the DNS assay gave a lower precision and did not give a specific value for each monosaccharide formed. We could observe specific monosaccharide accumulation (fructose) in the case of more complex sugar hydrolysis (with a higher polymerization degree) by TLC. In this case, high spatial resolution was obtained between the products of the reaction by thin-layer chromatography separation. This specific linkage-fructose recognized by invertase can be found in many polysaccharides such as raffinose, stachyose and inulin. Raffinose and stachyose are β(1 → 6)-galactosylated derivatives of the glucosyl moiety of sucrose and inulin is a fructan polysaccharide that consists of a chain of fructose molecules linked to a terminal β-D-glucose residue. These sugars are commonly found in many vegetables, such as onion or broccoli. It was previously reported that raffinose and stachyose were substrates of BfrA [10]. However, unlike the DNS detection that was used in this previous work, the TLC@UV methodology developed in our study was used to separate and identify monosaccharides that were produced by BfrA upon hydrolysis.

Fig. 5(a) shows the areas of the monosaccharide released after hydrolysis of these alternative substrates by BfrA, normalized to sucrose. The number of monosaccharide units in the substrates

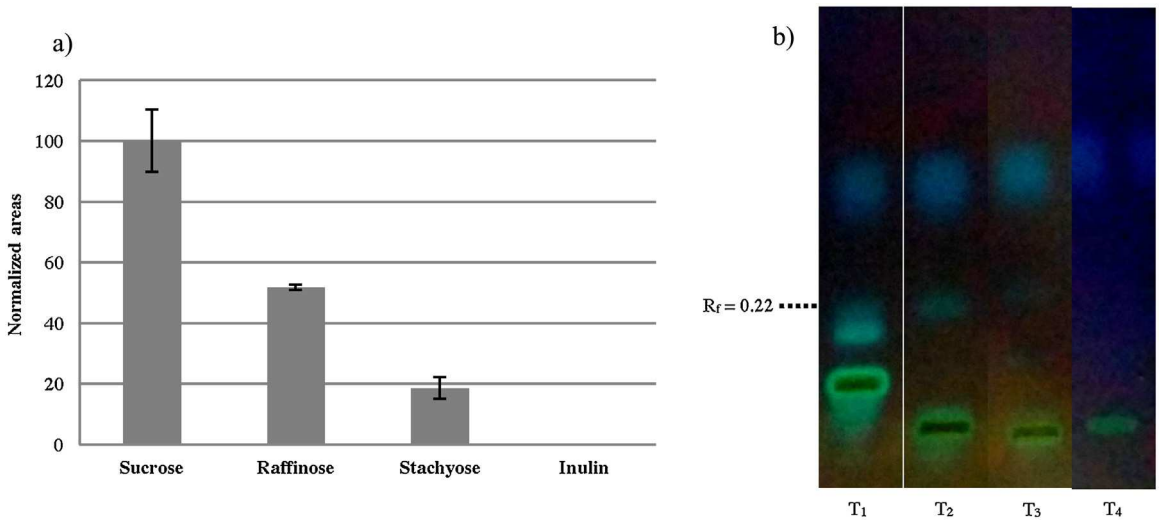


Fig. 5. (a) Substrate specificity of BfrA. Areas are normalized over Sucrose enzymatic activity. Each value is represented as Mean and Standard Deviation over 3 independent experiments. (b) TLC chromatoplates of substrate hydrolysis experiment after derivatization under 366 nm with detection of fructose (Rf = 0.22). Reaction stopped after 5 min. T1-T4: solutions of enzymatic reaction with sucrose (50 mM), raffinose (50 mM), stachyose (50 mM) and inulin (5 g/L).

is related to the enzymatic activity as sucrose (n = 2) exhibits a higher reaction velocity than raffinose (n = 3) and stachyose (n = 4). These results are inconsistent with those found by Belaz et al. [10] where stachyose showed higher activity towards invertase than raffinose and sucrose. DNS, which was used in this study, has a higher reactivity towards di- or trisaccharides than towards monosaccharides [16]. It is therefore not suitable to determine precisely the activity when polysaccharides are produced by the enzyme. Unlike raffinose and stachyose, no activity was observed when using inulin as substrate. As a fructofuranosidase, BfrA can only hydrolyze unbranched fructoside-containing substrates such as sucrose, raffinose or stachyose. Inulin cannot enter and bind the BfrA active site because of the steric hindrance caused by the polyfructoside moiety.

As shown in Fig. 5(b), the follow-up of polysaccharide hydrolysis by TLC@UV also proved the specific activity of the BfrA enzyme, which has not been characterized so far. Indeed, for each substrate studied, the monosaccharide released was easily identified as fructose, indicating that BfrA is a true fructofuranosidase. Therefore, along with the quantification of the products released, the TLC@UV methodology can also provide qualitative information by characterizing the monosaccharide product.

4. Conclusion

The aim of this study was to determine BfrA invertase kinetic parameters through glucose and fructose specific detections due to a simple, low-cost, biologically compatible and easily transposable method. For that purpose, a TLC@UV technique was developed. The repeatability and robustness of this methodology were confirmed by the separation and quantification validation methods based on the ICH guidelines with a 10% criterion value. When applied to the model invertase, the catalytic constants V_{max} and K_M were similar to those obtained with classical colorimetric assays and other techniques such as NMR or FTIR. Moreover, this methodology was extended to the characterization and quantification of di- or trisaccharide products formed after hydrolysis by invertase.

To our knowledge, this work is the first development by TLC with UV detection set up to perform the Michaelis-Menten experiment of a specific β-fructofuranosidase. As opposed to other separative techniques such as HPLC or GC, this TLC method is fully compatible with biological analysis conditions in terms of range of concentrations, speed of analysis and biological compatibility of sample preparation. Compared to colorimetric studies performed in biology, this technique also enables an increase in the specificity and sensitivity with lower enzyme consumption and, therefore, increases the analytical panel.

Thanks to its cost, rapidity, precision, robustness, the great variety of stationary phases and post chromatographic derivatization reagents, the TLC technique can be considered a method of choice for the study of enzymatic activity.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.049.

References

[1] A. Sturm, Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning, Plant Physiol. 121 (1999) 1–7.
[2] H. Nadeem, M.H. Rashid, et al., Microbial invertases: a review on kinetics thermodynamics, physiochemical properties, Process Biochem. 50 (2015) 1202–1210.
[3] S. Kulshrestha, P. Tyagi, et al., Invertase and its applications –a brief review, J. Pharm. Res. 7 (9) (2013) 792–797.
[4] J. Cerning-Beroard, The use of Invertase for determination of sucrose. Application to cereals cereal products and other plant materials, Cereal Chem. 52 (1975) 431–438.
[5] H.H. Sato, Y.K. Park, Invertase as an aid for fermentation of cane molasses into ethanol, Appl. Environ. Microbiol. 44 (4) (1982) 988–989.
[6] J.E. Middleton, W.J. Griffiths, Rapid colorimetric micro-method for estimating glucose in blood and C.S.F using glucose oxidase, Br. Med. J. 2 (1957) 1525–1527.
[7] L. Michaelis, M.L. Menten, Die kinetik der invertinwirkung, Biochemistry 49 (1913) 333–336.
[8] T.K.H. Vu, V.V.M. Le, Biochemical studies on the immobilization of the Enzyme Invertase (EC.3.2.1.26) in Aliginate Gel and its Kinetics, ASEAN Food J. 15 (2008) 73–78.
[9] L. Bowski, R. Saini, D.Y. Ryu, W.R. Vieth, Kinetic Modeling of the Hydrolysis of sucrose by invertase, Biotechnol. Bioeng. 13 (1971) 641–656.
[10] S. Belaz, T. Rattier, et al., Identification, biochemical characterization, and in-vivo expression of the intracellular invertase BfrA from the pathogenic parasite Leishmania major, Carbohydr. Res. 415 (2015) 31–38.
[11] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. 31 (1959) 426–428.
[12] K. Milosky, K. Wallace, A. Fenger, E. Schneider, K. Bendinskas, Comparison of biochemical and chemical digestion methods for carbohydrates, Am. J. Undergrad. Res. 7 (2008) 7–18.

[13] F. Carvalho, P. Paradiso, B. Saramago, A. Maria Ferraria, A. Maria Botelho, P. Fernandes, An integrated approach for the detailed characterization of an immobilized enzyme, J. Mol. Catal. B Enzym. 125 (2016) 64–74.
[14] L. Cang, D.M. Zhou, Q.Y. Wang, D.Y. Wu, Effects of electrokinetic treatment of a heavy metal contaminated soil on soil enzyme activities, J. Hazard. Mater. 172 (2009) 1602–1607.
[15] G. Sheila, J.S. Alves, M.P. Klein, R.C. Rodrigues, P.F. Hertz, High operational stability of invertase from Saccharomyces cerevisiae immobilized on chitosan nanoparticles, Carbohydr. Polym. 92 (2013) 462–468.
[16] D.J. Bell, D.J. Manners, A. Palmer, Observations on the reduction of alkaline 3:5-dinitrosalicylate by certain carbohydrates, J. Chem. Soc. (1952) 3760–3763.
[17] X. Shen, H. Perreault, Characterization of carbohydrates using a combination of derivatization, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry, J. Chrom. A 811 (1998) 47–59.
[18] H. Yu, Y.S. Ding, S.F. Mou, P. Jandik, J. Cheng, Simultaneous determination of amino acids and carbohydrates by anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection, J. Chrom. A 966 (2002) 89–97.
[19] E.F. Hilder, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Latex-functionalized monolithic columns for the separation of carbohydrates by anion-exchange chromatography, J. Chrom. A 1053 (2004) 101–106.
[20] S. Rodriguez-Sanchez, M.J. Garcia-Sarrio, J.E. Quintanilla-Lopez, A.C. Soria, M.L. Sanz, Analysis of iminosugars and other low molecular weight carbohydrates in Aglaonema sp. Extracts by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry, J. Chrom. A 1423 (2015) 104–110.
[21] X. Liu, N. Ai, et al., Quantification of glucose, xylose, arabinose, furfural, and HMF in corncob hydrolysate by HPLC-PDA-ELSD, Carbohydr. Res. 353 (2012) 111–114.
[22] J.L. Chavez-Sevin, Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection, J. Chrom. A 1043 (2004) 211–215.
[23] G.L. Sassaki, L.M. Souza, R.V. Serrato, T.R. Cipriani, P.A.J. Gorin, M. Lacomini, Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectometry: novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis, J. Chrom. A 1208 (2008) 215–222.
[24] E. Rojas-Escudero, A.L. Alarcon-Jimenez, P. Elizalde-Galvan, F. Rojo-Callejas, Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography, J. Chrom. A 1027 (2004) 117–120.
[25] A. Kazalaki, M. Misiak, A. Spyros, P. Dais, Identification and quantitative determination of carbohydrate molecules in Greek honey by employing ^{13}C NMR spectroscopy, Anal. Chem. 7 (2015) 5962–5972.
[26] G. del Campo, J. Zuriarrain, A. Zuriarrain, I. Berrigi, Quantitative determination of carboxylic acids amino acids, carbohydrates, ethanol and hydroxymethylfurfural in honey by ^{1}H NMR, Food Chem. 196 (2016) 1031–1039.
[27] M.A. Coimbre, A. Barros, D.N. Rutledge, I. Delgadillo, FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts, Carbohydr. Res. 317 (1999) 145–154.
[28] O. Anjos, M.G. Campos, P.C. Ruiz, P. Antunes, Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey, Food Chem. 169 (2015) 218–223.
[29] S. Farag, Separation and analysis of some sugars by using thin-Layer chromatography, J. A.S.S.B.T. 20 (1978) 251–254.
[30] K.M. Haldorsen, Quantitative Thin-Layer Chromatography of carbohydrates using pentavalent vanadium in sulphuric acid. Determination of mixtures of D-fructose, D-glucose and sucrose, J. Chromatogr. 150 (1978) 485–490.
[31] N. Iizima, M. Fujihara, T. Nagumo, Application of a sintered silica gel plate to the Thin-Layer Chromatography of carbohydrates, J. Chromatogr. 193 (1980) 464–469.
[32] G. Morlock, G. Sabir, Comparison of two orthogonal liquid chromatographic methods for quantitation of sugars in food, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 34 (2011) 902–919.
[33] M. Ghebregzabher, S. Rufini, B. Monaldi, M. Lato, Thin-Layer chromatography of carbohydrates, J. Chromatogr. 127 (1976) 133–162.
[34] R.D. Fell, The qualitative and quantitative analysis of insect hemolymph sugars by high performance Thin-Layer Chromatography, Comp. Biochem. Physiol. 95A (4) (1990) 539–544.
[35] A. Pyka, E. Wiatr, K. Kwiska, D. Gurak, Validation Thin Layer Chromatography for the determination of naproxen in tablets and comparison with a pharmacopoeial method, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 34 (2011) 829–847.
[36] L.H.S. Guimarães, A.F. Somera, et al., Production of β-fructofuranosidases by Aspergillus niveus using agroindustrial residues as carbon sources: characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose, Process Biochem. 44 (2) (2009) 237–241.
[37] C. Li, Effects of chemical modification by chitooligosaccharide on enzyme activity and stability of yeast beta-D-fructofuranosidase, Enzyme Microb. Technol. 64-65 (2014) 24–32.
[38] R. Schindler, H. Le Thanh, B. Lendl, R. Kellner, Determination of enzyme kinetics and chemometric evaluation of reaction products by FTIR spectroscopy on the example of β-fructofuranosidase, Vib. Spectrosc. 16 (1998) 127–135.
[39] Q. Xu, X. Zheng, et al., Purification and biochemical characterization of a novel of β-fructofuranosidase–fructofuranosidase from Penicillium oxalicum with transfructosylating activity producing neokestose, Process Biochem. 50 (8) (2015) 1237–1246.
[40] J.D. Kehlbeck, C.C. Slack, M.T. Turnbull, S.J. Kohler, Exploring the hydrolysis of sucrose by invertase using nuclear magnetic resonance spectroscopy: a flexible package of kinetic experiments, J. Chem. Educ. 91 (2014) 734–738.
[41] F. Exnowitz, B. Meyer, T. Hackl, NMR for direct determination of K_M and V_{max} of enzyme reactions based on the Lambert W function-analysis of progress curves, Biochim. Biophys. Acta 1824 (2012) 443–449.
[42] R. Schindler, H. Le Thanh, B. Lendl, R. Kellner, Determination of enzyme kinetics and chemimetric evaluation of reaction products by FTIR spectroscopy on the example of β-fructofuranosidase, Vib. Spectrosc. 16 (1998) 127–135.
[43] F. Cadet, F.W. Pin, C. Rouch, C. Robert, P. Baret, Enzyme kinetics by mid-infrared spectroscopy; β-fructosidase study by a one-step assay, Biochim. Biophys. Acta. 1246 (1995) 142–150.

Talanta 170 (2017) 419–424

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

TLC-UV hyphenated with MALDI-TOFMS for the screening of invertase substrates in plant extracts

Justine Ferey*, David Da Silva, Pierre Lafite, Richard Daniellou, Benoît Maunit

Univ. Orléans, CNRS, ICOA, UMR 7311, Rue de Chartres, 45067 Orléans cedex 02, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Thin-layer chromatography
Matrix assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry
Invertase
Plant extracts

ABSTRACT

In this study, thin-layer chromatography (TLC) hyphenated with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) was developed for the screening of invertase substrates in complex matrices. BfrA, a specific β-D-fructofuranosidase from *Leishmania major*, was chosen as a model enzyme to screen biological activity in plant extracts due to its capacity to hydrolyze specific carbohydrates. TLC was considered to be a reliable technique for screening substrates (bioactive molecules) in plant extracts due to its quantitative capabilities whereas MALDI-TOFMS was particularly useful for rapid identification. The first part of this approach consisted of a differential analysis by TLC-densitometry to highlight band under- and over-expressions in plant extract between blank and enzymatic reaction. Zones of interest were then immediately analyzed by TLC-MALDI-TOFMS coupling to identify bioactive molecules. Development of the method presented various challenges: the separation and analysis of isomers (such as glucose and fructose), the high matrix effect (demonstrated by the analysis of products with invertase enzyme naturally present in plant extract), and the analysis of polar molecules with low molecular mass (sugars). Thanks to the separative technique, the specificity of detection, and the high precision of the characterization, this method was shown to be feasible for the analysis of bioactive molecules in complex mixtures containing interfering compounds (e.g. proteins, salts). Overall, this study demonstrates that Thin-layer chromatography hyphenated with Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry is a simple, rapid, precise and efficient method for the analysis of suitable substrates in raw samples.

1. Introduction

The screening of bioactive molecules within complex matrices has been and is still of tremendous interest. Preliminary screening of biological activity plays a primordial role in the search for molecules with biological activity in natural products. Numerous analytical methods such as spectrophotometry and chromatography [1–6] have been developed to isolate molecules of interest. Among these methods, TLC, which is commonly used for the analysis of crude samples with minimal preparation and purification [7–10], seems to be one of the most suitable techniques for the discovery of bioactive molecules within crude extract. This technique is widely used for the detection of biologically active molecules [11,12] in complex matrices especially with the development of TLC-bioautography [13–15]. TLC has various advantages for bioactive molecule screening: rapid results are obtained, samples are analyzed under the same conditions because of simultaneous analyses, and it is a salt-tolerant technique that requires minimal sample preparation. TLC is also the only chromatographic method that can display the results as a picture-like image thus enabling a more convenient differential approach. Moreover, the quantitative approach is especially useful for screening experiments to isolate promising candidates as all the samples can be compared side by side. Nevertheless, in the case of complex mixture analyses, the technique has some drawbacks such as zone co-migration, ambiguous zone assignment and a retardation factor (R_F) that varies with certain parameters such as mobile phase composition, humidity and temperature. Direct identification of the analytes on the TLC plate is possible with standard deposition on the same plate. Mass spectrometry, which is considered as one of the most practical techniques in chemical and biological fields because of its high speed, sensitivity and specificity, is widely coupled with TLC to improve R_F precision, to detect co-migration and to specifically analyze isobars and isomers in order to obtain significant mass spectra, thus avoiding the drawbacks of TLC [16–19].

Several instrumental TLC-MS approaches have been developed such as Time of Flight Secondary Ion MS (TLC-TOF-SIMS), Matrix Assisted Laser Desorption Ionization MS (TLC-MALDI) [20–23], Electrospray

* Corresponding author.
E-mail address: justine.ferey@etu.univ-orleans.fr (J. Ferey).

http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.040
Received 2 March 2017; Received in revised form 13 April 2017; Accepted 16 April 2017
Available online 18 April 2017
0039-9140/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

MS (TLC-ESI MS) [24], Desorption Electrospray Ionization (TLC-DESI MS) and Direct Analysis in Real Time (TLC-DART MS) [25–32]. Both TLC-ESI MS and TLC-MALDI are widely employed but TLC-MALDI coupling has the advantage of providing good spatial resolution due to a laser beam focal spot of about 20 µm; it is also a non-invasive technique. TLC-MALDI-TOFMS coupling overcomes the problem of retardation factor imprecision and co-migration as it enables isobars to be specifically analyzed by matching a *m/z* value to each R_F value, making it a powerful technique for the detection and the identification of many compounds [33–37]. For the present application, the use of an aluminum TLC plate and a matrix with electrical conductance were necessary to provide ionization. TLC-UV hyphenated with MALDI-TOFMS, thanks to the combined advantages of the two techniques, could prove to be a method of choice for the screening of bioactive molecules [38]. The aim of this study was to develop a screening method by TLC-UV hyphenated with MALDI-TOFMS to quickly identify and selectively characterize potential substrates using the invertase enzyme, a specific β-fructofuranosidase (BfrA, EC 3.2.1.26) [34] in plant extract without sample preparation. This enzyme is a glycoside hydrolase that catalyzes the hydrolysis of the terminal non-reducing β-fructofuranosidase residues in sucrose, producing an equimolar mixture of glucose and fructose. As sugars are the most abundant natural products belonging to the primary metabolite of plants, the study of invertase substrates in plant extract is a good model to show the interest of the methodology. This development presented various challenges, namely the presence of a high matrix effect (with enzymatic products naturally present), the separation and analysis of position isomers (substrates and products), a large dynamic mass range of sugar concentrations and the analysis of highly polar molecules (i.e. difficult to ionize) with low molecular mass (importance of the selection and deposition of the MALDI matrix).

Thanks to a differential approach, an initial screening by TLC analysis and UV detection was performed to highlight substrates and products of the invertase reaction. MALDI-TOFMS was used in order to identify and characterize zones of interest. In this study we present three of the five plant extracts studied, selected for their metabolomic diversity characteristic of sugars found in polar (ethanol extraction) plant extracts.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All the solvents used: ethanol (EtOH), methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were of analytical grade and were purchased from SDS Carle Erba. Formic acid was from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). BfrA invertase from *Leishmania major* overexpressed in *Escherichia coli* was produced and purified as previously described by Belaz et al. [39]. MALDI non-organic matrix, which consisted of core-shell silica-coated iron oxide magnetic nanoparticles, was synthesized as previously described by Salwinski et al. [40] Commercially available roots of liquorice were obtained from FestiFruits 96 (Saint-Pierre-sur-Dropt, France). Mangosteen [41] and "LV 1784" unknown dried plant extract powders were provided by LVMH collaborators.

The de-ionized water was purified with a Milli-Q water system. The 4-aminobenzoic acid reagent, ammonium formate buffer, potassium sodium tartrate and trisodium citrate dihydrate were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Methods

2.2.1. TLC-UV and TLC-MALDI-TOFMS instrumentation

Quantitative analysis was carried out using TLC silica gel60 F_{254} 20×20 cm aluminum plates (from Merck, layer thickness 200 µm). Sample application was performed with a linomat IV (CAMAG Muttenz Switzerland); the developing chamber was a DESAGA HEIDELBERG glass chamber (20×20 cm); the densitometer was a CAMAG TLC scanner 3 linked to winCATS v 3.0 software. Analyses by MALDI-TOFMS were carried out on an Autoflex (Bruker Daltonik, Germany) with Flex Analysis and Flex Control as software.

2.2.2. Plant extracts preparation

Plant extractions (liquorice, LV 1784, mangosteen) were performed with ethanol as solvent by means of a MicroSYNTH microwave oven (Sorisole, Italy). For each plant, 1g was loaded into a 12 mL reactor filled with 7 mL EtOH. The mixtures were subjected to three extractions of 30 s with 1000 W irradiation power. After each cycle, the reactors were cooled down a few minutes in an ice bath to reach room temperature. The extract was then separated from solid plant residue by centrifugation (7000 rpm, 10 min) and filtration at 0.45 µm before chromatographic analyses.

2.2.3. Enzymatic assay

Each reaction was performed in 0.5 mL safe-lock tubes with 40 µL of diluted raw plant extract mixed with 40 µL of invertase solution at 0.04 g/L. For each plant extract, a control tube was made in the same conditions with 40 µL of diluted raw plant extract and 40 µL of ammonium formate buffer (50 mM, pH=6.4). The reaction was stopped by deposition on TLC plate after 2 h at room temperature.

2.2.4. TLC-UV hyphenated with MALDI-TOFMS method

2.2.4.1. TLC-UV method. Plates were pre-washed with methanol to obtain a stable baseline for the UV detection. The plates were pre-treated with a mixture of 0.1 M sodium bisulfite and 0.01 citrate buffers as described previously [8,42,43]. 3 µL of each solution (control and invertase reaction) were deposited as bands of 5 mm at a constant application rate of 4 s/µL keeping 5 mm space between each band as described previously [43]. Plates were then developed twice in the same direction, up to 6.5 cm, in the elution chamber without pre-conditioning with the mobile phase ACN/H_2O 80/20 (v/v). For derivatization, plates were dipped in a 4-aminobenzoic acid solution as described previously and heated in a drying oven at 130 °C for 15 min [43]. Densitometric evaluation was performed at 390 nm. Integration was performed with the software winCATS v 3.0. Peak areas were used to perform the differential analysis.

2.2.4.2. TLC-MALDI-TOFMS method. Plate washing and support pre-treatment were performed as mentioned above. The TLC plates intended for MALDI analysis were immersed three times in the MALDI matrix solution at 2 mg/mL in ethanol. After each dipping, plates were homogeneously dried with a hair drier to produce a thin-layer matrix deposition. 10 µL of the solutions were deposited in duplicate in order to divide the TLC plate into two equal parts (5 cm×10 cm) after migration, one for detection of sugars after 4-aminobenzoic acid derivatization and the other for analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. The deposition parameters and migration procedure were as described in section 2.2.3.1. After separation of the TLC plate, each separate zone detected at 366 nm (R_F values) was used to select zones of interest in the second part of the TLC plate intended for MALDI analyses. The TLC plate was then attached to a TLC-adapted MALDI-TOFMS target (Bruker Daltonik, Germany). All spectra were acquired in the reflector mode using delayed extraction conditions. Mass spectra were recorded manually in positive ion mode between *m/z* 160 and *m/z* 1300 with a nitrogen desorption laser at 337 nm used to achieve ionization. Three hundred shots were averaged to improve the S/N. External calibration of *m/z* was performed using peaks from maltose to maltohexaose (from *m/z* 203 to *m/z* 1013). Mass spectra were manually acquired by randomly scanning the zone surface corresponding to the R_F values, with the following settings:

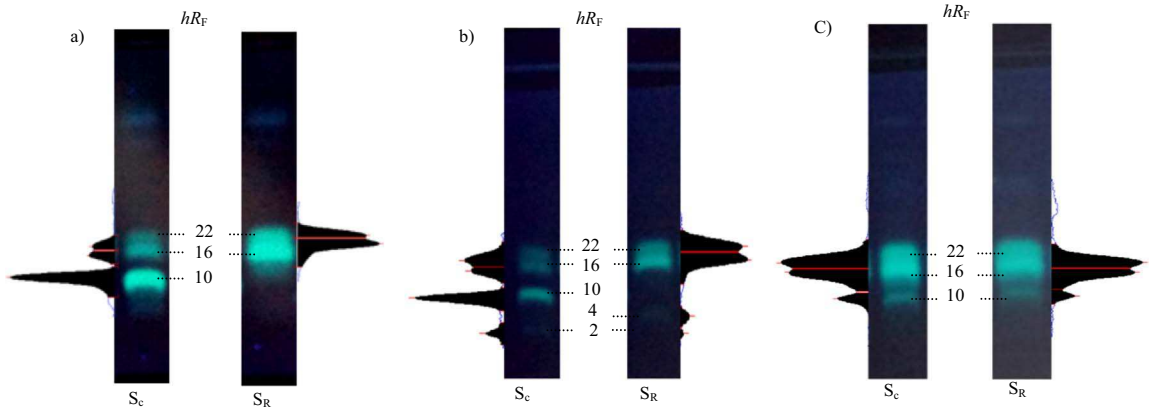


Fig. 1. TLC chromatoplates and scan-densitogram of controls and hydrolysis reaction with a) liquorice extract, b) LV 1784 extract and c) mangosteen extract, after derivatization under 366 nm. S_C: control solution, S_R: reaction solution. hR_F values correspond to the R_F values multiplied by 100.

accelerating voltage 19 kV, extraction delay time 40 ns and laser shot frequency 6.7 Hz. Raw data were processed with Flexcontrol software (Bruker Daltonik, Brumen, Germany) version 2.2.

3. Results and discussion

3.1. TLC-UV screening

For this evaluation, three plant extract samples were analyzed, namely, liquorice, LV 1784 and mangosteen. Fig. 1 shows TLC plates with the densitometric profiles of the control and the reaction solutions for the three samples. The differential study and the associated hR_F values are summarized in Table 1.

The densitometric profiles of the three plants show the major presence of 4 sugars with a high range of concentrations. In liquorice extract, the zone at hR_F =10 is five times more intense than those in LV1784 and mangosteen extract. However, in mangosteen extract zones at hR_F =16 and hR_F =22 are five times more intense than those in liquorice and LV1784 extracts. This difference in intensity, due to the matrix effect, could interfere in the differential study of zones before and after the enzymatic reaction because of possible plate overloading.

These extracts were analyzed after extraction and filtration without any sample preparation (such as evaporation which can be critical for volatile molecules). Sugars that were weakly present were detected by 4-aminobenzoic acid (Fig. 1b) thanks to its low limits of detection and quantification [43]. A fast relative quantitative screening of biological activity was first performed by TLC separation coupled with UV detection. Screening was based on the difference between the peak areas of control and reaction solutions. This differential approach was validated in our previous study on sugars by the repeatability, robustness and low limits of detection and quantification found [43]. Detection of zone over- and/or under-expressions confirmed the bioactivity of the invertase toward the extract. Zone under-expression highlighted the hydrolysis of substrates whereas zone over-expressions revealed the accumulation of product that can be naturally present in the plant extract before the enzymatic reaction. Plate overloading was therefore a real challenge for the detection of differences in zone intensities. Thanks to the separative technique and sugar polarity information, over- and under-expressed zones were easily linked. As highly polymerized sugars show strong polar interactions with stationary phase, monosaccharides usually have the highest R_F values. Lower R_F values are obtained with large sugars (disaccharides, trisaccharides, etc.). Therefore, after the enzymatic reaction, over-expressed zones are linked with the under-expressed zones that have a lower R_F.

For liquorice extract (Fig. 2a) one under-expressed zone was observed at hR_F =10 and two over-expressions at hR_F =16 and hR_F =22. Over- and under-expressions are highly significant, with clearly distinct error bars, indicating that in liquorice extract there is one invertase substrate (under-expressed zone with the lowest hR_F) hydrolyzed in two products. Fig. 2b shows 2 under-expressions at hR_F =2 and hR_F =10, two over-expressions at hR_F =16 and hR_F =22 and the appearance of a zone at hR_F =4 in the LV 1784 plant extract, indicating that two substrates and three products are potentially involved in the invertase enzymatic reaction. Concerning the mangosteen extract, only one under-expression was visible (hR_F =10) with no over-expression.

3.2. TLC-MALDI-TOFMS experiment

Once the first screening of suitable substrates involved in the enzymatic reaction had been completed, the molecules of interest were characterized by TLC-MALDI-TOFMS coupling. The interest of this coupling is that it avoids deposition of the standard on the same plate, making it possible to perform rapid and selective analysis of the zones of interest with high spatial resolution. Mass information can therefore be determined and correlated with retardation factors. To set up this coupling, a non-organic matrix proved to be suitable. Contrary to other matrices, and thanks to the particle silica layer, sample deposition and migration can be performed after plate dipping (thus avoiding diffusion) without any matrix migration. Finally, thanks to the nanometer

Table 1
Summary of zone over- and under-expressions and number of zone appearances found in plant extracts with associated retardation factor values.

	Under-expression		Over-expression		Appearance	
	Number	hR_F	*Number*	hR_F	*Number*	hR_F
Liquorice	1	10	2	16 22	/	/
LV 1784	2	2 10	2	16 22	1	4
Mangosteen	1	10	/	/	/	/

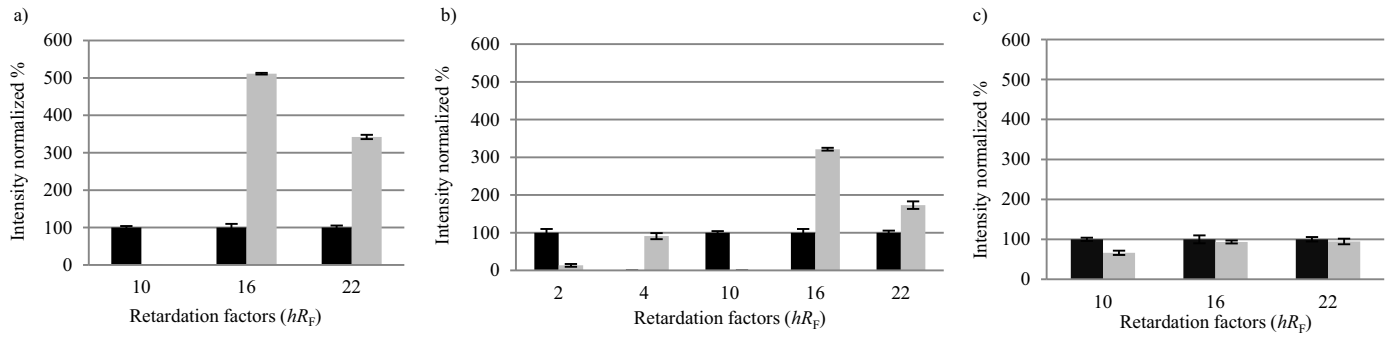


Fig. 2. Analysis of reaction hydrolysis of a) liquorice extract, b) LV1784 extract and c) mangosteen extract. The enzymatic activities were measured three times per experimental point (n=3). Reaction conditions: reaction time 2 h; reaction temperature: room temperature. Value normalized between the intensity of the zone with and without reaction. Black lines: control solution, grey lines: reaction solutions.

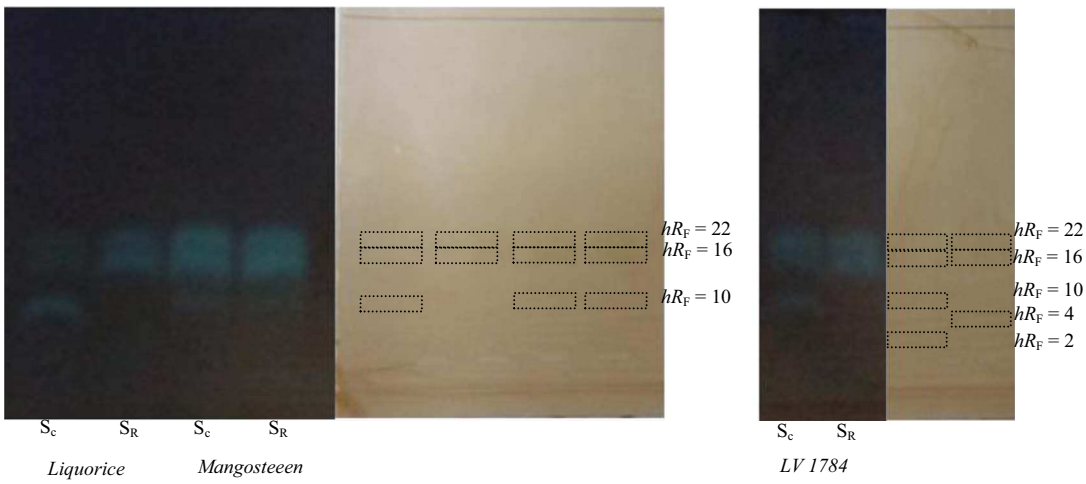


Fig. 3. Two parts of TLC chromatoplates dipped into MALDI matrix of controls and hydrolysis reaction with liquorice extract, LV 1784 extract and mangosteen extract. First TLC part: after derivatization under 366 nm, second TLC part: hR_F reported for MALDI analysis. S_C: control solution, S_R: reaction solution.

particle size, dipping the TLC in MALDI matrix solution did not affect plate pre-treatment and hence glucose and fructose separation. Even though a loss of contrast was visible because of the brown color of iron oxide (Fig. 3), derivatization with 4-aminobenzoic acid and detection under 366 nm were still possible. This detection after derivatization was more difficult with an organic matrix. Finally, the ionization obtained with this matrix proved suitable to obtain significant mass information of desorption on a silica plate.

In a first experiment, each control solution was analyzed by TLC-MALDI-TOFMS. As shown in Fig. 4, zones of interest were marked on the TLC plate used for the MALDI experiment and three *m/z* values for each of the three hR_F (2, 10 and 16/22) were found: *m/z* 527, *m/z* 365 and *m/z* 203. Owing to the lack of basic sites, which are necessary for protonation, sugars are difficult to detect and their signals generally result in less efficient sodium adducts $[M+Na]^+$. A low amount of interfering peak was detected with this matrix with a characteristic main cationic matrix peak at *m/z* 393. The sugars were trisaccharides, disaccharides and monosaccharides with a molecular mass of M=504 g/mol, M=342 g/mol and M =180 g/mol respectively. The fragmentation of trisaccharide into disaccharide and disaccharide into monosaccharides during ionization was evidenced by a mass loss of 162 Da. Peak intensities obtained by the MALDI experiment and densitometry evaluation were compared. For the same R_F (and *m/z* value), intensity values are consistent. For hR_F =16/ hR_F =22 (*m/z* 203), MALDI and densitometry experiments show that monosaccharides are more abundant in mangosteen extract than in liquorice and LV 1784 extracts where intensity values are similar. Disaccharide (hR_F =10, *m/z* 365) is abundant in liquorice extract but has a weak intensity in mangosteen extract. For trisaccharide (hR_F =2, *m/z* 527), both TLC-MALDI and TLC-UV experiments show weak intensities. Control and reaction solutions were then compared and for each zone of interest, *m/z* values are reported in Table 2. As shown in Table 2, under-expressed zones at hR_F =10 have the same *m/z* value (*m/z* 365 $[M+Na]^+$ adducts). As pointed out above, invertase specifically recognizes sucrose derivatives so that this disaccharide is probably sucrose, the most common sugar in plants. The two products linked to this sucrose hydrolysis are the two over-expressed zones at hR_F =16 and hR_F =22 whose *m/z* value was 203. Therefore, as these products with a molecular mass of M=180 g/mol are two monosaccharides coming from sucrose hydrolysis, they are glucose and fructose. As glucose is more polar than fructose, we can deduce that $hR_{F(glucose)}$ =16 and $hR_{F(fructose)}$ =22. This result was already shown in our previous study [43]. Due to the presence of isobaric compounds, this interpretation and deduction of the screening methodology will not be feasible in mass spectrometry (MALDI) without a separative dimension.

Analysis of the under-expressed zone at hR_F =2 showed the value *m/z* 527. This sugar with a molecular mass of M=504 g/mol is a trisaccharide containing a sucrose pattern. The associated over-expressed zone at hR_F =4 gave a signal at *m/z* 365. Therefore, the trisaccharide was hydrolyzed into a monosaccharide (glucose or fructose) and into a disaccharide. The latter, with a lower hR_F value than that of sucrose (4 and 10 respectively), is less polar than sucrose. According to our previous study [43], the retardation factor of this trisaccharide is the same as raffinose with hR_F =2. Therefore, this sugar could be a raffinose hydrolyzed into melibiose (α-D-glucopyranosyl-(1,6)-D-glucopyranose) (hR_F =4) and fructose (hR_F =22).

Furthermore, in liquorice extract, only the sucrose (hydrolyzed into fructose and glucose) was detected as a suitable substrate with respect to invertase. In LV 1784, two substrates were detected: sucrose and a

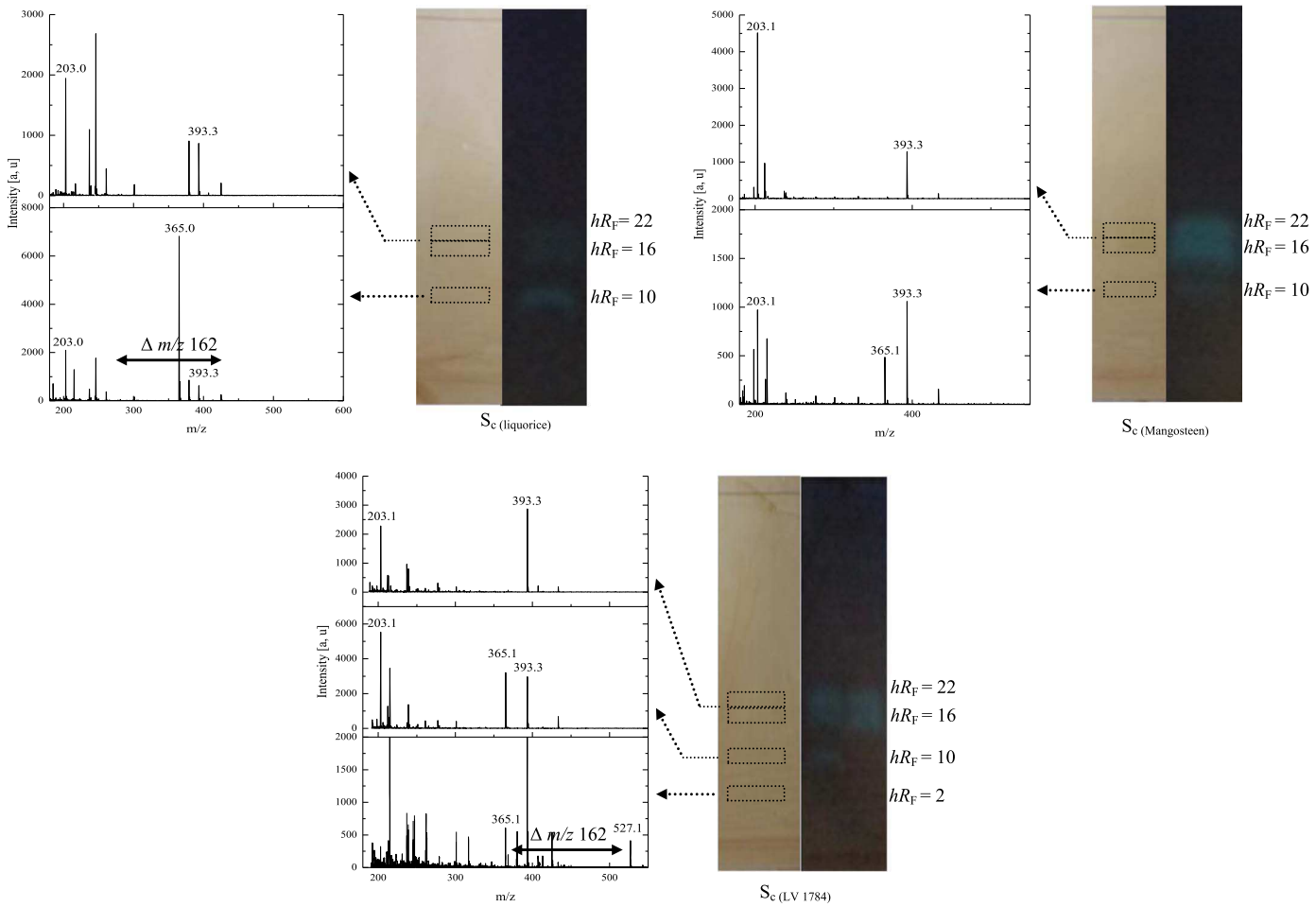


Fig. 4. Mass spectra of control solutions with associated dipped TLC plates (liquorice, mangosteen and LV 1784 plant extracts).

Table 2
Summary of assignment of *m/z* values for each modified zone after invertase reaction and TLC separation (Liquorice, LV 1784 and mangosteen extract). For mangosteen extract no overexpression was observed but zones at hR_F =0.16 and hR_F =0.22 were analyzed.

	Zones					
	Under-expression		Over-expression		Appearance	
	hR_F	$[M+Na]^+$	hR_F	$[M+Na]^+$	hR_F	$[M+Na]^+$
Liquorice	10	365	16	203	/	/
			22	203		
LV 1784	2	527	16	203	4	365
	10	365	22	203		
Mangosteen	10	365	(16)	(203)	/	/
			(22)	(203)	/	/

trisaccharide (potentially raffinose hydrolyzed into melibiose and fructose). The screening of these two plant extracts shows the potential of TLC-MALDI-TOFMS coupling with mass information obtained in a large dynamic range. Thanks to TLC, isomers were separated (glucose/fructose and disaccharide/sucrose) and therefore specifically detected. A differential approach was implemented with no matrix effect. Identification was performed by the MALDI-TOFMS experiment. In the mangosteen extract, the MALDI-TOFMS experiment identified sucrose with *m/z* 365 at hR_F =10 and glucose and fructose with *m/z* 203 at hR_F =16 and hR_F =22 respectively. As glucose and fructose are very abundant in the plant extract, a differential approach was not feasible because of plate overloading. The substrate was therefore monitored by observation of the under-expressed zone.

4. Conclusion

In this study we developed a TLC-UV hyphenated with MALDI-TOFMS method for the screening of invertase substrates and/or products in complex matrices. Despite various challenges such as high plant matrix effect and isomer separations, TLC hyphenated with densitometry enabled the detection of over- and/or under-expressed zones in invertase substrate. TLC-MALDI-TOFMS, due to the use of the non-organic matrix, allows an easy and rapid identification of high polar molecules with low molecular mass. This study was made possible thanks to the combination of the advantages of TLC (separative dimension, possible quantification, specific derivatization and simultaneous analysis) with those of MALDI/MS (specific MALDI matrix, fast characterization, non destructive method and analysis precision) and improves the reliability of zone assignment. The use of TLC-UV and TLC-MALDI-TOFMS coupling proved to be relevant for the identification of substrates and products of invertase hydrolysis in three plant extracts and could be a valuable alternative to classical tests such as DNS [39,43] which cannot detect specific suitable substrates and products in complex mixtures. This approach could be useful for qualitative and quantitative studies of molecules with biological activity with respect to other enzymes involved in oligosaccharide hydrolysis. Finally, thanks to its precision, robustness and specificity of detection, TLC-UV hyphenated with MALDI-TOFMS is shown to be a method of choice for the analysis of suitable substrates in complex mixtures.

References

[1] L. Gu, T. Wu, Z. Wang, TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from

fruit of perilla frutescens var. acuta, LWT - Food Sci. Technol. 42 (2009) 131–136.
[2] E. Calleri, C. Temporini, G. Massolini, Frontal affinity chromatography in characterizing immobilized receptors, J. Pharm. Biomed. Anal. 54 (2011) 911–925.
[3] H.B. Li, Y. Jiang, F. Chen, Separation methods used for Scutellaria baicalensis active components, J. Chromatogr. B 812 (2004) 277–290.
[4] D.M. Liu, Y.P. Shi, J. Chen, Application of capillary electrophoresis in enzyme inhibitors screening, Chin. J. Anal. Chem. 43 (2015) 775–782.
[5] H.B. Hines, E.E. Brueggemann, M.L. Hale, High-performance liquid chromatography-mass selective detection assay for adenine released from a synthetic RNA substrate by ricin A chain, Anal. Biochem. 330 (2004) 119–122.
[6] E. Destandau, A. Toribio, M. Lafosse, V. Pecher, C. Lamy, P. Andre, Centrifugal partition chromatography directly interfaced with mass spectrometry for the fast screening and fractionation of major xanthones in Garcina mangostana, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1390–1394.
[7] S. Farag, Separation and analysis of some sugars by using thin layer chromatography, J. A. S. S. B. T. 20 (1978) 251–254.
[8] R.D. Fell, The qualitative and quantitative analysis of insect hemolymph sugars by high performance thin-layer chromatography, Comp. Biochem. Physiol. 95 (1990) 539–544.
[9] L.W. Doner, L.M. Biller, High-performance thin layer chromatographic separation of sugars: preparation and application of aminopropyl bonded silica plates impregnated with monosodium phosphate, J. Chromatogr. 287 (1984) 391–398.
[10] P. Agrawal, K. Laddha, Development of validated high-performance thin layer chromatography for quantification of aristolochic acid in different species of the Aristolochiaceae family, J. Food Drug Anal. (2016) 1–5.
[11] T. Kriska, A.W. Girotti, A thin layer chromatographic method for determining the enzymatic activity of peroxidases catalyzing the two-electron reduction of lipid hydroperoxides, J. Chromatogr. B 827 (2005) 58–64.
[12] A. Aygan, B. Arikan, H. Korkmaz, S. Dincer, O. Colak, Highly thermostable and alkaline alpha-amylase from a halotolerant-alkaliphilic Bacillus sp. AB68, Braz. J. Microbiol. 39 (2008) 547–553.
[13] L.H. Gu, L.P. Liao, H.J. Hu, S.W.A. Bligh, C.H. Wang, G.X. Chou, Z.T. Wang, A thin-layer chromatography-bioautographic method for detecting dipeptidyl peptidase IV inhibitors in plants, J. Chromatogr. A 1411 (2015) 116–122.
[14] I.M. Choma, E.M. Grzelak, Bioautography detection in thin-layer chromatography, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2684–2691.
[15] W. Jesionek, Á.M. Móricz, P.G. Ott, B. Kocsis, G. Horváth, I.M. Choma, TLC-direct bioautography and LC/MS as complementary methods in identification of antibacterial agents in plant tinctures from the asteraceae family, J. AOAC Int. 98 (2015) 857–861.
[16] B. Hu, G.Z. Xin, P.K. So, Z.P. Yao, Thin layer chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry for direct analysis of raw samples, J. Chromatogr. A 1415 (2015) 155–160.
[17] S.C. Cheng, M.Z. Huang, J. Shiea, Thin layer chromatography/mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2700–2711.
[18] S.P. Pasilis, G.J. Van Berkel, Atmospheric pressure surface sampling/ionization techniques for direct coupling of planar separations with mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3955–3965.
[19] V. Ilbeigi, M. Sabo, Y. Valadbeigi, S. Matejcik, M. Tabrizchi, Laser desorption-ion mobility spectrometry as a useful tool for imaging of thin layer chromatography surface, J. Chromatogr. A 1459 (2016) 145–151.
[20] S. Mowthorpe, M.R. Clench, A. Cricelius, D.S. Richards, V. Parr, L.W. Tetler, Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight/thin layer chromatography/mass spectrometry- A rapid method for impurity testing, Rapid Commun. Mass Spectrom. 13 (1999) 264–270.
[21] E.D. Leriche, M. Hubert-Roux, M.C. Grossel, C.M. Lange, C. Afonso, C. Loutelier-Bourhis, Direct TLC/MALDI-MS coupling for modified polyamidoamine dendrimers analyses, Anal. Chim. Acta 808 (2014) 144–150.
[22] M. Manikandan, N. Hasan, H.F. Wu, Rapid detection of haloarchaeal carotenoids via liquid-liquid microextraction enabled direct TLC MALDI-MS, Talanta 107 (2013) 167–175.
[23] G. Morlock, W. Schwack, Hyphenations in planar chromatography, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 6600–6609.
[24] T.T. Häbe, G.E. Morlock, Miniaturization of instrumental planar chromatography with focus on mass spectrometry, Chromatographia 79 (2016) 797–810.
[25] Y. Lv, Z. Lin, T. Tan, F. Svec, Preparation of porous styrenics-based monolithic layers for thin layer chromatography coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric detection, J. Chromatogr. A 1316 (2013) 154–159.
[26] Z. Zhang, S.N. Ratnayaka, M.J. Wirth, Protein UTLC-MALDI-MS using thin films of submicrometer silica particles, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 7196–7202.
[27] I. Vovk, G. Popovic, B. Simonovska, A. Albreht, D. Agbaba, Ultra-thin-layer chromatography mass spectrometry and thin-layer chromatography mass spectrometry of single peptides of angiotensin-converting enzyme inhibitors, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3089–3094.
[28] K. Matheis, B. Fuchs, K. Lemmnitzer, R. Suß, H. Griesinger, S. Minarik, M. Oberle, M. Schulz, J. Schiller, Combining TLC separation with MS detection - A revival of TLC, J. Glycom. Lipidom. 05 (2015) 1000e125.
[29] A.A. Parent, T.M. Anderson, D.J. Michaelis, G. Jiang, P.B. Savage, M.R. Linford, Direct ToF-SIMS analysis of organic halides and amines on TLC plates, Appl. Surf. Sci. 252 (2006) 6746–6749.
[30] B.A.T. Gary, J. Van Berkel, V. Kertesz, Thin-layer chromatography/Desoprtion electrospray ionization mass spectrometry: investigation of Goldenseal alkaloids, Anal. Chem. 79 (2007) 2778–2789.
[31] T.T. Habe, G.E. Morlock, Office Chromatography: precise printing of sample solutions on miniaturized thin-layer phases and utilization for scanning Direct Analysis in Real Time mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1413 (2015) 127–134.
[32] A. Batubara, V.A. Carolan, P.M. Loadman, C. Sutton, S.D. Shnyder, M.R. Clench, Thin-layer chromatography/matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging for the analysis of phospholipids in LS174T colorectal adenocarcinoma xenografts treated with the vascular disrupting agent DMXAA, Rapid Commun. Mass Spectrom. 29 (2015) 1288–1296.
[33] B. Fuchs, R. Süß, A. Nimptsch, J. Schiller, MALDI-TOF-MS directly combined with TLC: a review of the current state, Chromatographia 69 (2008) 95–105.
[34] A.I. Gusev, A. Proctor, Y.I. Rabinovich, D.M. Hercules, Thin-layer chromatography combined with matrix-assisted laser desorption/Ionization mass spectrometry, Anal. Chem. 67 (1995) 1805–1814.
[35] D.T. Isbell, A.I. Gusev, N.I. Taranenko, C.H. Chen, D.M. Hercules, Analysis of nucleotides directly from TLC plates using MALDI-MS detection, Fresenius J. Anal. Chem. 365 (1999) 625–630.
[36] K. Dreisewerd, S. Kolbl, J. Peter-Katalinic, S. Berkenkamp, G. Pohlentz, Analysis of native milk oligosaccharides directly from thin-layer chromatography plates by matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal-time-of-flight mass spectrometry with a glycerol matrix, J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 17 (2006) 139–150.
[37] E.D. Leriche, M. Hubert-Roux, M.C. Grossel, C.M. Lange, C. Afonso, C. Loutelier-Bourhis, Direct TLC/MALDI–MS coupling for modified polyamidoamine dendrimers analyses, Anal. Chim. Acta 808 (2014) 144–150.
[38] K. Nimptsch, R. Suss, T. Riemer, A. Nimptsch, M. Schnabelrauch, J. Schiller, Differently complex oligosaccharides can be easily identified by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry directly from a standard thin-layer chromatography plate, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3711–3715.
[39] S. Belaz, T. Rattier, P. Lafite, P. Moreau, F.H. Routier, F. Robert-Gangneux, J.P. Gangneux, R. Daniellou, Identification, biochemical characterization, and in-vivo expression of the intracellular invertase BfrA from the pathogenic parasite Leishmania major, Carbohydr. Res. 415 (2015) 31–38.
[40] A. Salwinski, D. Da Silva, R. Delépée, B. Maunit, Enzyme-Coupled nanoparticles-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for searching for low-mass inhibitors of enzymes in complex mixtures, J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 25 (2014) 538–547.
[41] T. Michel, E. Destandau, L. Fougere, C. Elfakir, New "hyphenated" CPC-HPLC-DAD-MS strategy for simultaneous isolation, analysis and identification of phytochemicals: application to xanthones from Garcinia mangostana, Anal. Bioanal. Chem. 404 (2012) 2963–2972.
[42] M. Ghebregzabher, S. Ruffini, B. Monaldi, M. Lato, Thin-layer chromatography of carbohydrates, J. Chromatogr. 127 (1976) 133–162.
[43] J. Ferey, D. Da Silva, S. Bravo-Veyrat, P. Lafite, R. Daniellou, B. Maunit, Validation of a thin-layer chromatography/densitometry method for the characterization of invertase activity, J. Chromatogr. A 1477 (2016) 108–113.

Justine FEREY

Développement d'outils analytiques basés sur la spectrométrie de masse pour le suivi d'interactions enzyme-ligand dans le domaine de la Santé.

Résumé

Les enzymes et leur diversité d'actions sont appréciées dans des domaines d'applications variés allant de l'agroalimentaire à la thérapeutique. Ainsi, une attention toute particulière est portée à leur étude afin d'améliorer une action (contre le vieillissement de la peau, antivirale, anticancéreuse…) ou un procédé de synthèse. Ce projet de recherche s'inscrit dans une démarche de développement d'outils analytiques basés sur la spectrométrie de masse, permettant le suivi rapide et sensible d'interactions enzyme-ligand.

Dans une première étude, l'approche TLC couplée à une détection par UV a été évaluée pour la détermination de constantes enzymatiques de l'enzyme invertase. Cette approche couplée à un MALDI/TOF MS a permis d'identifier des substrats spécifiques de l'invertase au sein d'extraits de plantes. Pour preuve de concept, l'interaction cellobiohydrolase II–ligand est présentée dans le cadre de l'identification d'inhibiteur par TLC-MALDI/TOF et TLC-ENALDI MS.

En seconde étude, nos travaux ont porté sur la caractérisation directe de différentes enzymes kinases, puis aux suivis des réactions de phosphorylation de nucléosides /tides endogènes. Ces études, basées sur des approches « off-line » (Flow Injection Analysis, FIA) et « on-line » (Frontal Affinity Chromatography, FAC) couplées à un spectromètre de masse haute résolution, ont été réalisées au moyen de ces kinases libres et immobilisées. Dans le cadre de la recherche de nouveaux candidats médicamenteux antiviraux, le suivi d'une phosphorylation spécifique des molécules de synthèse, au regard de souches humaine ou virale de kinase, a également été évalué par ces deux méthodologies.

Mots clés *: interactions enzyme-ligand, constantes enzymatiques, enzymes immobilisées, FAC-HRMS, FIA-HRMS, TLC-UV, TLC-MALDI/TOF-MS.*

Development of analytical tools-based on mass spectrometry for the monitoring of enzyme-ligand interactions in the healthcare field.

Abstract

Enzymes are very appreciated and useful in various application fields from agri-business to therapeutic due to their diversity of actions. Therefore, their action mechanisms are widely studied in order to enhance an action (anti-aging of skin, antiviral, antitumorous) or a synthesis process. This research project is part of the approach to propose analytical tools based on mass spectrometry, allowing rapid and sensitive follow-up of enzyme-ligand interactions.

In a first study, the Thin-Layer Chromatography (TLC) approach coupled with UV detection was evaluated for the determination of invertase kinetic constants. This approach coupled with a MALDI / TOF-MS led to the identification of invertase substrates in plant extracts. As a proof of concept, the cellobiohydrolase II - ligand interaction was presented in the framework of the identification of inhibitor by TLC-MALDI / TOF and TLC-ENALDI MS.

In the second study, our work aimed at developing a direct method for the determination of kinetic parameters of kinases and following-up the phosphorylation reactions of endogenous nucleosides / tides. These studies, based on "off-line" (Flow Injection Analysis, FIA) and "on-line" (Frontal Affinity Chromatography, FAC) approaches coupled with a high-resolution mass spectrometer, were carried out using free and immobilized kinases. In the context of the search for new antiviral drug candidates, a specific phosphorylation of synthetic molecules regards to human or viral kinase was also evaluated by these both approaches.

Keywords: *enzyme – ligand interactions, kinetic constants, enzyme immobilization, FAC-HRMS, FIA-HRMS, TLC-UV, TLC-MALDI TOFMS, MALDI TOFMS.*

Institut de Chimie Organique et Analytique
Université d'Orléans, CNRS UMP 7311, BP 6759
45067 Orléans Cedex 2, France