



**HAL**  
open science

# Analyse par spectrométrie de masse des tubulines et de l'hormone de croissance

Hala Dadi

► **To cite this version:**

Hala Dadi. Analyse par spectrométrie de masse des tubulines et de l'hormone de croissance. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT: 2018SACLS582. tel-02560081

**HAL Id: tel-02560081**

**<https://theses.hal.science/tel-02560081>**

Submitted on 1 May 2020

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

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

# Analyse par spectrométrie de masse des tubulines et de l'hormone de croissance

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université Paris-Sud  
Laboratoire de Chimie physique (LCP)

École doctorale n°571 : sciences chimiques : molécules,  
matériaux, instrumentation et biosystèmes (2MIB)

Spécialité de doctorat: Chimie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 20 décembre 2018, par

**Hala Dadi**

## Composition du Jury :

<b>M. Thierry Martens</b> PU, Université Paris-Est Créteil	<b>Président</b>
<b>Mme. Marie-Claude Menet</b> MCU-PH, Université Paris Descartes	<b>Rapporteure</b>
<b>Mme. Emmanuelle Lipka</b> MCU, Université de Lille	<b>Rapporteure</b>
<b>Mme. Danielle Libong</b> MCU, Université Paris-Sud	<b>Examinatrice</b>
<b>M. Antoine Pallandre</b> PU, Université Paris-Sud	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Mme. Claire Smadja</b> PU, Université Paris-Sud	<b>Co-Directrice de thèse</b>
<b>Mme. Anne-Marie Wehenkel</b> CR, Institut Pasteur	<b>Invitée</b>

*À mes très chers parents,*

## **Remerciements**

*Je souhaite remercier en premier lieu et chaleureusement mon directeur de thèse, M. Antoine PALLANDRE, pour avoir dirigé la deuxième partie de ma thèse. Qu'il soit aussi remercié pour son soutien, sa disponibilité pour la correction de ce manuscrit et pour les nombreux conseils et encouragements qu'il m'a prodigués. J'associe à ces remerciements, ma co-directrice, Mme. Claire SMAJDA pour l'attention et le temps qu'elle a consacré à la relecture de ce manuscrit, qui a bénéficié de ses remarques. Je la remercie également de son suivi et de son aide à mon initiation à de nouvelles stratégies analytiques ainsi que pour tous nos échanges scientifiques qui ont été très enrichissants.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement M. Philippe MAITRE, Directeur du Laboratoire de Chimie physique pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je lui suis très reconnaissante pour son soutien et son aide pour la réalisation de ce travail.*

*J'adresse de chaleureux remerciements à M. Guillaume VAN DER REST, pour la relecture de la partie expérimentale de ce travail et pour tous ses commentaires très pertinents. Je tiens à le remercier pour tous les moments qu'il a consacré à discuter et à me donner des conseils.*

*Un grand merci à M. Frédéric HALGAND, pour son accompagnement depuis le début de ma thèse, pour m'avoir formée sur l'instrument que j'ai utilisé lors de mes analyses, pour son aide dans l'interprétation de mes résultats et pour toutes les discussions scientifiques qui m'ont beaucoup aidé pendant mon travail. Il m'a beaucoup appris, j'ai apprécié sa sympathie.*

*Je souhaite également remercier l'ensemble des membres du jury. Mme. Marie-Claude MENET, Maître de conférences de l'Université Paris Descartes, et Mme. Emmanuelle LIPKA, Maître de conférences de l'Université de Lille, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse. Je tiens à remercier M. Thierry MARTENS, Professeur des universités de l'Université Paris-Est Créteil, d'avoir accepté d'être président du jury. Je tiens à remercier Mme. Danielle LIBONG, Maître de conférences de l'université Paris-Sud, pour avoir honoré et accepté d'examiner mon travail. Je remercie également Mme. Anne-Marie WEHENKEL, Chercheuse permanente à l'Institut Pasteur, d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail.*

*J'adresse mes remerciements à tous les membres de l'équipe de M. Carsten JANKE de l'Institut Curie pour m'avoir accueillie dans le cadre de notre collaboration pendant ma première année de thèse. J'ai appris de nouvelles techniques et cela m'a permis de m'ouvrir à de nouveaux domaines de recherche.*

*Je remercie tous mes collègues qui m'ont apporté leur soutien moral pendant ces années d'études, André, Vitor, Aïcha, Sarah, Teseer, Eskander, Jan, je les en remercie sincèrement.*

*A titre plus personnel, je remercie chaleureusement ma sœur Aya, pour la grande patience, l'encouragement et le soutien moral. Je tiens à la remercier surtout pour sa confiance tout le long de ma thèse. Je suis très reconnaissante à ma meilleure amie Yasmine, pour son soutien et son encouragement ininterrompus. Je tiens à la remercier profondément pour le temps qu'elle a consacré pour relire des passages de mon manuscrit malgré la charge de travail qu'elle avait. Je remercie mon frère Aymen, pour son énergie toujours positive et nos aventures qui m'ont motivé durant ce travail.*

*Je remercie également les gens qui m'ont fait vivre des moments difficiles pendant ma thèse, ils m'ont beaucoup appris et c'est grâce à eux qu'aujourd'hui je suis plus forte. Je leur dois mon succès.*

*Pour finir, je suis redevable à mes parents, pour leur soutien moral et matériel et leur confiance indéfectible dans mes choix. Je remercie mon père pour toutes les nuits qu'il a passé à m'aider à l'élaboration de ce manuscrit avec la bonne mise en page. Je tiens à le remercier profondément pour son amour, ses conseils et ses mots précieux d'encouragement. Je remercie ma mère qui m'a gratifié de son amour et donné la motivation pour aboutir à ce travail. Je leur adresse toute ma gratitude du fond du cœur*

## Sommaire

<i>Introduction générale</i> .....	13
<i>Étude bibliographique</i> .....	17
<i>Chapitre 1 Étude bibliographique sur les tubulines</i> .....	18
<b>I. Les tubulines</b> .....	<b>18</b>
1. Les tubulines $\alpha$ et $\beta$ . .....	18
2. La polymérisation des tubulines en microtubules.....	20
3. La face externe des microtubules.....	22
4. L'hétérogénéité de la tubuline.....	22
<b>II. Les modifications post-traductionnelles (MPT) des tubulines</b> .....	<b>22</b>
1. La détyrosination/tyrosination .....	23
2. Les tubulines $\Delta$ -2 et $\Delta$ -3 .....	24
3. La glutamylation et la glycylation .....	24
4. Les enzymes responsables des polymodifications.....	25
5. La complexité structurale des queues C-terminales des tubulines .....	28
<b>III. Techniques d'analyse des polymodifications des tubulines</b> .....	<b>30</b>
<i>Chapitre 2 Étude bibliographique sur l'hormone de croissance</i> .....	32
<b>I. L'hormone de croissance</b> .....	<b>32</b>
1. Le gène de l'hormone de croissance et ses produits .....	33
2. La structure de l'hormone de croissance humaine.....	34
3. Les modification post-traductionnelles .....	36
4. La sécrétion de l'hormone de croissance .....	37
5. La régulation de l'hormone de croissance.....	37
6. L'hormone de croissance dans le sang.....	40
7. Les effets de l'hormone de croissance .....	41
8. L'hormone de croissance humaine recombinante.....	43
<b>II. Le dopage</b> .....	<b>44</b>
1. Histoire .....	44
2. Agents dopants.....	45
3. Détection du dopage à l'hormone de croissance .....	45
<i>Chapitre 3 Instrumentation</i> .....	49

<b>I.</b>	<b>La spectrométrie de masse.....</b>	<b>49</b>
1.	La source d'ionisation .....	49
2.	L'analyseur .....	50
3.	La spectrométrie de masse en tandem.....	53
<b>II.</b>	<b>La spectrométrie de masse à mobilité ionique .....</b>	<b>55</b>
1.	La spectrométrie de mobilité ionique.....	55
2.	La théorie.....	57
3.	Le couplage de la mobilité ionique à la spectrométrie de masse (IMMS).....	57
4.	La fragmentation en phase gazeuse .....	62
<b>III.</b>	<b>La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....</b>	<b>62</b>
1.	La chromatographie liquide en phase inverse (RP-CLHP) .....	62
2.	Couplage avec la spectrométrie de masse .....	63
<i>Chapitre 4 Matériels et méthodes.....</i>		<i>64</i>
<b>I.</b>	<b>Matériel biologique et purification des tubulines à partir de cerveau de porc .....</b>	<b>64</b>
1.	Production des peptides C-terminaux des tubulines .....	65
<b>II.</b>	<b>Spectrométrie de masse à mobilité ionique .....</b>	<b>66</b>
1.	Matériel synthétique.....	66
2.	Préparation de l'échantillon .....	67
3.	Spectrométrie de masse en tandem .....	67
4.	Conditions de la source d'ionisation.....	67
5.	Conditions du TWIMS.....	67
<b>III.</b>	<b>Hormones de croissances .....</b>	<b>68</b>
<b>IV.</b>	<b>Ultrafiltration.....</b>	<b>68</b>
<b>V.</b>	<b>Analyse de spectrométrie de masse des hormones de croissances.....</b>	<b>68</b>
<b>VI.</b>	<b>Digestion enzymatique de l'hormone de croissance.....</b>	<b>69</b>
<b>VII.</b>	<b>Chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse</b>	<b>69</b>
<i>Travaux de thèse .....</i>		<i>71</i>
<i>Chapitre 5 Caractérisation des polymodifications des tubulines.....</i>		<i>72</i>
<b>I.</b>	<b>Vérification structurale des peptides synthétiques .....</b>	<b>72</b>
<b>II.</b>	<b>Séparation par mobilité ionique des peptides isomères .....</b>	<b>74</b>
1.	Identification des peptides isomères séparés par mobilité ionique.....	75
2.	Optimisation des paramètres de mobilité ionique.....	78
3.	Analyse de mobilité ionique avec des paramètres conventionnels.....	80

<b>III.</b>	<b>Vérification structurale de la synthèse de peptides glyclés</b> .....	<b>82</b>
<b>IV.</b>	<b>Analyses de peptides de tubulines polyglutamylées</b> .....	<b>88</b>
1.	Purification des peptides C-terminaux de tubulines .....	88
2.	Spectrométrie de masse des peptides C-terminaux des tubulines.....	90
<b>V.</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>93</b>
<i>Chapitre 6 Analyse de l'hormone.....</i>		<i>94</i>
<i>de croissance par spectrométrie de masse.....</i>		<i>94</i>
<b>I.</b>	<b>Les préparations d'hormone de croissance humaine (hGH) étudiées.....</b>	<b>94</b>
<b>II.</b>	<b>Ultrafiltration et préparation d'échantillon pour l'analyse de spectrométrie de masse</b> .....	<b>94</b>
<b>III.</b>	<b>Analyse de spectrométrie de masse de l'hormone de croissance GH.....</b>	<b>95</b>
1.	L'hormone de croissance naturelle .....	95
2.	Les hormones de croissance recombinantes .....	96
<b>IV.</b>	<b>Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse RP-HPLC-MS</b> .....	<b>99</b>
3.	Optimisation des conditions de la chromatographie liquide en phase inverse .....	99
4.	Analyse de l'hormone de croissance humaine hGH par RP-HPLC-MS.....	104
<b>V.</b>	<b>Digestion protéolytique de l'hormone de croissance.....</b>	<b>114</b>
5.	Analyse LC-MS de digestats d'hormones de croissance .....	116
6.	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	119
<b>VI.</b>	<b>Conclusion :</b> .....	<b>121</b>
<i>Conclusion et perspectives</i> .....		<i>122</i>
<i>Références</i> .....		<i>126</i>

## **Table des figures**

<i>Figure 1 - Hétérogénéité des tubulines <math>\alpha</math> et <math>\beta</math>.</i>	19
<i>Figure 2 - La polymérisation des tubulines en microtubules.</i>	21
<i>Figure 3 - Les différentes modifications post- traductionnelles des tubulines.</i>	23
<i>Figure 4 - La famille des TLL.</i>	26
<i>Figure 5 - Les différentes TLL et leurs spécificités.</i>	27
<i>Figure 6 - Les enzymes impliquées dans les modifications post-traductionnelles de tubulines.</i>	28
<i>Figure 7 - Exemple d'isomérisation de polymodifications de tubulines.</i>	29
<i>Figure 8 - Séquence de l'hormone de croissance humaine.</i>	33
<i>Figure 9 - Cluster des gènes de l'hormone de croissance humaine.</i>	34
<i>Figure 10 - La structure tridimensionnelle de l'hormone de croissance humaine.</i>	35
<i>Figure 11 - Sites de fixation de la GH à son récepteur.</i>	36
<i>Figure 12 - Régulation de la sécrétion de la GH.</i>	38
<i>Figure 13 - Tissus-cibles de l'hormone de croissance.</i>	41
<i>Figure 14 - Effets directs et indirects de l'hormone de croissance.</i>	43
<i>Figure 15 - Représentation du principe d'une expérience de spectrométrie de masse.</i>	49
<i>Figure 16 - Représentation schématique du processus de l'ionisation par électrospray</i>	50
<i>Figure 17 - Principe de l'analyse de temps de vol (T-o-F) en présence d'un réflectron.</i>	52
<i>Figure 18.- Schéma d'une cellule de FT-ICR.</i>	52
<i>Figure 19 - Principe de la spectrométrie en tandem. L'étape MSI consiste à analyser</i>	54
<i>Figure 20 - Nomenclature des fragments peptidiques les plus communs en fragmentation</i>	55
<i>Figure 21 - Principe de la séparation par mobilité ionique.</i>	56
<i>Figure 22 - Schéma du SRIG de la cellule de mobilité TWIMS. Adapté de [1].</i>	58
<i>Figure 23 - Schéma descriptif d'un spectromètre de masse à mobilité ionique [2].</i>	59
<i>Figure 24 - Schéma du StepWave.</i>	60
<i>Figure 25. – Schéma descriptif de la purification des tubulines à partir de cerveaux de porc.</i>	65
<i>Figure 26 - Peptides de synthèse diglycylés.</i>	72
<i>Figure 27 - Spectres de masse de peptides isomères de structure.</i>	73
<i>Figure 28 - Spectres de fragmentation en phase gazeuse.</i>	74
<i>Figure 29 - Spectre de mobilité ionique d'un mélange 50%/50% de deux peptides isomériques diglycylés.</i>	75

<i>Figure 30 - Spectre de fragmentation CID après parcours de la cellule de mobilité -- ion précurseur au temps de dérive court</i> .....	76
<i>Figure 31 - Spectre de fragmentation CID après parcours de la cellule de mobilité -- ion précurseur au temps de dérive long.</i> .....	77
<i>Figure 32 - Profil incorrect de séparation en mobilité ionique.</i> .....	79
<i>Figure 33 - Séparation de mobilité correcte. Les ions sont entre 20 et 180 bins</i> .....	79
<i>Figure 34 - Comparaison entre les profils de mobilité ionique des peptides glycylysés, sur deux sites et un seul site et le mélange des deux.</i> .....	81
<i>Figure 35 - Peptides synthétiques avec des motifs de glycylation.</i> .....	82
<i>Figure 36 - Spectre de fragmentation CID du peptide contrôle</i> .....	83
<i>Figure 37- Spectre de fragmentation CID du peptide pep1-G (monoglycylé).</i> .....	84
<i>Figure 38 - Spectre de fragmentation CID du peptide pep1-GG (diglycylé).</i> .....	84
<i>Figure 39 - Spectre de fragmentation CID du peptide pep2-G (monoglycylé).</i> .....	85
<i>Figure 40- Spectre de fragmentation CID du peptide pep2-GG (diglycylé).</i> .....	86
<i>Figure 41 - Spectre de fragmentation CID du peptide pep3-G (monoglycylé).</i> .....	87
<i>Figure 42 - Spectre de fragmentation CID du peptide pep3-GG (diglycylé).</i> .....	87
<i>Figure 43 - Chromatographie échangeuse d'ions du mélange de digestion des tubulines.</i> .....	89
<i>Figure 44 - Spectres de masse de 4 fractions éluant à 600 mM de sel (rapport E/S de 1/400) superposés dans le logiciel mMass.</i> .....	90
<i>Figure 45 - Fractions chromatographiques avec différents niveaux de glutamylation observés par spectrométrie de masse</i> .....	92
<i>Figure 46 - Spectre de masse de l'hormone de croissance pituitaire.</i> .....	96
<i>Figure 47 - Spectre de masse de l'hormone de croissance saisie de douane (G).</i> .....	97
<i>Figure 48 - Spectre de masse de la GH (N). Ce spectre a été obtenu après ultrafiltration.</i> .....	97
<i>Figure 49 - Spectre de masse de la hGH (N).</i> .....	98
<i>Figure 50 - Chromatogrammes de la hGH (G).</i> .....	100
<i>Figure 51 - Chromatogrammes de RP-HPLC de la hGH pituitaire.</i> .....	101
<i>Figure 52 - Chromatogrammes de phase inverse d'hormones de croissance analysées avec une colonne C18. A.</i> .....	103
<i>Figure 53 - Spectre de masse correspondant au pic <math>t_r=29.33</math> min de la figure 38.</i> .....	104
<i>Figure 54 - Analyse RP-HPLC de préparations de hGH.</i> .....	105
<i>Figure 55 - Analyse spectrométrie de masse de différentes préparations de hGH.</i> .....	107
<i>Figure 56 - Spectres de masse de l'état de charge 13+ des 3 hormones de croissance</i> .....	108

<i>Figure 57 - Spectre de l'hormone de croissance pituitaire, pic * (tr=26.9 min) de la chromatographie de la figure 53. ....</i>	<i>109</i>
<i>Figure 58 - Spectres de masse du pic 2 des chromatogrammes A et B de la figure 53.....</i>	<i>111</i>
<i>Figure 59 - Spectre de masse de l'état de charge 13+ du pic chromatographique 2 de la figure 53. ....</i>	<i>112</i>
<i>Figure 60 - Chromatogramme de l'hormone de croissance saisie de douane (G). ....</i>	<i>113</i>
<i>Figure 61 - Spectre de masse de l'état de charge 13 + de hormone de croissance sous le pic 3 de la figure 53.....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 62 - Carte de clivage de l'hormone de croissance par la trypsine. ....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 63 - Spectres de masse des digestats d'hormone de croissance. ....</i>	<i>116</i>
<i>Figure 64 - Chromatogrammes RP-HPLC de digestat d'hormone de croissance naturelle. ....</i>	<i>117</i>
<i>Figure 65 - Chromatogrammes RP-CLHP de digestat d'hormone de croissance saisie de douane (G).....</i>	<i>118</i>
<i>Figure 66 - Spectre de masse du digestat de l'hormone de croissance saisie de douane (G). ....</i>	<i>119</i>
<i>Figure 67 - Spectre MS/MS du peptide oxydé T2 m/z 489,24, z=2. ....</i>	<i>120</i>
<i>Figure 68 - Spectre MS/MS du peptide oxydé T11 at m/z 689,33, z=2. ....</i>	<i>120</i>

### **Liste des tableaux**

<i>Tableau 1- Gradient CLHP en phase inverse pour séparer les peptides de la hGH.....</i>	<i>70</i>
<i>Tableau 2- Les valeurs m/z de quelques peptides C-terminaux de tubulines avec leurs différents états de glutamylation. On retrouve des adduits sodium sur certains peptides. L'intensité de chaque peptide diffère selon son état de glutamylation.....</i>	<i>91</i>

## *Glossaire*

- AMPc : adénosine monophosphate cyclique
- AMA : Agence mondiale anti-dopage
- AFLD : Agence française de lutte contre le dopage
- ATP: adenosine triphosphate
- BRB80 : Brinkley BR Buffer 1980
- CCP : carboxypeptidase
- CCS: collision cross section (Section efficace de collision)
- CID: collision induced dissociation (Dissociation induite par la collision)
- CE: collision energy (énergie de collision)
- EGTA : ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid.
- ESI: electrospray ionization (électronébulisation)
- GDP: Guanosine diphosphate
- GH: Growth hormone (Hormone de croissance)
- GHBP: Growth hormone binding protein (Protéine de liaison de l'hormone de croissance)
- GHIH : Growth hormone inhibiting hormone (Protéine d'inhibition de l'hormone de croissance)
- GHRH : Growth hormone releasing hormone (Hormone de libération de l'hormone de croissance)
- GHRP: Growth hormone releasing peptides (Peptides de libération de l'hormone de croissance)
- GHS: Growth hormone secretagogues (Sécrétagogues de l'hormone de croissance)
- GHS-R: Growth hormone secretagogues receptor (Récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance)
- GTP: Guanosine triphosphate
- bGH: bovine Growth hormone (Hormone de croissance bovine)
- eGH: equine Growth hormone (Hormone de croissance équine)
- hGH: human Growth hormone (Hormone de croissance humaine)
- HPLC: High performance liquid chromatography (Chromatographie liquide à haute performance)
- IGF-1: Insulin-like growth factor 1 (Facteur de croissance analogue à l'insuline 1)
- LBM: Lean body mass (masse maigre)
- MALDI: matrix-assisted laser desorption ionization (Désorption-ionisation laser assistée par matrice)
- MAPs : microtubules associated proteins (Protéines associées aux microtubules)
- MS: mass spectrometry (Spectrométrie de masse)
- MS/MS: tandem mass spectrometry (Spectrométrie de masse en tandem)

pI: point isoélectrique

K-PIPES : Acide pipérazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonique) dans KOH.

P-III-NP : N-Terminal propeptide of type III collagen (propeptide N-terminal du procollagène de type III )

SRIF: Somatotropin release-inhibiting factor (Facteur inhibant la libération de somatotropine)

SRIG: Stacked ring ion guide (Guide à ions)

rbGH: recombinant bovine Growth hormone (Hormone de croissance bovine recombinante)

reGH: recombinant equine Growth hormone (Hormone de croissance équine recombinante)

rhGH: recombinant human Growth hormone (Hormone de croissance humaine recombinante)

RPLC: Reversed-phase liquid chromatography (Chromatographie liquide en phase inverse)

TRH: Thyrotropin releasing hormone (Hormone de libération de la thyrotropine)

TTL : Tubulin tyrosine ligase (Tubuline tyrosine ligase)

TTLLs : Tubulin tyrosine ligase like (Tubuline tyrosine ligase analogue)

TWIMS: Travelling wave ion mobility spectrometry (Spectrométrie de masse à mobilité ionique de type TWIMS)

## *Introduction générale*

Ces vingt dernières années, la spectrométrie de masse a montré de manière évidente son importance pour l'analyse biochimique [3]. Celle-ci est devenue un outil ~~d'excellence~~ pour l'identification et la caractérisation des biomolécules. L'invention des deux méthodes d'ionisation MALDI (Matrix-assisted laser desorption ionization) et ESI (electrospray ionization) a permis l'analyse fine de molécules comme les peptides et les protéines par spectrométrie de masse [4], [5]. Le développement de ces méthodes d'ionisation douce pour l'identification et l'analyse structurale des macromolécules biologiques fut le sujet du prix Nobel de chimie en 2002.

Les applications de la spectrométrie de masse dans les sciences biologiques sont nombreuses. Ainsi, les macromolécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les sucres et les lipides ont pu être identifiées et caractérisées structurellement. La spectrométrie de masse est aussi une technique de routine dans la protéomique [6]. En effet, le séquençage des peptides et la présence de banques de données [7], [8] ont permis l'identification des protéines isolées ou présentes dans des mélanges biologiques complexes telles que le plasma. La spectrométrie de masse des protéines a non seulement permis leur identification mais a aussi évolué vers des caractérisations structurales plus complètes [9]. Ainsi, elle est actuellement un outil primordial dans la caractérisation des modifications post-traductionnelles des protéines [10].

Le couplage de la spectrométrie de masse avec des méthodes séparatives telles que l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide ont permis la séparation des composés constituant un mélange en amont de l'analyse. Le couplage de la spectrométrie de masse à la mobilité ionique a permis un avancement majeur pour la caractérisation des structures protéiques. La spectrométrie de mobilité ionique est une technique qui sépare les ions en fonction de leurs charges et leurs conformations. Ainsi, en couplant la spectrométrie de masse (MS) à la spectrométrie de mobilité ionique (IMS), des isomères de structures peuvent être séparés [2]. La spectrométrie de masse à mobilité ionique (IMS-MS) est devenue rapidement un outil important pour l'analyse des molécules biologiques comme les peptides,

les protéines et les sucres [11]. En effet, grâce à l'IMS-MS, il est devenu possible de différencier entre les anomères de sucres [12], les isomères de peptides et les isoformes conformationnelles des protéines [13].

La caractérisation de la structure d'une protéine est d'une grande importance car elle est directement liée à ses fonctions biologiques [14]. Par exemple, les moteurs moléculaires sont les protéines responsables des mouvements dans les cellules en transformant l'énergie chimique en énergie mécanique [15]. Les microtubules sont des moteurs moléculaires du cytosquelette. Ils interagissent avec les autres moteurs protéiques et sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires comme le transport et la division cellulaire. Les tubulines, constituants des microtubules ont des structures très complexes qui probablement participent aux fonctions de ces moteurs moléculaires [16]. En effet, les tubulines sont le siège de polymodifications post-traductionnelles (polyglutamylation et polyglycylation) qui peuvent générer des isomères de structure. La capacité de la spectrométrie de masse couplée à la mobilité ionique qui est de séparer les molécules selon leurs conformations, peut permettre une avancée pour la caractérisation des modifications post-traductionnelles de la tubuline.

Le couplage de la spectrométrie de masse à d'autres techniques séparatives a diversifié les domaines d'applications de cette technique. Son couplage à des techniques séparatives comme la chromatographie et l'électrophorèse fait qu'elle est maintenant une méthode couramment utilisée dans les domaines de l'analyse pharmaceutique et de la toxicologie.

Le domaine de la biotechnologie pharmaceutique s'est considérablement développé ces dernières années, se focalisant notamment sur la synthèse des protéines recombinantes. L'hormone de croissance humaine (hGH) est une des premières protéines qui a été produite par l'industrie pharmaceutique. Elle est principalement utilisée dans le traitement de la déficience à l'hormone de croissance chez les enfants et les adultes. La production de l'hormone de croissance à l'échelle industrielle a augmenté sa disponibilité pour les malades mais aussi pour les sportifs qui ont abusé à des fins de dopage. Le dopage est une pratique interdite pour tout sportif participant à une compétition. Cependant, la détection du dopage à la hGH est toujours une tâche difficile. En effet, la protéine recombinante est très similaire à sa forme endogène. Jusqu'à 2004, le dopage à la GH était considéré indétectable, aujourd'hui,

les tests anti-dopage approuvés par l'agence mondiale d'anti-dopage présentent plusieurs limites. D'une part, des limites liées à la détection par immunologie et d'autre part, des limites liées à la sécrétion et à la régulation de la GH au niveau de son expression et son métabolisme. Il est donc indispensable de développer de nouvelles méthodes pour la détection du dopage à la hGH. Dans ce contexte, des méthodes analytiques comme la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse peuvent représenter une alternative prometteuse aux méthodes de détection de la GH utilisées à l'heure actuelle.

Durant mon doctorat, j'ai travaillé sur la caractérisation structurale de deux protéines par spectrométrie de masse. La première est la tubuline, avec pour objectif une meilleure compréhension des modifications post-traductionnelles très particulières de cette protéine. La deuxième partie de ma thèse concerne l'hormone de croissance, cette protéine est présente sous une forme recombinante sur le marché pharmaceutique et pose un problème quant à son utilisation comme un agent dopant dans le sport. Ces travaux seront présentés dans cinq chapitres.

Le premier chapitre est une étude bibliographique sur les tubulines. La première partie porte sur la famille des tubulines, les modifications post-traductionnelles relatives et leur complexité. Dans un deuxième temps, nous présenterons les techniques qui ont été utilisées pour l'étude de ces poly-modifications. Finalement, nous introduirons le couplage de la spectrométrie de masse à la mobilité ionique.

Le second chapitre est une étude bibliographique sur l'hormone de croissance. Ce chapitre est divisé en deux parties. La première partie est dédiée à l'hormone de croissance, son gène et sa structure, ainsi que sa sécrétion, sa régulation et ses actions. La deuxième partie, s'intéresse au dopage dans les sports ; son histoire, les agents dopants et les tests antidopages de l'hormone de croissance.

Le troisième chapitre est une présentation de l'instrumentation et des méthodes d'analyse qui ont été utilisées durant cette thèse. Il décrit la spectrométrie de masse, son mode de fonctionnement et son couplage avec d'autres techniques analytiques dont la mobilité ionique et la chromatographie liquide.

Le quatrième chapitre portera sur les résultats de l'analyse des polymodifications des tubulines. Dans la première partie est abordée l'analyse de peptides synthétiques de tubuline modifiée par spectrométrie de masse couplée à la mobilité ionique. La seconde partie détaillera l'optimisation des paramètres techniques de mobilité ionique. Dans une troisième partie, des travaux sur des tubulines biologiques seront présentés.

Les travaux sur l'hormone de croissance seront présentés dans le cinquième chapitre. Différents lots d'hormones de croissance naturelles et synthétiques ont été caractérisés par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide en phase inverse.

Une conclusion générale sur l'ensemble de ces travaux termine ce manuscrit, et des perspectives seront proposées.

## *Étude bibliographique*

## ***Chapitre 1 Étude bibliographique sur les tubulines***

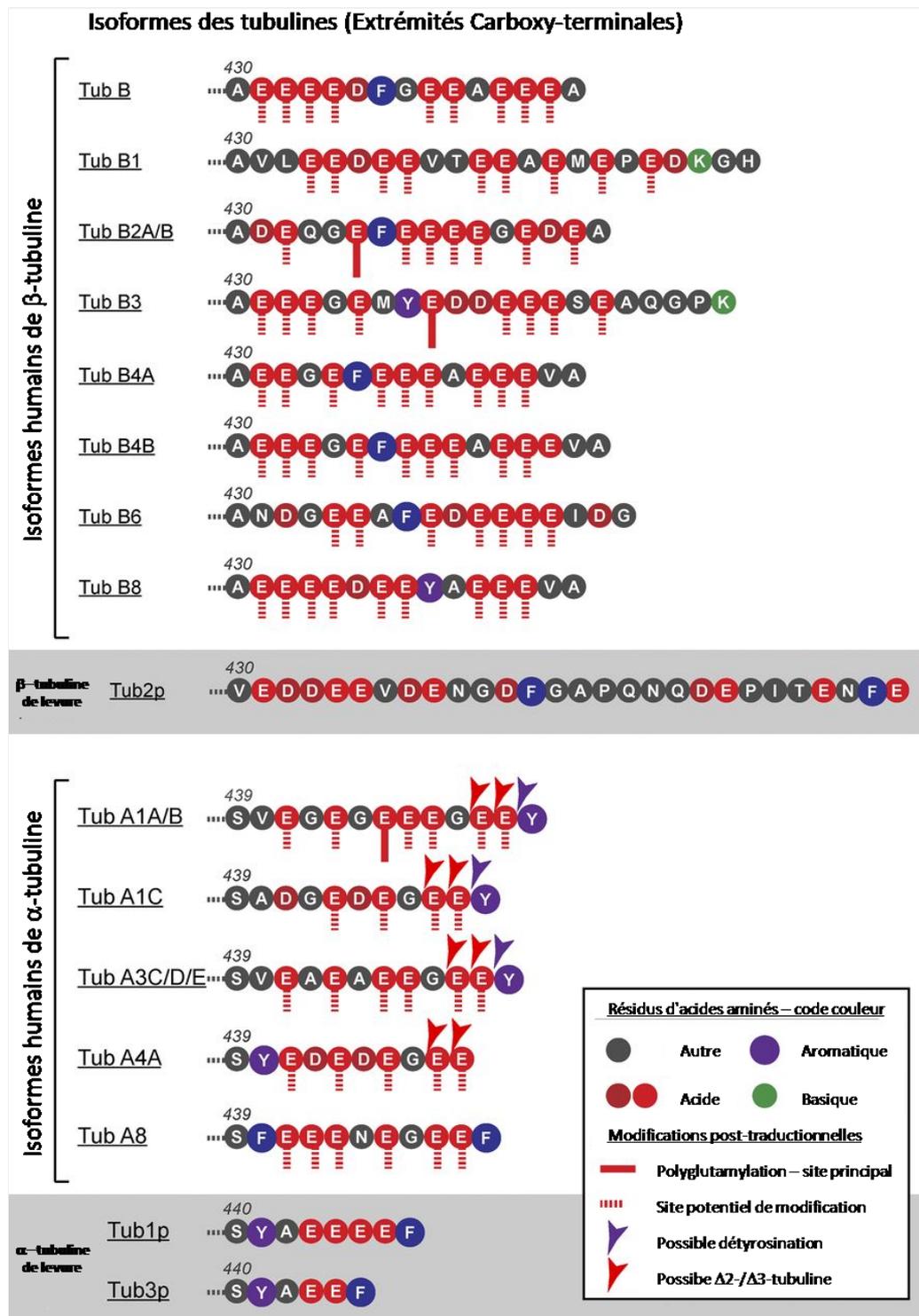
Les tubulines sont des protéines structurales qui forment les microtubules. Les microtubules sont des composantes importantes du cytosquelette de la cellule. Ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme le mouvement cellulaire et la division cellulaire (mitose).

### ***I. Les tubulines***

Les tubulines sont des protéines qui forment une super-famille de protéines. Cette superfamille est composée de six familles,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\sigma$ ,  $\varepsilon$ , et  $\eta$ -tubuline [17]. Dans ce chapitre, on va s'intéresser seulement aux tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ .

#### ***1. Les tubulines $\alpha$ et $\beta$ .***

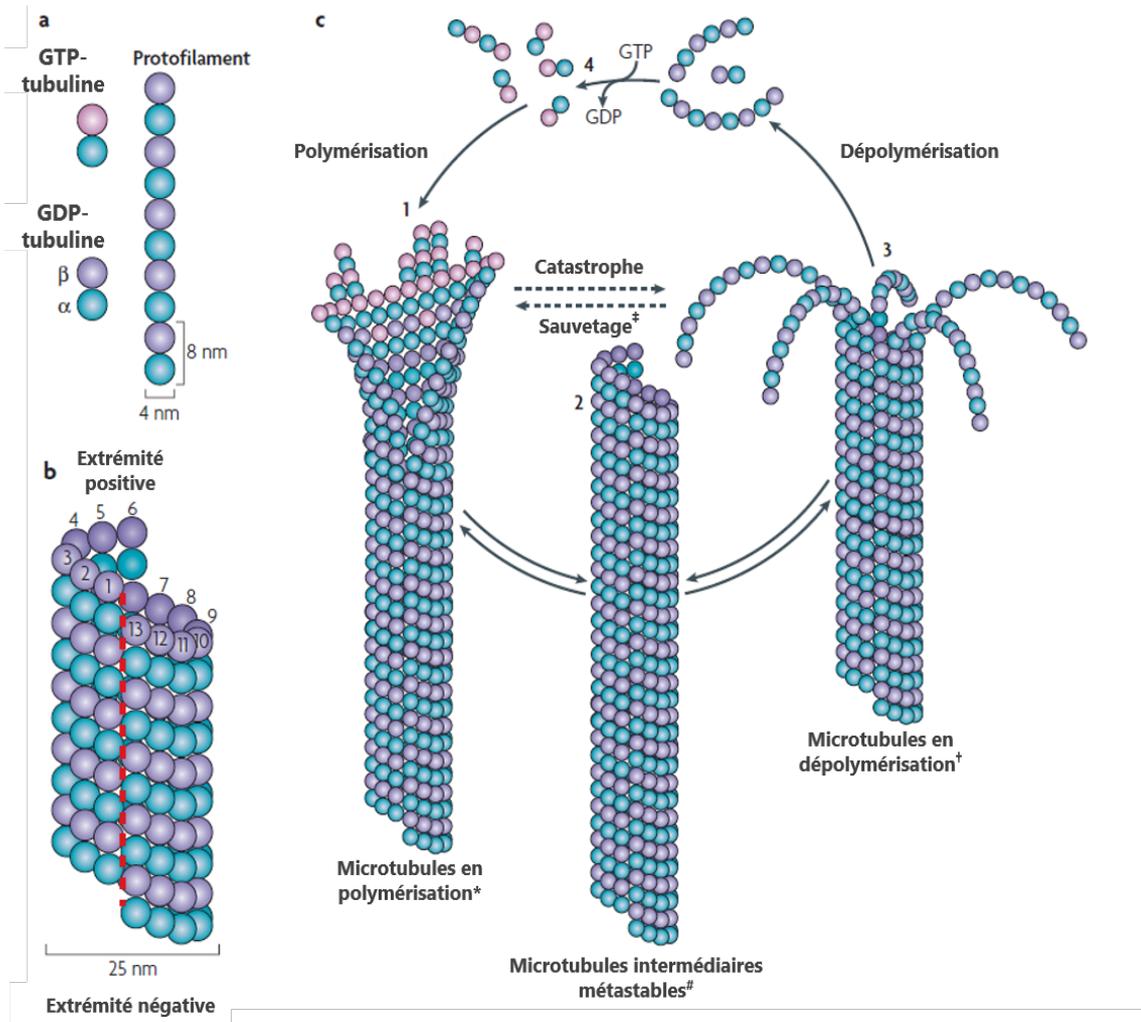
Ces deux familles de tubulines regroupent 13 protéines de 55 kDa chacune (figure 1). Les séquences d'acides aminés des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  sont conservées chez toutes les espèces et ne présentent que de subtiles différences, la majeure divergence se trouve au niveau C-terminal [18] (cf. figure 1). La tubuline  $\alpha$  et la tubuline  $\beta$  s'associent en hétérodimères  $\alpha\beta$ . Ces dimères constituent l'unité structurale du microtubule.



**Figure 1. - Hétérogénéité des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ .** Les extrémités C-terminales de tous les gènes de tubulines humaines sont présentées avec leurs modifications post-traductionnelles possibles. Le site principal et les sites qui peuvent être modifiés sont indiqués. Les différentes modifications post-traductionnelles indiquées vont être expliquées dans la partie II. Les extrémités C-terminales des tubulines de levure sont divergentes (adapté d'après [19]).

## ***2. La polymérisation des tubulines en microtubules***

Les dimères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  constituent les briques élémentaires du microtubule. Les microtubules sont des hétéropolymères composés d'hétérodimères stables d' $\alpha/\beta$ -tubulines. Ces derniers s'alignent de la tête à la queue pour former des protofilaments (Figure 2a). La paroi cylindrique et hélicoïdale des microtubules comprend généralement 13 protofilaments parallèles (Figure 2b). Le pas hélicoïdal de 12 nm en combinaison avec la répétition longitudinale de 8 nm entre les sous-unités de  $\alpha/\beta$ -tubuline le long d'un protofilament génèrent une discontinuité en surface de la paroi microtubulaire (lattice seam) (indiquée par les pointillés en rouge). L'assemblage-polymérisation et le désassemblage-dépolymérisation des microtubules (Figure 2c) sont entraînés par la liaison, l'hydrolyse et l'échange d'un nucléotide guanine (GTP : guanosine triphosphate) sur le monomère  $\beta$ -tubuline. La polymérisation est généralement amorcée à partir d'un pool de sous-unités de tubulines chargées en GTP (Figure 2c). Les feuilles de protofilaments aux extrémités des microtubules en polymérisation passent de la position légèrement repliée à une position droite. L'hydrolyse de GTP et la libération de phosphate inorganique se produisent peu après l'incorporation et sont favorisées par l'enfouissement et le verrouillage du nucléotide partiellement exposé à la suite de l'assemblage tête-bêche des dimères. Il a été suggéré que l'hydrolyse de GTP modifie la conformation d'un protofilament d'une tubuline-GTP légèrement courbée à une structure tubuline-GDP plus profondément courbée [20]. Ce modèle conformationnel nucléotides-dépendant prédit que la courbe tubuline-GDP reste droite forcément lorsqu'elle fait partie de la paroi microtubulaire. Les feuilles de microtubules en polymérisation maintiendraient une "coiffe" de sous-unités tubuline-GTP pour stabiliser la conformation droite de la tubuline à l'intérieur du microtubule lattice [21]. La fermeture de la structure de la feuille terminale génère des microtubules intermédiaires métastables à bouts arrondis (Figure 2c.2), qui peut faire une pause, subir une croissance supplémentaire ou passer à la phase de dépolymérisation. Les microtubules en dépolymérisation sont caractérisés par des réseaux en forme de fontaine contenant des structures annulaires et de protofilaments en spirale (Figure 2c.3). Ce changement de conformation, qui est vraisemblablement dirigé par la tubuline-GDP, peut déstabiliser les contacts latéraux entre protofilaments adjacents. Le cycle de polymérisation-dépolymérisation s'achève par l'échange du GDP avec du GTP par les produits du désassemblage. (Figure 2c).



**Figure 2. - La polymérisation des tubulines en microtubules.** *a*: les hétérodimères de tubulines s'associent de la tête à queue pour former un protofilament. *b*: microtubule formé par l'assemblage latéral de 13 protofilaments, l'association tête-à-queue des hétérodimères  $\alpha\beta$  confère aux microtubules une polarité avec un extrémité positive formée par les  $\beta$ -tubulines et une extrémité négative formée par les  $\alpha$ -tubulines. *c*: L'assemblage-polymérisation et le désassemblage-dépolymérisation de microtubules est assuré par la liaison et l'hydrolyse du GTP au niveau des tubulines  $\beta$  (adapté de [22]).

### ***3. La face externe des microtubules***

Les extrémités C-terminales des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  restent libres sur la face externe des microtubules [23], ces extrémités ne se polymérisent pas en microtubules. Les extrémités C-terminales des tubulines ont une grande hétérogénéité et leurs différentes structures pourraient jouer des rôles importants dans les fonctions des microtubules, le transport cellulaire [19].

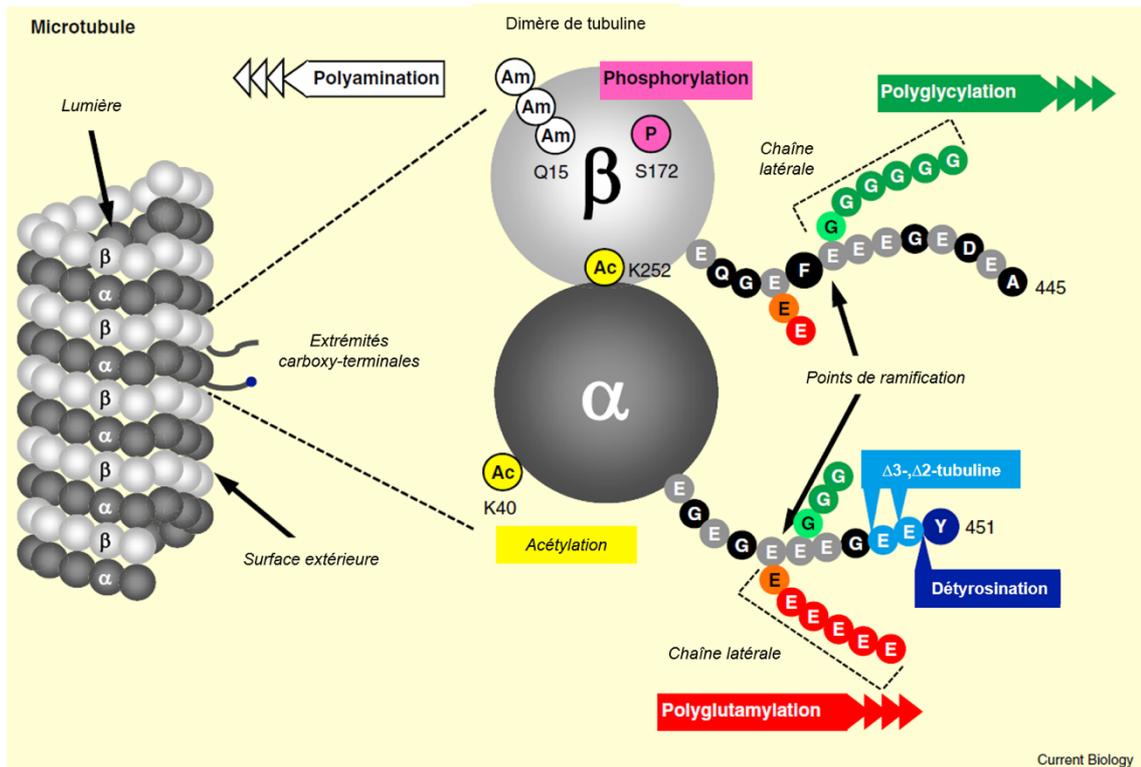
### ***4. L'hétérogénéité de la tubuline***

L'hétérogénéité de la tubuline est due à la présence de plusieurs gènes de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  et aussi à un nombre important de modifications post-traductionnelles [19].

Il existe treize gènes de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  [24]. Ces gènes donnent, après traduction, plusieurs isoformes de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ . Les différents isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  diffèrent principalement au niveau de leur extrémité C-terminales (voir figure 1). C'est sur cette région également que la plupart des modifications post-traductionnelles de tubulines se trouvent. Certaines modifications peuvent générer aussi différentes structures ce qui produit d'autres isoformes de tubulines.

## ***II. Les modifications post-traductionnelles (MPT) des tubulines***

De nombreuses modifications post-traductionnelles de tubulines ont été caractérisées (cf. figure 3). La grande majorité de ces modifications se produit essentiellement sur les extrémités C-terminales des tubulines [25].



**Figure 3. - Les différentes modifications post- traductionnelles des tubulines.** Le microtubule est formé par les parties globulaires des tubulines alors que les extrémités C-terminales sont exposées sur la surface externe du microtubule. Les modifications post-traductionnelles sont distribuées sur différentes régions de la tubuline: l'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline est présente sur deux sites, à la surface intérieure du microtubule et à l'interface  $\alpha$ -tubuline/ $\beta$ -tubuline. La polyamination (Am) et la phosphorylation (P) se retrouvent dans la partie globulaire de la tubuline  $\alpha$ . La détyrosination/tyrosination les tubulines  $\Delta 2$  et  $\Delta 3$  la polyglutamylaton et la polyglycylation sont exclusives aux extrémités C-terminales des deux tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  (adapté de [26]).

### 1. La détyrosination/tyrosination

Il s'agit d'un cycle d'excision et de réaddition de la tyrosine C-terminale de la tubuline  $\alpha$  [27] (voir figure 3, rectangles bleu clair). La détyrosylation est catalysée par une enzyme encore inconnue, qui appartient à une famille d'enzymes appelés CCPs (C-terminal carboxypeptidases) (figure 6) [28], [29]. Par contre l'enzyme de tyrosination appelée TTL (Tubulin tyrosine ligase) a été purifiée et clonée [30]. De manière intéressante, la CCP agit sur le microtubule [31] alors que la TTL n'agit que sur les dimères  $\alpha/\beta$  solubles [32]. La détyrosination participe à la stabilité des microtubules. En

effet, cette modification prévient la dépolymérisation de microtubules par les protéines moteurs de type kinase [33].

## **2. Les tubulines $\Delta$ -2 et $\Delta$ -3**

Les tubulines  $\Delta$ 2 ont vu le dernier résidu glutamate excisé côté C-terminal. Une fois que la tyrosine C-terminale de la tubuline  $\alpha$  est détyrosinée, le dernier glutamate de la séquence peptidique pourrait être clivé (voir figure 3, rectangle bleu foncé). Ce clivage bloque la tubuline à l'état détyrosiné [34]. Le rôle de cette modification est en synergie avec la détyrosination, elle est présente dans les microtubules stables des neurones [35]. L'enzyme responsable de cette modification est la CCP1 (figure 6) [36], membre de la famille des carboxypeptidases cytosoliques (CCPs). Récemment, il a été montré que cette enzyme peut aussi éliminer un deuxième résidu glutamate C-terminal des tubulines, donnant ainsi lieu à la tubuline  $\Delta$ -3 [37]. Les fonctions biochimiques des tubulines  $\Delta$ -2 et  $\Delta$ -3 ne sont pas encore connues. La seule fonction qu'on peut attribuer à ces tubulines est qu'elles participent à la stabilité des microtubules.

## **3. La glutamylation et la glycylation**

Ce sont deux polymodifications qui interviennent au niveau des extrémités C-terminales des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ . Elles consistent en l'ajout, sur des amino-acides glutamate, de résidus glutamate, dans le cas de la glutamylation, et de résidus glycine, dans le cas de la glycylation. Ces deux polymodifications peuvent générer une diversité structurale. En effet, plusieurs résidus de la structure primaire des tubulines peuvent être modifiés et plusieurs structures des chaînes additionnelles sont envisageables. Cette observation renforce l'idée que ces modifications jouent un rôle important dans la régulation des fonctions des microtubules et principalement dans leurs interactions avec les protéines associées aux microtubules (MAPs : microtubule-associated proteins) [38].

### ***La polyglutamylation***

Elle fut découverte dans les années 90 sur différentes isoformes de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  dans le cerveau des mammifères [39], [40]. La chaîne polyglutamate peut comporter jusqu'à six résidus. Selon la fonction des microtubules, le nombre de glutamates ajoutés varie. Par exemple, les microtubules centriolaires sont beaucoup plus polyglutamylés que les microtubules cytoplasmiques [41]. La polyglutamylation est importante pour la survie neuronale: Rogowski *et al.* ont montré en 2010 que l'hyperglutamylation

aboutissait à une dégénérescence de cellules neuronales [36]. L'affinité de la kinésine, de la protéine Tau, des MAP1B et MAP2 (membres de la famille des protéines associées au microtubule) est connue pour être optimale pour un niveau de polymodification triglutamylé [42]–[44]. La régulation de ces interactions se fait vraisemblablement grâce à l'augmentation de la charge négative au niveau de l'extrémité C-terminale des tubulines, qui est due aux groupements carboxylate des résidus glutamate additionnels. La polyglutamylolation a d'autres fonctions, dans le battement des cils cellulaires et dans la division cellulaire. En effet, elle régule les interactions des tubulines avec les moteurs moléculaires comme la dynéine des axonèmes [45] et elle est fortement présente dans l'anneau de cytokinèse [41].

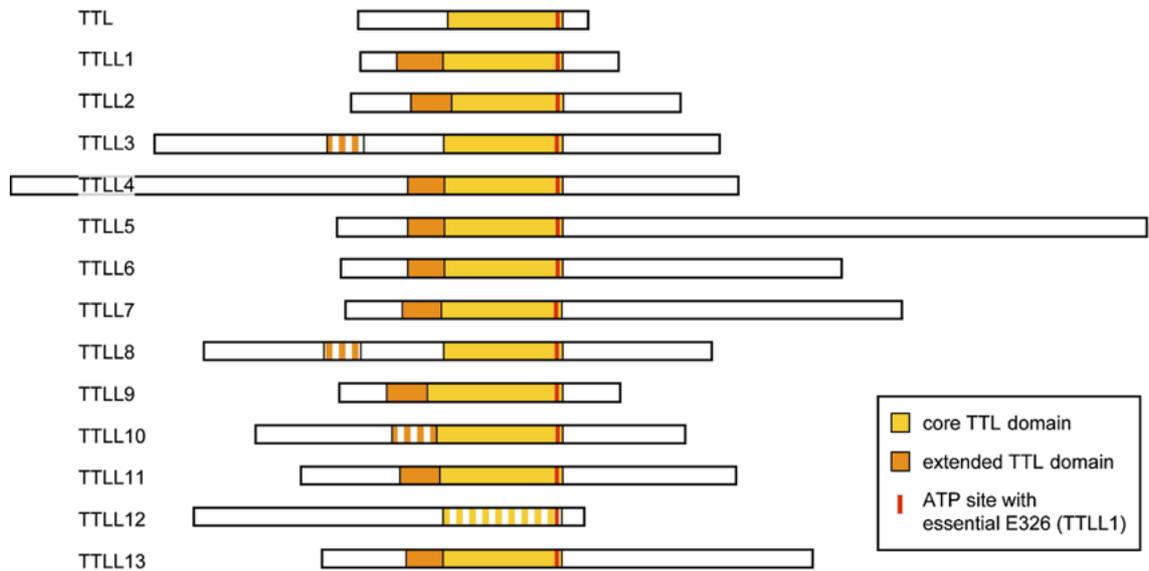
### ***La polyglycylation***

Cette polymodification, qui fut découverte après la polyglutamylolation, se produit sur les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  des axonèmes de différentes espèces [46]–[48]. La polyglycylation est exclusivement présente dans les cils cellulaires et les flagelles, ce qui suggère que cette polymodification joue un rôle crucial dans les fonctions de ces structures, en particulier la motilité. De nombreuses études ont montré que l'élimination des glycylasses (par knock out) ou la mutation de sites de polymodification au niveau de l'extrémité C-terminale des tubulines, conduit à la stérilité des mâles, probablement due à la perte de la mobilité du spermatozoïde. Ainsi, on pense que l'une des fonctions de la polyglycylation est la stabilisation des microtubules. En effet, Rogowski et al. ont montré en 2009 que l'extinction des gènes des glycylasses aboutissait au désassemblage des axonèmes à des stades tardifs de la spermatogenèse [32]. La polyglycylation est importante pour la maturation des cils cellulaires. En effet, l'élimination des enzymes responsables de la glycylation conduit à la perte des cils cellulaires matures des cellules épendymaires (cellules du système nerveux central) [49]. Comme pour la polyglutamylolation, la régulation de la polyglycylation implique deux types d'enzymes, les glycylasses et les déglycylasses.

## ***4. Les enzymes responsables des polymodifications***

Les enzymes de polymodification des tubulines sont nombreux et constituent une famille: les TTLLs (tubulin tyrosine ligase like). Leur appellation vient de l'homologie de séquence qu'ils partagent avec la première enzyme modifiante des tubulines, la tubuline tyrosine ligase (TTL) [50], [51]. En effet, le domaine catalytique des TTLLs,

tel qu'il est prédit par les algorithmes d'alignement de séquence, correspond au domaine catalytique de la tubuline tyrosine ligase (TTL). Ce domaine est divisé en deux parties, une partie commune à la TTL et aux TTLLs, dit domaine cœur (core TTL domain) et une partie spécifique des TTLLs, en N-terminal du premier, dit domaine étendu (extended TTL domain) (cf. figure 4).



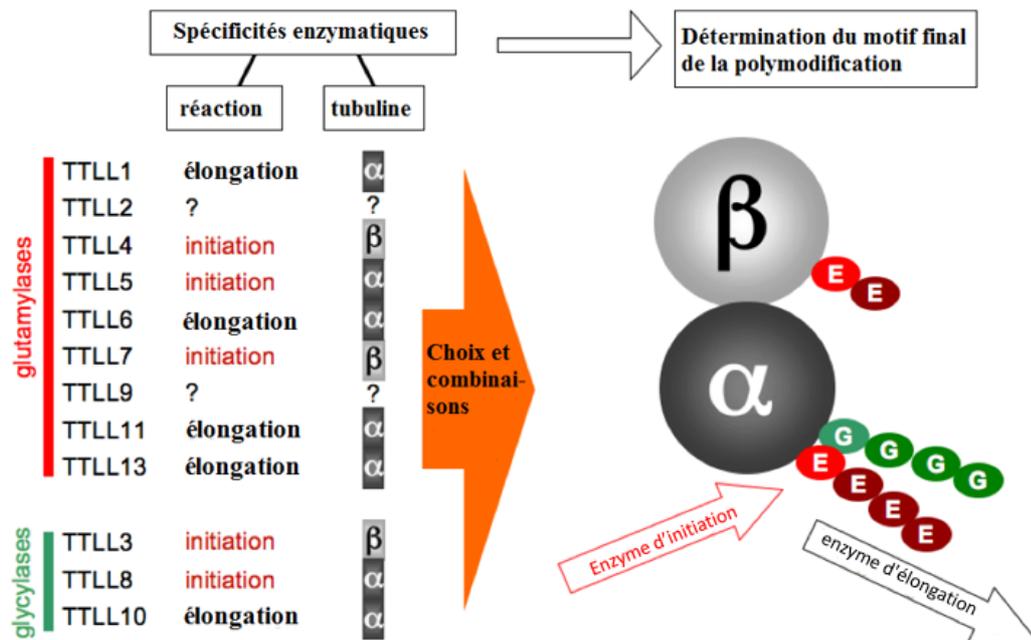
**Figure 4. - La famille des TTLL.** Les rectangles jaunes correspondent à la région dite « core TTL domain » qui est commune à la TTL et les TTLL, ce domaine est moins conservé chez la TTLL 1. Les rectangles oranges correspondent à la région dite « extended TTL domain » qui est spécifique au TTLL. Ce domaine est moins conservé chez les TTLL 3, 8 et 10 (rectangles oranges avec rayures blanches). La marque rouge correspond au site de la liaison à l'ATP (adapté de [51]).

Ces enzymes sont au nombre de 13: dix glutamylases et trois glycyllases. Les différentes spécificités de ces enzymes connues à ce jour, sont illustrées sur la figure 5.

### **Les glutamylases**

Ces enzymes catalysent la formation d'une liaison isopeptidique entre deux glutamates. La liaison implique le groupement  $\alpha$ - ou  $\gamma$ -carboxylate du glutamate qui précède dans la chaîne latérale, et le groupement  $\alpha$ -amine du nouveau résidu glutamate rajouté. Il ne peut s'agir que du  $\gamma$ -carboxylate dans le cas où la liaison implique le résidu glutamate de la chaîne principale de la tubuline [50], [51]. Les glutamylases se différencient par leur spécificité de substrat et la réaction qu'ils catalysent. Les TTLL1, TTLL5, TTLL6, TTLL11, TTLL13 ciblent l' $\alpha$ -tubuline, alors que les TTLL4 et TTLL7 modifient la  $\beta$ -

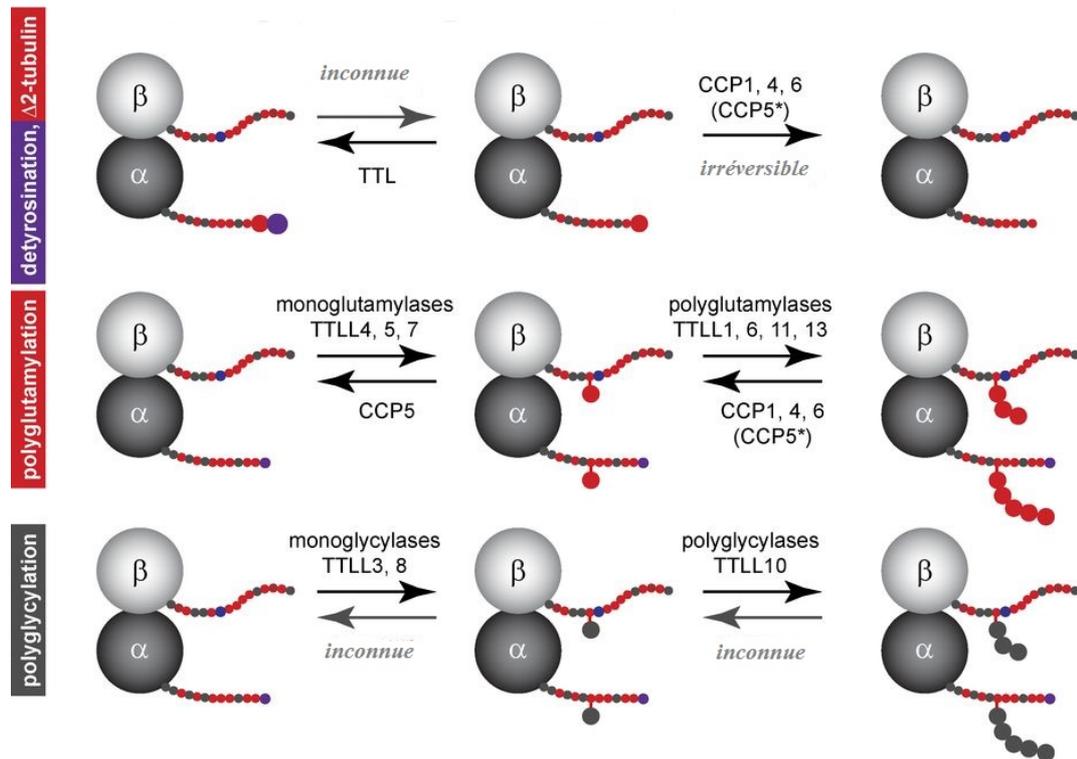
tubuline [51]. Il existe des glutamylases qui sont capables d'ajouter le premier résidu glutamate sur la chaîne principale des tubulines et des gultamylases qui allongent la chaîne glutamate latérale [51] (figures 5 et 6). Dans le système nerveux, la TTLL1 est une sous-unité d'un complexe protéique responsable de l'activité polyglutamylase [50].



**Figure 5. - Les différentes TTLL et leurs spécificités.** Ces enzymes sont caractérisés par leurs spécificités chimiques (glutamylase ou glycylase), structurale (initiation ou élongation) et de substrat (tubulines  $\alpha$  ou  $\beta$ ) (adapté de [19]).

### Les glycylases

Les glycylases sont des enzymes comparables aux glutamylases, à ceci près qu'ils ajoutent des résidus glycine et non pas des résidus glutamate. Ils ont été découverts dans les axonèmes des cils cellulaires [52]. Chez les mammifères, la polyglycylation est le produit d'une coopération entre une initiase (TTLL3 ou TTLL8) et une élongase (TTLL10) (figure 6). Chez la drosophile, en revanche, la TTLL3 est bifonctionnelle, car elle est dotée des activités initiase et élongase [52]. La TTLL10 humaine a perdu sa fonction polyglycylase [52], ce qui explique que l'on n'observe que de la monoglycylation dans le flagelle du spermatozoïde humain [53].



**Figure 6. - Les enzymes impliqués dans les modifications post-traductionnelles de tubulines. Détyrosination/ $\Delta$ 2-tubuline :** l'enzyme responsable de la détyrosination est inconnue mais celle qui catalyse la tyrosination est la TTL (tyrosin tubuline ligase), les CCP1,4 et 6 le dernier glutamate de la tubuline  $\alpha$  pour donner la  $\Delta$ 2-tubuline. **Polyglutamylation :** l'addition du point de branchement (premier glutamate ajouté) est catalysée par les TTL4, 5 et 7. L'élongation de la chaîne polyglutamate est catalysée par les TTL1, 6, 11 et 13. Les glutamates ajoutés peuvent être enlevés par les CCP1, 4 et 6 mais le point de branchement par la CCP5. **Polyglycylation :** la première glycine est ajoutée grâce à la TTL3 ou 8 alors que la TTL10 catalyse l'élongation de la chaîne polyglycine (adapté d'après [19]).

### 5. La complexité structurale des queues C-terminales des tubulines

La haute complexité des structures C-terminales polymodifiées (Figure 7) des tubulines est due à plusieurs facteurs. La polymodification peut être présente sur un seul glutamate de la séquence C-terminale de la tubuline, dans ce cas-là, la polymodification est dite linéaire (figure 7.a), ou alors plusieurs glutamates sont polymodifiés et dans ce cas-là, la polymodification est dite multisite (figure 7.c). La présence de branchements différents entre résidus de la chaîne latérale polyglutamate conduit à une



### ***III. Techniques d'analyse des polymodifications des tubulines***

Les polymodifications des tubulines ont été étudiées dès le début des années 90. A l'aide notamment de l'isoélectrofocalisation, qui sépare les polypeptides en fonction de leur point isoélectrique [54]. Différents types de chromatographie échangeuse d'ions et sur résine de phases inversée (principalement pour les peptides) ont également été employées. La spectrométrie de masse (sur les peptides) ainsi que le séquençage d'Edman, ont permis de localiser le point de branchement de la chaîne polyglutamate/polyglycine latérale sur la structure primaire des tubulines [55]. Différents anticorps ont été produits pour reconnaître les tubulines polymodifiées. L'anticorps GT335 reconnaît toutes les structures des tubulines glutamylées quel que soit le nombre de résidus additionnels, car il reconnaît spécifiquement le point de branchement [56]. L'anticorps polyE, plus récent [51], est spécifique des structures polyglutamate à plus longue chaîne. L'anticorps AXO49 reconnaît un niveau élevé de polyglycylation [57] alors que TAP952 reconnaît des tubulines glycyliées quel que soit leur niveau de glycylation [53].

Cependant, ces méthodes n'ont pas permis d'identifier tous les isomères structuraux des tubulines (exemple, cf. figure 7). La spectrométrie de masse a été très utile pour l'étude des polymodifications des tubulines. Elle a permis la caractérisation des niveaux de polyglutamylatation et de polyglycylation [39], [46] et dans certains cas, des structures de peptides C-terminaux de tubulines ont été caractérisées. En 1990, Edde *et al.* [39] ont suggéré que les 21 variants de tubuline détectés par isoélectrofocalisation [54], ne pouvaient être que le fait de modifications post-traductionnelles. Ces auteurs ont pu montrer par spectrométrie de masse, que la tubuline  $\alpha$  peut porter, à la position E445 de sa séquence C-terminale (voir figure 3, rectangle rouge), de 1 à 5 résidus glutamates. En 1991, Redeker *et al.* ont caractérisé la structure de la chaîne polyglutamate ajoutée à la tubuline  $\alpha$  [55]. Grâce à la spectrométrie de masse et au séquençage d'Edman, ils ont pu déterminer le point de branchement de la chaîne polyglutamate sur les tubulines  $\alpha$  [55].

D'autres études s'intéressaient à la polyglycylation de la tubuline  $\beta$ . En 1999, Vinh *et al.* ont réalisé un travail plus élaboré pour caractériser les structures des différentes chaînes polyglycine post-traductionnelles des tubulines  $\beta$  de paramécie (organisme eucaryote unicellulaire). La structure la plus abondante trouvée dans ces tubulines correspondait à un niveau hexaglycylé: deux glycines étant localisées sur chacune des

positions E437 et E438 et un résidu glycine se trouvant sur chacune des positions E439

et E441 :  $^{427}D A T A E E E G E F E^{437} E^{438} E^{439} G E^{441} Q^{442}$   
 $G_2 \quad G_2 \quad G \quad G$  [58], [59]. Ces résultats ont été

obtenus grâce à la spectrométrie de masse en tandem MS/MS (voir chapitre 3, section I.3), les peptides C-terminaux de tubulines  $\beta$  de différents niveaux de polyglycylation ont été séparés par MS. Les différents peptides de tubulines  $\beta$  polyglycylés ont été fragmentés dans le spectromètre de masse afin de déterminer les structures des chaînes polyglycines additionnées avec différents niveaux de polyglycylation observées [58]. L'identification des différentes structures de polyglycylation a été possible grâce aux ions fragments qui portent la chaîne polyglycine latérale (cette chaîne ne se fragmente pas). Des isomères de structure de certains peptides de tubulines  $\beta$  polyglycylés ont été identifiés [58], [59]. Ces travaux ont démontré que la spectrométrie de masse en tandem est capable de différencier des isomères de peptides C-terminaux de tubulines polymodifiées. Cependant, ceci n'a été démontré que dans le cas de la polyglycylation de la tubuline  $\beta$ . Dans le cas de la polyglutamylolation de la tubuline  $\alpha$  par exemple, la différenciation entre les isomères de structure de peptides polyglutamylés (figure 7) pourrait être plus difficile. En effet, la séquence C-terminale de la tubuline  $\alpha$  est composée principalement de glutamates qui sont les résidus ajoutés dans le cas de la polyglutamylolation, ainsi, certains isomères peuvent avoir des fragments communs. D'autre part, les structures  $\gamma 1 \alpha 2 \alpha 3 \alpha 4$  et  $\gamma 1 \alpha 2 \gamma 3 \alpha 3$  (figure 7) restent difficiles à séparer car ils produisent les mêmes fragments.

Récemment, un nouveau type de spectromètre de masse a été commercialisé par Waters. C'est un spectromètre qui couple deux techniques, la mobilité ionique et la spectrométrie de masse. La mobilité ionique sépare les isomères chargés selon leur conformation (voir chapitre 3, section II)- L'analyse de cette propriété ajoute des données analytiques complémentaires à la spectrométrie de masse, est importante pour la biochimie. Ce couplage analytique pourrait aider à mieux caractériser des structures isomères des peptides C-terminaux de tubulines polymodifiées.

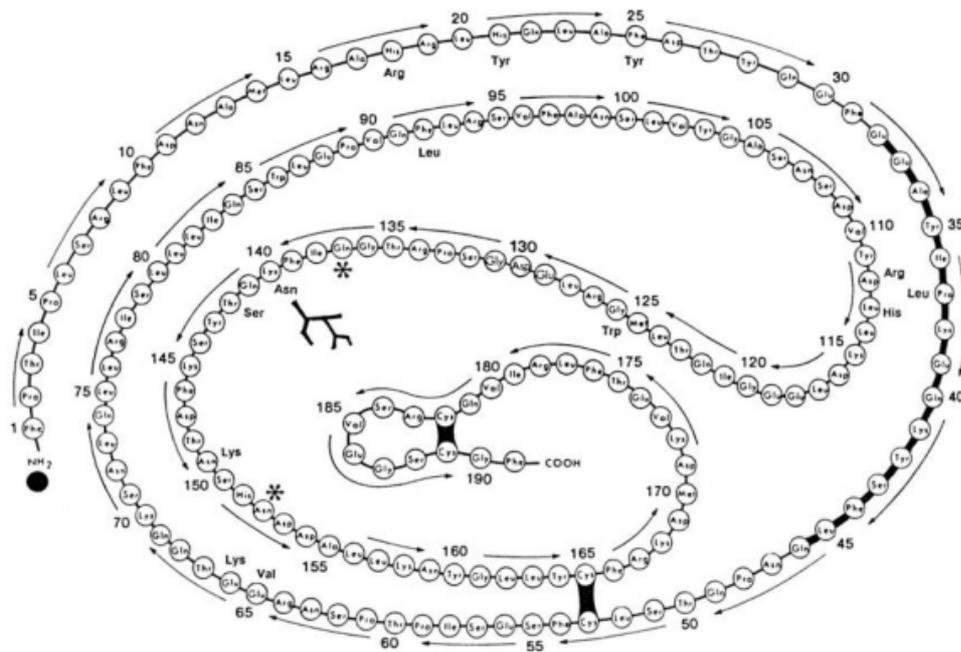
## ***Chapitre 2 Étude bibliographique sur l'hormone de croissance***

Dans cette partie bibliographique nous nous intéressons à l'hormone de croissance, d'une part, son origine, sa structure et ses fonctions. D'autre part, nous présentons comment cette protéine est devenue importante non seulement pour le traitement de la déficience à l'hormone de croissance, mais aussi pour le dopage dans les sports.

### ***I. L'hormone de croissance***

L'hormone de croissance (GH) est connue pour être la molécule responsable de la croissance postnatale [60], [61]. Mais le rôle physiologique de la GH n'est pas limitée à la croissance postnatale, elle est également impliquée dans la régulation d'autres métabolismes [62]. La GH a notamment une action sur le métabolisme glucidique et lipidique [63], sur la synthèse protéique et l'hypertrophie musculaire [64]. En conséquence, l'hormone de croissance est utilisée pour traiter la déficience à l'hormone de croissance et comme agent dopant grâce à ses actions sur les muscles et sur la composition en matière grasseuse du corps.

L'hormone de croissance humaine (hGH) est une protéine qui a été isolée et purifiée à partir de glande pituitaire pour la première fois en 1956 par Li et Papkoff [65]. C'est un polypeptide de 191 acides aminés (figure 8) [66]. Elle est synthétisée par les cellules somatotropes de l'antéhypophyse, d'où son appellation de somatotropine [67].

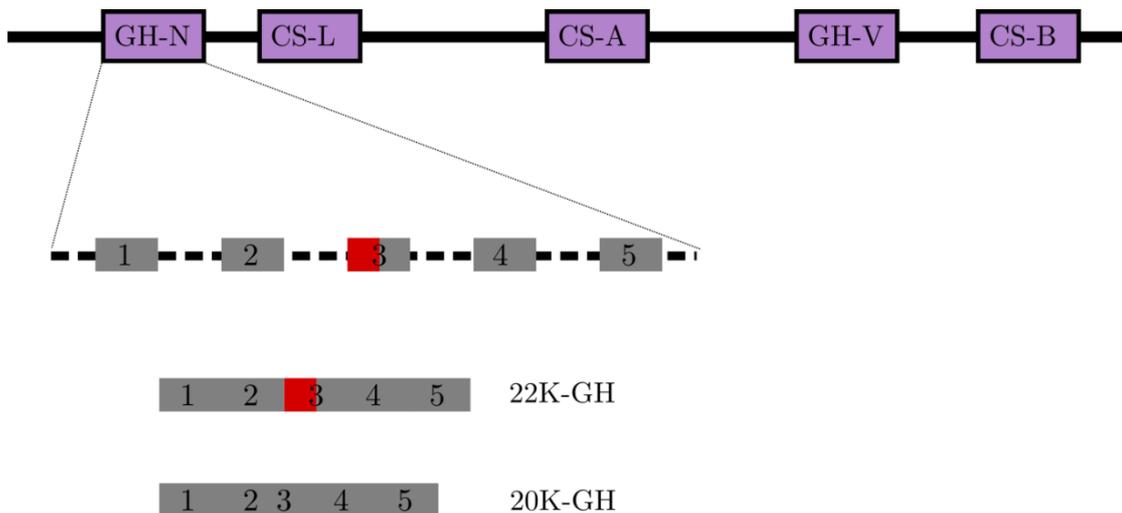


**Figure 8. - Séquence primaire de l'hormone de croissance humaine.** Les deux ponts disulfures sont localisés entre les cystéines 53-156 et 182-189. Les acides aminés de 32 à 46 sont absents dans la hGH 20K-GH. Les résidus annotés en noir à côté de la chaîne principale sont remplacés dans la séquence de l'hormone de croissance du placenta (par exemple la lysine 140 est remplacée par une asparagine), les résidus avec un astérisque pourraient être déamidés. L'asparagine Asn 140 est glycosylée dans l'isoforme du placenta (tiré de [68]).

### 1. Le gène de l'hormone de croissance et ses produits

Chez l'humain, le locus du gène GH est localisé sur le bras q du chromosome 17. Il est composé de 5 gènes apparentés (figure 9): GH1 ou GH-N et CS-L qui sont exprimés dans la glande pituitaire, GH2 ou GH-V, CS-A et CS-B qui sont exprimés dans le placenta.

Le gène GH-N ou GH1 code principalement pour le variant 22K-GH. La masse moléculaire de cette isoforme est de 22129 Da et c'est l'isoforme majeur de l'hormone de croissance humaine (hGH). Une autre isoforme aussi produite par le gène GH-N est le variant 20K-GH. C'est le produit d'un épissage alternatif dans l'exon 3 (voir figure 10) [69]. La forme 20K-GH ne représente que 5-10% de la GH [70]. La hGH 20K-GH a la même structure que la hGH 22K-GH, si ce n'est que la région 32-46 de la séquence peptidique est absente, conduisant à une hormone de croissance de 176 acides aminés avec un poids moléculaire de 20274 Da.



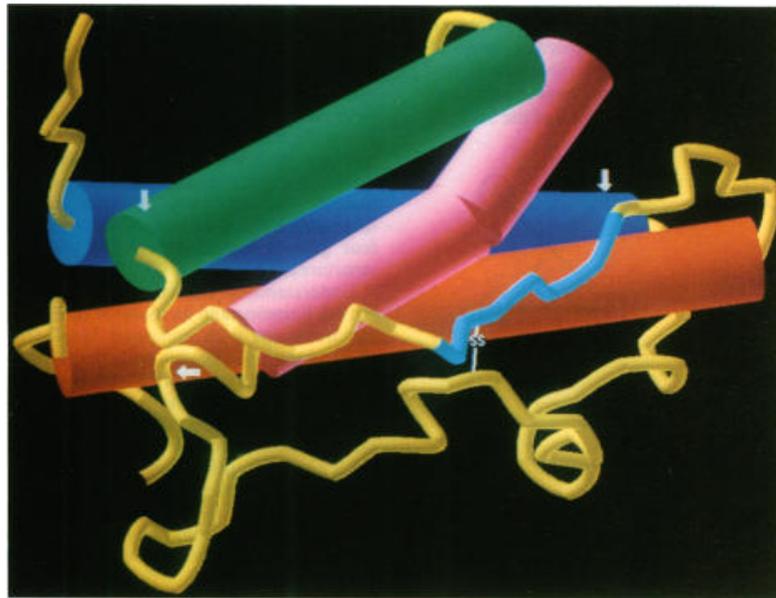
**Figure 9. - Cluster des gènes de l'hormone de croissance humaine.** Le gène *hGH* est localisé sur le bras long du chromosome 17. Il contient 5 gènes apparentés : *GH-N* (normal growth hormone gene), *GH-V* pour l'hormone de croissance du placenta, *CS-A*, *-B* and *-L* pour les gènes des somatomotropines chorioniques A et B et le gène de la somatomotropine like-protein. Le gène *GH-N* est composé de 5 exons et 4 introns. Le produit majeur de ce gène est l'hormone de croissance de 22 kDa. Un épissage alternatif a lieu à l'exon 3 pour produire l'hormone de croissance de 20 kDa. L'arrangement des gènes (boîtes violettes) est décrit par [71].

Le gène *GH-V* ou *GH2* code pour l'hormone de croissance placenta. Elle est similaire à l'hormone de croissance 22K-GH, sauf que sa séquence peptidique diffère en 13 acides aminés, sa masse moléculaire est de 22321 Da. Cette isoforme peut être glycosylée à son asparagine 140 et donne ainsi le variant de 24 kDa [68], [72]. Les somatomotropines chorioniques sont aussi exprimées dans le placenta, et sont les produits des gènes *CS-A* et *B*. En revanche, le gène *CS-L* est exprimé dans la glande pituitaire et donne la somatomotropine chorioniques like-protein. Les somatomotropines chorioniques sont très similaires à l'hormone de croissance humaine mais elles ont des activités biologiques différentes [68].

## 2. La structure de l'hormone de croissance humaine

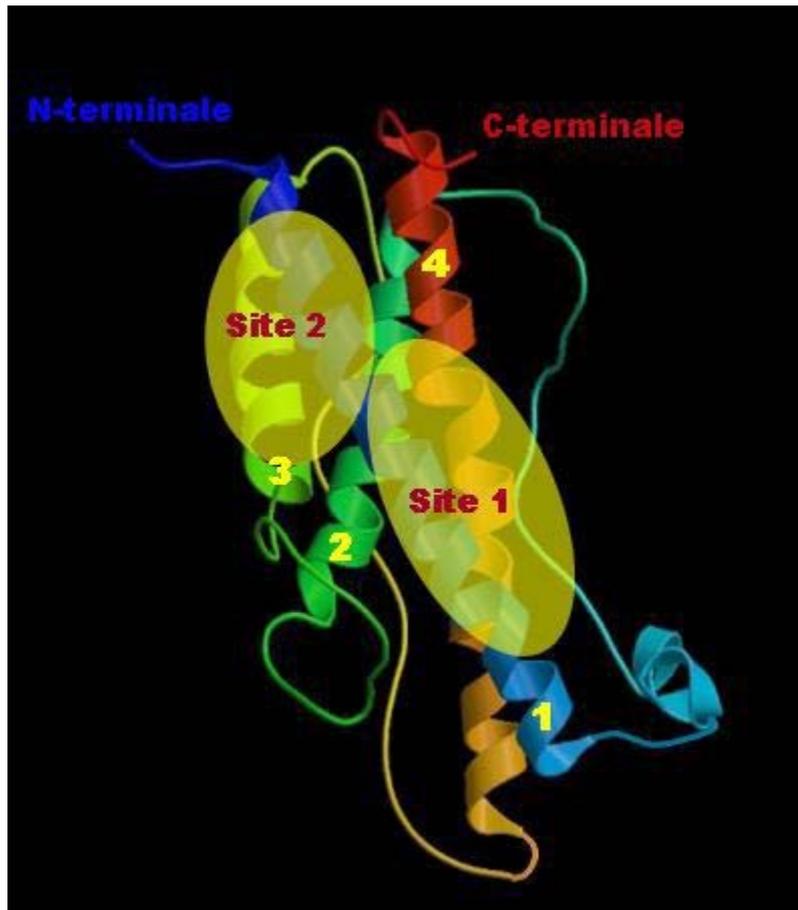
L'hormone de croissance humaine est synthétisée sous forme d'une pro-hormone avec un peptide signal de 26 acides aminés [73], [74]. Ce peptide signal adresse la GH à sa destination cellulaire et il est éliminé à sa sécrétion. L'hormone finale est composée

de 191 acides aminés. Sa structure secondaire est maintenue par deux ponts disulfures entre les cystéines 53-165 et 182-189, formant ainsi, une petite et une grande loupe qui lient quatre hélices  $\alpha$  (figure 10). La structure tridimensionnelle de la GH a été prédite pour la première fois par Cohen et al. [75]. Le travail de Abdel-Meguid *et al* [76] par cristallographie à rayons X a permis d'établir la structure tridimensionnelle de l'hormone de croissance.



**Figure 10.** - *La structure tridimensionnelle de l'hormone de croissance humaine. Les quatre cylindres colorés (vert, rose, orange et bleu) sont les quatre hélices  $\alpha$ . L'extrémité de l'hélice bleue (à gauche, en haut de la figure) est le N-terminal et l'extrémité de l'hélice orange (à gauche, en bas de la figure) constitue le C-terminal de la protéine. Les dimensions de la molécules sont :  $55\text{\AA} \times 35\text{\AA} \times 35\text{\AA}$  ([76]).*

Chaque hélice  $\alpha$  contient 20-30 acides aminés, les hélices  $\alpha$  sont connectées par des segments qui sont impliqués dans la liaison de la GH à son récepteur. Les sites de fixation du récepteur ont été définis grâce à la structure cristallographique du complexe de la hGH avec le domaine extracellulaire de son récepteur (figure 11) [77].



*Figure 11. - Sites de fixation de la GH à son récepteur. Le site 1 se situe entre les hélices  $\alpha$  1 et 4 et le site 2 se situe entre les hélices  $\alpha$  1 et 3 ([77]).*

### **3. Les modifications post-traductionnelles**

L'hormone de croissance est une protéine qui n'a pas beaucoup de modifications. La forme la plus abondante est la forme non modifiée [68], [70]. Un petit nombre d'hormone de croissance modifiée a été identifié.

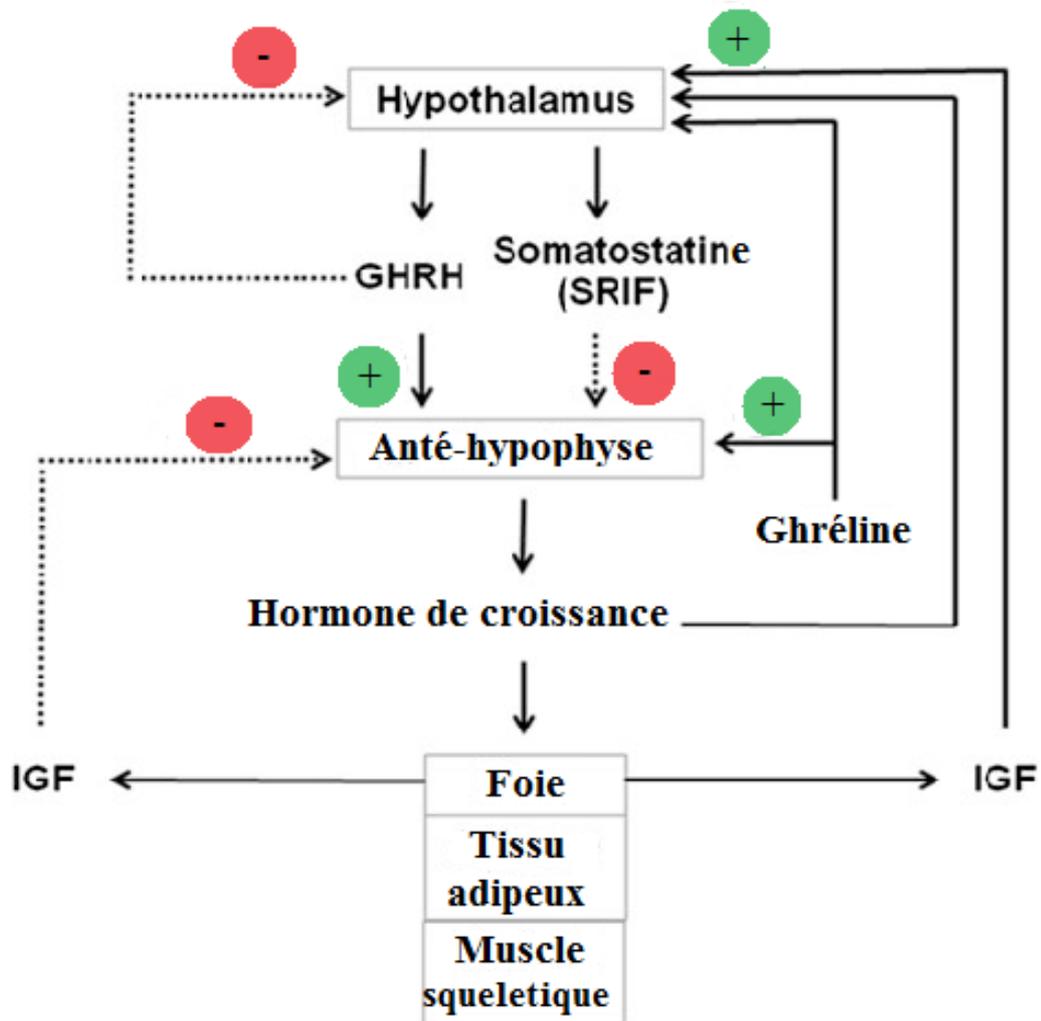
L'hormone de croissance humaine du placenta a été identifiée comme ayant un variant glycosylé sur l'asparagine 140 [78]. Une décennie plus tard, Kohler *et al.* ont décrit une autre hormone de croissance pituitaire glycosylée. Cette dernière est une O-glycosylation sur la thréonine 60 [79]. Des formes acétylées, déamidées et phosphorylées de l'hormone de croissance humaine ont été identifiées [68], [80].

#### ***4. La sécrétion de l'hormone de croissance***

L'hormone de croissance est synthétisée, stockée et sécrétée par les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure. La sécrétion de la GH est maximale durant les périodes de croissance, la période post-natale et la puberté et après elle diminue progressivement avec l'âge [81], [82]. La sécrétion de la GH est pulsatile [83] et reliée au rythme circadien [84]. Le premier pic a lieu après le début du sommeil [85]. Les taux de GH nocturnes sont plus élevés que ceux diurnes [86]. Les amplitudes de pics de GH dépendent de l'âge et du sexe, ils sont plus importantes chez les enfants et chez les femmes par rapport aux hommes [87]. Les valeurs plasmatiques basales de la GH normales diminuent avec l'âge, les amplitudes ~~is~~ sont de 1-4 ng/L chez l'adulte [87].

#### ***5. La régulation de l'hormone de croissance***

Comme pour toute hormone, il existe un système de régulation pour la GH. La régulation de la GH se fait par un système neuroendocrinien. Un schéma résumant les facteurs de la régulation de la sécrétion de GH est présenté dans la figure 12. La sécrétion de la GH est principalement régulée par deux facteurs hypothalamiques, la GHRH (growth hormone releasing hormone) et la somatostatine, GHIH (growth hormone inhibiting hormone) ou SRIF (somatotropin release-inhibiting factor), eux-mêmes régulés par des neurotransmetteurs comme la dopamine et l'adrénaline [88].



**Figure 12. - Régulation de la sécrétion de la GH.** La sécrétion de la GH est stimulée par la GHRH et la Ghreline. Le SRIF inhibe la sécrétion de la GH. Un rétrocontrôle négatif se fait par l'IGF (adapté de [89]).

La GHRH est un peptide de 44 acides aminés sécrété par les neurones neuroendocrines de l'hypothalamus [90]. Quand il arrive aux cellules somatotropes, il se fixe sur son récepteur qui est couplé à une protéine G. La transduction de signal stimule l'augmentation de l'AMPC (adénosine monophosphate cyclique) qui à son tour, d'une part, induit l'ouverture des canaux à  $Ca^{2+}$ , ce qui libère les granules de GH par exocytose, et d'autre part, active la protéine kinase A qui induit la transcription de GH via Pit-1 qui se lie sur le promoteur du gène hGH-N (gène de la GH 22k) [88], [91].

Il existe d'autres peptides qui ont une action synergique à la GHRH. On distingue deux classes : La classe des peptides « GHRH-like » et la classe de peptides GHRP (GH

releasing peptides). La première classe est formée de la sécrétine (VIP, « vasoactive intestinal peptide »), le GIP « Gastric inhibiting peptides », le CRF « Corticotropin-releasing factor », le glucagon et le PACAP « Pituitary adenylate cyclase-activating peptide » [92]. Ces peptides sont semblables à la GHRH dans la structure et la fonction. La deuxième classe est composée par les GHRP sont des peptides synthétiques analogues à la GHRH [93]. Ces peptides sont appelés GHS (growth hormone secretagogues), ils stimulent la sécrétion de la GH par la glande pituitaire en se fixant sur leur récepteurs GHS-R (growth hormone secretagogues receptor). Le clonage de ce type de récepteurs a permis la découverte de son ligand endogène, la Ghréline [94]. La Ghréline est un peptide de 28 acides aminés secrété par les cellules endocrines de l'estomac. La sérine 3 de la Ghréline est acylée, cette modification post-traductionnelle est indispensable à son activité. Les récepteurs de la ghréline sont présents dans l'hypothalamus, la glande pituitaire et l'estomac. Ainsi, la ghréline est un facteur important dans la régulation de la GH et stimule fortement la sécrétion de la GH [95].

En revanche, le peptide hypothalamique SRIF inhibe la sécrétion de la GH. C'est un peptide cyclique présent sous deux formes, SRIF-14 et SRIF-28. Ces deux formes proviennent du clivage de la présomatostatine. Son mode d'action est l'opposé de celui de la GHRH. Il se fixe sur son récepteur transmembranaire couplé à une protéine G ce qui déclenche un signal d'inhibition de l'AMPC. Par conséquent, les canaux à  $Ca^{2+}$  se referment et la concentration des ions  $Ca^{2+}$  diminue dans les cellules somatotropes ce qui bloque la libération de GH. La sécrétion de la GH est aussi inhibée par une autre hormone qui est la TRH (Thyrotropin releasing hormone) [88].

L'inhibition de la sécrétion de la GH se fait également par un rétrocontrôle négatif exercé par l'IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) et la GH elle-même. L'IGF-1 est le médiateur principal des actions de la GH. L'IGF-1 semble agir sur la transcription du gène de la GH et la sécrétion de SRIF qui inhibe la sécrétion de la GH [96], [97].

Finalement, il faut citer que la sécrétion de la GH est également régulée par des facteurs extérieurs comme l'âge, le sexe, le sommeil et le stress, l'exercice et la nutrition.

## **6. L'hormone de croissance dans le sang**

La GH sécrétée par l'hypophyse est transportée vers ses tissus-cibles par la circulation sanguine. Les récepteurs à l'hormone de croissance sont présents dans la plupart des cellules de l'organisme. La durée de vie de la GH est de 20 min approximativement [98]. Dans le sang, une partie de la GH se lie à sa protéine de liaison, la GHBP « growth hormone binding protein », une autre partie se dimérise soit avec une autre molécule de 22K-GH, soit avec une molécule de 20K-GH [68]. La GHBP est un facteur important qui joue sur la biodisponibilité de la GH dans le plasma puisque la moitié de la GH est complexée à la GHBP [99].

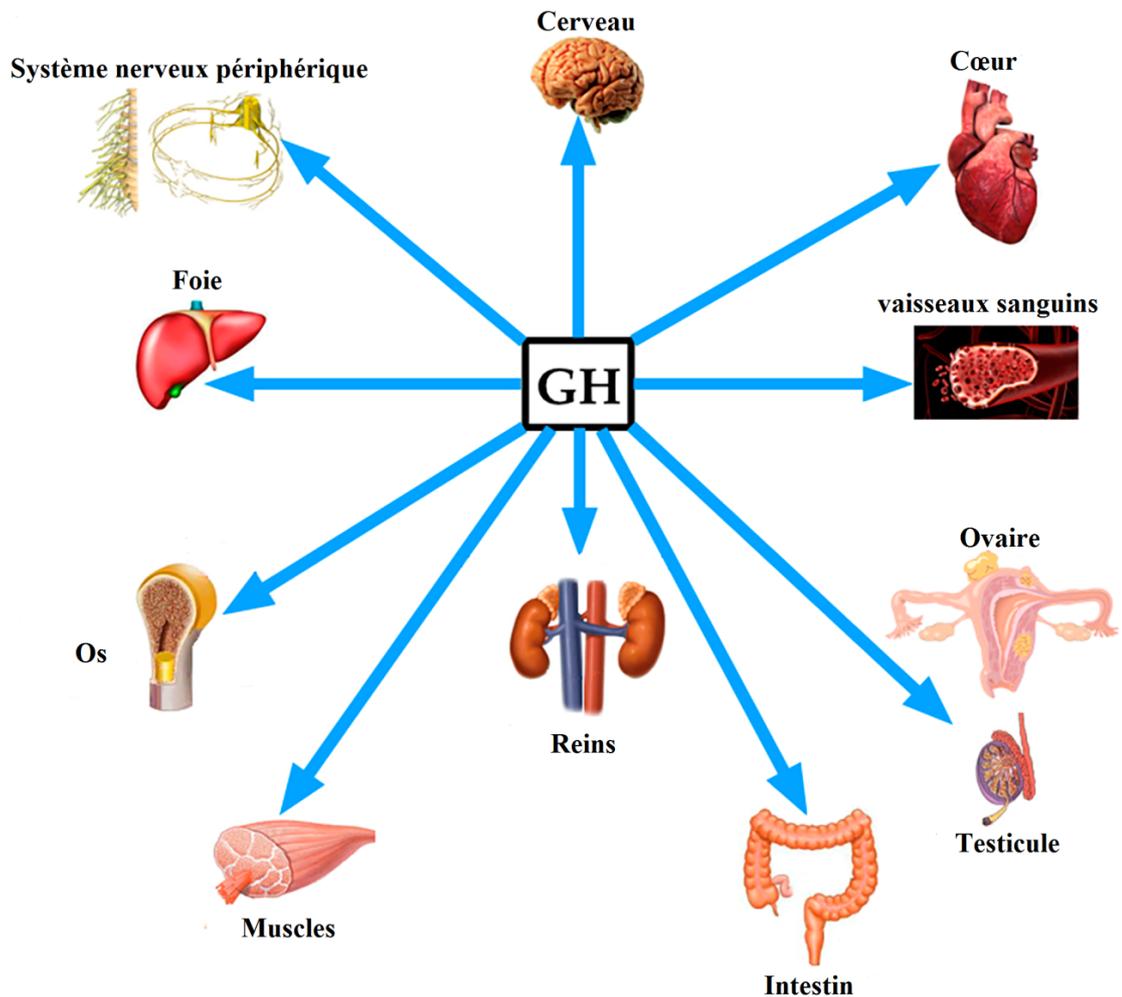
La GHBP est la forme soluble du domaine extracellulaire du récepteur de la GH. La GHBP est une glycoprotéine de 61 kDa qui lie la GH 22K avec une forte affinité [70]. La liaison de la GH à la GHBP augmente sa durée de demi vie et permet de garder un taux plasmatique de GH basal entre les pics de sécrétion. Comme la structure de la GHBP est semblable à celle du récepteur de la GH, la GHBP peut inhiber la liaison de la GH à son récepteur. Par contre, ceci n'a pas été confirmé que par des études *in vitro*, probablement parce que la demi vie de la GH complexée est prolongée [70].

Il existe dans le plasma humain une autre GHBP mais d'une affinité plus faible pour la GH. Cette forme de GHBP a un poids moléculaire de 100 kDa et n'a pas de relation avec la GHBP de forte affinité, ni avec le récepteur de la GH. De manière intéressante cette forme de GHBP lie préférentiellement la forme 20k de la GH avec une affinité plus forte que celle de la GH 22k [70].

L'élimination de la GH se fait principalement par le foie et le rein et par la dégradation dans ses organes-cibles. L'élimination rénale est très différente selon les différentes formes de GH qui circulent dans le sang (22k, 20K, dimères, complexe GH-GHBP). Les fragments produits dans les tissus peuvent revenir dans la circulation sanguine [70].

A la lumière de ce qui précède, on aperçoit la complexité de la GH plasmatique. La conséquence principale est que la composition du sang en GH n'est pas fixe. Par

conséquent, le dosage de la GH, soit pour les diagnostics, soit pour les tests anti-dopage, reste une opération qui fait face à beaucoup de défis et de limitations.



**Figure 13. - Tissus-cibles de l'hormone de croissance.** L'hormone de croissance de multiples actions sur différents tissus et organes. Voici quelques actions de la GH : la croissance longitudinale des os, l'hypertrophie musculaire, elle favorise la stéroïdogénèse et la folliculogénèse et le développement cardiaque [62]. Adapté d'après [100]

## 7. Les effets de l'hormone de croissance

L'hormone de croissance est connue pour son effet primordial sur la croissance postnatale mais elle est aussi une hormone qui a un rôle physiologique s'exerçant au niveau de différents organes (figure 13). En effet, la présence de son récepteur dans plusieurs types cellulaires explique la diversité de ses rôles. La GH peut avoir au niveau de ses tissus-cibles, une action directe ou action indirecte via les facteurs de croissance

IGF. Les actions directes et indirectes de l'hormone de croissance sont résumées à la figure 14.

#### ***Rôle de GH sur la croissance***

La croissance et la prolifération cellulaire sont les rôles principaux de l'hormone de croissance. Par son médiateur principal l'IGF-1, la GH stimule la prolifération des chondrocytes et des ostéoblastes pour favoriser la croissance osseuse longitudinale [101]. Il semble qu'en plus de son action indirecte, la GH a une action directe dans la croissance osseuse. En effet, la croissance est maintenue chez des souris dont le gène de l'IGF-1 est déleté [102]. D'ailleurs, il a été montré précédemment que la croissance des os long peut être induite par l'injection de la GH dans le cartilage (action locale) [103], [104].

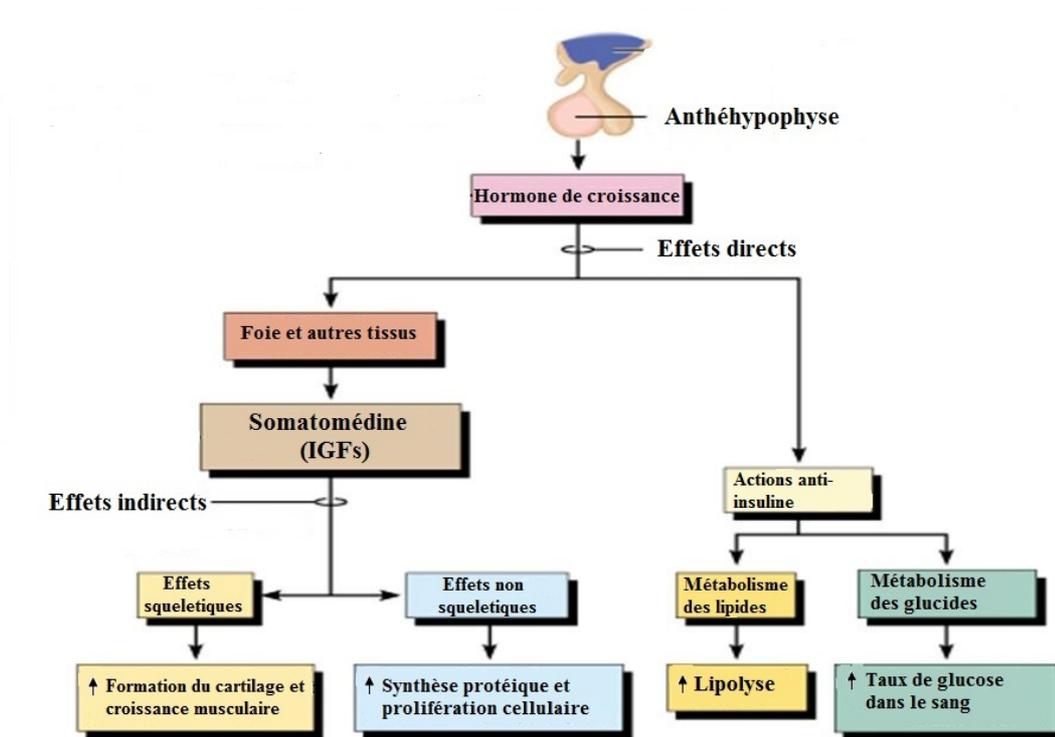
#### ***Rôle de la GH sur le muscle***

La GH est une hormone importante pour le développement musculaire. Le muscle squelettique est une cible directe de la GH [105]. La GH augmente la synthèse protéique dans le muscle squelettique et peut inhiber la dégradation des protéines [106]. La GH exerce aussi ses actions sur le tissu musculaire par l'intermédiaire de l'IGF-1 induit l'hypertrophie et la force musculaire [107]. La déficience à l'hormone de croissance est accompagnée d'une diminution de la masse musculaire, de la force et de la performance physique [108], [109]. Le traitement par la GH augmente la masse corporelle maigre (en anglais LBM pour Lean body mass), la masse musculaire et la résistance [110], [111]. Les effets de la GH et l'IGF-1, quand ils sont couplés à une pratique d'un exercice physique augmentent l'endurance et la force musculaire [112].

#### ***Rôle de la GH sur le métabolisme***

l'hormone de croissance joue un rôle important dans le métabolisme [113]. Il y a une forte expression des récepteurs de l'hormone de croissance dans le foie [114]. La fixation de l'hormone de croissance sur son récepteur stimule la sécrétion de l'IGF-1 (Insulin-like growth factor 1). Par la suite, l'IGF-1 agit sur ces cellules cibles, c'est une action indirecte de la GH. Des études ont montré que l'IGF-1 stimule la synthèse protéique et la lipolyse [115]–[117]. Par ailleurs, l'action directe de la GH sur les cellules hépatiques induit la production de glucose soit par glucogénèse ou

glycogénolyse [118]–[121]. En plus de cette action anti-insuline, la GH agit directement sur le tissu adipeux et augmente la lipolyse [89].



**Figure 14. - Effets directs et indirects de l'hormone de croissance.** Les effets indirects de l'hormone de croissance sont exercés par l'intermédiaire de l'IGF. L'IGF agit sur la croissance musculaire et sur la prolifération cellulaire. Les effets directs de l'hormone de croissance ont une action ant-insuline, ils augmentent le taux de glucose dans le sang et la lipolyse. Adapté d'après [122].

### 8. L'hormone de croissance humaine recombinante

L'hormone de croissance humaine est une des premières protéines issues des biotechnologies produites par l'*Escherichia Coli* [123]. En 1985, différentes compagnies ont commencé à utiliser ce système d'expression dans la production de l'hormone de croissance pharmaceutique: Protropin par Genentech, humatrope par Lilly, Biotropin par Biotech, Norditropin par Novo Nordisitk, Serostim par Serono [124]. Un avantage important,—lié à la production industrielle de l'hormone biosynthétique, est de remplacer l'hormone de croissance extraite de cadavres (parfois contaminée aux prions). Ceci a eu une incidence positive sur le traitement des maladies liées à une déficience à la GH chez les enfants et les adultes. Certains personnes traitées

avec cette hormone de croissance ont développé plus tard la maladie de Creutzfeldt–Jakob, qui est une maladie neurodégénérative liée à une altération conformationnelle de la protéine du Prion [125]–[127]. Du fait de la capacité de l’hormone de croissance à augmenter la croissance musculaire, la tonicité, la force, la production du lait [128] et à booster la performance physique, depuis 1981, elle est utilisée comme agent anabolique par les athlètes, dans l’élevage du bétail et dans les compétitions des courses d’animaux.

## ***II. Le dopage***

Dans le monde du sport, il arrive que des sportifs, de haut niveau ou amateurs, utilisent des méthodes interdites afin d’améliorer leurs performances physiques. L’organisation mondiale des nations unies pour l’éducation, la science et la culture définit le dopage comme l’utilisation de substances ou méthodes interdites par le sportif pour améliorer ses résultats à l’entraînement et en compétition. Les stéroïdes sont les substances qui viennent le plus souvent à l’esprit lorsqu’il est question de dopage, mais le dopage comprend aussi l’utilisation par le sportif d’autres substances interdites (comme les stimulants, hormones, diurétiques, narcotiques), le recours à des méthodes interdites (comme la transfusion sanguine ou le dopage génétique). Le refus de se soumettre à un contrôle anti-dopage ou encore la tentative de fausser les résultats d’un contrôle sont également sanctionnés [129].

### ***1. Histoire***

Le dopage est bien antérieur à ce que l’on peut croire généralement. Cette pratique existait déjà à l’époque des grecs [130]. Le cycliste danois Knud Enemark Jensen est mort en 1960 lors des jeux olympiques de Rome. Après ce décès, les contrôles anti-dopage sont devenus obligatoires. Dans les années 80, le dopage se multiplie avec la présence de plusieurs agents dopants (Stéroïdes, EPO et hormones de croissances). En 1999, l’Agence mondiale anti-dopage (AMA) a été créée. Les activités de l’AMA se regroupent sur l’éducation pour sensibiliser aux dangers du dopage, la recherche scientifique pour le développement de méthodes anti-dopage et la supervision de la conformité du code mondial antidopage. En France, l’Agence française de lutte contre

le dopage (AFLD) a été créé en 2006, ses activités consistent dans le conseil, la réglementation et les analyses anti-dopage.

## ***2. Agents dopants***

Il existe différents types d'agents dopants. On distingue les agents anabolisants comme les stéroïdes, les hormones peptidiques, facteurs de croissance, l'érythropoïétine (EPO) et l'hormone de croissance (GH). On trouve ces agents dans la liste des substances interdites de l'agence mondiale anti-dopage [131]. L'efficacité des tests anti-dopage est très variable. Il y a des substances plus facile à détecter que d'autres [132]. C'est la nature des agents dopants qui pose parfois des difficultés analytiques. En effet, parmi les produits dopants, on trouve des substances synthétiques qui ont des analogues naturels dans le corps humain : les deux principaux sont l'érythropoïétine (EPO) et l'hormone de croissance (GH). Les molécules obtenues par biotechnologie sont, dans la plupart des cas, identiques ou très proches de leurs formes endogènes. Par conséquent, la détection de la forme exogène dans les fluides biologiques devient très difficile [133]. En plus des difficultés liées à la détection de certains produits dopants, il y a des défis liés à la détection de certaines méthodes de dopage comme l'autotransfusion qui jusqu'à ce jour, ne présente pas de méthode de détection [132].

## ***3. Détection du dopage à l'hormone de croissance***

L'hormone de croissance naturelle a été largement étudiée, soit pour améliorer les diagnostics des maladies liées à la hGH, ou pour développer des tests anti-dopages.

Les Techniques d'immunoessais ont été le plus employées pour détecter et quantifier l'hormone de croissance [134]. Les tests immunoessais sont efficaces pour diagnostiquer les maladies reliées à la GH, mais ils ne sont pas très performants pour détecter le dopage à l'hormone de croissance. Ces tests sont parfois limitants pour la détection du dopage à l'hormone de croissance [135]. En effet, une augmentation de hGH peut être induite par d'autres facteurs que l'administration d'hormone de croissance recombinante. La sécrétion de la GH est stimulée par l'exercice [136], ce qui fait qu'elle est déjà élevée chez des individus très actifs comme des athlètes. En outre,

la sécrétion de la GH est pulsatile, un pic de sécrétion pourrait coïncider avec une mesure de GH, donnant lieu à des faux positifs. La sécrétion de la hGH est régulée par le sommeil, la nutrition et les émotions et donc elle présente une variabilité intra et interindividuelle. C'est pour cela que les chercheurs travaillent sur le développement de techniques pour détecter l'abus de l'hormone de croissance.

A l'heure actuelle, il existe deux tests anti-dopage de la hGH utilisés dans les contrôles officiels: le test des isoformes de GH et le test des biomarqueurs de GH.

### ***Le test des isoformes de GH***

C'est une méthode directe pour détecter le dopage à la hGH. Elle est basée sur la différenciation entre les proportions des isoformes de la hGH normales et celles trouvées après administration de hGH recombinante (rhGH) [137], [138]. Le principe est que la préparation de la rhGH ne contient que la forme 22K-GH alors que hGH naturelle est composée de plusieurs isoformes pituitaires. Par conséquent, l'administration de rhGH augmente le rapport entre la 22K-GH et la GH pituitaire [138]–[140]. Le test est composé deux kits, un premier kit de test initial et un kit de validation. Chaque kit contient deux tests immunologiques, « recombinant » qui reconnaît la forme 22K-GH et « pituitaire » qui reconnaît plusieurs isoformes de la hGH pituitaire [139]. Le résultat est exprimé en rapport recGH/pitGH. En plus, des limites liées aux tests immunologiques et à la sécrétion et la régulation de la GH, la grande faiblesse du test des isoformes est la fenêtre de temps de détection. En effet, une étude a montré que les échantillons collectionnés 21h après l'injection de rhGH donnent toujours un test négatif [141]. De plus, la durée de demi-vie de l'hormone de croissance est très faible (20 minutes approximativement) [99]. Ceci explique le faible nombre de tests positifs, l'AFLD n'a trouvé qu'un seul cas positif de dopage à l'hormone de croissance [142].

### ***Le test des biomarqueurs de GH***

C'est une méthode indirecte basée sur les actions de la GH. La GH stimule l'expression de l'IGF-1 et le recyclage du collagène. Le test de biomarqueurs de GH mesure les taux

plasmatiques de l'IGF-1 et le propeptide N-terminal du collagène type III (P-III-NP). Les facteurs qui influencent les mesures de l'IGF-1 et du (P-III-NP) sont principalement l'âge et le sexe [143]. Le test est donc accompagné d'un score (score GH-2000) calculé en fonction de ces deux facteurs [143]. Les mesures sont réalisées par des tests immunologiques (deux tests pour chaque biomarqueur) et peuvent être validés par des analyses en spectrométrie de masse [144]. Les avantages du test des biomarqueurs de GH par rapport à celui des isoformes de la GH sont, d'une part, la fenêtre de temps de détection est plus longue (jours-semaines) [143], [145], [146] et d'autre part, le rythme sécrétoire de ces biomarqueurs n'est pas pulsatile comme la sécrétion de la GH et leurs taux plasmatiques sont relativement stables [147]. Cependant, seulement deux cas positifs ont pu être détectés par le test des biomarqueurs de GH [148]. Les tests décrits ci-dessus ne sont pas définitifs à cause de limitations liées aux tests immunologiques, de nouvelles méthodes non immunologiques doivent être développées [134], [149].

La spectrométrie de masse est une des techniques analytiques qui a été utilisée pour le développement de nouveaux tests d'anti-dopage. L'avantage de la spectrométrie de masse est qu'elle est capable de caractériser la structure des molécules, permettant ainsi d'avoir des informations plus spécifiques. Différentes études de spectrométrie de masse ont été publiées. La spectrométrie de masse a permis de différencier entre l'hormone de croissance équine endogène (eGH) et l'hormone de croissance équine recombinante (reGH). Les séquences peptidiques de l'eGH et la reGH diffèrent par le premier acide aminé [150]. Le même travail a été réalisé pour l'hormone de croissance bovine (bGH/rbGH) [151]. En revanche, cela n'a pas été possible pour l'hormone de croissance humaine car la séquences peptidiques de l'hormone de croissance humaine endogène (hGH) et celle de sa forme recombinante (rhGH) sont identiques [152].

Différentes études par LC-MS/MS ont été réalisées afin de développer des méthodes de détection du dopage à l'hormone de croissance. Deux études ont montré que des préparations d'hormone de croissance recombinante présente des substitutions d'acides aminées. Dans la première, la méthionine 14 a été remplacée par une valine [153]. La deuxième étude a montré que 2% de GH issues d'une autre préparation

d'hormone de croissance recombinante présente des substitutions d'acides aminées (M14, M125 et M170) et des modifications post-traductionnelles (oxydation des méthionines, déamidation) [154]. Cependant ces approches n'ont pas été analysées à partir de liquides biologiques. En 2014, des auteurs ont pu détecter et différencier entre la forme 22k-GH et la forme 20K-GH (cette forme n'est pas présente dans l'hormone de croissance recombinante) dans le plasma humain [155]. Ils ont déterminé le ratio entre les formes 22K-GH et 20K-GH endogènes dans le plasma d'individus après exercice physique [155]. Partant du principe que l'administration de rhGH change les rapports entre la forme 22K-GH et les autres formes de GH pituitaires dont la 20K-GH, cette méthode semble prometteuse pour un nouveau test d'antidopage de GH, complémentaire du test des isoformes de GH approuvé par la WADA. Dans cette même étude, les chercheurs ont observé, qu'après exercice physique une autre isoforme de la GH (masse moléculaire 23 kDa) présente un taux sanguin plus élevée que celui de la 20K-GH. Celle-ci correspondrait à la forme glycosylée de la hGH [156]. Comme la glycosylation est une modification post-traductionnelle qui n'existe sur l'hormone de croissance recombinante, du fait de sa production par E. Coli, cette piste pourrait être intéressante pour le développement d'une nouvelle méthode de détection du dopage à la hGH.

## Chapitre 3 Instrumentation

### I. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui identifie les molécules en mesurant leur masse. Le processus est basé sur l'ionisation de la molécule pour qu'elle puisse être transportée sous un champ électrique dans un analyseur afin de mesurer son rapport masse-sur-charge. La spectrométrie de masse est une des premières techniques qui a permis l'identification des isotopes [157].

Une molécule analysée par spectrométrie de masse passe par trois étapes (figure 15). Après l'injection de l'échantillon, la première étape est l'ionisation, elle se réalise dans la source d'ionisation, c'est dans cette partie du spectromètre que les ions sont produits. Il existe différentes méthodes d'ionisation. Les deux méthodes les plus utilisées pour l'analyse de peptides ou de protéines sont l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) et l'ionisation par électronébulisation (ESI). Ces deux méthodes d'ionisation dites « douces » permettent d'ioniser les biomolécules sans les fragmenter. Les ions produits seront ensuite séparés dans l'analyseur et enfin détectés par le détecteur. Le signal va être traité et converti en un spectre de masse.

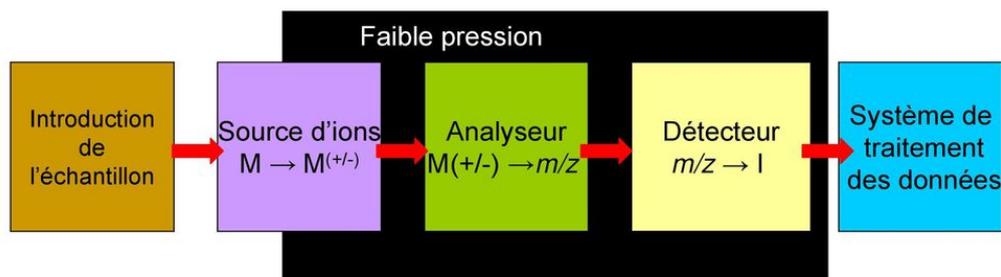


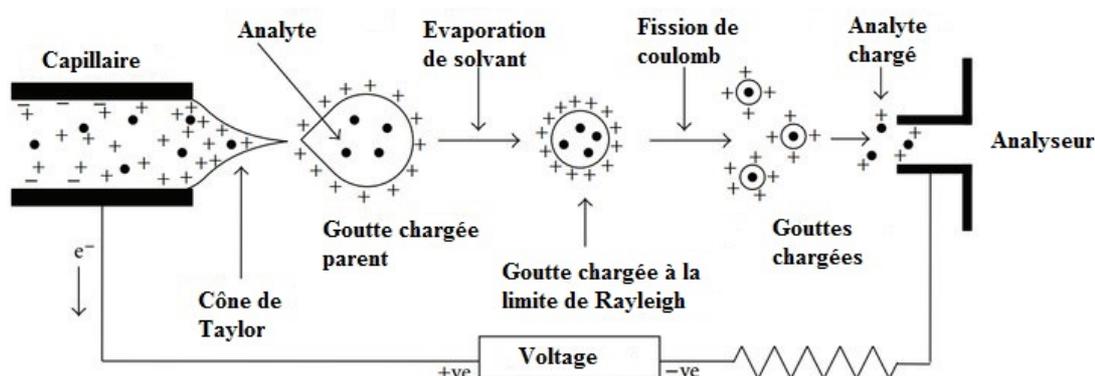
Figure 15. - Représentation du principe d'une expérience de spectrométrie de masse. (adapté de [158]).

#### 1. La source d'ionisation

Il existe plusieurs techniques d'ionisation mais les deux techniques compatibles avec les molécules biologiques sont l'ionisation ESI et MALDI [159].

### ***L'ionisation ESI***

L'ionisation ESI consiste à appliquer un voltage élevé (2.8 kV – 4 kV) à l'échantillon. L'analyte doit être présent dans un solvant contenant un électrolyte adapté au processus d'évaporation-fission et apportant les porteurs de charge. Cet électrolyte est généralement un acide volatil pour produire des ions positifs et une base volatile pour produire des ions négatifs. L'échantillon (analyte + solvant) est amené par un capillaire dont la sortie est l'anode (+) et l'entrée du spectromètre correspond à la cathode (-). Par conséquent, les gouttes solvant-analyte chargées positivement vont être extraites de l'extrémité du ménisque au bout du capillaire. L'évaporation progressive du solvant dans la région de désolvation entraîne une augmentation de la répulsion électrostatique au sein de la gouttelette ; jusqu'à entraîner une fission de la gouttelette en gouttelettes plus petites. Le processus fission – évaporation se répète jusqu'à la formation de l'ion [160].



**Figure 16. - Représentation schématique du processus de l'ionisation par électrospray (adapté de [161]).**

### ***2. L'analyseur***

Après l'étape de l'ionisation, les ions sont analysés dans l'analyseur. Il existe différents types d'analyseurs. On distingue l'analyseur temps de vol (TOF), le filtre quadripolaire (Q), le piège ionique (IT) et d'autres analyseurs. Les spectromètres tandem dans l'espace sont formés le plus souvent de plusieurs analyseurs successifs. Ce type de spectromètres permet de faire une analyse par spectrométrie de masse en tandem. Un rapport  $m/z$  d'intérêt est sélectionné et l'ion correspondant est fragmenté dans une région de collision entre les deux analyseurs. Les fragments obtenus sont

ensuite analysés par le temps en vol (TOF) (Q-TOF) pour en mesurer leurs rapports m/z.

***Le temps de vol (TOF : time-of-flight)***

Le TOF sépare les ions en mesurant le temps qu'ils mettent pour arriver au détecteur. Le temps de vol d'un ion dépend de deux facteurs, la masse et la charge [162]. Il peut être déterminé par deux équations :

Un ion de masse  $m$ , et charge  $q$ , est accéléré dans un champ électrique de potentiel  $V$ . Il a une énergie cinétique qui s'exprime par l'équation suivante :

$$qV = E = 1/2mv^2 \quad (1)$$

avec  $E$  l'énergie cinétique de l'ion en joule (J),  $m$ , sa masse en kg et  $v$ , sa vitesse en m/s.

L'équation (1) donne pour la vitesse :

$$v = \sqrt{2qV/m} \quad (2)$$

Et le temps,  $t$  en s est donné par:

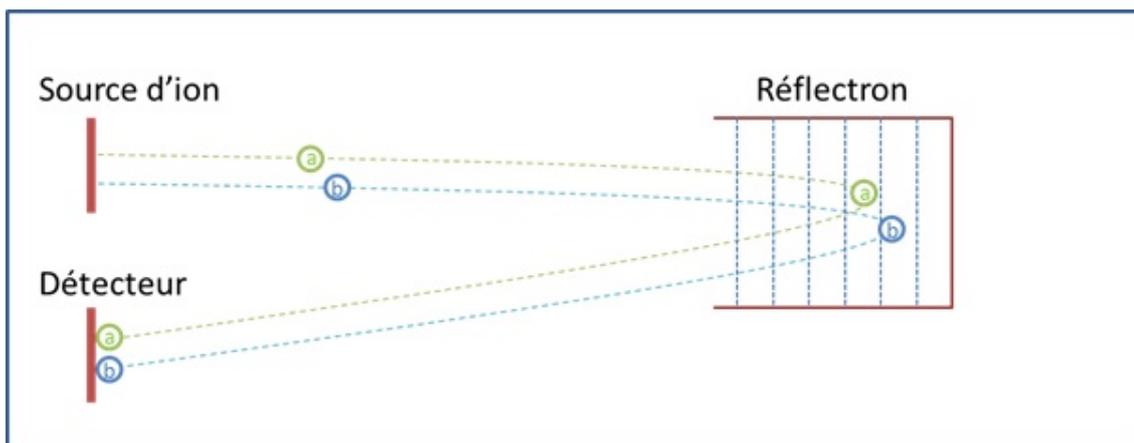
$$t = d/v \quad (3)$$

Avec,  $d$ , la distance parcourue par l'ion et  $v$ , la vitesse de l'ion.

Si on combine les équations (2) and (3), on trouve que :

$$t = d \sqrt{m/2qV} \quad (4)$$

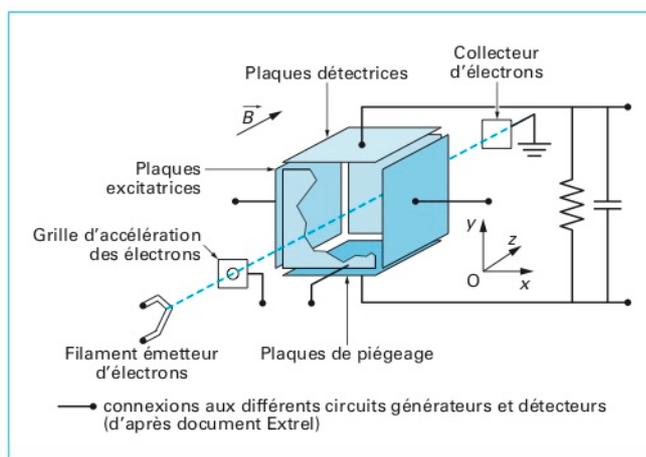
Pour la même énergie, les petits ions (faible m/z) atteignent le détecteur plus rapidement que les gros ions (m/z élevé). Par contre, des ions de même masse peuvent avoir des énergies différentes et donc des vitesses différentes. La résolution du TOF peut être améliorée par l'addition d'un réflectron [162]. Le réflectron produit un champ électrique qui ralentit les ions. Les ions avec une énergie élevée traversent le réflectron plus profondément et donc prennent plus de temps pour arriver au détecteur. Les ions de même masse mais d'énergie plus faible ont un trajectoire plus courte dans le réflectron et arrivent au détecteur plus rapidement. Par conséquent, les ions de même masse mais d'énergies différentes arrivent au détecteur au même temps (figure 17). Chaque ion produit un signal sur le détecteur, le signal est convertit en un pic de m/z [162].



**Figure 17. - Principe de l'analyse de temps de vol (TOF) en présence d'un réflectron.** Les deux ions *a* et *b* ont le même  $m/z$ . L'ion *b* a une énergie cinétique plus grande que celle de l'ion *a*, il rentre plus profondément dans le réflectron pour arriver au même temps que l'ion *a*. (tiré de [163]).

***L'analyseur à résonance ionique cyclotronique (ICR pour ion cyclotronic resonance)***

La spectrométrie de masse à transformée de Fourier (FT-ICR/MS) offre de très grandes performances. Ces deux plus grands atouts sont la précision en masse et résolution. On peut atteindre une précision de l'ordre de 1 à 5 ppm et des résolutions supérieures 100000 [164] .



**Figure 18.- Schéma d'une cellule de FT-ICR.** Tiré de [164] .

***La cellule FT-ICR***

Un analyseur FT-ICR est formé d'une cellule mise dans un champ magnétique  $B$ . La cellule est composée de 3 paires de plaques parallèles. Une paire pour piéger les ions, la deuxième pour les exciter et la troisième pour les détecter (Figure 18).

### ***Le piégeage des ions***

Dans la cellule FT-ICR l'ion est soumis à un mouvement circulaire (cyclotronique) caractérisé par une fréquence de rotation cyclotronique  $V_c$  exprimée par l'équation suivante :

$$V_c = \frac{zeB}{2\pi m} = \frac{eB}{2\pi(\frac{m}{z})}$$

avec, B, le champ magnétique en T, m/z, la masse sur charge de l'ion.

La fréquence de rotation cyclotronique est indépendante de la vitesse initiale des ions, mais elle est inversement proportionnelle au rapport m/z. Par conséquent, une mesure précise de la fréquence de rotation cyclotronique permettra une mesure précise de la masse. Les ions sont piégés grâce au champ électrique qui les confine dans les axes X et Y, pour assurer un confinement au niveau de l'axe Z (Figure 18), un potentiel est appliqué sur les plaques de piégeage [164].

### ***L'excitation des ions***

Cette étape est importante parce qu'elle assure que tous les ions de même m/z soit en phase. Elle se fait par l'application d'une différence de potentiels alternative sur les plaques d'excitation. Cette différence est égale à la fréquence cyclotronique des ions d'intérêt. Le rayon de la trajectoire des ions va augmenter et ils vont arriver sur des orbites circulaires de rayon plus grand. Il s'agit donc de balayer tous les fréquences cyclotroniques correspondantes aux différentes valeurs m/z.

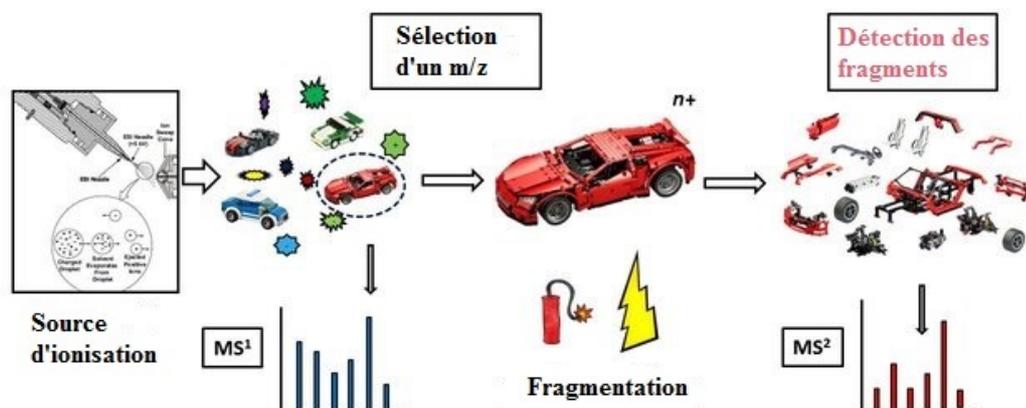
### ***La détection des ions***

Le mouvement cohérent d'un paquet d'ions est détecté par les plaques de détection sous forme d'un courant d'image. Le courant image est converti en un spectre de fréquences-cyclotroniques par transformée de Fourier. Le spectre de fréquences est ensuite converti en un spectre de masse [165]. Les applications de la FT-ICR/MS sont nombreuses, notamment pour l'analyse de mélanges complexes du fait de son pouvoir de résolution élevé, la séparation d'espèces proches et les modifications post-traductionnelles des protéines comme la glycosylation.

## ***3. La spectrométrie de masse en tandem***

La spectrométrie de masse en tandem implique plusieurs étapes de sélection et d'analyse d'ions par spectrométrie de masse. Il s'agit de faire une première analyse

(MS<sup>1</sup>) et de sélectionner une masse d'intérêt. L'espèce sélectionnée sera fragmentée et les fragments obtenus seront analysés dans une deuxième étape de spectrométrie de masse (MS<sup>2</sup>) (figure 18) [166].



**Figure 19. - Principe de la spectrométrie en tandem.** L'étape MS<sup>1</sup> consiste à analyser l'échantillon et sélectionner un m/z d'intérêt. Cet ion m/z sera fragmenté dans un quadripôle ou piège à ions. Les ions fragments produits sont analysés à l'étape MS<sup>2</sup> (adapté de [167]).

La technique de fragmentation d'ions la plus commune est la fragmentation par énergie de collision (CID : collision-induced dissociation) [168] mais il existe d'autres types de fragmentation comme la fragmentation par capture d'électron (ECD : electron-capture dissociation) [169] et la fragmentation par transfert d'électron (ETD : electron-transfer dissociation) [170].

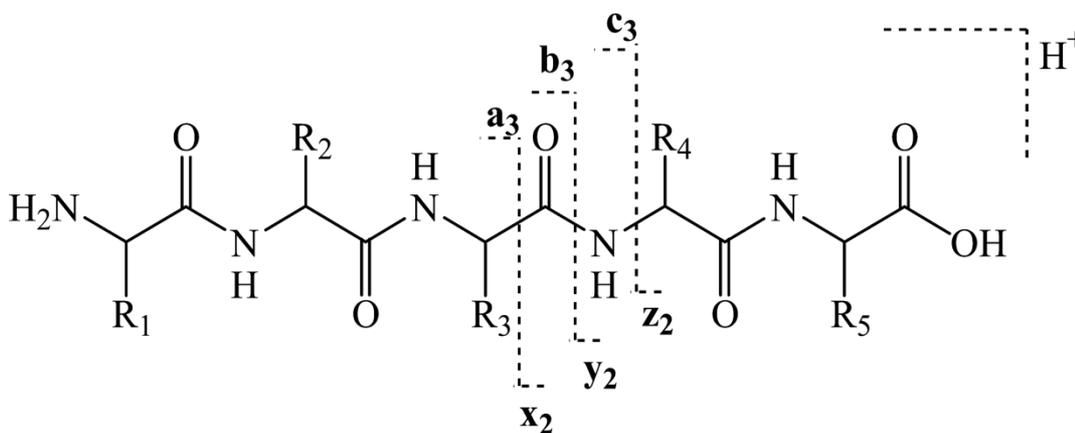
#### ***Dissociation induite par collision (CID)***

Le principe de la dissociation induite par CID est l'activation des ions. La fragmentation des ions se fait en présence de gaz inerte comme l'hélium ou l'argon. Les collisions entre l'ion précurseur et les molécules de gaz augmentent son énergie interne [168]. L'énergie interne va se redistribuer en énergie vibrationnelle qui provoque la coupure des liaisons.

#### ***Fragmentation des peptides par CID***

Les peptides peuvent se fragmenter aux liaisons amide C-N, C $\alpha$ -C ou N- C $\alpha$ , ces coupures aboutissent aux ions a<sub>n</sub>, b<sub>n</sub>, c<sub>n</sub> du côté N-terminal et x<sub>n</sub>, y<sub>n</sub>, z<sub>n</sub> du côté C-terminal (figure 19). Cette nomenclature des ions produits de la fragmentation des

peptides a été introduite par Biemann en 1988 [171] mais la première nomenclature a été proposée en 1984, par Roepstorff et Fohlman [172]. En CID, on forme généralement des fragments a, b et y.



**Figure 20.** - *Nomenclature des fragments peptidiques les plus communs en fragmentation* (tiré de [173]).

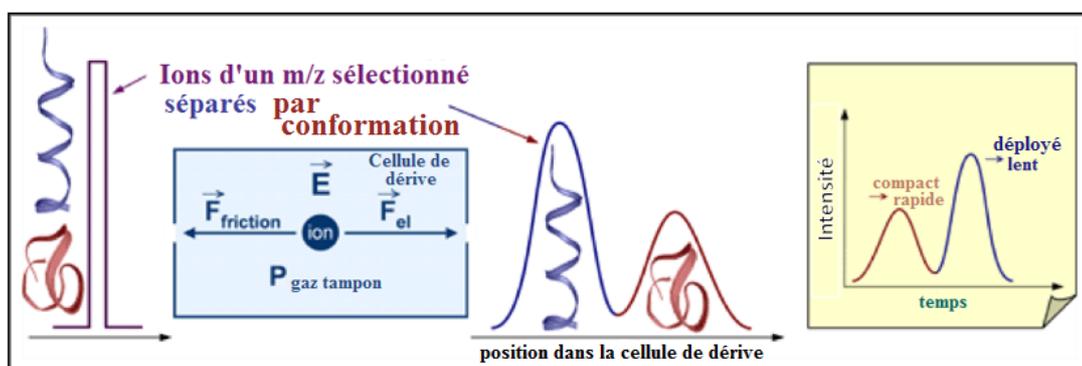
La fragmentation des peptides permet l'identification de l'enchaînement des acides aminés [174]. Dans le séquençage *de novo* où on ne connaît pas préalablement la séquence peptidique, les acides aminés peuvent être déterminés par la différence de masse entre deux ions fragments successifs. Par contre, dans le cas où on connaît la séquence peptidique, on peut faire des fragmentations *in silico* et comparer les masses des fragments théoriques avec ceux observés sur le spectre de fragmentation CID.

## **II. La spectrométrie de masse à mobilité ionique**

### **1. La spectrométrie de mobilité ionique**

Il s'agit d'une technique qui mesure la propension d'un ion à se déplacer dans un brouillard gazeux sous l'effet d'un champ électrique (IMS) [175]. Le principe de la mobilité ionique est décrit sur la figure 20. Il est possible de mesurer cette grandeur physique dans une cellule de mobilité (cellule de dérive). Un spectromètre de mobilité ionique mesure le temps de passage d'un ion pour traverser la cellule ; temps de dérive (en anglais, drift time). Plus précisément, les ions sont séparés selon leurs sections

efficaces de collision (en anglais CCS, collision cross section). La CCS, désignée par  $\Omega$  est une grandeur physique qui représente la probabilité d'interaction entre l'ion et les molécules de gaz présentes dans la cellule de mobilité, elle est exprimée en  $\text{Å}^2$ . Plus la section efficace de collision de l'ion est grande, plus il sera freiné par le gaz et plus il mettra de temps pour migrer dans la cellule de dérive et arriver au détecteur. Dans un spectromètre de masse à mobilité ionique, une cellule de mobilité est intercalée entre la source d'ions et l'analyseur qui mesure les rapports  $m/z$  des analytes chargés [2]. Ainsi, une expérience typique de spectrométrie de masse à mobilité ionique consiste à sélectionner tous les ions d'un rapport  $m/z$  donné et à les injecter dans la cellule de mobilité ionique. En fonction de leur structure tridimensionnelle, les ions vont être séparés dans la cellule de mobilité. Les ions de structure déployée rencontreront davantage de molécules de gaz au cours de leur dérive dans la cellule de mobilité et seront donc ralentis à cause des forces de friction. En revanche, les ions de structure compacte migreront dans la cellule avec une vitesse plus importante. Ainsi, il est possible de différencier des ions d'un même rapport  $m/z$ , en fonction de leur conformation.



**Figure 21. - Principe de la mobilité ionique.** Deux ions de même masse et de même charge évolueront plus ou moins vite dans une cellule de mobilité en fonction de leur conformation tridimensionnelle. L'ion de conformation déployée (molécule bleue) sera freiné dans la cellule de mobilité et aura donc un temps de migration plus long que l'ion de conformation compacte (molécule rouge), qui sortira de la cellule avant le précédent (adapté de [175]).

## 2. La théorie

L'ion subit deux forces dans la cellule de mobilité : l'une électrostatique, dépendant du champ électrique appliqué et l'autre, opposée, la force de friction provoquée par la collision des ions avec les molécules du gaz, cette dernière croît avec la vitesse de l'ion. Il existe ainsi une vitesse d'équilibre pour laquelle ces deux forces se compensent. Ainsi, la vitesse de dérive  $v_d$  de l'ion est donnée par:

$$v_d = K * E$$

Avec,  $K$  est la mobilité de l'ion. Cette mobilité dépend de la densité du gaz. Pour être rendue indépendante de cette densité du gaz, elle peut être exprimée sous forme d'une mobilité réduite  $K_0$  en utilisant la densité standard du gaz (Pression standard,  $P_0=760$  torr et température standard,  $T_0=273$  K). Un instrument à mobilité ionique mesure la mobilité de l'ion comme un temps de dérive  $t_d$ ,  $t_d$  se compose d'un temps mort  $t_0$  et d'un temps d'arrivée :

$$t_d = t_0 + (1^2.273,15/760.T) (1/K_0) \left(\frac{P}{V}\right)$$

Dernièrement, le temps de dérive a été relié à une CCS  $\Omega$  en  $\text{\AA}^2$  qui est calculée par l'équation de Mason-Schamp suivante :

$$\Omega = \frac{3q}{16N_0} \sqrt{2\pi/\mu k_B T} (1/K_0)$$

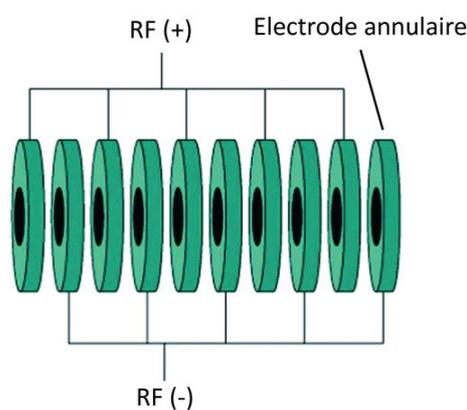
avec  $q$ , la charge de l'ion en ( C ),  $N_0$ , la densité du gaz tampon,  $\mu$ , la masse réduite ion-gaz en (kg) ,  $k_B$  , constante de Boltzmann en (J/K) ,  $T$ , la température en (K) et  $K_0$ , la mobilité réduite [176].

## 3. Le couplage de la mobilité ionique à la spectrométrie de masse (IMMS)

Le couplage de la mobilité ionique à la spectrométrie de masse a été introduit dans les années 1980 par le groupe de Bowers [175] mais il s'est principalement développé depuis le début des années 2000 sous l'impulsion de David Clemmer [177], [178] et d'autres [11]. Il existe différents types d'IMS pouvant être couplés avec de la spectrométrie de masse : la mobilité ionique différentielle (DIMS or FAIMS), la mobilité ionique à tube de dérive (DT-IMS), la mobilité ionique en vagues (TWIMS). Dans le présent manuscrit, nous allons détailler la technologie TWIMS.

### ***Travelling wave ion mobility mass spectrometry (TWIMS)***

Une cellule de dérive de type TWIMS est tout d'abord un tube composé d'électrodes annulaires sur lesquels sont appliqués alternativement une tension radiofréquence de signe opposé, créant ainsi un guide d'ion (SRIG : stacked ring ion guide) (figure 21) [1] [179]. La technologie TWIMS consiste à ajouter individuellement sur ces électrodes annulaires une tension (pseudo-)continue créant une structure de vague de potentiels au sein du tube. Ces vagues sont progressivement déplacées d'une électrode vers la suivante en direction de la sortie, ce qui crée une série de vagues qui transportent les ions tout le long de la cellule de mobilité [180].



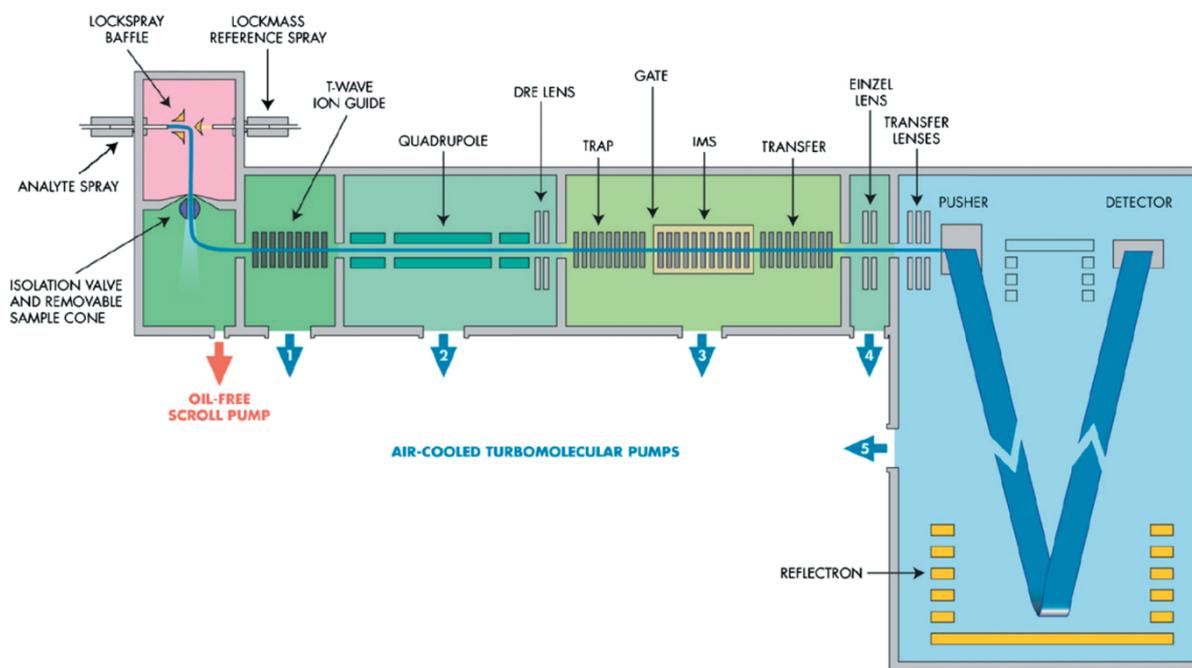
**Figure 22.** - Schéma du SRIG de la cellule de mobilité TWIMS. Le SRIG est un guide d'ions formé d'électrodes circulaires parallèles trouées formant un tunnel par lequel passent les ions. Ces derniers sont confinés grâce à un potentiel de radiofréquence. (adapté de [1]).

L'équilibre entre les forces électrostatiques et la force de friction décrit dans la partie précédente ne peut se faire que dans les fronts montants et descendants des vagues. Par conséquent, en TWIMS, la séparation des ions par mobilité dépend de trois paramètres. La hauteur de la vague (WH) et la vitesse de la vague (WV) ainsi que la pression du gaz tampon [1]. La hauteur de la vague (WH) représente la différence du potentiel pseudo-continu (en V) appliqué entre les électrodes hautes de la vague et les électrodes basses de la vague. La vitesse de la vague (WV) qualifie la vitesse (en m/s) à laquelle la vague parcourt la région de séparation, et correspond en fait à un réglage du

décali entre l'application du potentiel de vague sur une électrode et sur l'électrode suivante. La taille du gaz tampon est un autre paramètre qui peut jouer sur la séparation des ions dans la cellule de mobilité [181].

### *Le Synapt G2-Si HDMS*

Le Synapt G2-Si est spectromètre de masse hybride quadripôle-temps-de-vol (Q-TOF). Une cellule de mobilité et deux régions de collision ont été intercalées entre les deux analyseurs « Quad » et « TOF » [2]. Un schéma descriptif est présenté en figure 22.



*Figure 23. - Schéma descriptif d'un spectromètre de masse à mobilité ionique [2].*

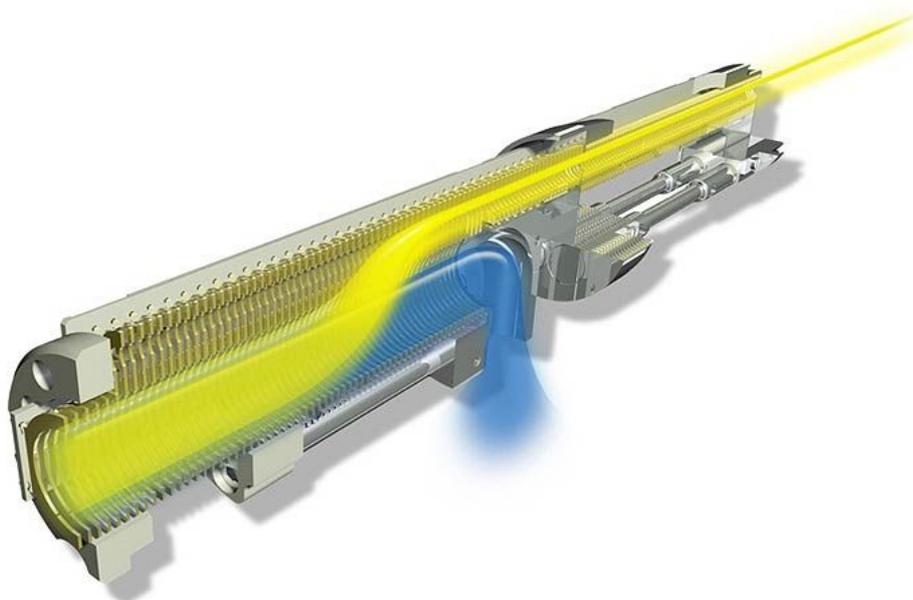
### *La source d'ionisation Z-electrospray*

Au contraire des sources d'ionisation ESI conventionnelles où les ions atteignent le vide du spectromètre dans une trajectoire linéaire, le Synapt G2-Si est muni d'une source en Z-electrospray. La technologie Z-electrospray consiste à délivrer les ions à l'entrée du spectromètre avec une trajectoire qui ressemble à la lettre "Z" (figure 24). La méthode d'ionisation "Z-spray" est plus efficace que la méthode en "trajectoire droite". Dans la méthode conventionnelle, la trajectoire des ions (molécules chargées) et la trajectoire des molécules du solvant (molécules neutres) est la même. Donc, quand les ions sont

attirés par le champ électrique vers l'entrée du spectromètre, les espèces neutres du solvant s'accumulent à l'entrée, ce qui la bloque, ainsi, la sensibilité du spectromètre diminue. En revanche, dans les sources Z-spray, l'entrée du spectromètre est située dans un axe perpendiculaire à l'axe du capillaire, de manière que les ions soient dirigés vers l'entrée du spectromètre et les molécules neutres continuent dans la trajectoire droite. La désolvatation est donc meilleure et la sensibilité du spectromètre augmente.

### *Le Step-Wave*

Le StepWave assure la transmission des ions de la source d'ionisation jusqu'au quadripôle. Il est formé de deux tubes T-Wave, un de grand diamètre et un autre de petit diamètre (figure 23). Les deux tubes sont parallèles l'un sur l'autre et ils sont connectés par un canal d'ions. La technologie T-Wave consiste à utiliser des voltages de radiofréquence (RF) pour confiner les ions dans un axe radial (flux jaune dans la figure 23). Les ions rentrent d'abord dans le guide à ion large, un courant continu (DC) est appliqué pour dévier les ions vers le petit guide. Les molécules neutres sont in affectées par le DC et continuent leur chemin dans le guide large et ils seront évacuées (flux bleu dans la figure 23). Ce processus en "off-axis design" permet d'éliminer les contaminants et transmettre plus d'ions et donc augmenter la sensibilité et diminuer la limite de détection.



**Figure 24. - Schéma du StepWave.** Le flux jaune correspond aux analytes et le flux bleu sont les contaminants (tiré des documents de Waters [182]).

### ***Le quadripôle***

Il se situe avant la cellule de mobilité (figure 22). Le quadripôle (Q) est un analyseur qui peut être utilisé comme un filtre de masse pour sélectionner un rapport  $m/z$  donné. Le quadripôle opère sur la notion de stabilité de trajectoire. Il est composé de 4 barres cylindriques. Les barres opposées sont mises sur un même voltage de même signe, le voltage est formé d'un courant continu (DC) et d'un voltage de radiofréquence (RF).

### ***Le TriWave***

La fonction principale du TriWave est la séparation par mobilité ionique. La mobilité ionique rajoute une nouvelle dimension à l'information obtenue par la spectrométrie de masse. Les ions sont séparés en quelques millisecondes. Ceci s'intercale parfaitement entre les microsecondes de l'analyse TOF et les secondes de l'analyse par chromatographie liquide. Le TriWave est composé de 3 tubes T-Wave (figure 22). Le tube central est la cellule de mobilité TWIMS. Un champ électrique pseudo-continu est appliqué pour faire déplacer les ions et un voltage de radiofréquence (RF) pour les confiner. Le champ électrique pseudo-continu crée des vagues qui propulsent les ions. Les deux tubes avant et après la cellule de mobilité sont appelés Trap et Transfer respectivement. Le Trap accumule les ions durant le cycle de mobilité en cours, ce qui augmente le « duty cycle », et délivre les ions par paquets donnant le temps de départ pour la mobilité. Le tube de mobilité est constitué de deux sections : la première, remplie d'hélium, a pour fonction de permettre l'entrée des ions dans une région de haute pression, qui nécessite une accélération préalable des ions tout en limitant leur fragmentation [183]. Le Transfer transmet les ions de la cellule de mobilité vers l'analyseur de masse (TOF). Le TriWave permet la fragmentation des ions par réglage des potentiels d'accélération entre ses différentes parties. La fragmentation des ions peut se faire soit dans le Trap, soit dans le Transfer. Si la fragmentation est réalisée dans le Trap, les ions fragments peuvent être séparés non seulement par leurs  $m/z$  mais aussi selon leurs structures tridimensionnelles, dans la cellule de mobilité. Par contre, si la fragmentation se fait dans le Transfer, deux isomères de même  $m/z$  peuvent être d'abord séparés dans la cellule de mobilité et ensuite fragmentés dans le Transfer. Leurs fragments vont avoir le même temps de dérive que leurs précurseurs respectifs. Par

conséquent, le couplage IMS-MSMS fournit des informations sur la structure tridimensionnelle et la composition des molécules.

#### ***4. La fragmentation en phase gazeuse***

Il s'agit d'un processus couramment employé en spectrométrie de masse, qui consiste à provoquer des fragmentations d'ions en phase gaz. Pour cela, les ions sont accélérés dans une cellule dans laquelle règne une pression de gaz très modérée. L'ion entre en collision avec les molécules de gaz et accumule progressivement une énergie interne qui le conduit à se fragmenter. On appelle ce processus la dissociation induite par les collisions (En anglais, collision-induced dissociation, CID). Il existe d'autres manières pour fragmenter des ions en phase gaz, comme la capture de photons dans l'infrarouge ou dans l'ultraviolet, ou encore la capture d'électron(s).

Le couplage de la spectrométrie de masse à la mobilité ionique dans le spectromètre de masse que nous utilisons permet de transférer des ions préalablement séparés par mobilité ionique dans une cellule de collision. Ainsi, les ions en sortie de la cellule de mobilité (ions précurseurs) peuvent être fragmentés et les ions fragments sont alors injectés dans un analyseur à temps-de-vol (En anglais, time-of-flight, TOF) pour en mesurer le rapport  $m/z$ .

### ***III. La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)***

La chromatographie liquide est une technique analytique couramment utilisée pour la séparation des peptides et protéines. Cette technique emploie une phase liquide et une phase stationnaire. Les molécules sont entraînées par la phase liquide et séparées selon leurs interactions chimiques avec la phase liquide d'une part et la phase stationnaire d'autre part. C'est une technique séparative robuste qui propose une multitude de modes dédiés à la séparation des mélanges.

#### ***1. La chromatographie liquide en phase inverse (RP-CLHP)***

Dans ce type de chromatographie liquide, la phase stationnaire est une phase apolaire. Par conséquent, les molécules hydrophiles sont éluées en premier alors que les

molécules plus hydrophobes sont retenues par la phase stationnaire et donc éluées tardivement. Une phase apolaire est obtenue par le greffage covalent de chaînes alkyles sur les groupements silanols des supports stationnaires en silice [184]. La longueur des chaînes alkyles greffées est variable, elle peut aller de quatre à dix-huit carbones pour développer des rétentions variables avec la phase stationnaire, qui feront varier le temps de migration. Les molécules hydrophobes comme les peptides et les protéines retenues par la phase stationnaire sont éluées grâce à l'augmentation du pourcentage du solvant organique dans la phase mobile.

## ***2. Couplage avec la spectrométrie de masse***

La chromatographie liquide en phase inverse est facilement couplée à la spectrométrie de masse parce qu'elle peut se faire avec des phases mobiles compatibles avec l'ionisation des molécules en spectrométrie de masse (acétonitrile ou méthanol). C'est donc une technique de choix pour l'analyse de peptides et de protéines. Le couplage LC/MS permet de faire une séparation des molécules avant l'analyse masse, ce qui simplifie l'identification des protéines par le biais d'une séparation chromatographique au préalable [185]. La différenciation entre des isomères devient possible et l'analyse d'échantillons complexes comme par exemple les digestats de protéines est facilitée [150]. Pour simplifier, la chromatographie liquide permet de traiter l'échantillon avant son entrée dans le spectromètre de masse. Les peptides des digestats sont d'abord séparés par la chromatographie puis analysés par la spectrométrie de masse. Il devient alors plus facile de sélectionner des peptides d'intérêt et de les fragmenter en phase gazeuse afin de caractériser leur structure peptidique [153].

## ***Chapitre 4 Matériels et méthodes.***

### ***I. Matériel et méthodes pour l'analyse des tubulines***

#### ***1. Purification des tubulines à partir de cerveau de porc***

Des peptides issus de tubulines de cerveau de porc ont été utilisés comme matériel biologique. La purification de tubulines se fonde sur l'alternance d'étapes de polymérisation et de dépolymérisation. Le protocole de la purification est détaillé à la figure 24. La dépolymérisation se fait à 4°C dans le tampon BRB80 (Brinkley BR Buffer 1980: communément utilisé pour polymériser les microtubules). La polymérisation se fait à 30°C en présence de GTP et de glycérol, car le GTP inhibe la dépolymérisation. La seconde polymérisation se fait dans un tampon HMPB (High molarity PIPES buffer) à 1M de PIPES (Acide pipérazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonique)), ce qui permet d'enlever tous les MAPs fixées aux microtubules [186]. Cette étape remplace la chromatographie sur phosphocellulose utilisée dans les anciens protocoles [31]. Les centrifugations sont menées à 4°C (dépolymérisation) ou à 30°C (polymérisation). Après la deuxième polymérisation, un coussin de saccharose est utilisé dans la centrifugation de microtubules. Nous mettons du saccharose au fond du tube d'ultracentrifugation ; les microtubules, qui sont lourds, vont percer le coussin et sédimenter, alors que tout ce qui est plus léger restera au-dessus du coussin. Ainsi, dans le culot se trouvent les microtubules purifiés.

#### ***Tampons et solutions utilisées***

##### ***Tampon de dépolymérisation (TD) :***

- \* 50 mM de MES (acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique).
- \* 1 mM de CaCl<sub>2</sub>.

##### ***Tampon HMPB :***

- \* 1M de K-PIPES pH 6,9.
- \* 10 mM de MgCl<sub>2</sub>.
- \* 20 mM d'EGTA.

##### ***Tampon BRB80 :***

- \* 80 mM de K-PIPES (pH 6,8).

\* 1 mM de MgCl<sub>2</sub>.

\* 1 mM d'EGTA.

### **GTP 200 mM:**

\* 0,1 g de G8877 de Sigma.

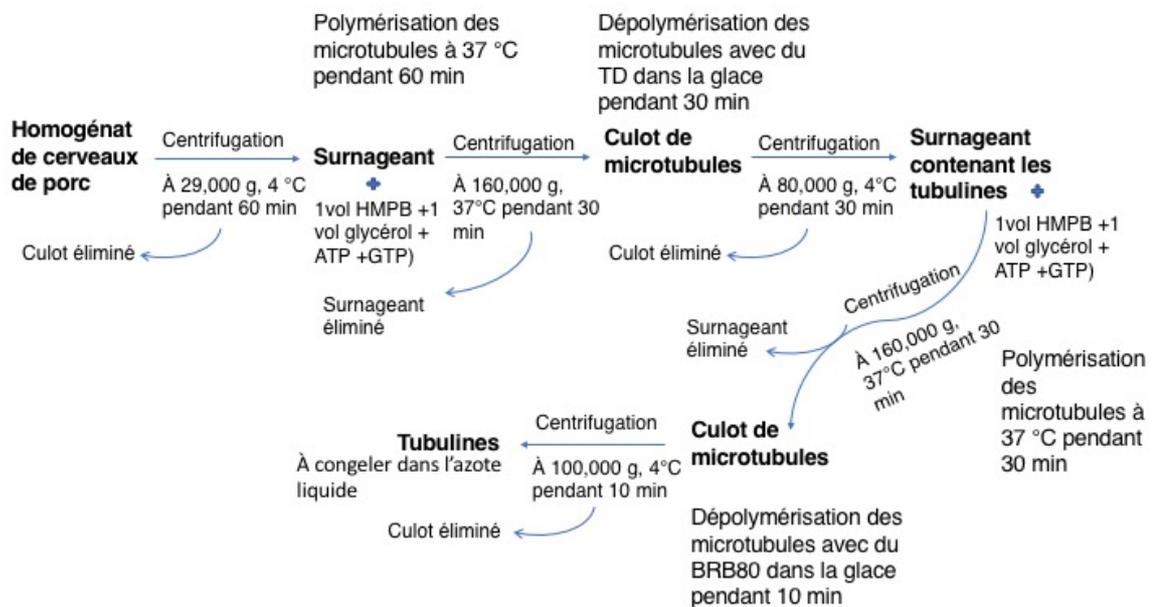
\* 1 mL d'H<sub>2</sub>O.

### **Coussin de saccharose:**

\* 1 g de saccharose.

\* 3,3 mL de glycérol.

\* 6,6 mL de BRB80.



**Figure 25. – Schéma descriptif de la purification des tubulines à partir de cerveaux de porc.** Les cerveaux de porc sont mixés et conservés dans du TD. Après une première centrifugation à froid pendant 60 min on garde le surnageant (contient des microtubules dépolymérisés) et on élimine le culot. Dans le tube du surnageant, on rajoute du 1 volume de HMPB, 1 volume de glycérol et du GTP, et on met le tube dans un bain-marie à 37 °C pour que les tubulines se polymérisent. La deuxième centrifugation se fait à 37 °C afin que les microtubules ne se dépolymérisent pas et restent dans le culot, à cette étape on élimine le surnageant. Les microtubules sont ensuite dépolymérisés dans le TD à froid pendant 30 min. Par conséquent, la troisième centrifugation se fait à froid, pour donner un surnageant contenant les tubulines, à cette étape, c'est le culot qui est éliminé. Le surnageant est donc mis pour une deuxième polymérisation à 37 °C et pendant 30 min. Cette polymérisation est suivie d'une centrifugation à 37 °C pendant 30 min pour donner un culot de microtubules. Les microtubules sont ensuite dépolymérisés et centrifugés à froid pendant 10 min pour donner des tubulines pures (surnageant).

## **2. Production des peptides C-terminaux des tubulines**

### ***Digestion enzymatique***

La tubuline purifiée est digérée par l'endoprotéase endoAspN afin d'en libérer l'extrémité C-terminale. La digestion se fait pendant 5h à 36°C. Le rapport massique enzyme/substrat (E/S) doit être de 1/400. Pour digérer 400 µg de tubuline, il faut donc utiliser 1 µg d'endoAspN (Promega, Wisconsin, Etats-Unis). L'endoAspN est commercialisée sous forme de lyophilisat en fioles de 2 µg (Il est préférable d'utiliser toute la quantité et d'éviter de recongeler). Pour redissoudre la protéase, on ajoute 50 µL d'eau bidistillée dans la fiole. La réaction de protéolyse est stoppée en congelant le tube en attendant la chromatographie échangeuse d'anions.

### ***Séparation et purification des peptides C-terminaux des tubulines par chromatographie échangeuse d'ions***

Les peptides d'intérêt, les peptides C-terminaux des tubulines, sont très acides car à forte composante acide glutamique. Leur acidité est, de plus, incrémentée par les polymodifications. La chromatographie échangeuse d'anions est idéale pour séparer les peptides composant le mélange. Nous avons utilisé un système Akta Purifier avec une colonne Resource Q 1 mL (GE Healthcare). Le tampon A contient 20 mM Tris-HCl, 50mM NaCl, pH 8.0, alors que le tampon B correspond au tampon A mais avec 1M de NaCl final. Un gradient de 0 à 100% de tampon B est réalisé en 40 min avec un débit de 0.1 mL/min. Les peptides ont été détectés par un détecteur UV (longueur d'onde de 214 nm).

### ***3. Spectrométrie de masse à mobilité ionique***

La caractérisation structurale des peptides C-terminaux des tubulines est effectuée par spectrométrie de masse à mobilité ionique. L'instrument utilisé est le Synapt G2-Si HDMS (Waters, UK). Le mode d'ionisation est l'électronébulisation (En anglais, electrospray ionisation, ESI), ce qui impose un dessalage des peptides grâce à la chromatographie en phase inversée.

### ***Matériel synthétique***

Pour valider l'approche expérimentale des peptides synthétiques, mimant la structure des tubulines glycyliées, ont été employés (PSL, Germany). Les peptides synthétiques, conditionnés avec du sel trifluoroacétate d'ammonium (toutes les fonctions carboxylate sont protonées, seule la fonction  $\alpha$ -amine est protonée et le contre-ion est le

trifluoroacétate), ont été redissous dans de l'acétonitrile 50% (V/V) dans l'eau contenant 1% d'acide formique. La concentration des solutions ainsi constituées est de 1pmol/ $\mu$ L.

### ***Préparation de l'échantillon***

Le dessalage des fractions chromatographiques se fait selon la méthode décrite par Rusconi *et al* [187], à l'aide d'une microcolonne préparée à l'aide d'un cône effilé (Eppendorf gel loader) et de la résine polymérique similaire à de la résine de phase inversée (Résine POROS 50 R2), que l'on conserve dans de l'acétonitrile pur. La solution d'équilibration de la colonne est l'acide formique 1% dans l'eau et la solution aqueuse d'éluion est composée d'acétonitrile 50% (V/V) acidifié à 1% (V/V) d'acide formique. Avant de percoler l'échantillon dans la micro-colonne, celui-ci est préalablement acidifié avec 3% d'acide formique afin de protoner les fonctions carboxyliques des résidus acides afin qu'ils s'adsorbent à la résine hydrophobe. Le dessalage à proprement parler s'effectue en rinçant la colonne à l'acide formique 1% (V/V) dans l'eau. L'éluion est alors opérée en percolant dans la colonne le tampon d'éluion. L'éluât est alors prêt à être analysé par spectrométrie de masse.

### ***Spectrométrie de masse en tandem***

Les peptides ont été fragmentés par CID dans le compartiment Transfer du TriWave. L'énergie de collision (CE) a été optimisée suivant le peptide analysé, elle se situe entre 16 et 23 V.

### ***Conditions de la source d'ionisation***

Le potentiel d'électronébulisation était de 3,2 kV. La température de la source et celle de désolvatation étaient de 80°C et de 280 °C respectivement.

### ***Conditions du TWIMS***

Le gaz tampon dans la cellule de mobilité est l'azote, à une pression de 3 mbar. Deux paramètres de mobilité fondamentaux peuvent être réglés par l'utilisateur: la vitesse de la vague (wave velocity, WV) et la hauteur de la vague (wave height, WH). Une explication du fonctionnement de la cellule de mobilité Tri-Wave de chez Waters est proposée au chapitre 2, mais ces deux paramètres déterminent la capacité de la cellule de mobilité à séparer nos peptides synthétiques diglycylés. Nous avons fait varier ces deux paramètres afin d'avoir la meilleure séparation par mobilité ionique des deux

peptides synthétiques. Les valeurs suivantes ont été retenues:  $WV = 722 \text{ m/s}$  ;  $WH = 18.9 \text{ V}$ . Pour avoir une meilleure séparation, de nouvelles valeurs ont été utilisées :  $WV = 1000 \text{ m/s}$  ;  $WH = 40 \text{ V}$ .

## ***II. Matériel et méthodes pour l'analyse des hormones de croissances***

L'hormone de croissance humaine naturelle a été achetée de l'institut NIBSC (Londres, UK), l'hormone de croissance recombinante saisie de douane a été fournie par l'AFLD (Châtenay-malabry, France), l'hormone de croissance humaine pharmaceutique a été achetée dans une pharmacie locale (Orsay, France).

### ***1. Ultrafiltration***

L'ultrafiltration par des concentrateurs de type Vivaspin permet de nettoyer, modifier la composition du tampon et concentrer l'échantillon. Les concentrateurs Vivaspin sont des dispositifs constitués par une membrane permettant de filtrer les molécules en fonction de leur masse moléculaire. Nous avons utilisé des concentrateurs (Sartorius, France) avec un cut-off de 5 kDa. Ce cut-off est compatible avec la masse molaire de l'hormone de croissance (22 kDa). Cette masse est convenable pour l'hormone de croissance qui fait 22 kDa. Ces dispositifs fonctionnent par ultracentrifugation jusqu'à 14000 g. Nous avons filtré 3 types d'hormones de croissance dans l'acétate d'ammonium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pH 8,5, la hGH pituitaire, la hGH pharmaceutique (N) et la hGH saisie de douane (G). La filtration a été faite à 4°C à 14000 g en 3 runs de 20 min. Les échantillons filtrés ont été ensuite analysés par spectrométrie de masse MS.

### ***2. Analyse de spectrométrie de masse des hormones de croissances***

Les hormones de croissance humaines intactes filtrées ont été analysées par TOF-MS (Synapt G2-Si HDMS, Waters). Les échantillons ont été dilués dans 50% (V/V) d'acétonitrile avec 2% (V/V) d'acide formique. Les échantillons ont été ionisés par électronebulisation avec un voltage de capillaire de 2.8 kV. La température de la source et celle de désolvatation étaient de 80°C et de 280 °C respectivement.

### ***3. Digestion enzymatique de l'hormone de croissance***

Les hormones de croissance ont été digérées par la trypsine (Promega, Wisconsin, USA) avec un rapport E/S 1:100 sur la nuit. Avant la digestion les protéines ont été réduites avec 5-10  $\mu\text{M}$  (Concentration finale en solution) de DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pendant 2 heures à 56 °C et puis alkylées dans le noir pendant 1 heure avec 3  $\mu\text{M}$  (Concentration finale en solution) d'iodoacétamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

### ***4. Chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse***

La chromatographie liquide en phase inverse a été utilisée pour purifier et séparer les différentes formes de l'hGH intacte et pour séparer les peptides après digestion enzymatique. L'hormone de croissance intacte a été analysée avec une colonne C8 alors que son digestat a été analysé avec une colonne C18. Le choix des colonnes est justifié par le poids moléculaire de chaque analyte. En effet, plus la chaîne carbonée de la colonne est longue, plus sa capacité à retenir les molécules est grande. Par conséquent, pour retenir les peptides (faible poids moléculaire) on utilise des colonnes avec longues chaînes carbonées et pour les protéines (poids moléculaire moyen pour la GH), on utilise une colonne avec un chaîne carbonée plus ou moins longue.

Pour l'hGH intacte, une colonne C8 (300 Å, 4,6mm x 250 mm, diamètre des particules 5 $\mu\text{m}$ , Interchim, France). Les protéines ont été éluées avec 70% (V/V) de phase B. La phase mobile A est une phase aqueuse à 0.1% (V/V) d'acide formique. La phase mobile B est composée de 90% (V/V) d'acétonitrile, 10% (V/V) H<sub>2</sub>O et 0.1% (V/V) d'acide formique.

Pour les peptides issus de la digestion de hGH, une colonne C18 (300 Å, 2,1mm x 50 mm, diamètre des particules 1,7 $\mu\text{m}$ , Waters, UK) a été utilisée. Un gradient a été utilisé pour éluer les peptides. La phase mobile A est une phase aqueuse à 0.1% d'acide formique. La phase mobile B est composée de 90% (V/V) d'acétonitrile, 10% (V/V) H<sub>2</sub>O et 0.1% (V/V) d'acide formique. Le gradient est détaillé dans le tableau 1.

Temps (min)	A%	B%
5	95	5
15	80	20
25	50	50
30	0	100
45	0	100
50	95	5
60	95	5

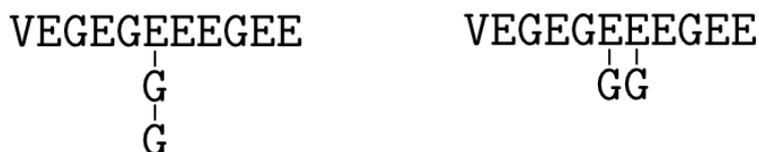
**Tableau 1-** Gradient CLHP en phase inverse pour séparer les peptides de la hGH.

## *Travaux de thèse*

## ***Chapitre 5 Caractérisation des polymodifications des tubulines***

Afin d'établir l'intérêt de la mobilité pour améliorer la compréhension des difficultés présentées dans le premier chapitre (paragraphe 5) dans le domaine des polymodifications des tubulines, nous avons choisi un couple de peptides C-terminaux de tubuline alpha diglycylés isomères structuraux (figure 25).

Nous avons choisi des peptides dont les différences structurales sont les plus faibles possible par rapport à celles que nous serons susceptibles de rencontrer lors d'analyses de peptides biologiques. Ces deux peptides synthétiques sont des isomères de site, l'un portant une chaîne latérale diglycine sur un seul site et l'autre portant deux résidus glycine mais chacun sur un site différent (voir figure 24).

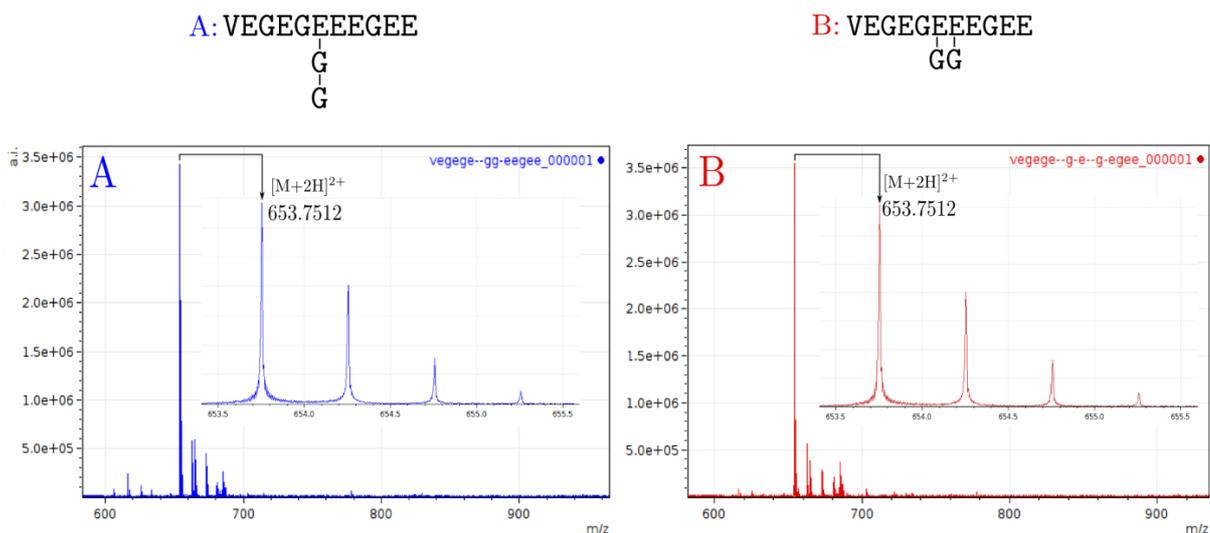


**Figure 26. - Peptides de synthèse diglycylés.** Ces deux peptides ont la même masse moléculaire ( $M_{\text{monoisotopique}}=1305,484 \text{ Da}$ ) ; le pic de masse pour l'ion  $[M+2H]^{2+}$  est attendu à  $m/z$  653,73.

### ***I. Vérification structurale des peptides synthétiques***

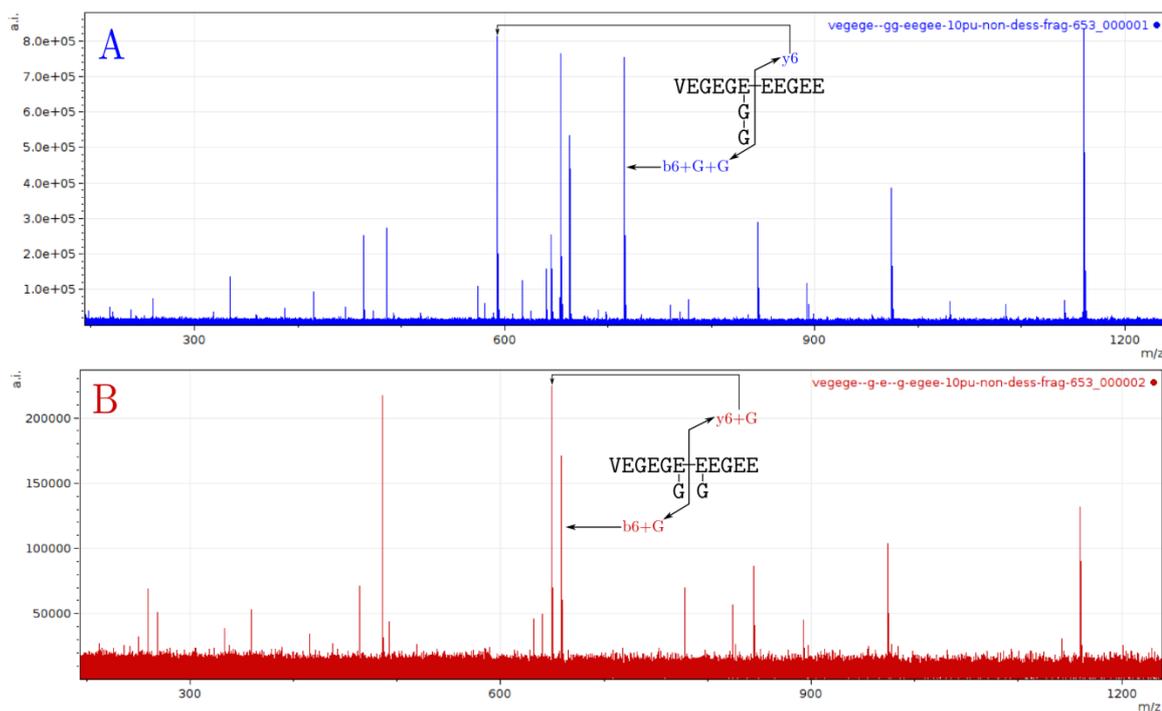
Il nous a fallu en tout premier lieu vérifier que leurs structures étaient celles attendues (figure 25). Ceci a pu être déterminé par spectrométrie de masse conventionnelle. En effet, les deux peptides, étant des isomères, devaient produire exactement le même spectre de masse. En revanche, l'on pouvait s'attendre à des spectres de fragmentation différents.

Ces suppositions ont été confirmées : l'analyse par spectrométrie de masse ESI-TOF des deux peptides pris isolément a produit des pics de masse à une valeur identique correspondant à la valeur  $m/z$  calculée ( $m/z$  653,73) pour des ions bichargés. Les spectres illustrés à la figure 26 montrent bien que les deux peptides de synthèse ont la même masse.



**Figure 27.- Spectres de masse de peptides isomères de structure.**  $M_{\text{monoisotopique}} = 1305,484$  Da ;  $[M+2H]^{2+}$  à  $m/z$  calculé 653,73 et  $m/z$  mesuré 653,75. Les conditions d'analyses : 3 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvation. Spectres obtenus après infusion d'une solution de peptides directement dans la source.

Nous avons donc fragmenté chacun des deux peptides isolément par CID. Les spectres de fragmentation obtenus sont montrés à la figure 27 sont différents. En effet, le spectre A contient la signature de la structure diglycylée sur un seul site, alors que le spectre B correspond de la structure à deux résidus glycine sur deux sites différents.

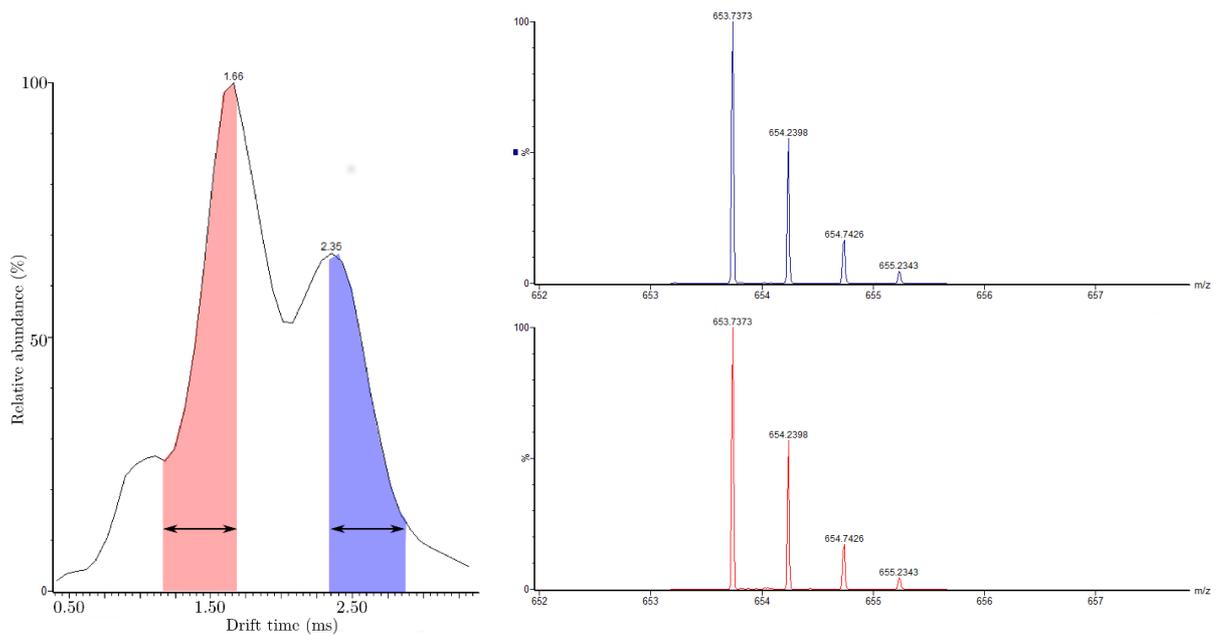


**Figure 28. - Spectres de fragmentation en phase gazeuse.** Ions précurseurs  $[M+2H]^{2+}$  à  $m/z$  mesuré 653,75. A: spectre CID du peptide diglycylé à structure linéaire. B: spectre CID du peptide diglycylé à structure multisite (figure 11). Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation. L'énergie de collision était de 20 V. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.

Après avoir établi que les peptides synthétiques avaient bien les structures attendues, nous avons étudié leur mobilité en phase gaz.

## II. Séparation par mobilité ionique des peptides isomères

Afin de comparer les mobilités ioniques des deux peptides, nous les avons mélangés dans une solution équimolaire à 0,5 pmol/uL (0,5 uM) finaux. Le mélange a été analysé par spectrométrie de masse à mobilité ionique. Le mobilogramme montré à la figure 28 montre que le mélange comporte des ions dont la mobilité est significativement différente, avec des temps de dérive compris entre 1,25 ms et 2,75 ms. On constate que la résolution des espèces ioniques n'est que partielle, puisque les deux pics à 1,66 ms et à 2,35 ms ne sont pas séparés par un retour à la ligne de base.



**Figure 29. - Spectre de mobilité ionique d'un mélange 50%/50% de deux peptides isomériques diglycylés.** Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation. Les paramètres de mobilité étaient 722 m/s pour la WV et 18,2 V pour la WH. Le gaz tampon utilisé est l'azote N<sub>2</sub>.

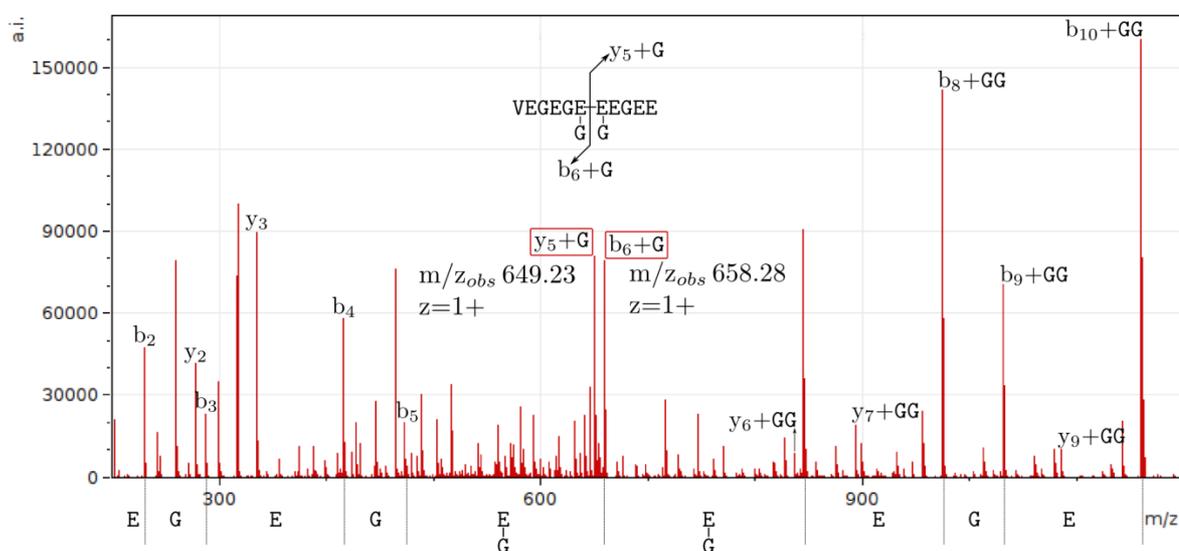
Afin de vérifier que les deux pics de mobilité correspondaient aux peptides diglycylés, nous avons extrait les spectres de masse associés aux aires sous ces deux pics (rouge et bleu de la figure 28). Les espèces moléculaires responsables de chacun des deux pics de mobilité sont bien l'un et l'autre des peptides diglycylés. Mais ce renseignement ne permettait pas d'attribuer aux différentes mobilités ioniques observées une structure d'isomère définie. En première hypothèse, nous pouvons supposer que l'espèce moléculaire responsable du temps de dérive le plus court soit le peptide diglycylé sur deux sites, car plus compact que son isomère (cf. figure 27). Pour confirmer cette possibilité, les ions issus de la cellule de mobilité ont été fragmentés par dissociation induite par la collision (CID)

### ***1. Identification des peptides isomères séparés par mobilité ionique***

Puisque nous avons déjà établi que les deux peptides diglycylés avaient des profils de fragmentation différents, nous espérons pouvoir tirer parti de ces signatures dans

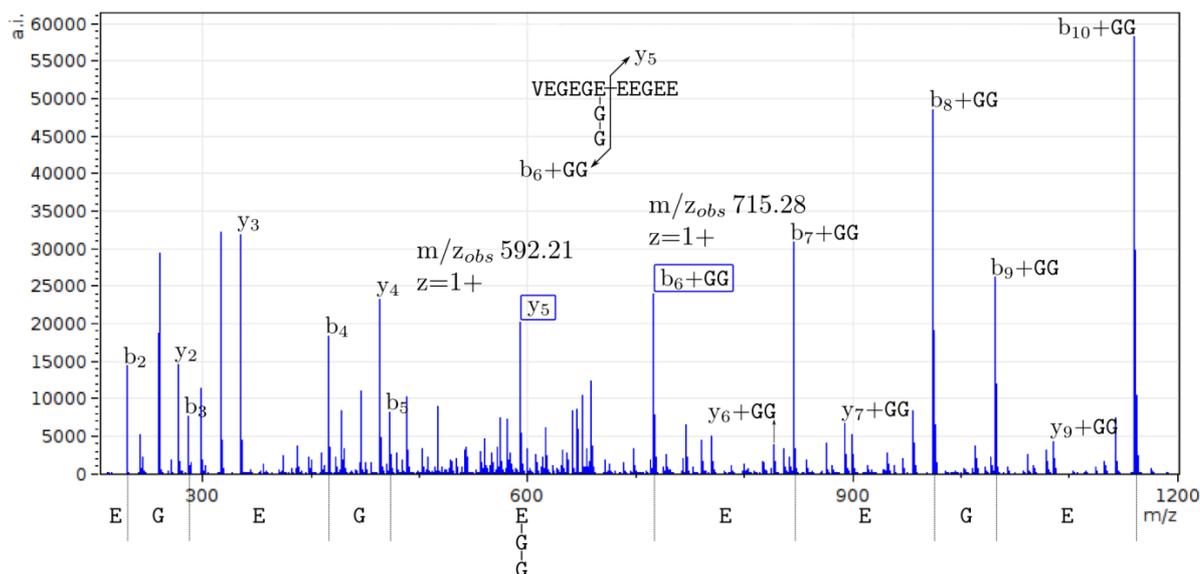
une expérience de fragmentation CID sur les ions préalablement séparés dans la cellule de mobilité.

L'intégration des spectres de fragmentation pour les ions sortis de la cellule de mobilité entre 1,25 ms et 1,75 ms (aire rouge de la figure 28) produit le spectre présenté sur la figure 28. Le pic de masse à  $m/z$  649.24 correspond à l'ion-produit  $y_5$  monoglycylé (calculé:  $m/z$  649,23) et le pic de masse à  $m/z$  658,28 correspond à l'ion-produit  $b_6$  monoglycylé (calculé:  $m/z$  658,27). Il s'agit donc du peptide biglycylé sur deux sites, ce qui conforte notre hypothèse selon laquelle il a une structure plus compacte que l'autre.



**Figure 30. - Spectre de fragmentation CID après parcours de la cellule de mobilité -- ion précurseur au temps de dérive court.** Les conditions d'analyses : 3 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvation. L'énergie de collision était de 23 V. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.

La confirmation de ce résultat vient de l'analyse par fragmentation des ions issus de la cellule de mobilité entre 2,37 ms et 2,75 ms (aire bleue de la figure 28). Le spectre de fragmentation obtenu est représenté à la figure 29. Le pic de masse à  $m/z$  715,30 correspond à l'ion-produit  $b_6$  diglycylé (calculé:  $m/z$  715,28) et le pic de masse à  $m/z$  592,22 correspond à l'ion-produit  $y_5$  non glycylé (calculé:  $m/z$  592,21).



**Figure 31. - Spectre de fragmentation CID après parcours de la cellule de mobilité -- ion précurseur au temps de dérive long.** Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation. L'énergie de collision était de 23 V.

En résumé, les deux isomères peptides sont effectivement séparés dans la cellule de mobilité et par fragmentation CID. Par contre, cette séparation n'est pas parfaite, parce que les deux peptides restent un peu mélangés dans la cellule. En effet, le fragment b<sub>6</sub>+G signature du peptide diglycylé multisite est aussi présent dans le spectre du peptide diglycylé monosite mais avec une faible intensité. L'idée est que si nous parvenions à obtenir une séparation, même relativement limitée, celle-ci doit permettre d'ouvrir la voie à une séparation bien meilleure d'autres isomères peptidiques issues de préparations de tubulines biologiques.

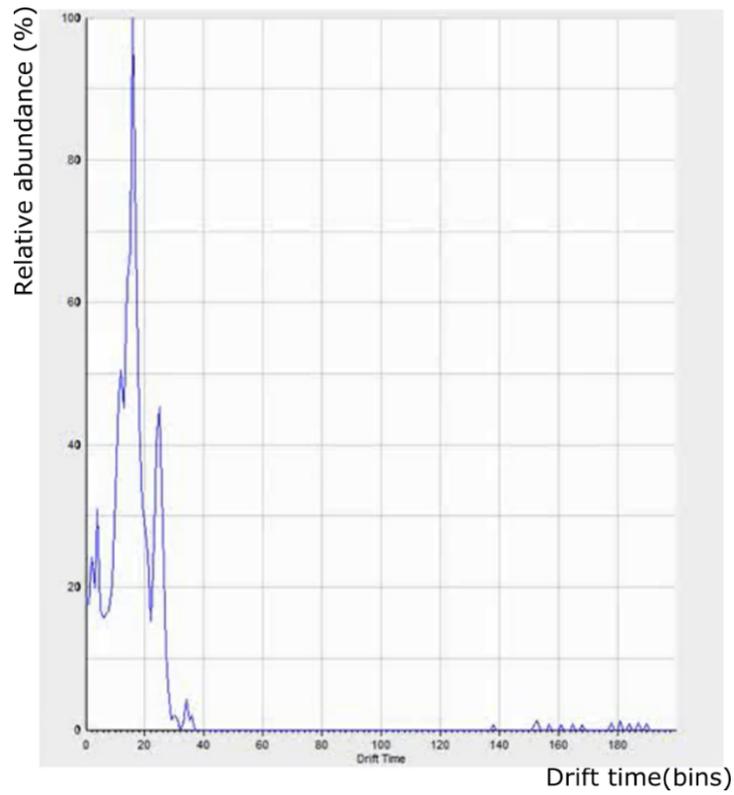
On peut noter que Wu *et al* [188] sont parvenus à obtenir une séparation avec un retour à la ligne de base de peptides isomères. C'est probablement que leurs peptides avaient une différence plus grande. Nous n'avons pas eu toutes les données pour faire les calculs de section efficace de collision de nos deux peptides synthétiques et nous ne sommes donc pas en mesure d'indiquer quel est le taux de différence entre les deux sections.

## ***2. Optimisation des paramètres de mobilité ionique***

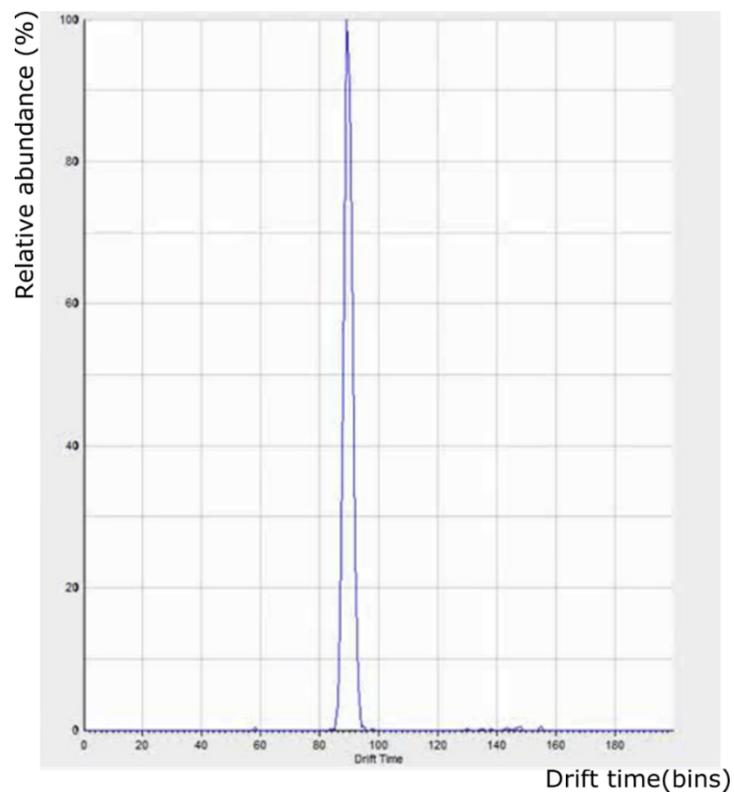
Sur le Synapt G2Si-HDMS (voir paragraphe 2.d, chapitre 3 pour plus d'explications), l'utilisateur ne règle pas directement le temps d'observation de la mobilité ionique. L'acquisition des différents points temporels est synchronisée avec les impulsions du pusher du temps de vol, lui-même cadencé par le temps pris par les ions les plus lourds pour parcourir le temps de vol. De plus, l'instrumentation fixe à 200 le nombre de cycles du pusher au cours d'une séparation en mobilité. Le temps dévolu à la séparation est donc fixé à l'avance par des paramètres sans lien direct avec ceux de mobilité (cadencement du pusher du temps de vol et un total de 200 bins). Par exemple une séparation de 69  $\mu\text{s}$  entre les impulsions du pusher, fixé par une gamme de masse avec un  $m/z$  maximum de 2000, conduira à une durée totale d'enregistrement de  $200 \times 0,069 = 13,8$  ms, avec un point tous les 69  $\mu\text{s}$  (1 bin). Après la fin des 13,8 ms (200 bins), la cellule de dérive doit être vide avant le début d'une nouvelle séparation d'ions. Si une nouvelle séparation commence alors que des ions de la séparation précédente sont toujours présents dans la cellule de dérive, un phénomène qui s'appelle « carry-over » se produit (Figure 31). Les résultats obtenus avec la présence de ce phénomène ne sont pas considérés comme corrects, car, pour des raisons de synchronisation, le temps entre cycles varie d'un cycle de mobilité à l'autre.

Pour éviter ce phénomène, le fabricant recommande de régler les paramètres instrumentaux tels que la séparation d'ions se fasse entre les cycles de pusher 20 à 180 de manière à garder les premiers et les derniers 20 bins toujours vides (cf. figure 31). Les paramètres de mobilité ionique doivent être optimisés de manière à respecter cette règle.

Les paramètres qui influencent sur la séparation en mobilité sont la Vitesse de la vague (WV, en m/s), et la hauteur de la vague (WH, en V) et la pression du gaz qui remplit la cellule de mobilité. Le « carry-over » est observé quand la hauteur de la vague est très faible ou la pression du gaz est trop élevée. La situation opposée résulte en une mauvaise séparation, les pics sont trop proches. La meilleure séparation est obtenue lorsque les pics sont étalés le plus possible entre les cycles 20 et 180 comme pour l'exemple présenté à la figure 32.



**Figure 32.** - Profil incorrect de séparation en mobilité ionique. Il représente un phénomène de « carry-over » entre deux cycles de mobilité.

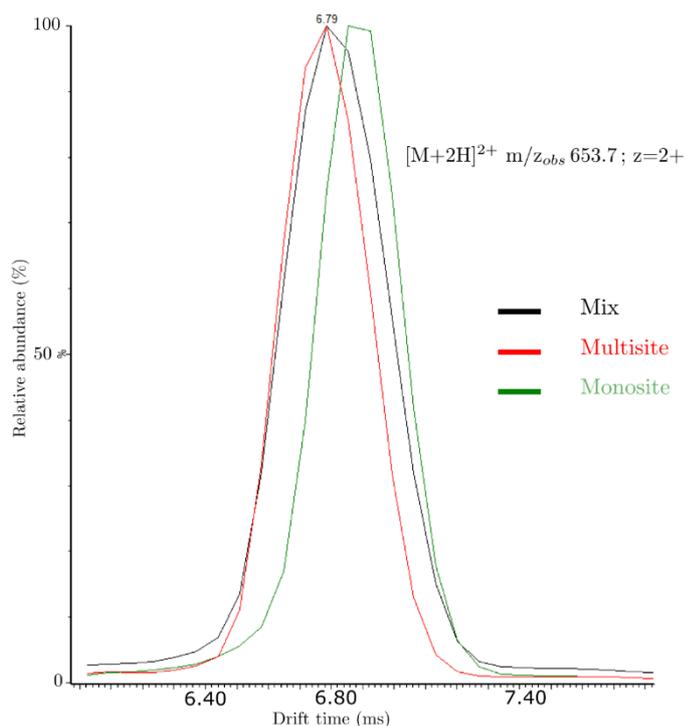


**Figure 33.** - Séparation de mobilité correcte. Les ions sont entre 20 et 180 bins. Les paramètres TWIMS sont optimisés pour que la vitesse des ions ne soit ni, trop rapide, ni trop lente.

Les résultats présentés au début de ce chapitre ont été obtenus suite à une optimisation des paramètres jusqu'à l'obtention du profil présenté. Les valeurs  $WH=18$  V et  $WV=722$  m/s ont produit un profil indiquant que les peptides sont séparés partiellement. Ces paramètres donnent lieu à un profil de mobilité cohérent mais les ions passent par un « carry-over » avant que le profil ne se stabilise. Ces résultats ont été discutés avec un expert de TWIMS, Kevin Giles (Corporate Scientific Fellow Waters Corporation, Milford · MS Research). Il nous a confirmé que la séparation obtenue n'est pas fiable parce qu'un phénomène de « carry-over » a lieu. En effet, il nous a expliqué que le voltage est remis à zéro après chaque cycle de mobilité et donc une séparation ne peut pas se faire en deux cycles de mobilité.

### ***3. Analyse de mobilité ionique avec des paramètres conventionnels***

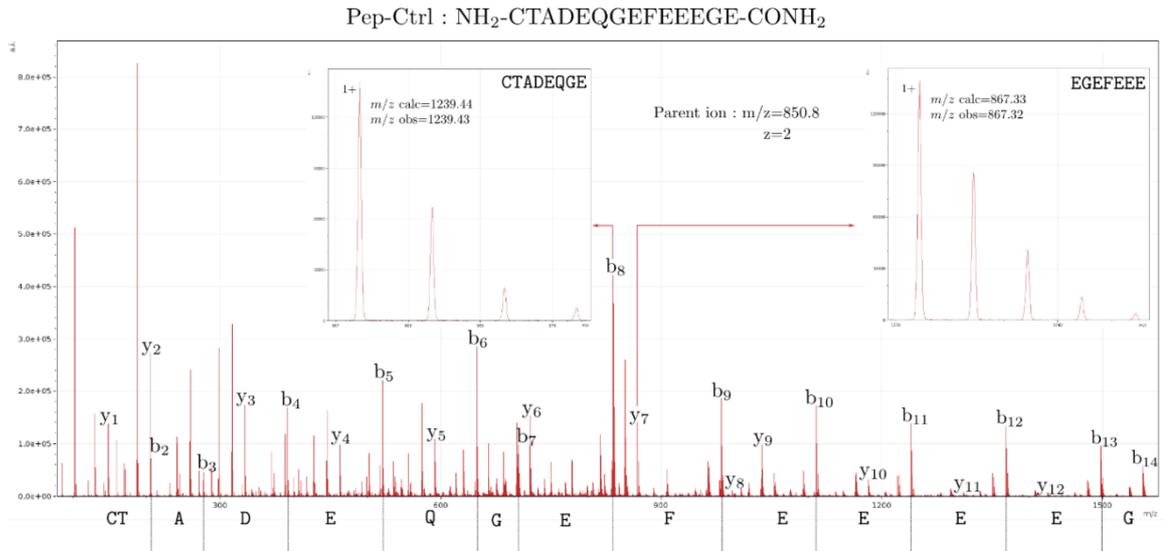
Les résultats présentés ci-dessus ont été obtenus avec des paramètres de mobilité ionique qui ne sont pas conventionnels. Par conséquent, nous avons répété l'analyse IMS-MS avec des paramètres de mobilité optimisés avec la bonne méthode ( $WH=40$  V;  $WV=1100$  m/s). Malheureusement, nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats qu'auparavant. Il n'y a pas de séparation entre les deux conformations des peptides. Le spectre de mobilité dans la figure 33 montre un seul pic pour chaque peptide, ainsi que pour le mélange.



**Figure 34. - Comparaison entre les profils de mobilité ionique des peptides glycylés, sur deux sites et un seul site et le mélange des deux.** Ces profils ont été obtenus avec des paramètres de mobilité conventionnels. Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation. Les paramètres de mobilité étaient 1000 m/s pour la WV et 40 V pour la WH. Le gaz tampon utilisé est l'azote N<sub>2</sub>.

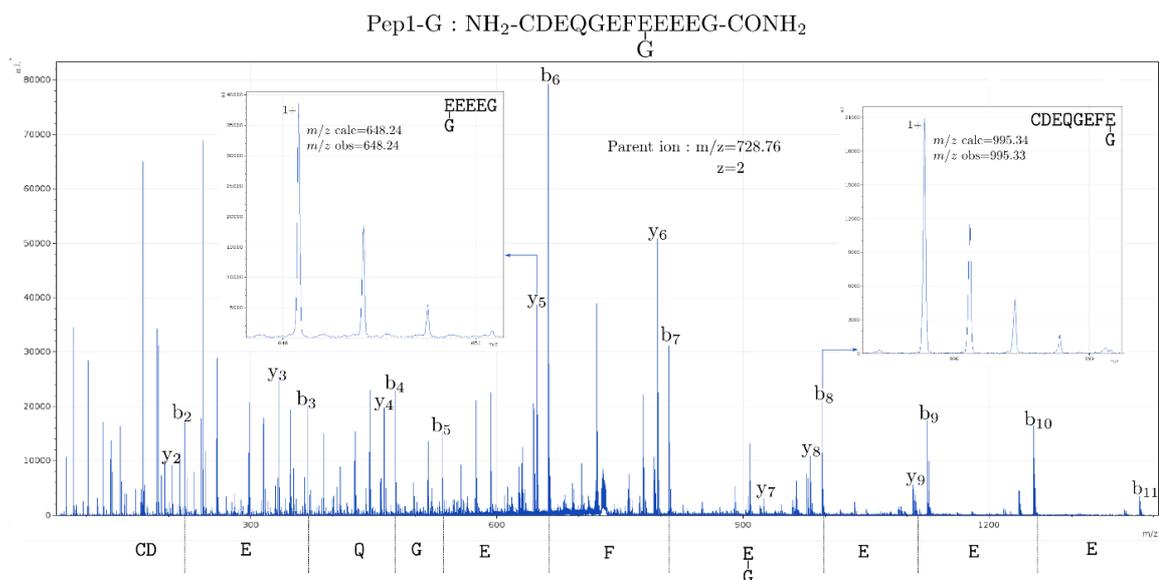
Nous avons essayé d'optimiser les paramètres de mobilité ainsi que le débit de gaz dans la cellule de mobilité. Toutes les combinaisons de paramètres qui respectaient les normes de séparation en mobilité TWIMS ne permettaient la séparation des deux isomères peptidiques. Nous avons aussi testé l'expérience en mode d'ionisation négative et nous avons obtenu les mêmes résultats. Finalement, nous avons pensé que l'addition de cations aux peptides pourrait stabiliser des structures différentes. Nous avons testé plusieurs cations, le calcium, le plomb, le césium et le guanidinium [189]. Malheureusement, avec aucun des cations, nous avons pu obtenir un meilleur résultat. Nous pouvions essayer d'autres méthodes comme le changement du gaz de la cellule de mobilité mais nous n'avons pas pu le réaliser à cause du temps consacré à ce projet.



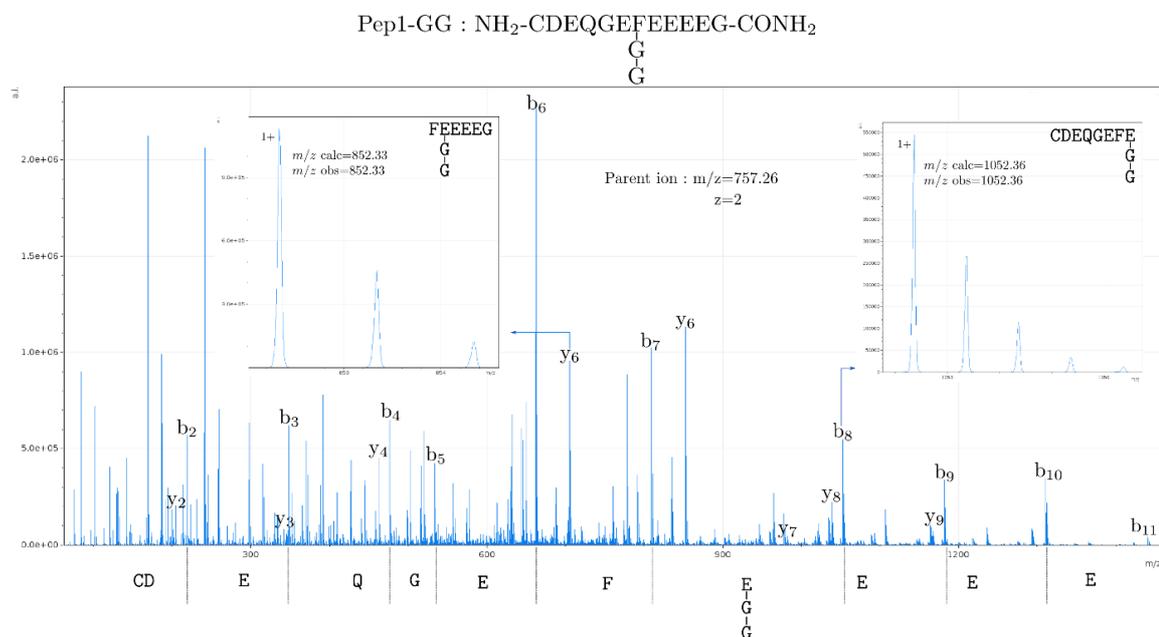


**Figure 36.** - *Spectre de fragmentation CID du peptide contrôle. Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvation. L'énergie de collision était de 22 V. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.*

Les spectres de fragmentation des peptides monoglycylé Pep1-G et diglycylé Pep1-GG sont représentés dans les figures 36 et 37 respectivement. Les fragments signatures du peptide Pep1-GG sont les ions b8 (m/z 1052,36) et y6 (852,33) avec deux glycines rajoutées sur chacun d'eux. Pour le peptide Pep1-G, les ions fragments y5-G et b8-G sont spécifiques pour sa structure.



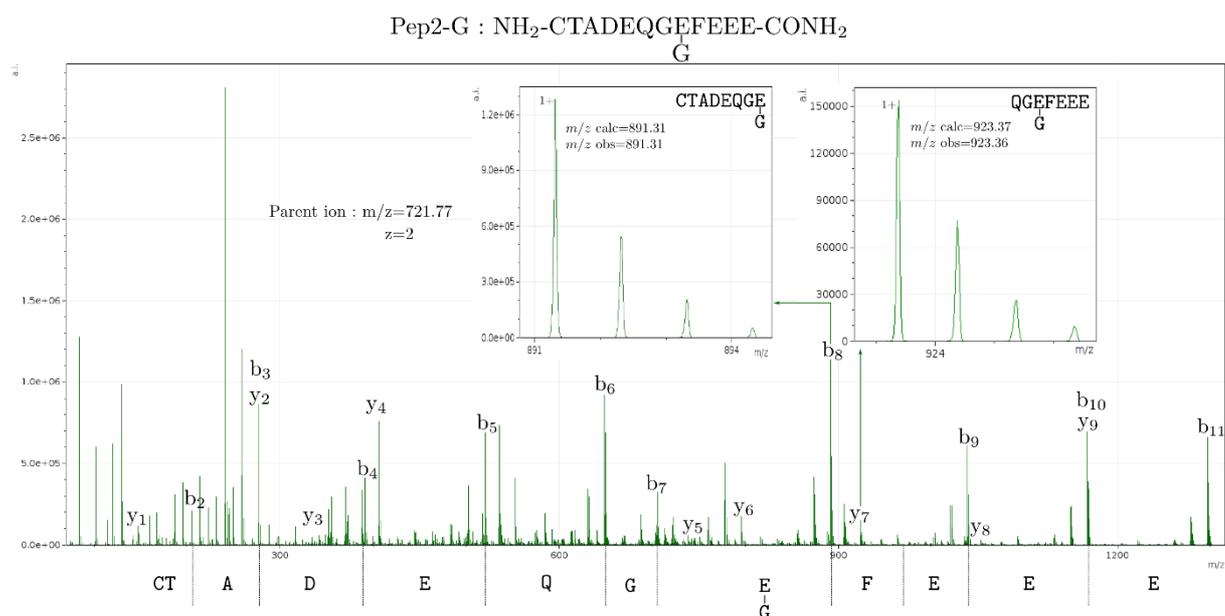
**Figure 37.** - Spectre de fragmentation CID du peptide pep1-G (monoglycylé). Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvation. L'énergie de collision était de 19 V. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.



**Figure 38.** - Spectre de fragmentation CID du peptide pep1-GG (diglycylé). Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvation. L'énergie de collision était

de 20 V. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.

Le même travail effectué pour les peptides pep1-G et pep1-GG, a été réalisé pour les paires de peptides Pep2 et Pep3 (figures 38-41).

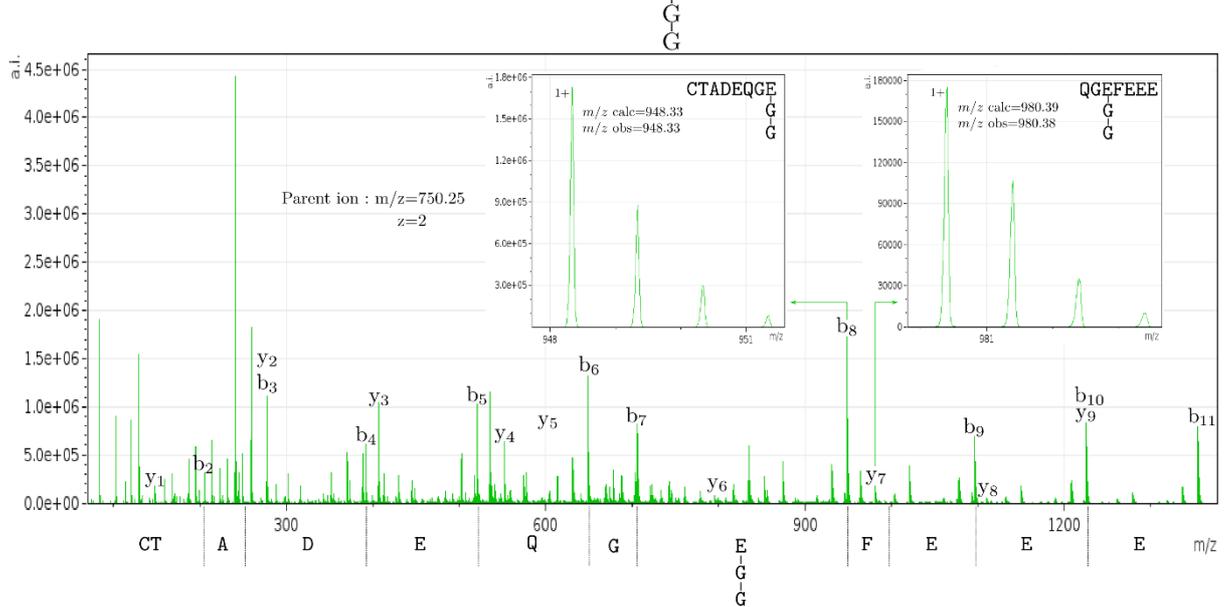


**Figure 39. - Spectre de fragmentation CID du peptide pep2-G (monoglycylé).**

Les ions y7-G (encart de droite) et b8-G (encart de gauche) sont les fragments signature de ce peptide. Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvation. L'énergie de collision était de 16 V. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.

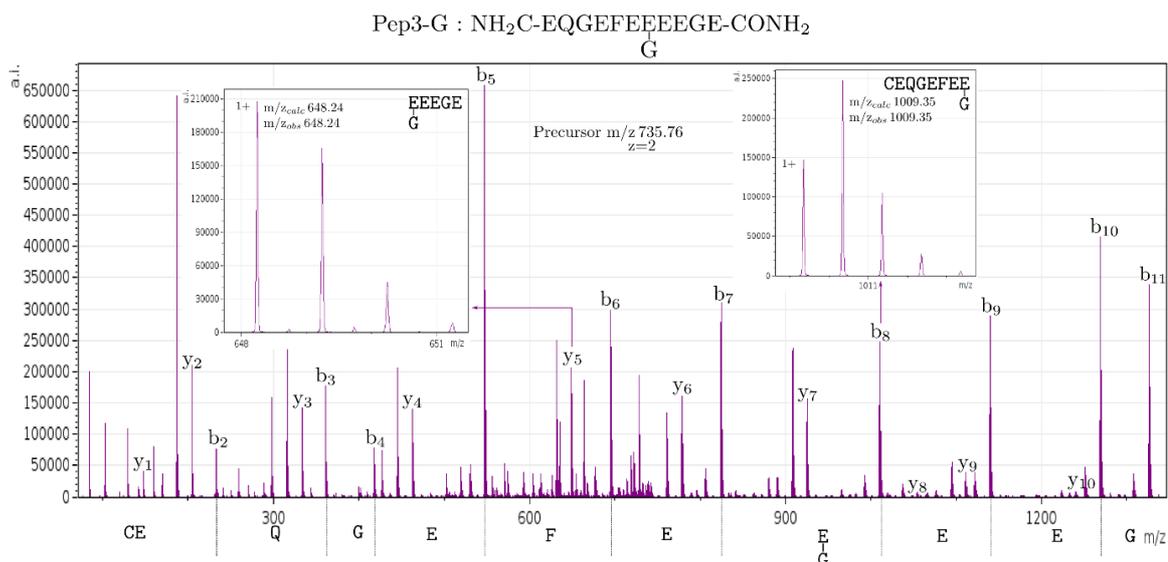
Pour les peptides pep2-G et pep2-GG, les ions fragments signatures de leurs structures sont les ions y7-G et b8-G (figure 38) pour le pep2-G et les ions y7-GG et b8-GG pour le pep2-GG (figure 39).

Pep2-GG : NH<sub>2</sub>-CTADEQGEFEEEE-CONH<sub>2</sub>

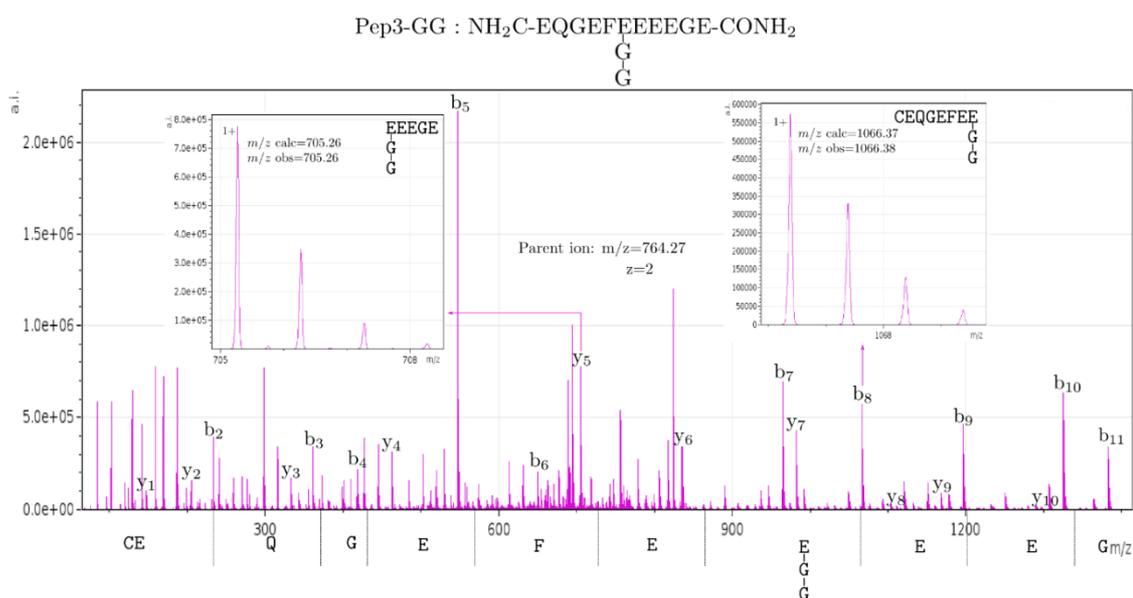


**Figure 40.** - Spectre de fragmentation CID du peptide pep2-GG (diglycylé). Les ions y7-GG (encart de droite) et b8-GG (encart de gauche) sont les fragments signature de ce peptide. Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation. L'énergie de collision était de 18 V. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.

Finalement, pour les peptides pep3-G et pep3-GG, les ions fragments signatures de leurs structures sont les ions y5-G et b8-G (figure 40) pour le pep3-G et les ions y5-GG et b8-GG pour le pep3-GG (figure 41).



**Figure 41. - Spectre de fragmentation CID du peptide pep3-G (monoglycylé).** Les ions y5-GG (encart de gauche) et b8-GG (encart de droite) sont spécifiques de la structure pep2-GG. Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation. L'énergie de collision était de 19 V. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.



**Figure 42. - Spectre de fragmentation CID du peptide pep3-GG (diglycylé).** Les ions y5-GG (encart du gauche) et b8-GG (encart du droite) permettent l'identification de la

*structure pep3-GG. Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 80°C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvation. L'énergie de collision était de 18 V. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.*

On peut conclure de cette série de figures que la spectrométrie de masse en tandem est utile pour l'identification et la séparation de peptides modifiés avec une glycylation sur leurs chaînes latérales [190].

#### ***IV. Analyses de peptides de tubulines polyglutamylées***

En parallèle des travaux présentés sur les peptides synthétiques. Nous avons analysé des tubulines biologiques, purifiées à partir de cerveaux de porc. La stratégie analytique est fondée sur le fait que les polymodifications des tubulines sont localisées dans la queue C-terminale de ces protéines, une région très acide, avec une forte prédominance de résidus glutamate. Il s'agit donc d'effectuer les étapes suivantes dans la séquence suivante : Purifier les tubulines à partir de cerveau de porc ; Digérer les tubulines par l'endoprotéase endoAspN afin de libérer les peptides C-terminaux acides ; Purifier les peptides C-terminaux par chromatographie échangeuse d'ions ; Dessaler les peptides C-terminaux purifiés sur résine de phase inversée ; Analyser les peptides par spectrométrie de masse.

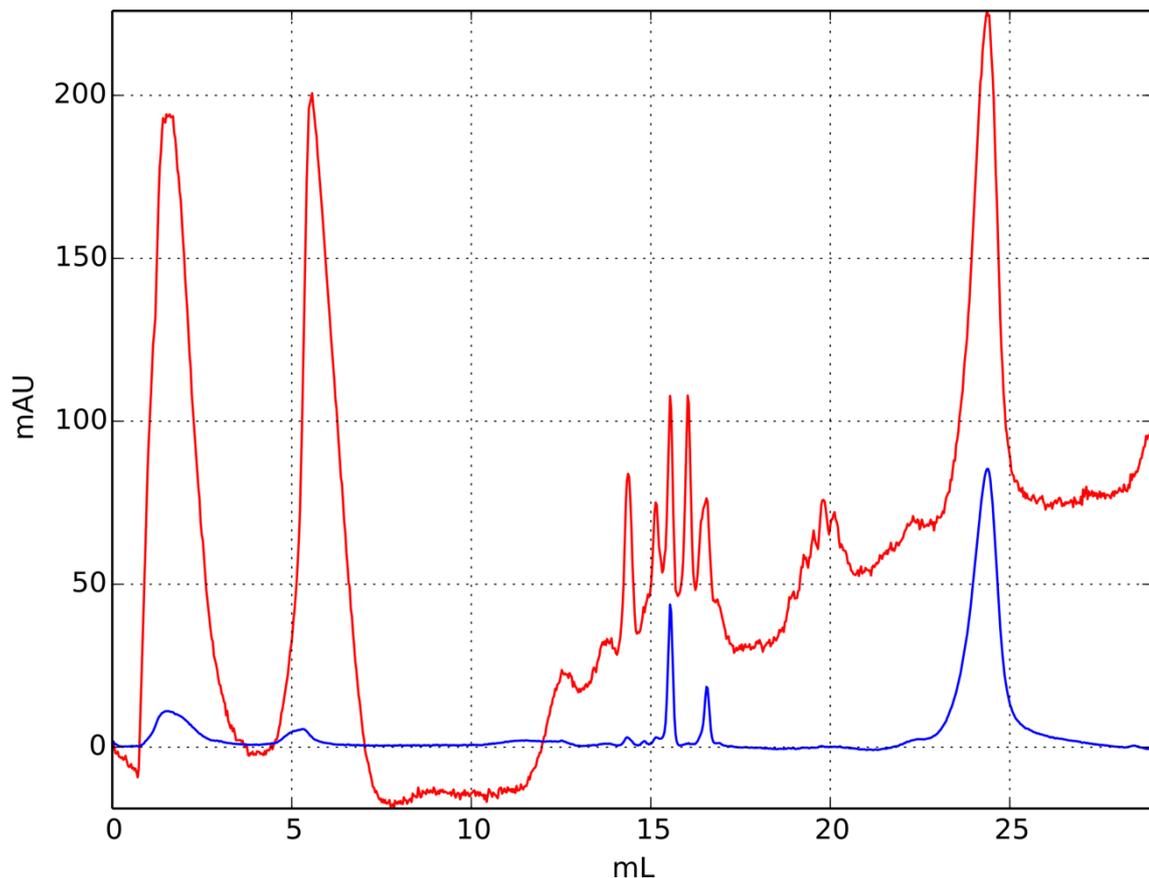
##### ***1. Purification des peptides C-terminaux de tubulines***

Les tubulines purifiées à partir de cerveau de porc ont été digérées par l'endoprotéase endoAspN, qui hydrolyse la liaison peptidique en N-terminal des résidus aspartate. La ressemblance entre l'aspartate et le glutamate fait que cet enzyme coupe parfois au niveau d'un glutamate, surtout quand le rapport massique enzyme/substrat (E/S) est trop grand. Cette perte de spécificité est critique dans notre cas, car les peptides C-terminaux de tubuline sont très riches en résidus glutamate et la digestion de la tubuline dans cette région n'est pas adaptée à notre stratégie analytique puisque c'est cette région qui nous intéresse dans les tubulines. Le rapport E/S documenté dans la

littérature dans le cas des tubulines est de 1/400 [46]. Nous avons donc testé deux rapports, 1/400 et 1/200, afin d'établir s'il était possible d'augmenter la quantité d'enzyme sans avoir de coupures aspécifiques.

Après digestion, les mélanges peptidiques obtenus ont été soumis séparément à une chromatographie sur colonne échangeuse d'ions afin de purifier les peptides C-terminaux des tubulines. En effet, leur acidité est telle qu'ils sont aisément séparés de tous les autres peptides et les fractions sont collectées pour une analyse ultérieure.

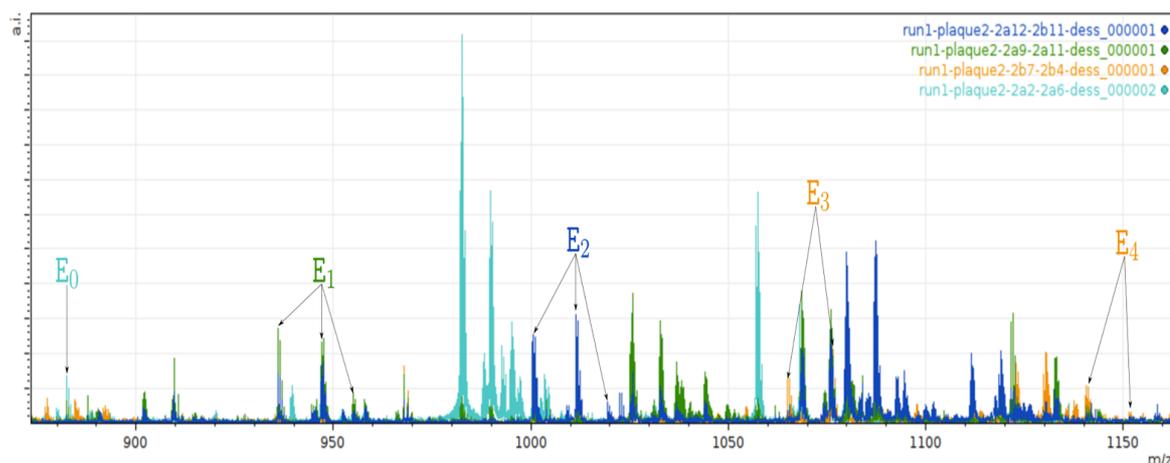
La figure 42 montre le chromatogramme obtenu, après digestion enzymatique à rapport E/S de 1/400. Les peptides C-terminaux des tubulines sont élués tardivement (volume d'éluion 18-21 mL).



**Figure 43.** - Chromatographie échangeuse d'ions du mélange de digestion des tubulines. Les tubulines ont été digérées par *endoAspN* à un rapport enzyme/substrat 1/400. Les traces rouge et bleue correspondent aux absorbances à 215 nm et 280 nm respectivement. Les peptides C-terminaux des tubulines sont élués entre 18 et 21 mL.

## 2. Spectrométrie de masse des peptides C-terminaux des tubulines

Les fractions de chromatographie échangeuse d'anions collectées ont été dessalées selon le protocole publié par [191] et analysées par spectrométrie de masse FT-ICR (Fourier transform-ion cyclotronic resonance).



**Figure 44.** - Spectres de masse de 4 fractions chromatographiques superposés dans le logiciel *mMass*. L'identité putative des différents peptides C-terminaux de tubuline est indiquée avec leur niveau de glutamylation. Les annotations  $E_0$ ,  $E_1$ , correspondent au niveau de glutamylation observé sur les peptides. Spectres obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.

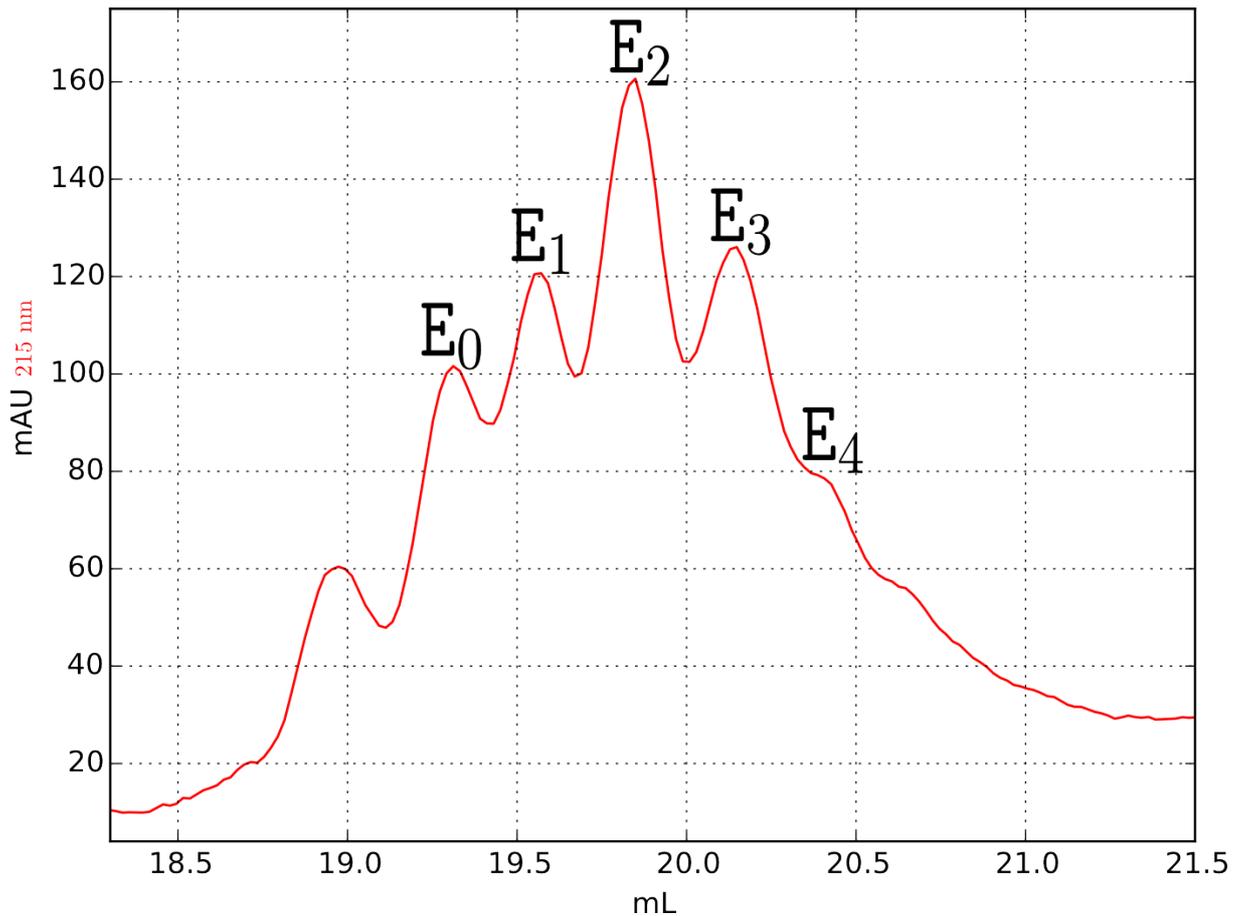
De manière intéressante, nous nous sommes aperçus que nous n'observons des pics de masse correspondant aux peptides C-terminaux des tubulines que pour les fractions éluant tardivement au cours de la chromatographie échangeuse d'anions, dans les massifs chromatographiques présents entre 18 et 20 mL (Figure 42). Ceci est tout à fait cohérent avec le fait que ces peptides sont très acides et qu'ils sont donc retenus plus longtemps dans la colonne au cours du gradient (voir figure 42).

Les données de masse les plus significatives ont été regroupées dans la Figure 43, qui est le résultat de la superposition de différents spectres de masse obtenus pour les différentes fractions du massif chromatographique éluant tardivement (20 mL). Nous observons sur ces spectres des pics dont la valeur m/z correspond aux peptides C-terminaux des tubulines avec un certain nombre de résidus glutamate additionnels (de 0

à 4), les masses de peptides ont été regroupées dans le tableau 2. Il est intéressant de noter que les différents niveaux de glutamylation (jusqu'à 4 glutamates ajoutés) sont observés dans des fractions de chromatographie distinctes : plus le niveau de glutamylation est important, plus le peptide concerné élué dans un pic de chromatographie tardif. Ceci est cohérent avec le fait que la glutamylation est une modification post-traductionnelle qui acidifie le peptide modifié. La Figure 44 illustre cette observation.

Peptide C-terminal de tubuline	m/z	Charge (z)	Agent de charge	Niveau de glutamylation	Volume d'éluion	Intensité
DEQGEFEEEEGEDEA	882,304	2	H <sup>+</sup> Na <sup>+</sup>	E0	19,3 mL	Faible
DEQGEFEEEEGEDEAE	935,839	2	2H <sup>+</sup>	E1	19,6 mL	Moyenne
DEQGEFEEEEGEDEAEE	1000,356	2	2H <sup>+</sup>	E2	19,8 mL	Moyenne
DEQGEFEEEEGEDEAEE	1011,350		H <sup>+</sup> Na <sup>+</sup>	E2	19,8mL	Intense
DEQGEFEEEEGEDEAE EE	1064,874	2	2H <sup>+</sup>	E3	20,2 mL	Moyenne
DEQGEFEEEEGEDEAE EE	1075,869	2	H <sup>+</sup> Na <sup>+</sup>	E3	20,2 mL	Intense
DEQGEFEEEEGEDEAE EE E	1140,394	2	2H <sup>+</sup>	E4	20,4 mL	Faible
DATAEEGEFEEEAEE EVA EEEE	1250,470	2	H <sup>+</sup> Na <sup>+</sup>	E4	20,4 mL	Très faible

**Tableau 2- Les valeurs m/z de quelques peptides C-terminaux de tubulines avec leurs différents états de glutamylation. On retrouve des adduits sodium sur certains peptides. L'intensité de chaque peptide diffère selon son état de glutamylation.**



**Figure 45.- Fractions chromatographiques avec différents niveaux de glutamylation observés par spectrométrie de masse. E0= pas de glutamylation, E1= niveau 1 de glutamylation, E2= niveau 2 de glutamylation, E3= niveau 3 de glutamylation, E4= niveau 4 de glutamylation (voir figure 43).**

Ces résultats de chromatographie sont en accord avec les données de Redeker et al. Et Mary et al. [40], [47] qui ont étudié les tubulines. Rusconi et al. [191] ont étudié la télokinine, qui fait l'objet de déglutamylation séquentielle et qui a donc pu être purifiée directement par chromatographie échangeuse d'anions.

L'identité des espèces moléculaires responsables des différents pics de masse présents dans la figure 43 n'a pas encore été confirmée par fragmentation en phase gazeuse. Cependant, nous avons préparé une liste des rapports m/z d'intérêt afin de les localiser au plus vite dans les spectres. L'objectif était de rechercher le plus rapidement possible les pics d'intérêt afin de les analyser dès que possible par mobilité ionique. Cette longue liste de rapports m/z théoriquement attendus a été élaborée grâce à un logiciel codé en langage Python.

Toutefois, nous pensons qu'il s'agit des peptides C-terminaux de tubulines polyglutamylées car ils ont tous élué en fin de gradient de chromatographie échangeuse d'anions et la région C-terminale des tubulines est la plus acide de toute la structure primaire. En outre, nous remarquons que l'intensité des pics de masse correspondant à des peptides tétraglutamylés est très faible (tableau 2), ce qui reflète la faible concentration des hauts niveaux de glutamylation *in vivo*, comme décrit dans la littérature [42].

## V. Conclusion

Les polymodifications des tubulines sont impliquées dans différentes pathologies. Par exemple, des anomalies de glycylation peuvent provoquer la stérilité [52], [53] et des anomalies de glutamylation sont impliquées dans la neurodégénérescence [36]. Ces pathologies sont reliées à des anomalies au niveau des microtubules. Ainsi, il est important de caractériser l'origine biochimique de ces pathologies.

Les résultats présentés montrent que la spectrométrie de masse est un outil analytique puissant pour la caractérisation des isomères de structure. La spectrométrie de masse en tandem était capable de différencier les deux peptides glycylés, sur deux sites et sur un seul site. Des fragments signatures pour chaque structure ont été obtenus par fragmentation CID pour confirmer la présence de structures correspondantes. Par contre, en addition des fragments signatures, des fragments internes pour chaque structures (pour le peptide glycylé sur un seul site  $\overset{-E-E-}{\underset{|}{G}-G}$  et le peptide glycylé sur deux sites  $\overset{-E-E-}{\underset{|}{G}} \overset{-E-E-}{\underset{|}{G}}$ ) ont complété l'analyse. Ceci peut être effectué en augmentant l'énergie de collision pour trouver la valeur qui produit ces types d'ions.

On peut conclure des résultats obtenus en mobilité ionique TWIMS que les conditions expérimentales influencent directement les profils de mobilité obtenus. Le phénomène de « carry-over » pourrait produire des faux positifs. Par conséquent, suivre des instructions bien spécifiques durant l'optimisation des paramètres du TWIMS est crucial pour obtenir des résultats fiables.

Un travail plus élaboré en spectrométrie de masse en tandem, couplée à d'autres techniques analytiques comme par exemple, la chromatographie liquide pourrait être réalisé à terme afin de caractériser les structures des tubulines polymodifiées.

## ***Chapitre 6 Analyse de l'hormone de croissance par spectrométrie de masse***

L'objectif du projet de recherche est de développer un test anti-dopage à l'hormone de croissance. La première étape était de caractériser cette protéine. Comme l'hormone de croissance est présente sous forme naturelle et synthétique dans l'organisme de l'adulte dopé, il a fallu analyser les deux formes. Les techniques analytiques que nous avons utilisées pour caractériser les différentes préparations d'hormone de croissance sont la chromatographie en phase inverse et la spectrométrie de masse.

### ***I. Les préparations d'hormone de croissance humaine (hGH) étudiées***

Dans le cadre du projet, nos collaborateurs de l'AFLD (Agence française de lutte contre le dopage) nous ont fourni des lots de saisie de douane d'hormone de croissance que nous appelons par la suite, hGH saisie de douane (G).

L'hormone de croissance naturelle a été achetée de l'Institut national des standards biologiques (NIBSC, Ecosse, Royaume-Uni), appelée, hGH pituitaire. Nous avons aussi travaillé sur des préparations d'hormone de croissance pharmaceutiques, désignées par hGH pharmaceutique (N) et (Z).

### ***II. Ultrafiltration et préparation d'échantillon pour l'analyse de spectrométrie de masse***

La spectrométrie de masse à ionisation électrospray ne tolère pas les contaminants et les sels. Donc, il faut que les échantillons à analyser soient très propres. Malheureusement, les préparations pharmaceutiques contiennent un nombre important d'excipients (par exemple, le poloxamer 188) qui sont incompatibles avec l'analyse directe en spectrométrie de masse. L'ultrafiltration par des concentrateurs de type Vivaspin permet de nettoyer, modifier la composition du tampon et concentrer l'échantillon. Les concentrateurs Vivaspin sont des dispositifs avec une membrane qui ne laisse passer que des molécules avec un poids moléculaire spécifique. Nous avons

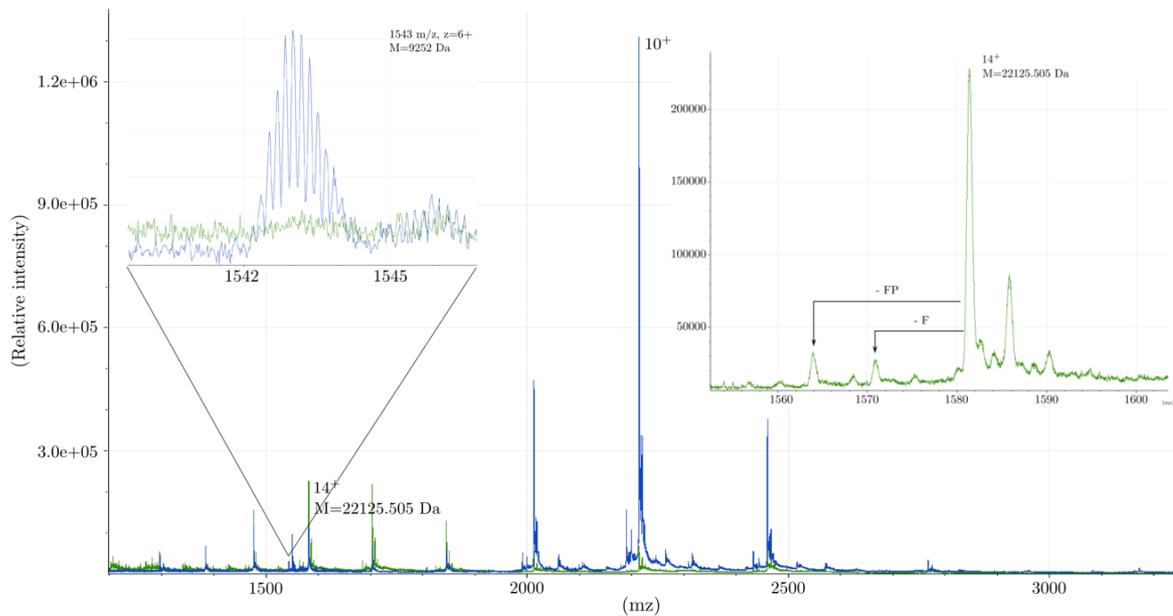
utilisé des concentrateurs (Sartorius, France) qui laissent passer toutes les molécules au-dessous de 5 kDa. Cette masse est convenable pour l'hormone de croissance qui fait 22 kDa. Ces dispositifs fonctionnent par ultracentrifugation avec une force qui peut aller jusqu'à 14000 g. Nous avons filtré 3 types d'hormones de croissance dans l'acétate d'ammonium, pH 8,5, la hGH pituitaire, la hGH pharmaceutique (N) et la hGH saisie de douane (G). La filtration a été faite à 4°C à 14000 g en 3 run de 20 min. Les échantillons filtrés ont été ensuite analysés par spectrométrie de masse MS.

### ***III. Analyse de spectrométrie de masse de l'hormone de croissance GH***

Après avoir dessalé les échantillons, les différentes GH ont été analysées par TOF-MS. Les protéines ont été ionisées par electrospray, le voltage appliqué était de 2,8 kV. La température de désolvatation et le débit de gaz de désolvatation étaient à 100 °C et 600 L/hr respectivement.

#### ***1. L'hormone de croissance naturelle***

L'analyse en spectrométrie de masse de l'hormone de croissance pituitaire (figure 45) a confirmé la présence de la GH non modifiée 22K et une molécule à 9 KDa, qui est probablement un fragment de GH [141]. Par contre, la forme 20K de la GH pituitaire n'a pas été observée sur le spectre de masse (figure 45). Ceci est le cas dans la littérature où on ne trouve aucune étude de spectrométrie de masse qui mentionne l'observation de la forme 20K intacte. La distribution des états de charge de la GH est bimodale, ce qui pourrait donner signe de la présence de deux conformations ouvertes et compactes. Dans chaque état de charge, on note la présence de formes oxydées et d'autres adduits. Les pics à faible rapport m/z pourraient être attribués à des formes de hGH tronquées ou dégradées. Le pic à m/z 1563.91 correspond à la perte des deux premiers acides aminés de la hGH (-FP) (encart de droite sur la figure 45). Probablement, le deuxième pic à m/z 1523.41 est une autre forme tronquée.

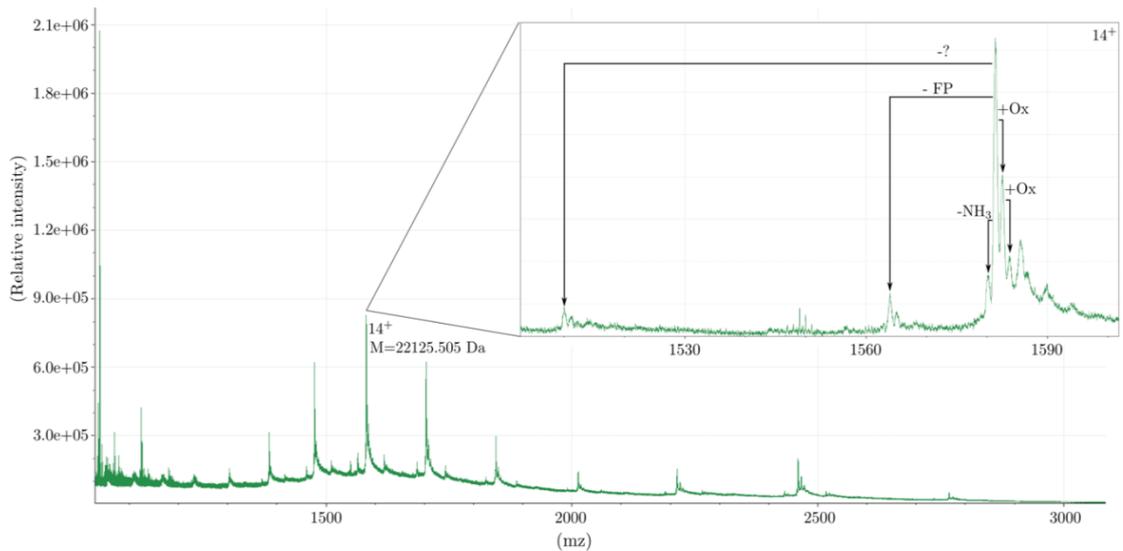


**Figure 46.- Spectre de masse de l'hormone de croissance pituitaire.** La trace bleue est obtenue en conditions natives : 2,8 kV pour la tension du capillaire, 130 V pour la tension d'extraction, 50 °C pour la température de la source et 100 °C pour la température de désolvation) et la trace verte en conditions dénaturantes (3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvation). Dans l'encart à gauche, on voit le pic correspondant au fragment 9 kDa de la GH. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.

## 2. Les hormones de croissance recombinantes

### *L'hormone de croissance saisie de douane (G)*

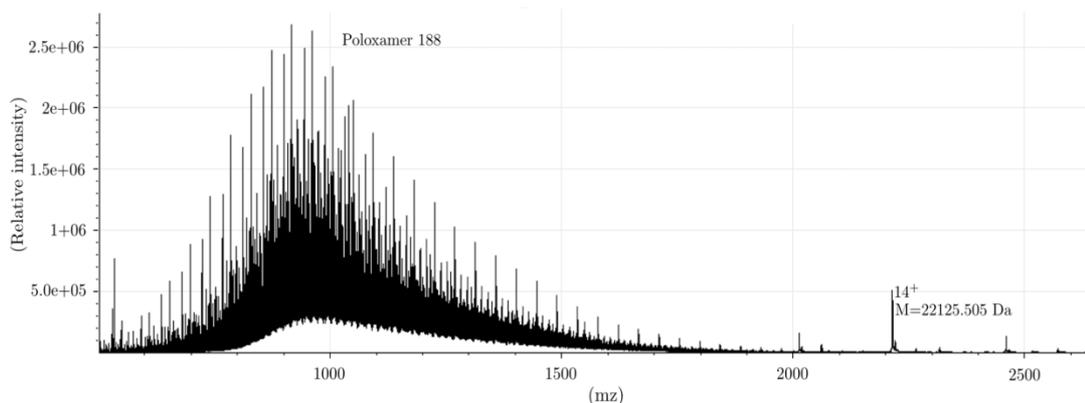
Le spectre de masse de la GH recombinante (Figure 46) est très similaire à celui obtenu pour la GH pituitaire. En revanche, la GH (G) est oxydée deux fois. De manière identique à l'hormone de croissance pituitaire, on note la présence de formes probablement tronquées qui ont perdu les deux premiers acides aminés de la séquence.



**Figure 47.- Spectre de masse de l'hormone de croissance saisie de douane (G).** Dans l'encart à droite, on voit l'état de charge le plus abondant 14+. Conditions d'analyse : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.

#### **L'hormone de croissance pharmaceutique (N)**

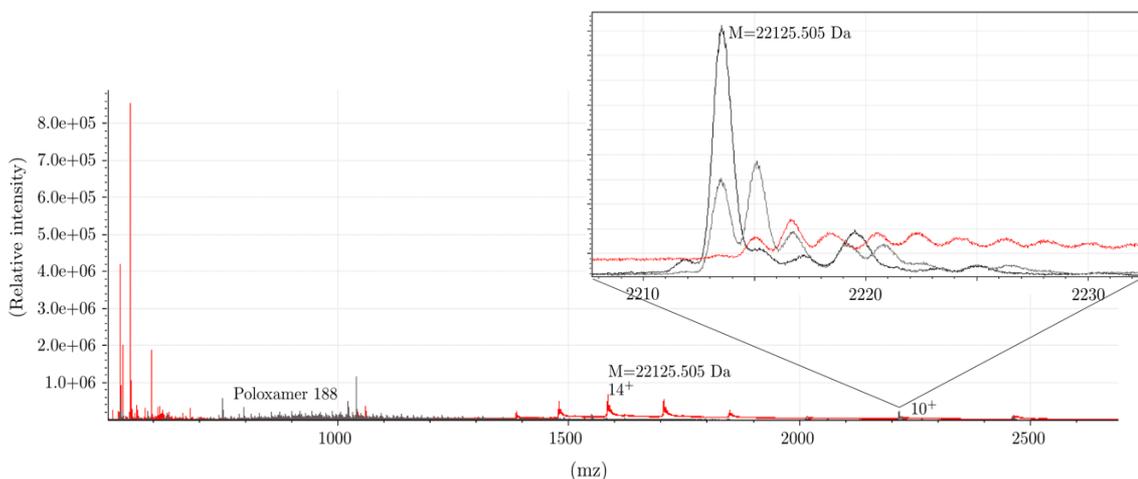
L'analyse de la hGH (N) a montré que l'ultrafiltration est inefficace pour éliminer certains excipients. Dans la Figure 47, le spectre de la hGH (N) montre la présence d'un polymère. Les pics du polymère se chevauchent avec les pics de l'hormone de croissance ce qui rend la détection des faibles états de charge impossible.



**Figure 48.- Spectre de masse de la GH (N).** Ce spectre a été obtenu après ultrafiltration. Les clusters entre 400 et 2000 m/z correspondent à un polymère. Les pics après 2000 m/z correspondent aux faibles états de charge de la hGH. 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la

température de désolvatation. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.

Pour éliminer le polymère, nous avons procédé à une précipitation de la GH à l'acétone froid. Le spectre de masse obtenu après cette opération est présenté dans la figure 48 (trace grise). Nous remarquons que le signal du polymère a diminué mais il est toujours présent. Par conséquent, nous avons répété la précipitation pour voir si on arrive à éliminer complètement le polymère. Le spectre obtenu après la deuxième étape de précipitation (trace rouge dans la figure 48) montre que le signal du polymère a disparu mais on voit l'apparition de formes modifiées de la hGH (encart en haut, à droite de la figure 48). Les espèces modifiées chimiquement sont plus abondantes que la forme normale de la hGH. La précipitation à l'acétone froid est une technique récurrente dans la purification des protéines mais, il arrive que dans certains cas ce ne soit pas la meilleure technique à utiliser. Simpson et Beynon ont montré en 2010 que la précipitation à l'acétone provoque une modification chimique de peptides [192]. Donc nous avons décidé d'arrêter les précipitations à l'acétone.



**Figure 49.- Spectre de masse de la hGH (N).** La trace noire correspond à l'échantillon avant filtration. La trace grise a été obtenue après une étape de précipitation à l'acétone et la trace rouge a été obtenue après deux étapes de précipitation à l'acétone. Conditions d'analyse : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation. Spectre obtenu après infusion de la solution de peptide directement dans la source.

## ***IV. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse RP-CLHP-MS***

L'ultrafiltration n'était pas une technique de purification commune à toutes les préparations de hGH à notre disposition. Donc, il a fallu trouver une autre technique en amont de l'analyse par spectrométrie de masse. La chromatographie liquide en phase inverse nous paraissait une bonne technique, compatible avec la spectrométrie de masse par le biais du couplage. La CLHP sépare l'échantillon avant son entrée dans le spectromètre de masse. En plus, l'étape de chromatographie liquide en phase inverse séparera les différents variants protéiques qui peuvent exister dans les préparations d'hormone de croissance. Ceci permettra de mieux identifier et caractériser les formes naturelles et recombinantes de l'hormone de croissance. Les pics chromatographiques ont été détectés par un spectromètre de masse de type Q-TOF.

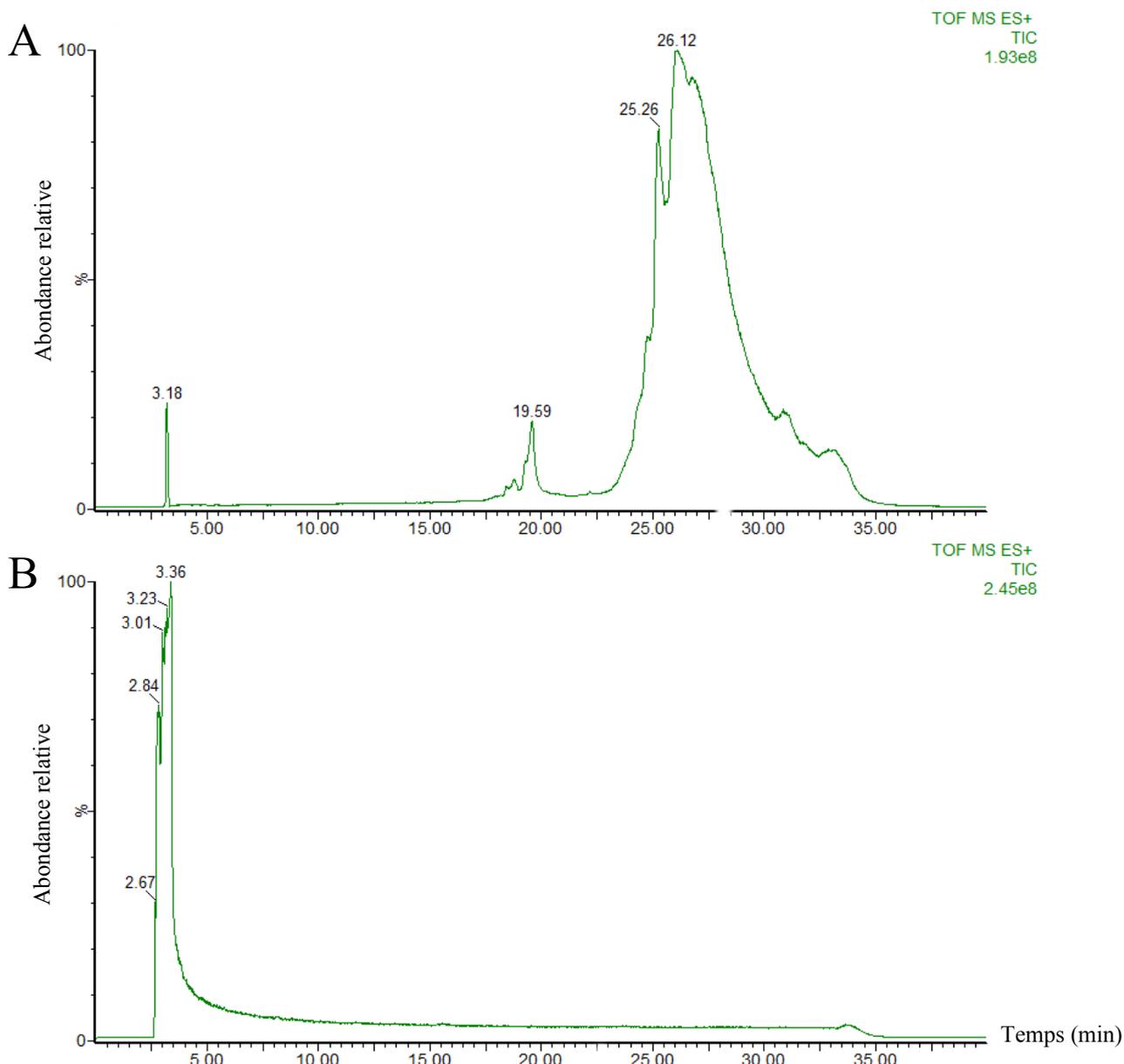
### ***3. Optimisation des conditions de la chromatographie liquide en phase inverse***

Il existe différents paramètres qui peuvent être optimisés pour obtenir une bonne séparation en chromatographie liquide. Les phase stationnaire et mobile jouent un rôle important dans la séparation ainsi que, le gradient et le débit d'élution. Le temps d'analyse a aussi une influence sur la qualité de la séparation. Dans la pharmacopée européenne et dans la plupart des études de chromatographie en phase inverse sur l'hormone de croissance, nous remarquons l'utilisation de phases mobiles avec des compositions particulières. Par exemple, l'ajout de propanol, l'utilisation de phase contenant des sels comme le tris-HCl et le phosphate de potassium [185], [193], phosphate d'ammonium et phosphate de sodium [194]. Par contre, comme nous travaillons dans un couplage de chromatographie à la spectrométrie de masse, il a fallu choisir des phases mobiles compatibles avec l'analyse en spectrométrie de masse. La phase mobile était composée d'une phase A qui consistait en 100% H<sub>2</sub>O et 0,1% acide formique, et d'une phase B qui consistait en 90% acétonitrile, 10% H<sub>2</sub>O et 0,1% d'acide formique. Les gradients et les phases stationnaires utilisées seront discutés plus bas.

#### ***Gradient d'élution***

De nombreuses études de RP-CLHP sur l'hormone de croissance décrivent une élution isocratique ou avec un gradient linéaire avec une colonne C4 [194], [195]. La meilleure séparation chromatographique a été obtenue avec un gradient linéaire de 5% à

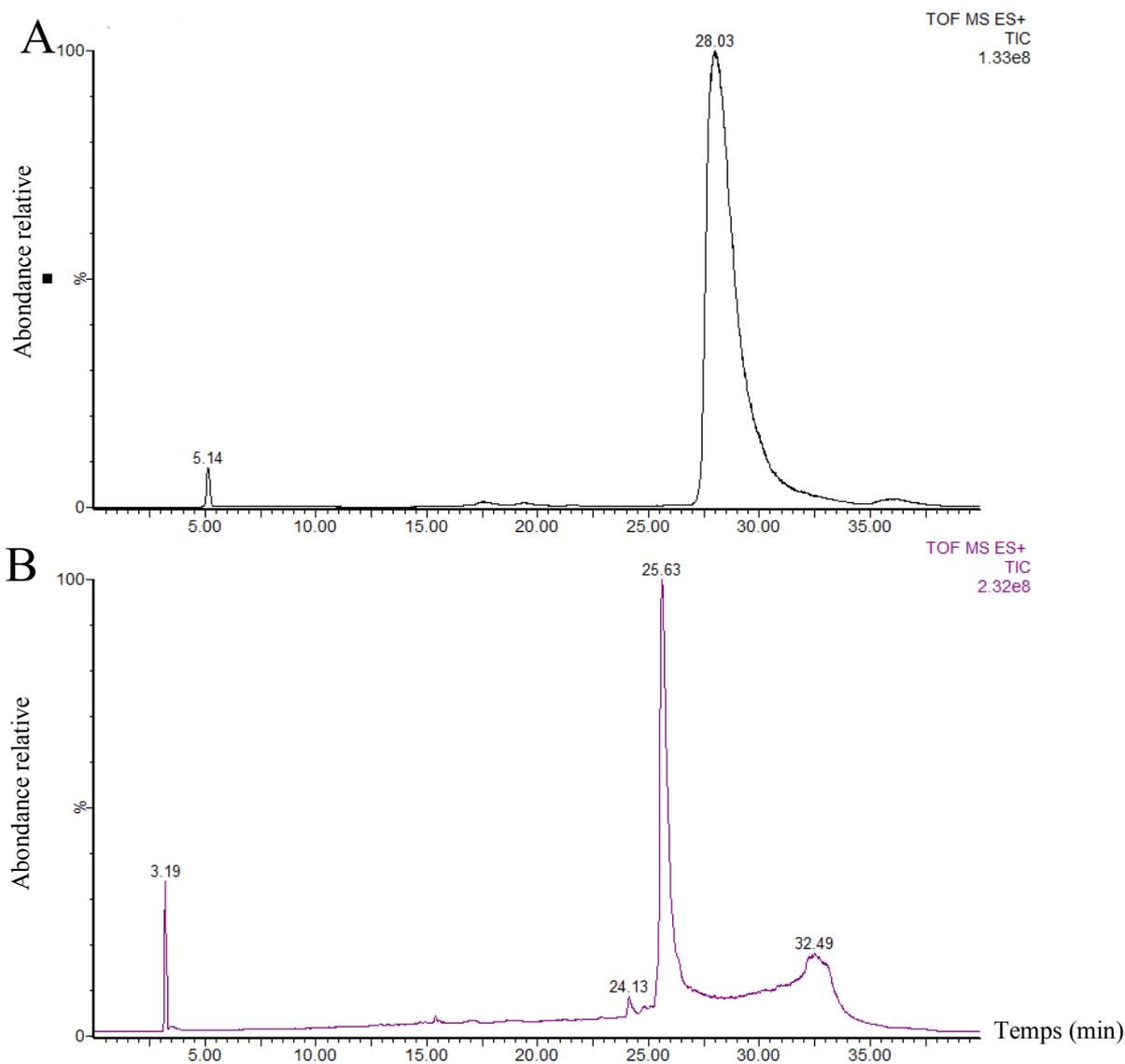
70% en phase B (Figure 49.A). La phase initiale doit avoir un pourcentage minimal en phase B pour retenir les molécules les plus polaires. Alors que, dans la figure 49.B, on remarque que le pourcentage initial n'était pas adéquat car la protéine (GH) est éluée avec le solvant, ce qui ne donne pas de séparation des différentes formes de GH.



**Figure 50. - Chromatogrammes de la hGH (G).** A. Chromatogramme obtenu avec un pourcentage initial de 95%A,5%B. B. Chromatogramme obtenu avec un pourcentage initial de 30%A, 70%B. L'analyse a été fait avec une colonne C8 (300 Å, 4,6mm x 250 mm, 5µm pour la taille des particules, Interchim, France) et un débit de 1mL/min.

### ***Le débit***

Un débit de 1 mL/min est le débit optimum et a été adéquat pour la séparation des différentes hGH (Figure 50B). La figure 50 montre qu'avec un débit de 1mL/min, il y a un pic supplémentaire au pic principal (pic à  $t_r=24,13$ , figure 50B) de l'hormone de croissance alors qu'avec un débit de 0.850 mL/min, on ne voit que le pic de la forme de GH non modifiée (Figure 50A).



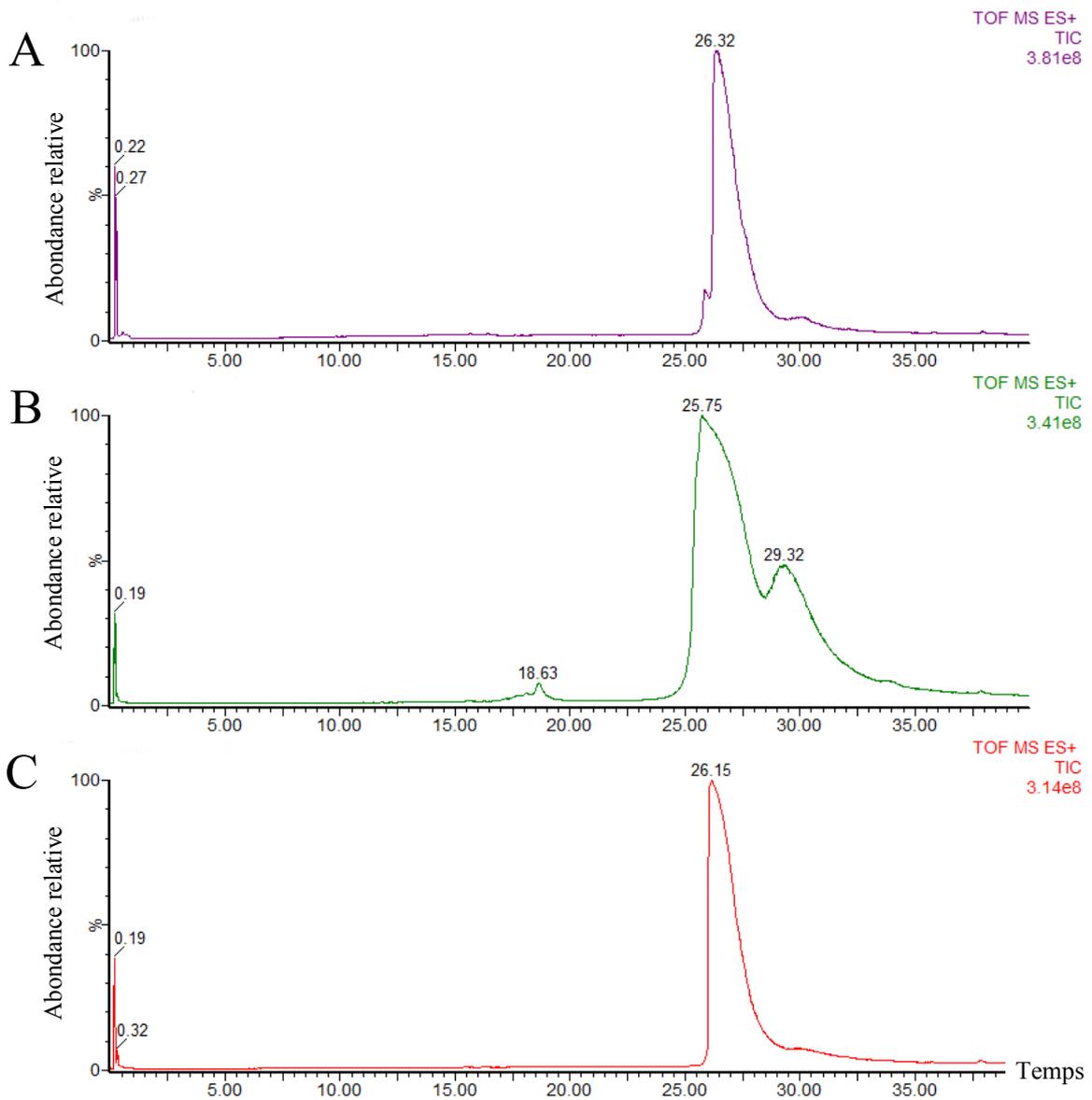
**Figure 51. - Chromatogrammes de RP-CLHP de la hGH pituitaire. A. Chromatogramme obtenu un débit de 0,85 mL/min. B. Chromatogramme obtenu avec un débit 1 mL/min. L'analyse a été faite avec une colonne C8 (300 Å, 4,6mm x 250 mm, 5µm pour la taille des particules, Interchim, France)**

### ***La phase stationnaire***

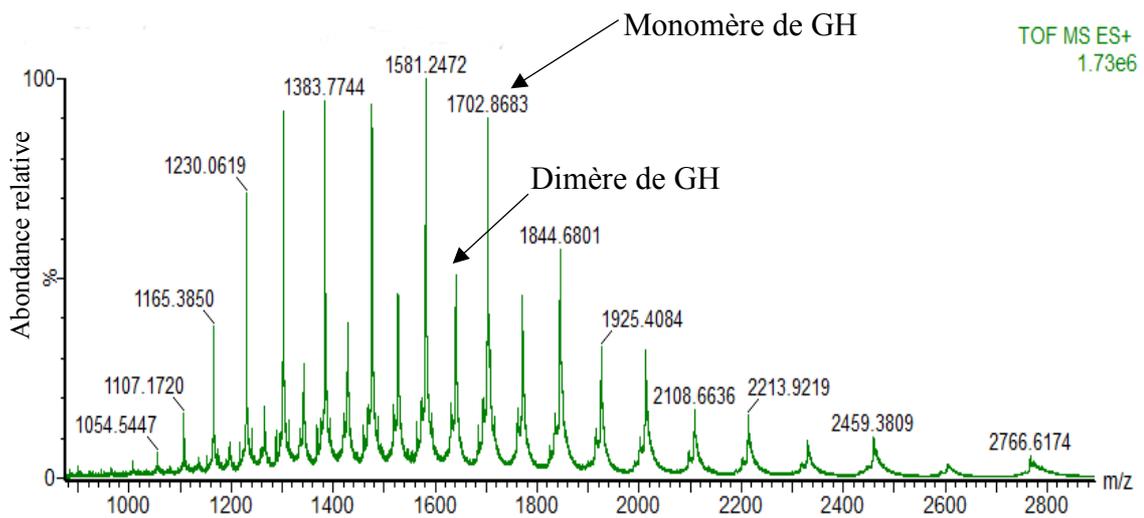
La pharmacopée européenne utilise dans son protocole d'analyse de l'hormone de croissance un phase stationnaire C4, comme on le retrouve aussi dans d'autres publications [194], [196]. De nombreux chercheurs ont utilisé une phase C18 [185], [193], [197] pour analyser la GH. Par contre, peu d'études mentionnaient l'utilisation d'une phase C8 [198].

Dans le présent travail, la séparation des différents isoformes de l'hormone de croissance humaine a été obtenue avec une phase C8 (300 Å, 4,6mm x 250 mm, 5µm pour la taille des particules, Interchim, France). Les phases stationnaires sont souvent choisies selon la taille de la séquence peptidique. Plus la séquence peptidique est longue, plus la chaîne carbonée de la phase stationnaire est courte [199]. Par exemple pour l'analyse de peptides, on utilise des phases stationnaires avec de longues chaînes carbonées (C18). Nous avons donc choisi une phase stationnaire C8 parce que l'hormone de croissance est une protéine de taille moyenne (22 kDa).

Nous avons également testé une colonne C18, mais la séparation des différentes formes de la GH était moins bonne. On ne retrouve pas toutes les formes séparées avec la colonne C8 (cf. figure 49.A). Par contre, pour la hGH (G), on voit l'apparition d'un autre pic à 29,32 min (Figure 51). D'après les spectres de masse, ce pic correspond à un dimère de GH (Figure 52). Ceci est en accord avec d'autres auteurs qui ont démontré la présence de la GH sous forme oligomérique [70], [200].



**Figure 52. - Chromatogrammes de phase inverse d'hormones de croissance analysées avec une colonne C18. A. Chromatogramme de l'hormone de croissance pituitaire. B. Chromatogramme de l'hormone de croissance saisie de douane (G). C. Chromatogramme de l'hormone de croissance pharmaceutique (Z). L'analyse a été faite avec une colonne C18 (300 Å, 2,1mm x 50 mm, 1,7 µm pour la taille des particules, Interchim, France) et un débit de 0.15 mL/min.**

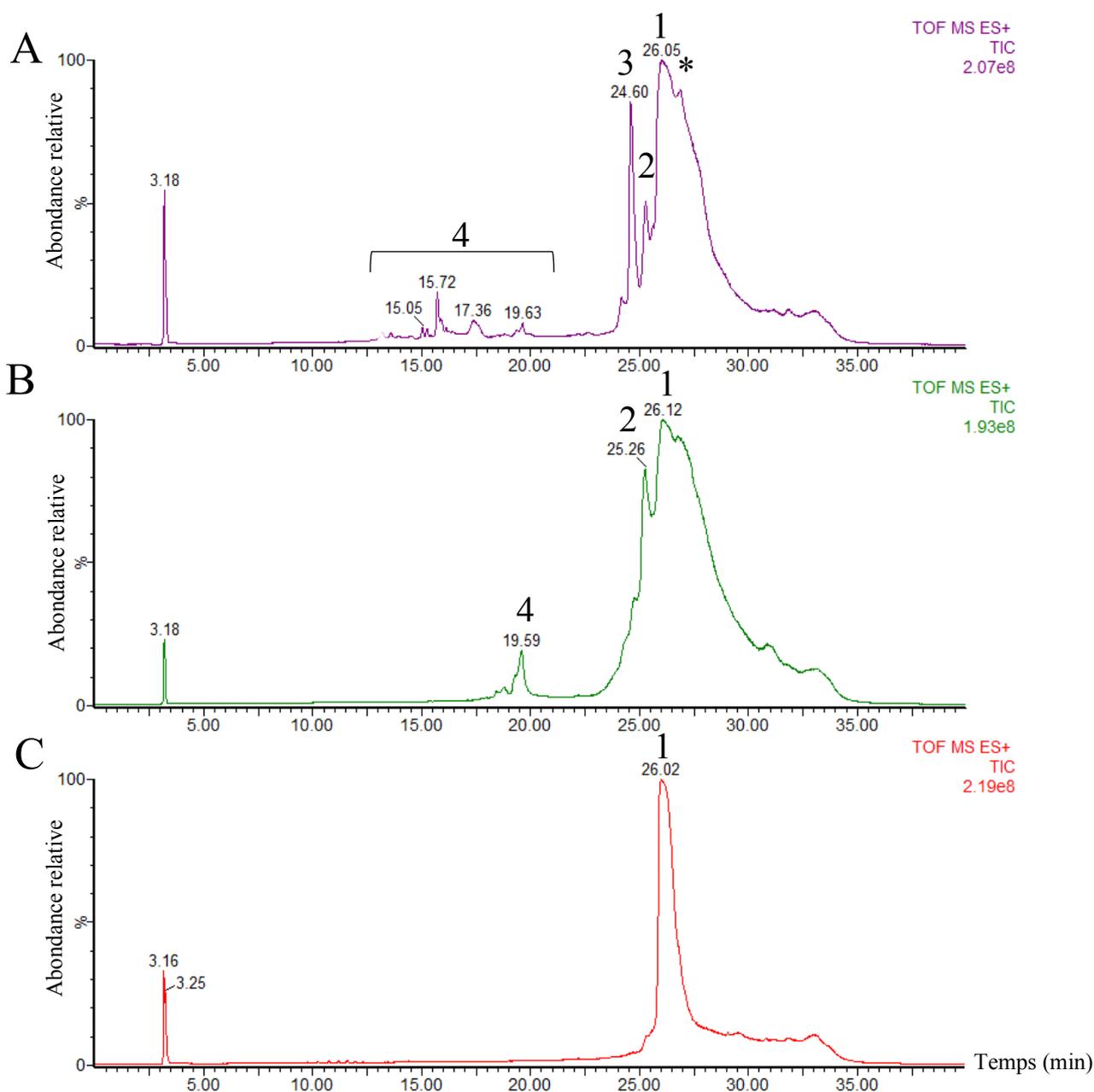


**Figure 53.** Spectre de masse correspondant au pic  $t_r=29.32$  min de la figure 51. Les pics de masse des états de charge du dimère intercalent ceux du monomère. Conditions d'analyse : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80°C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation.

#### **4. Analyse de l'hormone de croissance humaine hGH par RP-CLHP-MS**

L'analyse de chromatographie liquide en phase inverse RP-CLHP a montré que les différentes préparations de hGH ont des temps de rétention approximativement similaires. Les différentes hGH ont été éluées entre 25 et 27 min (Figure 53). Le chromatogramme A présente l'analyse RP-CLHP de la hGH pituitaire. Le pic 1, dans les 3 chromatogrammes A, B et C correspond à la forme 22K-GH. Dans le chromatogramme A, ce pic a un petit épaulement entre 26,4 et 27 min qui pourrait être attribué à la forme 20K de la GH et/ou à une forme glycosylée. En revanche, cette forme n'a pas été retrouvée dans les deux autres chromatogrammes. Les pics 2 correspondent à la forme oxydée de la GH alors que le pic 3 ( $t_r=24,6$  min) correspond à la fixation d'une molécule d'eau à la hGH. Le chromatogramme C ne présente pas beaucoup de pics. Ceci peut être expliqué par le fait que les préparations pharmaceutiques sont conditionnées de manière très contrôlée, alors que les produits saisis par la douane proviennent généralement de laboratoires asiatiques avec des normes inconnues et probablement défectueuses. C'est pour cela que l'on trouve des

contaminants dans leurs produits. Par contre, il est logique que le chromatogramme de la hGH naturelle présente différents pics, cela est le résultat de la diversité de l'hormone de croissance humaine pituitaire [70] (isoformes biologiques et fragments présents dans la glande pituitaire). Les pics chromatographiques 4 correspondent probablement à des fragments et des produits de dégradation de la GH.



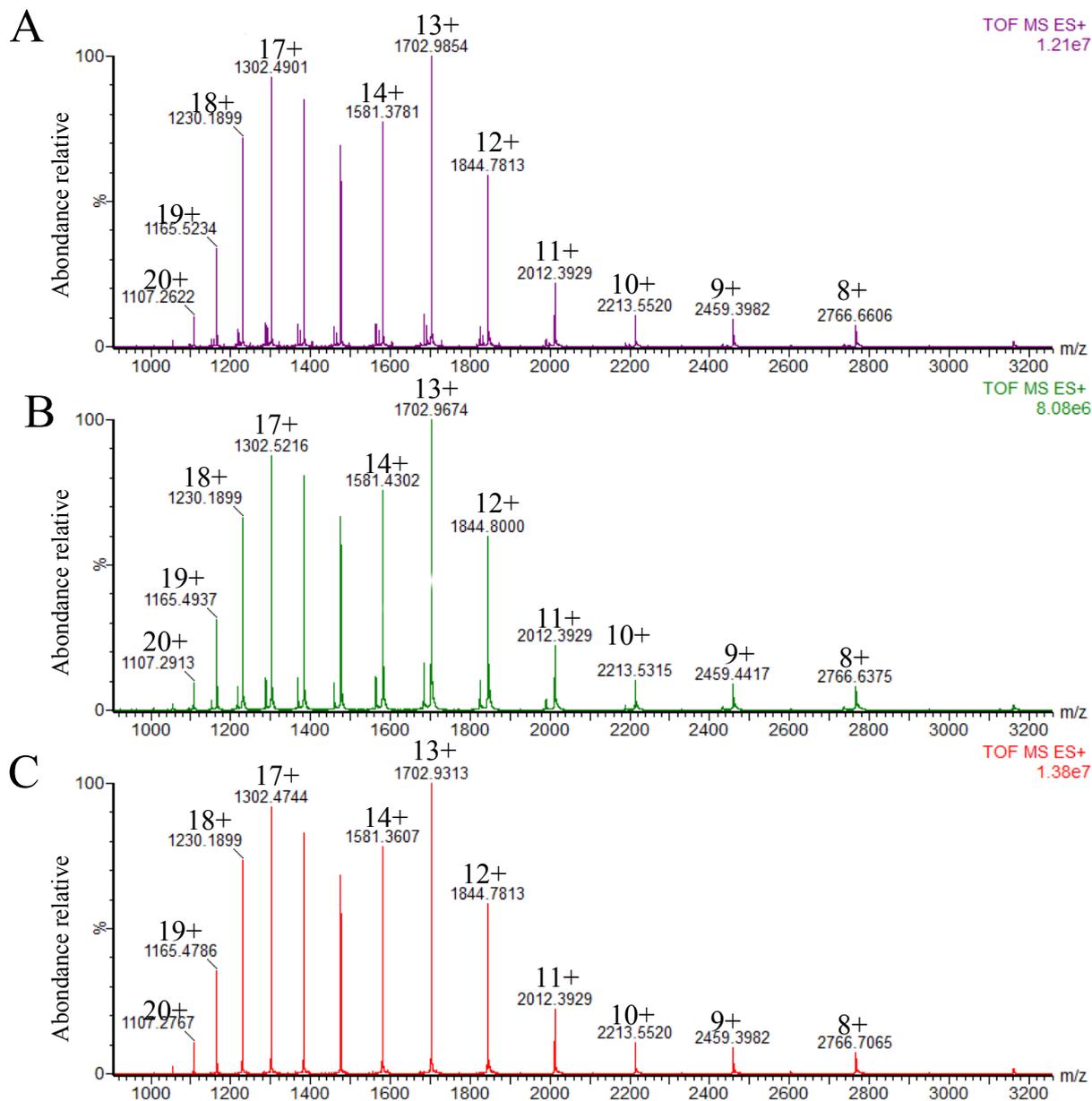
**Figure 54.** - Analyse RP-CLHP de préparations de hGH. A, B and C. Chromatogrammes de phase inverse de la hGH pituitaire, la saisie de douane (G) et la hGH pharmaceutique (Z) respectivement. Les pics 1 correspondent à la forme non modifiée de la GH (22 KDa). Le signe \* correspond à un épaulement du pic et peut être

*attribué aux formes 20K et glycosylée de la GH. Les pics 2 sont attribués aux formes oxydées de la GH. Les pics 3 pourraient être attribués à la fixation d'une molécule d'eau à la hGH. Les pics 4 sont probablement des produits de dégradation de la hGH. L'analyse a été réalisé avec une colonne C8 (300 Å, 4,6mm x 250 mm, 5µm pour la taille des particules, Interchim, France), la phase mobile A a été composée de H<sub>2</sub>O avec 0,1% d'acide formique et la phase mobile B a été composée de 90% acétonitrile et 0,1% d'acide formique. Le débit était de 1mL/min et la détection a été assurée par le spectromètre de masse.*

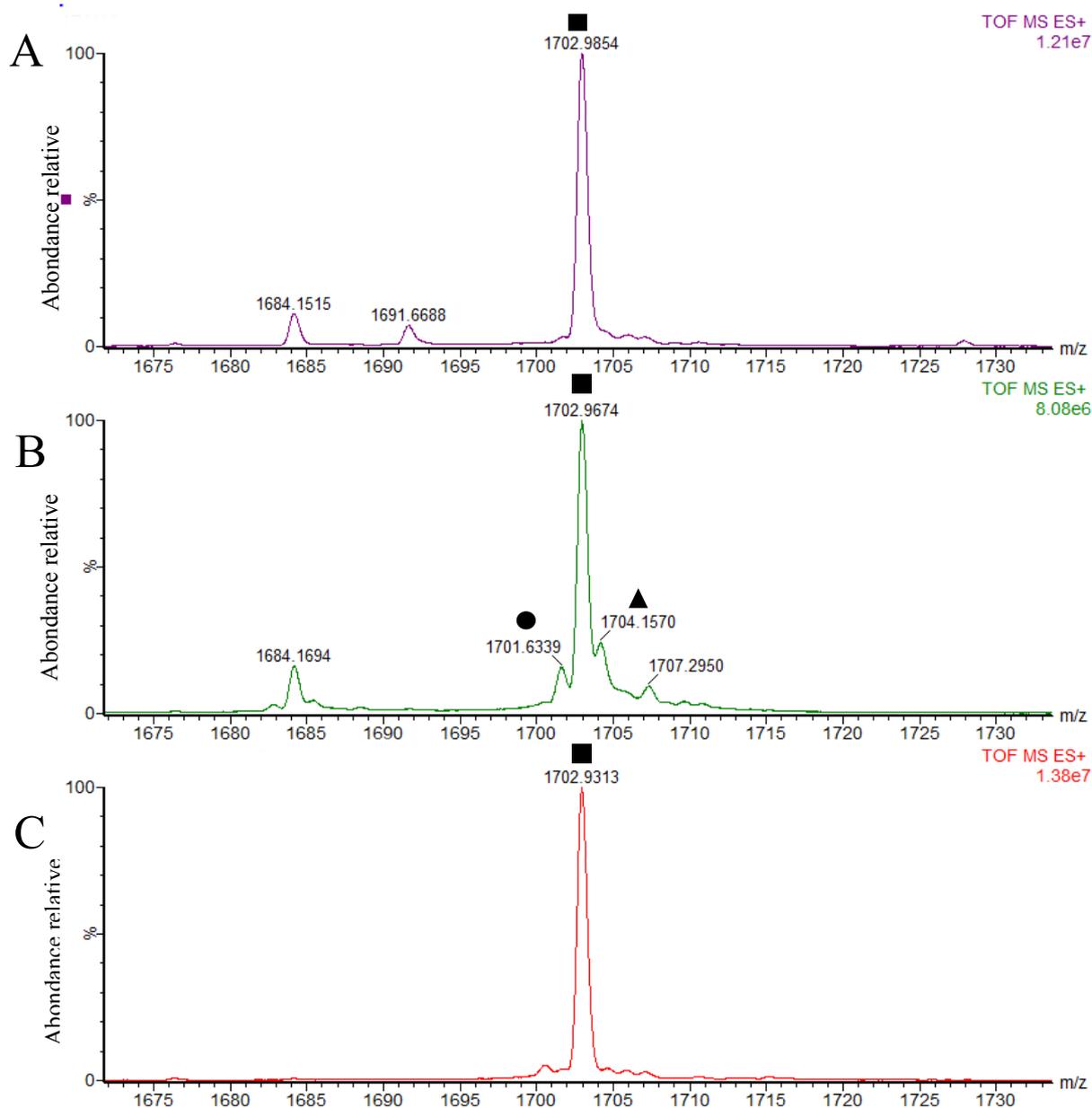
Les spectres de masse correspondants aux différents chromatogrammes sont présentés dans la figure 54. Les hormones de croissance naturelle et recombinante ont la même masse moléculaire  $M=22124,7\pm 0,8$  Da qui correspond à la masse calculée de l'hormone de croissance. La distribution des états de charge est aussi comparable entre les différentes hGH. La figure 54 présente un agrandissement de l'état de charge le plus abondant qui correspond à l'ion  $[M+13H]^{13+}$  ( $m/z$   $1702,98\pm 0,06$ ) et ses adduits.

La figure 54 représente un agrandissement des spectres de masses sur l'état de charge  $13^+$  du pic chromatographique 1 de la figure 53. Nous remarquons que le spectre de la hGH saisie de douane (G) présente des pics additionnels avant et après le pic principal. Ces pics pourraient être attribués à la perte d'un ammonium ( $-NH_3$ ) ( $m/z$   $1701.63\pm 0,06$ ) et l'oxydation de la méthionine 14 ou 25 ( $mz$   $1704.15\pm 0,06$ ). La hGH pharmaceutique (Z) ne contient pas beaucoup d'adduits, ceci est peut-être dû au fait que le « vial » de la hGH (Z) était nouvellement ouvert et que les modifications observées pour la hGH (G) dans la figure 53.B sont liées aux conditions stockages.

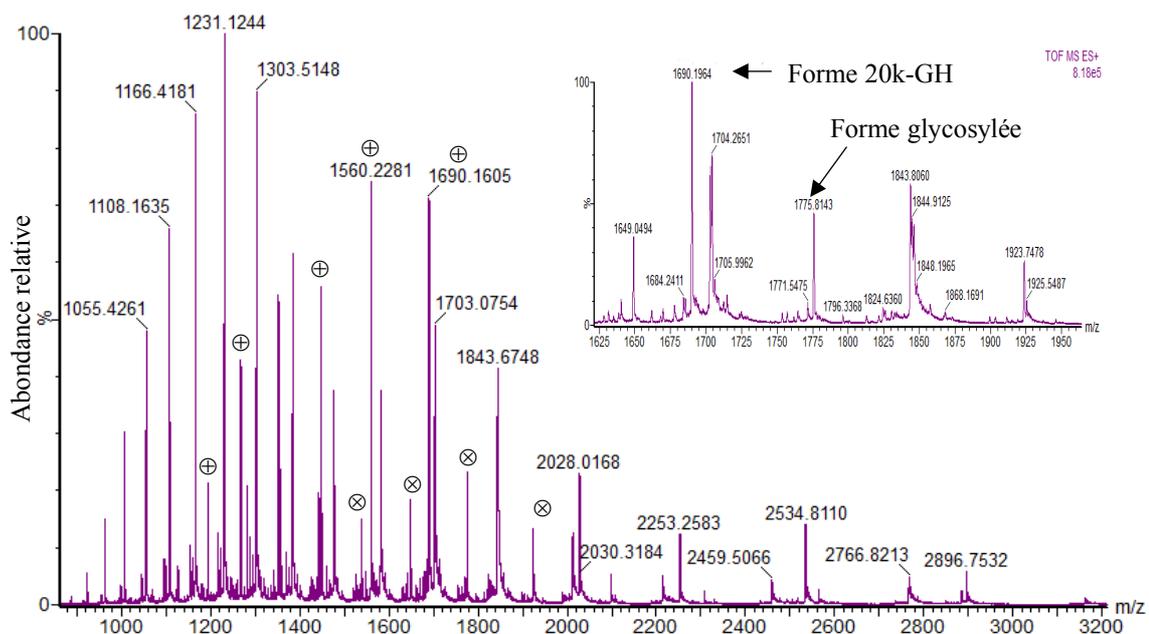
L'erreur sur la mesure des masses des protéines a été évaluée sur la base d'une série de mesures prises à des différents jours d'expérience.



**Figure 55. - Analyse de spectrométrie de masse de différentes préparations de hGH. A.** Spectre de masse de la hGH pituitaire. **B.** Spectre de masse de la hGH saisie de douane (G). **C.** Spectre de masse de la hGH pharmaceutique (Z). La distribution des charges est similaire pour les 3 hormones de croissance. Conditions d'analyse : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80°C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation.



**Figure 56. - Spectres de masse de l'état de charge 13+ des 3 hormones de croissance. A.** Spectre de masse de la hGH pituitaire. **B.** Spectre de masse de la hGH saisie de douane (G). **C.** Spectre de masse de la hGH pharmaceutique (Z). Le pic principal (■) correspond à la GH non modifiée. Le pic (●) peut être attribué à la perte d'un ammonium. Le pic (▲) correspond à l'oxydation de la GH. Le pic à 1727.90 peut être attribué à  $[M+13H+sucrose-H_2O]^{13+}$ . Conditions d'analyse : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80°C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation.



**Figure 57. - Spectre de l'hormone de croissance pituitaire, pic \* ( $t_r=26.9$  min) de la chromatographie de la figure 53. Les pics  $\oplus$  correspondent aux états de charge de la forme 20 kDa de la GH et les pics  $\otimes$  correspondent aux états de charge de la forme glycosylée de la GH. L'encart à droite est un agrandissement de la région  $m/z$  1600-1800 du spectre. Conditions d'analyse : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation.**

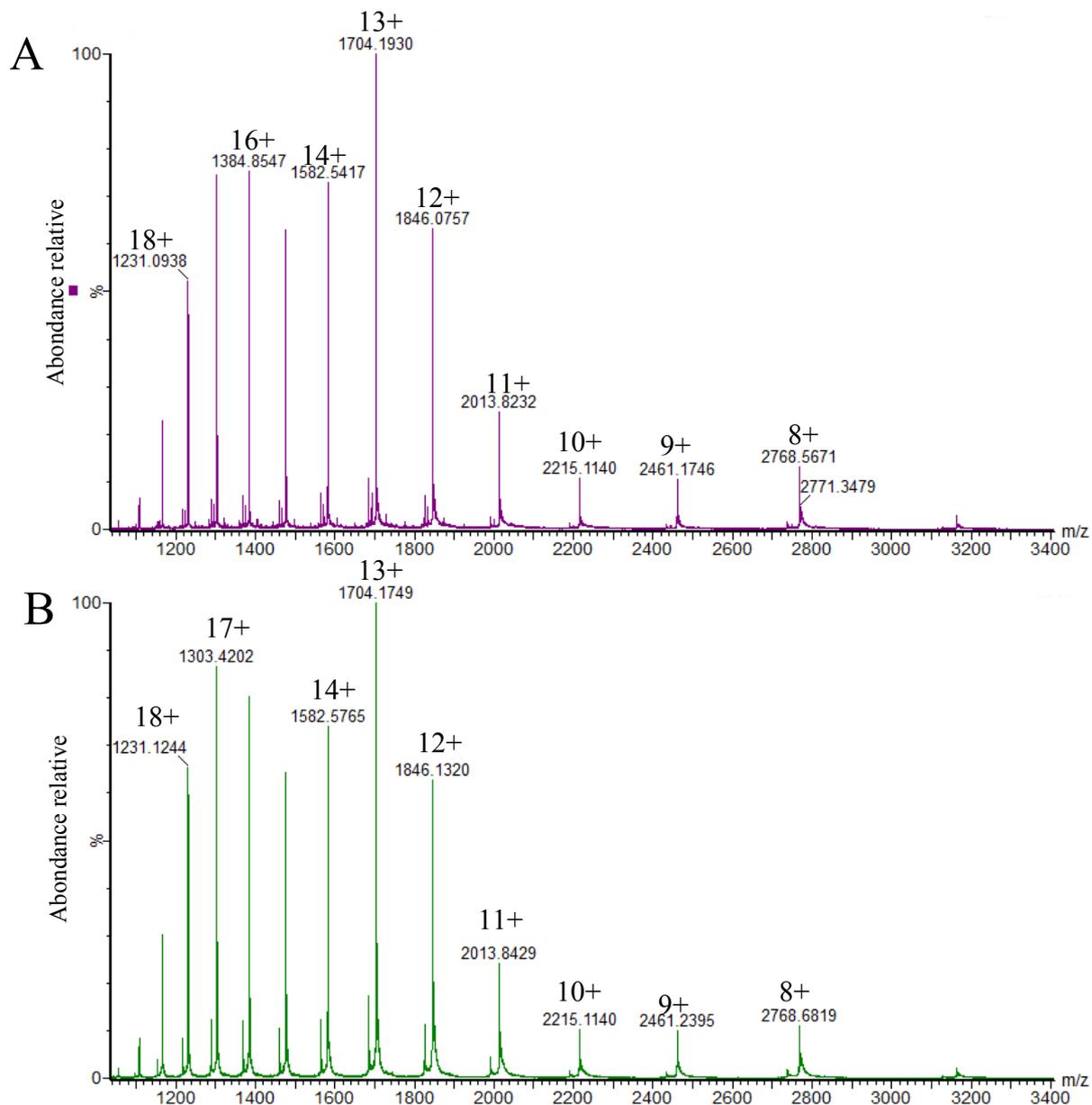
La figure 56 représente le spectre de masse correspondant à l'épaule du pic 1 du chromatogramme A de la figure 53. On voit la présence de la forme 20K-GH ( $m/z$  1690.19 $\pm$ 0,06,  $z=12$ ), la masse moléculaire est de 20270,2 Da, qui est en cohérence avec la masse mesurée de la GH 20K (20269,7 $\pm$ 0,7 Da). Le pic à  $m/z$  1775.81 $\pm$ 0,06,  $z=13$  peut être attribué à une forme glycosylée de la GH avec une différence de masse par rapport à la forme non glycosylée de 948,3 $\pm$ 0,7 Da. Ceci est en cohérence avec le fait que la hGH pituitaire pourrait avoir une forme glycosylée (différence de masse de +947.4 Da entre les pics monoisotopiques de la forme GH non modifiée et la forme glycosylée) comme décrit par Bustamante *et al.* [78], [79]. Ces derniers ont caractérisé la hGH glycosylée par MS et ils ont déterminé la position de la O-glycosylation. Ils ont réalisé des analyses de MALDI-TOF/MS et ESI-MS/MS du digestat de la forme glycosylée de la hGH (24 kDa). Ils sont arrivés à déterminer la présence de la glycosylation à la thréonine 60 par fragmentation CID du peptide T6. L'analyse ESI-MS/MS du glycopeptide T6 a permis la caractérisation de la séquence et le branchement de l'O-oligosaccharide qui commence avec une N-acetyl galactosamine avec deux

branches, la première contient un galactose et un acide neuraminique et la deuxième consiste en un seul acide neuraminique.

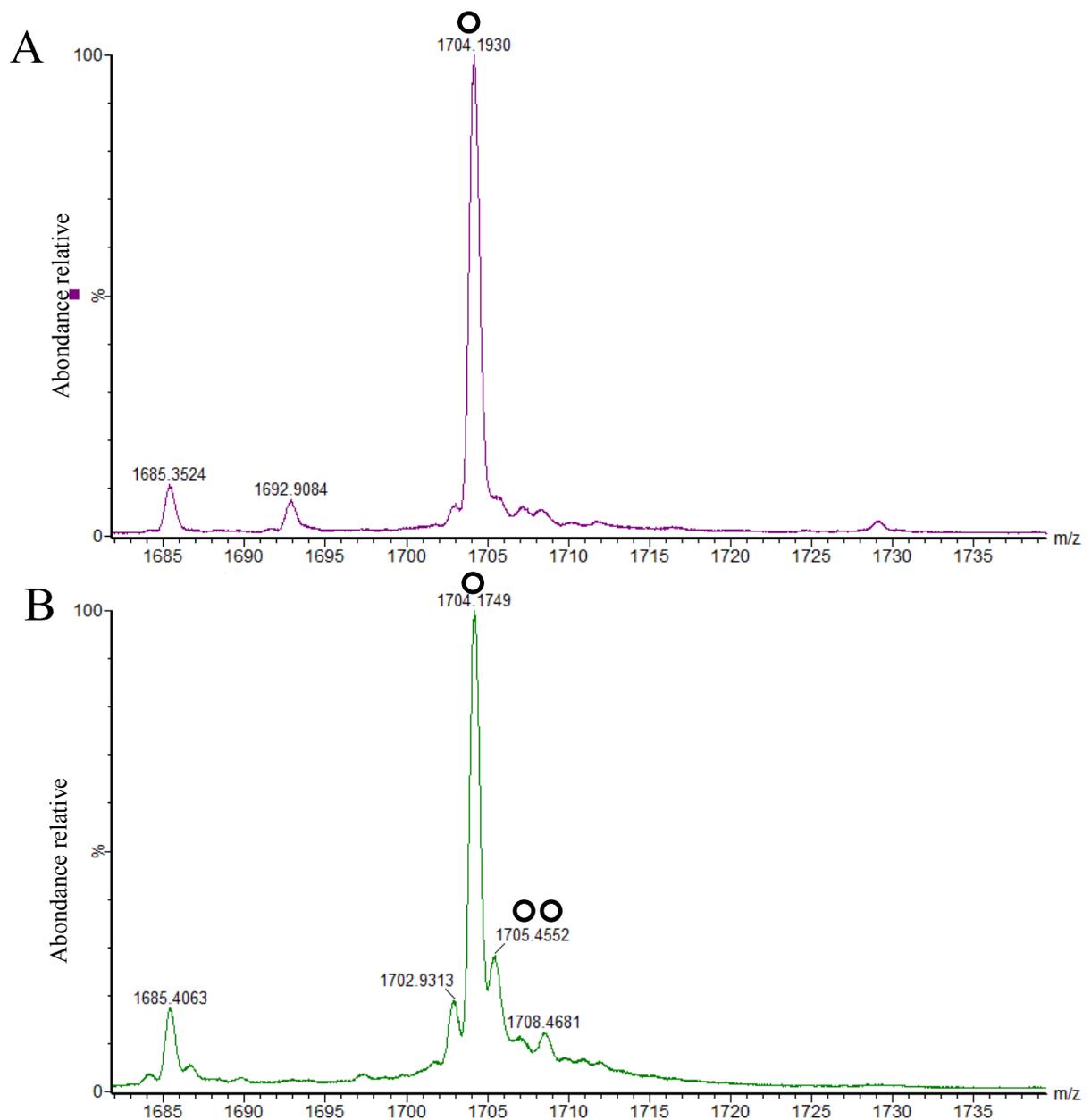
L'élution de la forme 20K-GH après la forme 22K-GH dans une chromatographie en phase inverse est un peu étrange. La forme 22K-GH est de taille plus importante et devait être retenue plus longtemps que la forme 20K-GH. En revanche, après avoir vérifié l'hydrophobicité de la forme 20K-GH en regardant la composition de chaque isoforme par GPMW lite, il se trouve qu'elle est plus hydrophobe de la forme 22K-GH et donc c'est logique qu'elle soit retenue plus longtemps. Par ailleurs, la forme 20K avec d'autres formes de la hGH a été étudiée par électrophorèse capillaire parce qu'il n'était pas possible de les détecter par les techniques de chromatographie liquide [185], [201].

Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de procéder à la caractérisation du motif de la glycosylation. Ceci a été déjà réalisé en 2009 [79]. Par ailleurs dans le spectre de masse de la forme 22K-GH, on trouve un pic à  $m/z$   $1727.90 \pm 0,06$  (figure 55.A) peut être attribué à  $[M+13H+sucrose-H_2O]^{13+}$ . Il est important de signaler que les pics attribués à des formes glycosylées de la hGH ne sont présents dans aucun des spectres des hormones de croissance recombinantes.

Les pics chromatographique 2 (figure 53) sont attribués à la forme oxydée de la GH. Les spectres de masse relatifs aux deux hormones naturelle et recombinante (G) sont présentées dans la figure 57. Un agrandissement sur l'état de charge  $13^+$  est représenté sur la figure 58. Les pics les plus intenses à  $m/z$   $1704,15 \pm 0,06$  correspondent à la GH oxydée sur une de ses deux méthionines (masse moléculaire moyenne de  $22141,07 \pm 0,7$  Da). L'oxydation de la GH a été observée dans d'autres études [185], [193], [202]. Par contre, le spectre de masse de l'hormone de croissance saisie de douane (G) présente un pic supplémentaire à  $m/z$   $1705,45 \pm 0,06$  qui pourrait être attribué à une GH oxydée deux fois (oxydation sur les deux méthionines M14 et 125).

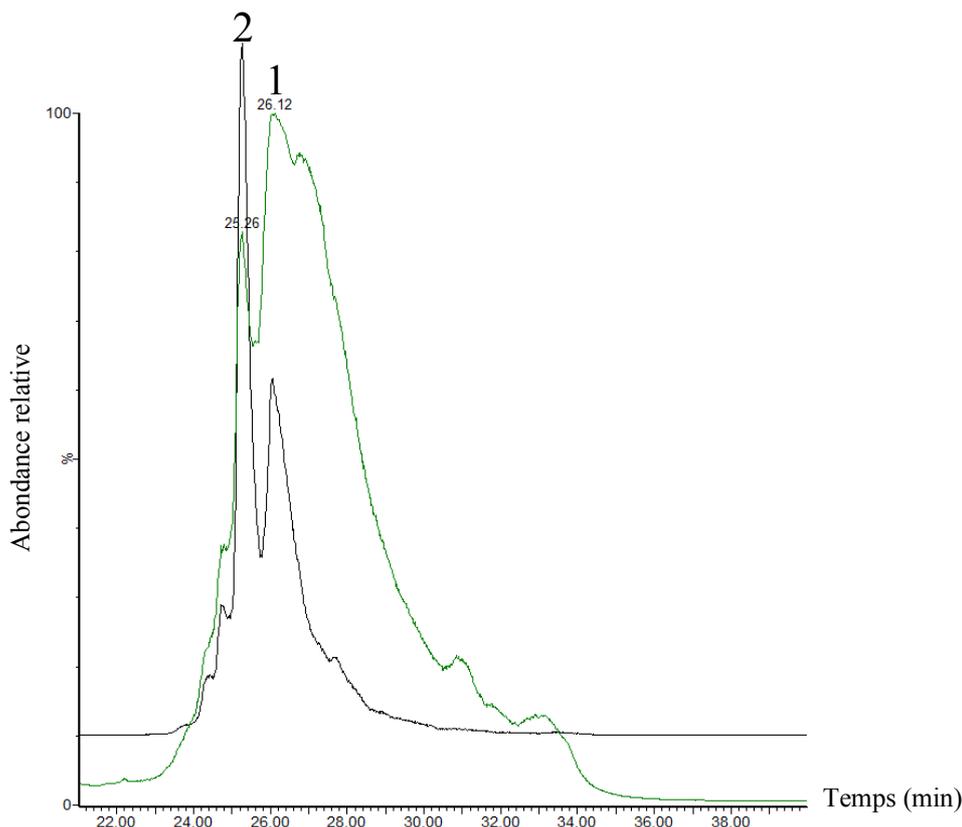


**Figure 58.** - Spectres de masse du pic 2 des chromatogrammes A et B de la figure 53. **A.** Spectre de masse de la hGH pituitaire oxydée. **B.** Spectre de masse de la hGH saisie de douane (G) oxydée. Conditions d'analyse : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation.



**Figure 59. - Spectre de masse de l'état de charge 13+ du pic chromatographique 2 de la figure 53. A. Spectre de l'hormone de croissance pituitaire. B. Spectre de masse de l'hormone de croissance saisie de douane (G). Le pic (●) correspond à la forme oxydée de la GH et le pic (●●) correspond à forme oxydée deux fois. Conditions d'analyse : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation.**

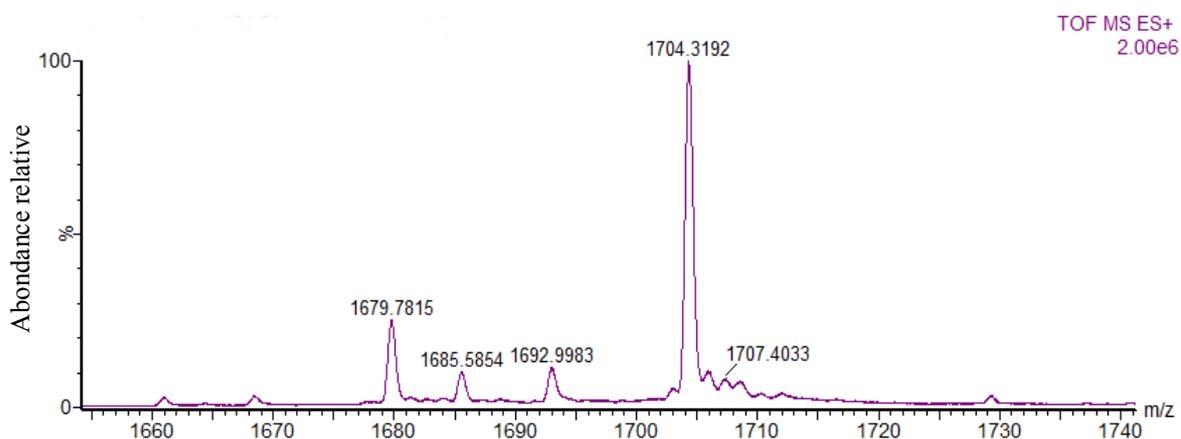
On remarque que les formes oxydées de la GH ne co-éluent pas, on observe la forme oxydée sous les deux pics chromatographiques 1 et 2 (figure 59) avec une intensité plus importante pour le pic 2. Ceci peut être expliqué par la présence de deux conformations différentes pour la GH oxydée, mais on ne peut pas être sûrs de cette interprétation parce que sous le 1, on retrouve la forme  $\text{GH}+\text{Na}^+$  ( $m/z$   $1704,51\pm 0,06$ ) qui à cause de la faible résolution ne peut pas être séparée de la forme GH oxydée.



**Figure 60.- Chromatogramme de l'hormone de croissance saisie de douane (G).** La trace verte correspond au chromatogramme de l'ensemble des formes de GH. La trace noire correspond à la forme oxydée de la GH. Le pic 1 correspond principalement à la forme non modifiée de la GH. Le pic 2 est attribué à la forme oxydée de la GH. L'analyse a été faite avec une colonne C8 (300 Å, 4,6mm x 250 mm, 5µm pour la taille des particules, Interchim, France) et un débit de 1mL/min. La phase mobile A a été composée de H<sub>2</sub>O avec 0,1% d'acide formique et la phase mobile B a été composée de 90% acétonitrile et 0,1% d'acide formique. Le débit était de 1mL/min et la détection a été assurée par le spectromètre de masse.

Le pic chromatographique 3 pourrait correspondre à la GH avec la fixation d'une molécule d'eau. En effet, le pic à  $m/z$   $1704,31\pm 0,06$  (figure 60) correspond à une espèce

de  $22143.01 \pm 0,7$  Da en moyenne, ce qui donne une différence de 18.2 Da par rapport à la forme non modifiée de la GH ( $22124.81 \pm 0,7$  Da).



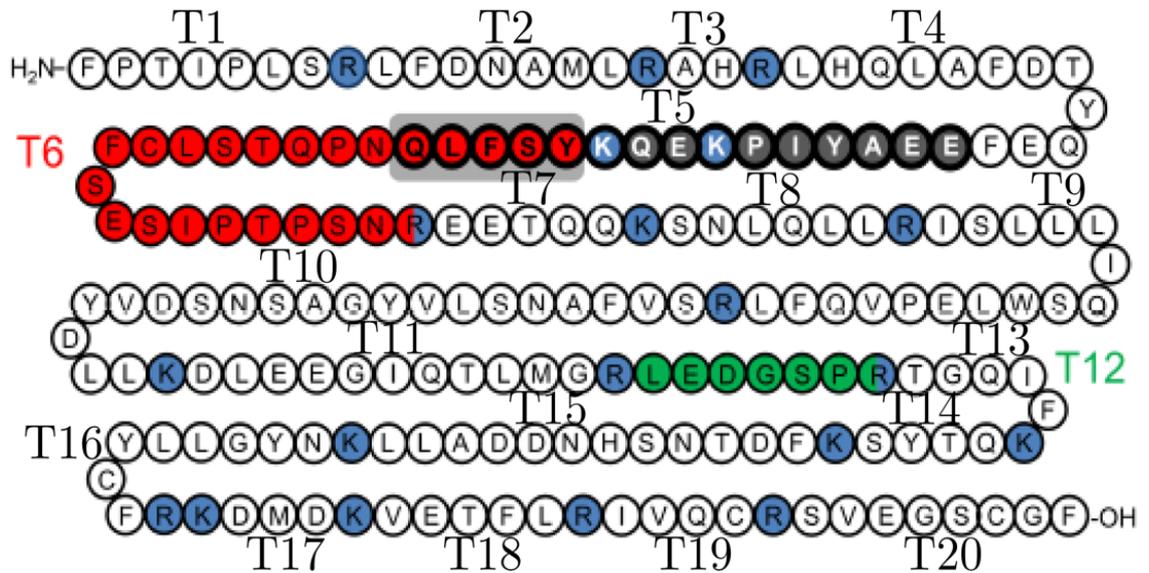
**Figure 61.** - Spectre de masse de l'état de charge  $13^+$  de hormone de croissance sous le pic 3 de la figure 53. Le pic à  $m/z$   $1704,31 \pm 0,06$  est dû à la fixation d'une molécule d'eau à la GH. Conditions d'analyse : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvation.

## V. Digestion protéolytique de l'hormone de croissance

La digestion protéolytique est utilisée pour compléter les informations obtenues de l'analyse de spectrométrie de masse des protéines intactes. C'est ce qu'on appelle, une approche « bottom-up » en spectrométrie de masse. La protéine est d'abord digérée par une enzyme protéolytique. Les peptides obtenus seront ensuite analysés par le spectromètre de masse. Chaque peptide pourrait être sélectionné et fragmenté pour avoir plus d'informations structurales sur la protéine. Malheureusement, il n'a pas été possible de compléter ce travail à cause de problèmes de digestion que nous avons rencontré, le principal était une contamination de l'eau utilisée. Par contre, nous présentons par la suite un début d'optimisation des conditions de digestion et d'analyse de chromatographie liquide en phase inverse.

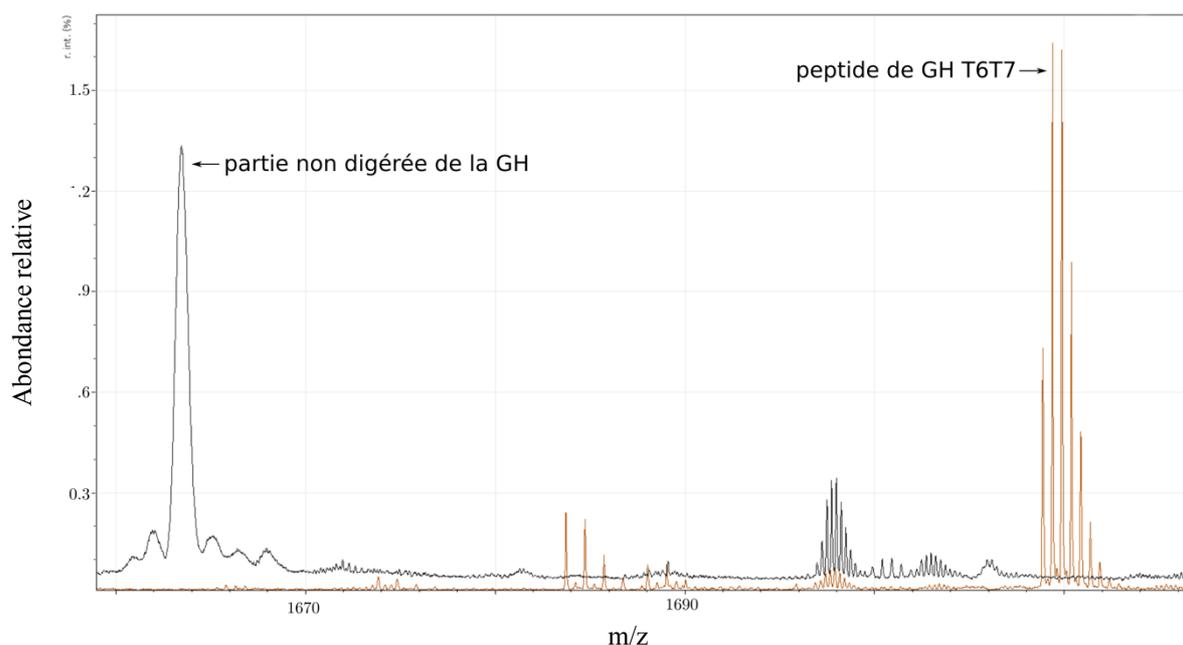
L'hormone de croissance a été digérée par la trypsine. La trypsine coupe la liaison peptidique au groupement carboxyle des résidus, arginine et lysine. Le choix de la trypsine comme enzyme de digestion de la GH est justifié par le fait qu'elle produit des

peptides facilement chargés en spectrométrie de masse. En effet, la trypsine produit des peptides dont le C-terminal est une arginine ou une lysine qui sont des acides aminés très basiques et tendent à être chargés positivement dans le spectromètre de masse et donc détectés par le détecteur. En plus, le clivage par la trypsine produit des peptides protéospécifiques de l'hormone de croissance, T6 et T12 (Figure 61).



*Figure 62.- Carte de clivage de l'hormone de croissance par la trypsine. Les labels T(numéro) représentent la position du clivage dans la séquence.*

La pharmacopée européenne utilise un rapport de digestion 1:60 enzyme : substrat et 4 heures de digestion. Par contre, un rapport de 1:100 et une digestion sur la nuit était plus efficace (Figure 62).

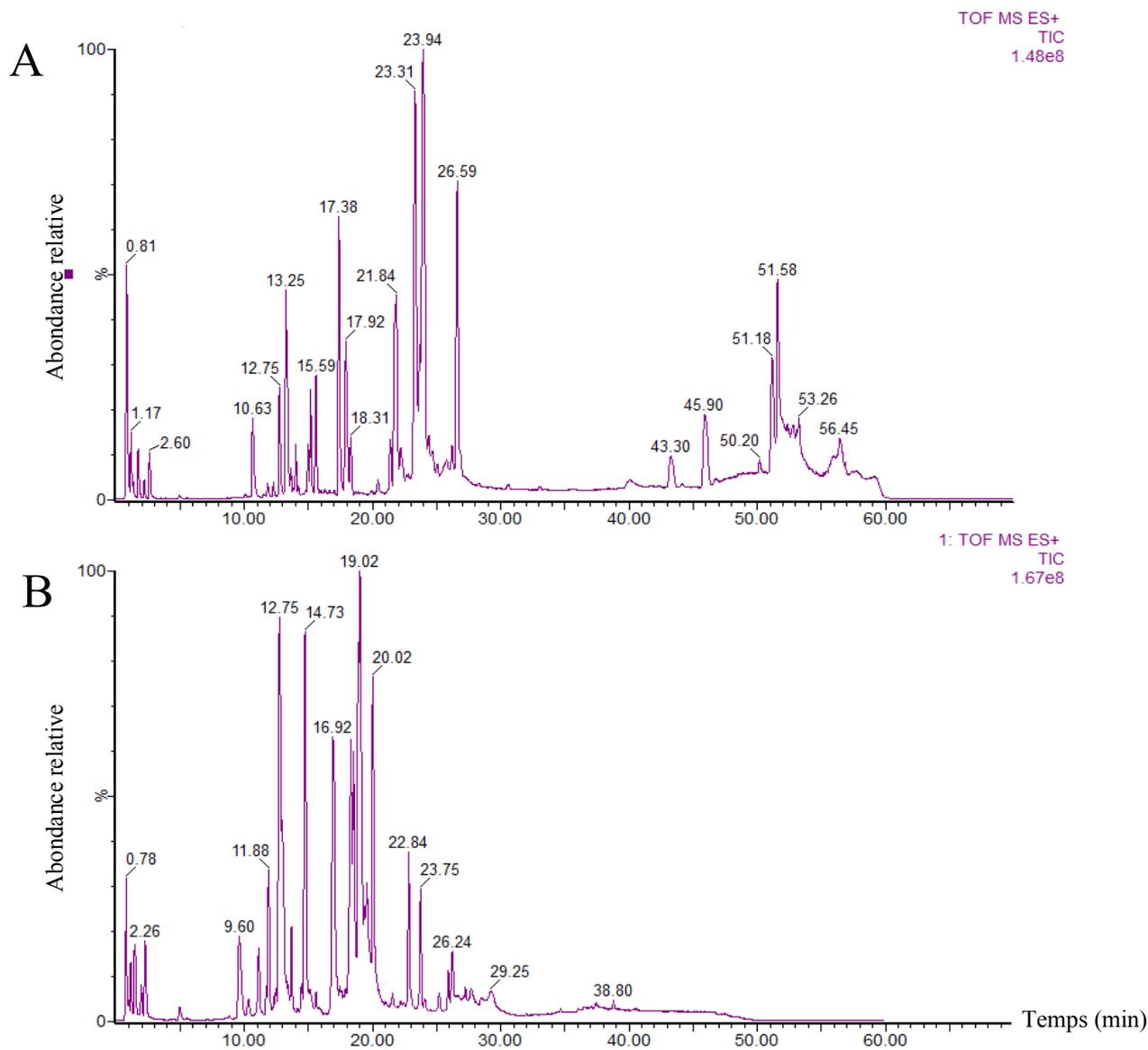


**Figure 63. - Spectres de masse des digestats d'hormone de croissance obtenu après infusion directe de la solution dans la source. La trace noire correspond au digestat obtenu après 4h de digestion avec un rapport enzyme : substrat de 1 : 60. La trace orange correspond au digestat obtenu après une nuit de digestion avec un rapport enzyme : substrat de 1 :100. La digestion a été faite à 37 °C. L'appareil utilisé est le synapt G2-Si HDMS.**

## **5. Analyse LC-MS de digestats d'hormones de croissance**

### **Optimisation du gradient de chromatographie liquide en phase inversée**

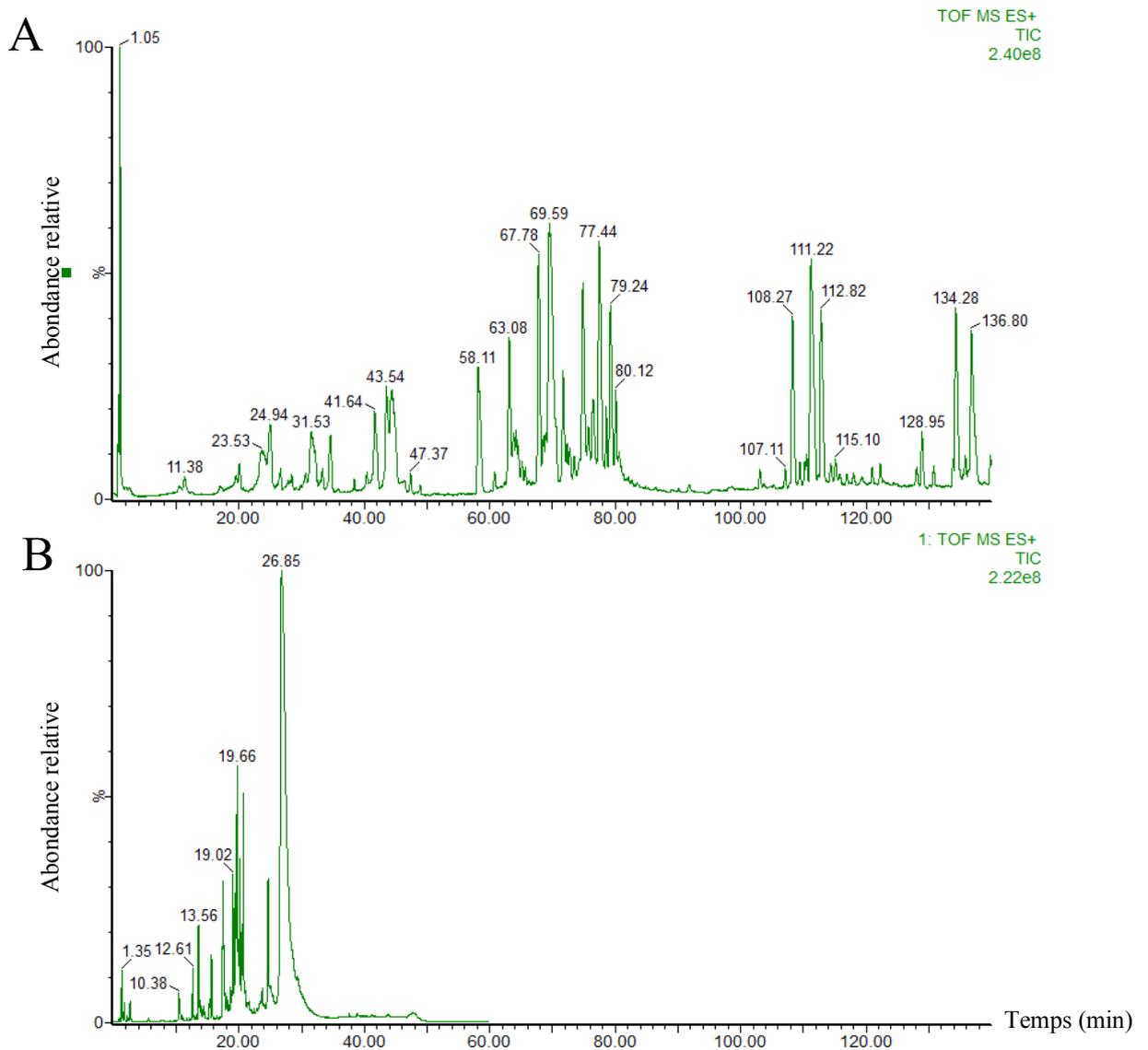
Comme pour les protéines intactes, la phase mobile était composée d'une phase A qui consistait en 0,1% acide formique dans l'eau, et d'une phase B qui consistait en 90% acétonitrile, 10% H<sub>2</sub>O et 0,1% d'acide formique. Les digestats ont été analysés par une colonne C18.



**Figure 64.** - Chromatogrammes RP-HPLC de digestat d'hormone de croissance naturelle. **A.** Chromatogramme obtenu avec un gradient : de 5 à 15 min on passe de 5% à 20% B, de 15 à 25 min on atteint 50% B, de 25 à 35 min, on atteint 80%, de 35 à 45 on monte jusqu'à 100% et à la fin on rééquilibre la colonne à 5% B jusqu'à 60 min. **B.** Chromatogramme obtenu avec un gradient : de 5 à 15 min on passe de 5% à 20% B, de 15 à 25 min on atteint 50% B, de 30 à 45 min, on monte jusqu'à 100% et à la fin on rééquilibre la colonne à 5% B jusqu'à 60 min. . L'analyse a été fait par une colonne C18 (300 Å, 2,1mm x 50 mm, 1,7 µm pour la taille des particules, Interchim, France) et un débit de 0.15 mL/min.

La Figure 63 présente des chromatogrammes des digestats de GH obtenus avec deux gradients différents. Une meilleure séparation des peptides de GH est obtenue avec le gradient le plus long (70 min). Cependant, un autre gradient a été employé par

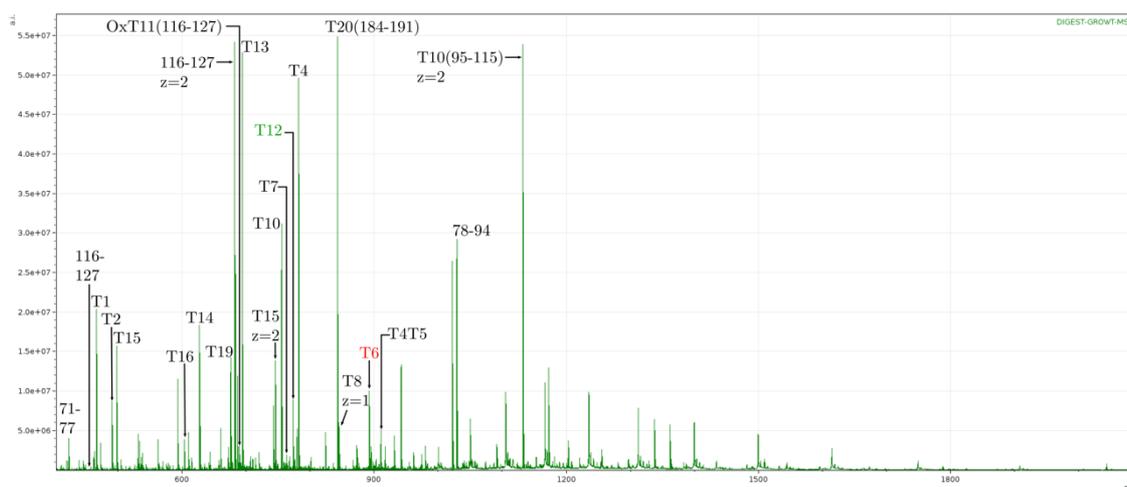
d'autres auteurs [79] semble plus adapté à la séparation du mélange peptidique. Ils ont utilisé un gradient de 0% à 45% B ACN, 0,1% TFA en 140 min. En effet, les pics chromatographiques sont plus étalés avec un gradient linéaire de 5% à 50% B en 140 min (figure 64).



**Figure 65. - Chromatogrammes RP-CLHP de digestat d'hormone de croissance saisie de douane (G).** **A.** Chromatogramme obtenu avec un gradient linéaire de 5% à 50% B en 140 min. **B.** Chromatogramme obtenu avec un gradient : de 5 à 15 min on passe de 5% à 20% B, de 15 à 25 min on atteint 50% B, de 30 à 45 min, on monte jusqu'à 100% et à la fin on rééquilibre la colonne. L'analyse a été faite à l'aide d'une colonne C18 (300 Å, 2,1mm x 50 mm, 1,7 µm pour la taille des particules, Interchim, France) et un débit de 0.15 mL/min.

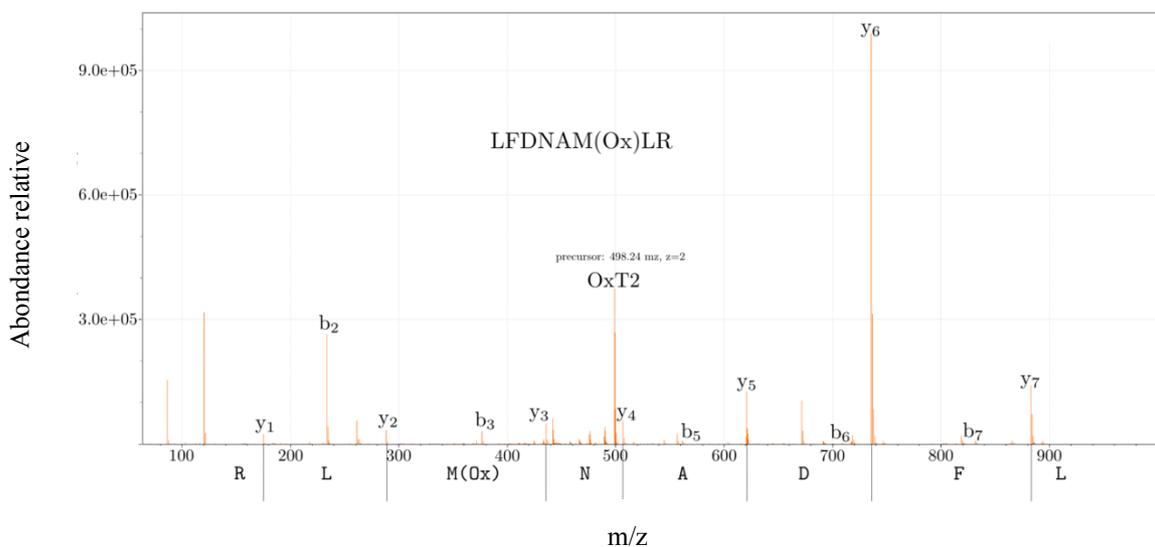
## 6. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

L'analyse LC-MS (L'appareil utilisé est le synpat G2-Si HDMS) sur l'hormone de croissance saisie de douane (G) a montré la présence de deux oxydations sur cette dernière. Ces deux oxydations ont été caractérisées par spectrométrie de masse en tandem. Le digestat a été tout d'abord analysé par LC-MS (figure 65). Ensuite, les masses correspondantes aux peptides oxydés ont été sélectionnées par le quadrupole et les peptides ont été fragmentés par CID.

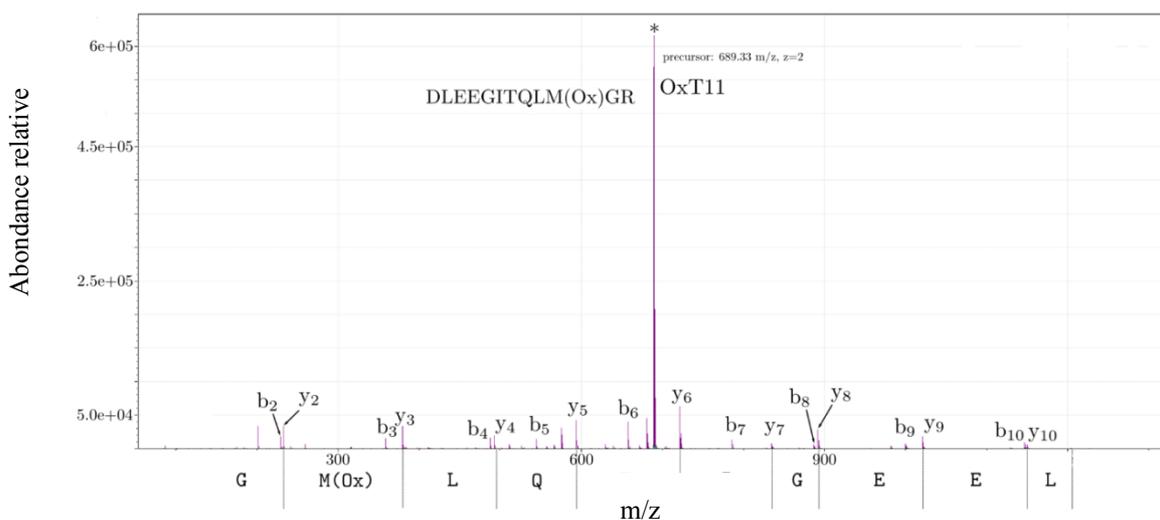


**Figure 66.- Spectre de masse du digestat de l'hormone de croissance saisie de douane (G).** Les pics annotés correspondent aux différents peptides de la GH après digestion trypsique. Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvation.

Les résultats de CID montrent que l'hormone de croissance peut être oxydée sur deux méthionines, M14 and M125 (Figures 66 et 67). L'oxydation est confirmée par la présence des ions fragments b et y contenant la méthionine oxydée. Par contre, lorsque nous avons additionné la masse de l'oxygène, nous avons retrouvé les m/z correspondantes.



**Figure 67.** - Spectre MS/MS du peptide oxydé T2 m/z 489,24, z=2. Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction, 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation. L'énergie de collision était de 20 V.



**Figure 68.** - Spectre MS/MS du peptide oxydé T11 at m/z 689,33, z=2. Les conditions d'analyses : 3,2 kV pour la tension du capillaire, 50 V pour la tension d'extraction 80 °C pour la température de la source et 280 °C pour la température de désolvatation. L'énergie de collision était de 20 V.

Pour voir si l'ensemble de l'oxydation de l'hormone de croissance saisie de douane

(G) est dû à ces deux peptides, nous avons comparé les rapports d'intensité peptide oxydé/peptide non oxydé et protéine oxydée/protéine non oxydée. Les rapports n'ont pas été proches, le rapport protéine oxydée/protéine (0,3) est plus grand que le rapport peptide oxydé/peptide (0,05), ceci peut être expliqué par la présence d'autres peptides oxydés que nous n'avons pas détectés. L'oxydation peut changer l'ionisation des peptides.

Nous n'avons pas été en mesure d'employer cette approche pour confirmer et caractériser la glycosylation observée sur l'hormone de croissance pituitaire. La glycosylation de la GH est prédite sur la thréonine 60, la détection et la caractérisation du peptide glycosylé serait un début pour élaborer une approche analytique pour quantifier le peptide glycosylé (signature de l'hormone de croissance naturelle) par rapport au peptide non glycosylé (signature des deux formes de la GH, naturelle et recombinante).

## ***VI. Conclusion :***

Le couplage de la chromatographie en phase inverse à la spectrométrie de masse a permis de purifier et séparer les différentes formes de hGH naturelles et recombinantes.

L'analyse de chromatographie phase inverse a montré que la hGH naturelle et recombinante ont le même temps de rétention. Avec la spectrométrie de masse, on n'a pas pu mettre en évidence une différence de masse en les deux formes hGH et rhGH. Par contre, la préparation naturelle de hGH contenait des formes qui n'étaient pas présentes dans les préparations recombinantes, telles que la forme 20 kDa et la forme glycosylée. Ces résultats doivent être complétés par la caractérisation de la forme glycosylée et la confirmation avec le motif de glycosylation. L'élaboration d'une approche analytique qui quantifie le peptide glycosylé (signature de l'hormone de croissance naturelle) par rapport au peptide non glycosylé (signature des deux formes de la hGH, naturelle et recombinante) pourrait être une amorce vers un test anti-dopage. En effet, l'administration de la hGH recombinante pourrait perturber le rapport du peptide glycosylé/peptide non glycosylé.

## *Conclusion et perspectives*

Ce travail de thèse a porté sur deux sujets différents, mais, qui tous les deux ont fait appel à la spectrométrie de masse comme technique d'analyse. Dans un premier temps, la spectrométrie de masse couplée à la mobilité ionique a été employée pour la caractérisation des polymodifications des tubulines. Dans un second temps, la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide en phase inverse a été utilisée pour l'analyse de l'hormone de croissance humaine (hGH) dans le but de mettre en évidence une différence chimique entre la hGH naturelle et la hGH recombinante en vue de concevoir un nouveau test anti-dopage.

Les dimères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  se polymérisent en microtubules. Cependant, les extrémités C-terminales des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  ne sont pas impliquées dans la polymérisation et restent exposées à la surface extérieure du microtubule. Ces extrémités C-terminales sont le siège de polymodifications post-traductionnelles, la polyglutamylation et la polyglycylation. La polyglutamylation consiste en l'ajout de résidus glutamates à l'extrémité C-terminale de la chaîne principale de la tubuline et la polyglycylation est comparable à la précédente, mais elle consiste en l'ajout de résidus glycines. Ces polymodifications sont catalysées par une famille d'enzymes qui, avec les différentes isoformes de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , génèrent un grand nombre de tubulines polymodifiées. Les structures qui en résultent peuvent être impliquées dans la régulation des fonctions des microtubules et leurs interactions avec d'autres protéines. Les polymodifications des tubulines sont aussi impliquées dans différentes pathologies. Par exemple, des anomalies de glycylation qui peuvent provoquer la stérilité et des anomalies de glutamylation (impliquées parfois dans la neurodégénérescence). Ces pathologies sont reliées à des anomalies au niveau des microtubules. Ainsi, il est important de caractériser les structures de extrémités C-terminales des tubulines polymodifiées.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons montré que la spectrométrie de masse en tandem, couplée à la mobilité ionique permet de distinguer deux peptides glycylysés. Chaque peptide a deux glycines ajoutées sur la séquence primaire, sauf qu'ils ne diffèrent que par le site de glycylation. Pour le premier, les deux glycines sont

ajoutées sur un seul glutamate de la séquence primaire, alors que pour le deuxième peptide, chaque glycine est ajoutée sur un glutamate. La spectrométrie de masse en tandem était capable de différencier les deux peptides glycylysés. La dissociation induite par collision (CID) a permis de produire des ions fragments spécifiques à chacun des deux peptides. La présence de la structure glycylysée sur un seul site a été confirmée par des fragments b et y. Le même type d'analyse de spectrométrie de masse en tandem a pu différencier entre différentes structures de glycylation d'une série de peptides synthétiques glycylysés qui ont été conçus pour le développement d'anticorps pour détecter des tubulines glycylysées *in vitro*.

Pour l'analyse en mobilité ionique, nous avons observé que le type TWIMS (travelling wave ion mobility spectrometry) n'est pas simple et que la fiabilité des résultats dépend directement de l'optimisation des paramètres. Par conséquent, suivre des instructions du constructeur bien spécifiques durant l'optimisation des paramètres du TWIMS est crucial pour obtenir des résultats fiables.

Les perspectives relatives à cette étude pourront s'orienter d'une part vers des analyses CID plus abouties, en utilisant des énergies de collision différentes pour produire d'autres fragments signature de chaque peptide comme, les fragments internes :  $\overset{-E-E-}{\underset{|}{G}}-G$  pour le peptide glycylysé sur un seul site et  $\overset{-E-E-}{\underset{|}{G}} \underset{|}{G}$  le peptide glycylysé sur deux sites. D'autre part, au niveau de la séparation par mobilité ionique TWIMS, il est possible de changer d'autres paramètres pour améliorer la séparation des deux peptides, comme par exemple, changer le gaz tampon de la cellule de dérive. Il serait également intéressant d'essayer de séparer d'autres peptides synthétiques polymodifiés plus proches des structures de polymodifications présentes dans les tubulines biologiques. Finalement, d'autres techniques analytiques peuvent être utilisées, comme la chromatographie liquide en phase inverse. La facilité du couplage de techniques analytiques sur les spectromètres commerciaux actuels permet de réaliser une analyse multidimensionnelle qui peut être utile pour l'étude des mélanges complexes des peptides C-terminaux de tubulines biologiques. Ceci peut permettre une avancée concernant la détermination du code de la tubuline « the tubulin code ». Le code de la tubuline est une hypothèse basée sur l'idée que les structures de polymodifications présentes sur les extrémités C-terminales de tubulines représentent des motifs qui seront lus par les molécules qui interagissent avec les microtubules pour réguler leurs fonctions biologiques. Ainsi, le

déchiffrage de ce code représentera une grande avancée dans la recherche sur les microtubules.

L'hormone de croissance humaine (hGH) est l'hormone responsable de la croissance post-natale. Elle est aussi une hormone anabolique qui stimule la synthèse des constituants de l'organisme. Elle induit donc la synthèse protéique qui est essentielle à la croissance musculaire. Par conséquent, l'hormone de croissance est une substance intéressante pour les sportifs qui se dopent. La GH est massivement fabriquée par les compagnies pharmaceutiques pour le traitement de la déficience à la GH. Sa présence sous forme recombinante a été détournée de son objectif thérapeutique et devenir un agent dopant couramment utilisé pour le dopage. La sécrétion de la GH est rythmique et dépend de plusieurs facteurs comme le cycle nyctéméral, le sexe, l'âge et d'autres facteurs extérieurs. Le taux de GH dans le sang est aussi régulé par différents facteurs moléculaires et environnementales. Pour toutes ces raisons, la détection du dopage à la hGH reste très difficile. Les tests d'anti-dopage à la GH approuvés par l'agence mondiale d'anti-dopage (WADA) font face à certaines limites liées aux tests eux-mêmes et d'autres liées à la GH qui se dégrade très rapidement dans l'organisme. Les tests disponibles sont des tests immunologiques qui peuvent avoir des réactions interférentes et ils ne reconnaissent pas toutes les isoformes de la GH. D'autre part, comme nous l'avons dit ci-dessus, le taux de la GH dans le sang est influencé par plusieurs facteurs. Ainsi que, la forme recombinante de la hGH est similaire à sa forme endogène. Par conséquent, il est souhaitable de développer de nouvelles techniques et méthodes pour différencier la hGH recombinante de la hGH naturelle.

Dans la deuxième partie de cette thèse, la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide en phase inverse a permis de séparer des variants de hGH naturelles et hGH recombinantes. Nous avons trouvé que la hGH naturelle a un variant glycosylé alors que la hGH recombinante n'est pas glycosylée. Des variants oxydés ont été aussi observés, l'analyse de digestat d'hGH recombinante par spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie en phase inverse ont confirmé la présence de l'oxydation sur deux méthionines.

Les perspectives de cette partie de la thèse sont différentes. Tout d'abord, il est important de caractériser la glycosylation de la hGH naturelle, soit par approche « Top down », en fragmentant la protéine intacte, soit, par approche « bottom up », par fragmentation des peptides de la hGH après digestion enzymatique. Une fois la structure du peptide glycosylé déterminée, il sera possible de le quantifier et faire un rapport entre le peptide non glycosylé et le peptide glycosylé. D'autre part, il est très souhaitable d'aller vers une miniaturisation du système. En effet, les analyses anti-dopage à la GH sont réalisées sur le sang qui est une matrice délicate à prélever en quantité très limitée. Le développement d'un système microfluidique avec lequel on peut réaliser des tests anti-dopage peut représenter un progrès notable dans le domaine analytique, pour des analyses multipliées et répétées intégrant des étapes de pré-traitement d'échantillons et de séparation. Finalement, pour surmonter la courte durée de demi-vie de la GH, il serait intéressant de trouver d'autres biomarqueurs de la GH ou cibler les formes liées de la GH (GH liée à la GHBP) qui présentent une durée de demi-vie plus longue. Les efforts de chimistes analytiques, de pharmaciens et de médecins doivent être regroupés pour l'élaboration d'un nouveau test d'anti-dopage à la hGH dans un futur proche.

## *Références*

- [1] K. Giles, J. L. Wildgoose, D. J. Langridge, and I. Campuzano, “A method for direct measurement of ion mobilities using a travelling wave ion guide,” *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 298, no. 1–3, pp. 10–16, Dec. 2010.
- [2] A. B. Kanu, P. Dwivedi, M. Tam, L. Matz, and H. H. H. Jr, “Ion mobility-mass spectrometry,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–22, 2008.
- [3] J. R. Yates and J. R. Yates III, “HiSTORicAL cOmmeNTArY | special feature A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes,” 2011.
- [4] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, and F. Hillenkamp, “Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds,” *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 78, pp. 53–68, Sep. 1987.
- [5] M. Karas, D. Bachmann, and F. Hillenkamp, “Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules,” *Anal. Chem.*, vol. 57, no. 14, pp. 2935–2939, Dec. 1985.
- [6] M. A. Baldwin, “Protein identification by mass spectrometry: issues to be considered,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2004.
- [7] D. F. Hunt, J. Shabanowitz, and A. B. Giordani, “Collision activated decompositions in mixture analysis with a triple quadrupole mass spectrometer,” *Anal. Chem.*, vol. 52, no. 3, pp. 386–390, Mar. 1980.
- [8] J. K. Eng, A. L. McCormack, and J. R. Yates, “An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database,” *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 5, no. 11, pp. 976–989, Nov. 1994.
- [9] A. Artigues *et al.*, “Protein Structural Analysis via Mass Spectrometry-Based Proteomics,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 919, pp. 397–431, 2016.
- [10] M. R. Larsen, M. B. Trelle, T. E. Thingholm, and O. N. Jensen, “Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry,” *Biotechniques*, vol. 40, no. 6, pp. 790–798, Jun. 2006.

- [11] J. A. McLean, B. T. Ruotolo, K. J. Gillig, and D. H. Russell, "Ion mobility-mass spectrometry: A new paradigm for proteomics," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 240, no. 3 SPEC. ISS., pp. 301–315, 2005.
- [12] J. Hofmann, H. S. Hahm, P. H. Seeberger, and K. Pagel, "Identification of carbohydrate anomers using ion mobility–mass spectrometry," *Nature*, vol. 526, no. 7572, pp. 241–244, 2015.
- [13] B. T. Ruotolo, S.-J. Hyung, P. M. Robinson, K. Giles, R. H. Bateman, and C. V. Robinson, "Ion Mobility–Mass Spectrometry Reveals Long-Lived, Unfolded Intermediates in the Dissociation of Protein Complexes," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 46, no. 42, pp. 8001–8004, Oct. 2007.
- [14] P. E. Wright and H. J. Dyson, "Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm," *J. Mol. Biol.*, vol. 293, no. 2, pp. 321–331, Oct. 1999.
- [15] J. Howard, "Molecular motors: structural adaptations to cellular functions.," *Nature*, vol. 389, no. 6651, pp. 561–567, Oct. 1997.
- [16] C. P. Garnham and A. Roll-Mecak, "The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions.," *Cytoskeleton (Hoboken)*, vol. 69, no. 7, pp. 442–63, Jul. 2012.
- [17] P. G. McKean, S. Vaughan, and K. Gull, "The extended tubulin superfamily.," *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. Pt 15, pp. 2723–33, Aug. 2001.
- [18] N. Fukushima, D. Furuta, Y. Hidaka, R. Moriyama, and T. Tsujiuchi, "Post-translational modifications of tubulin in the nervous system," *J. Neurochem.*, vol. 109, no. 3, pp. 683–693, May 2009.
- [19] C. Janke, "The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions.," *J. Cell Biol.*, vol. 206, no. 4, pp. 461–472, 2014.
- [20] H.-W. Wang and E. Nogales, "Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly," *Nature*, vol. 435, no. 7044, pp. 911–915, Jun. 2005.
- [21] D. Sept, "Microtubule Polymerization: One Step at a Time," *Curr. Biol.*, vol. 17, no. 17, pp. R764–R766, Sep. 2007.

- [22] C. Conde and A. Cáceres, “Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 10, no. 5, pp. 319–332, May 2009.
- [23] D. L. Sackett and D. Sept, “Structure and Evolution of Tubulin C-terminal Tails,” *Biophys. J.*, vol. 96, no. 3, p. 572a, Feb. 2009.
- [24] HGNC, “Tubulins (TUB) Gene Family | HUGO Gene Nomenclature Committee.” [Online]. Available: <https://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/778>. [Accessed: 15-Sep-2018].
- [25] Y. Song and S. T. Brady, “Post-translational modifications of tubulin: Pathways to functional diversity of microtubules,” *Trends Cell Biol.*, vol. 25, no. 3, pp. 125–136, 2015.
- [26] M. M. Magiera and C. Janke, “Post-translational modifications of tubulin.,” *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 9, pp. R351-4, May 2014.
- [27] G. G. Gundersen, M. H. Kalnoski, and J. C. Bulinski, “Distinct populations of microtubules: Tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo.,” *Cell*, vol. 38, no. 3, pp. 779–789, 1984.
- [28] E. Kalinina, R. Biswas, I. Berezniuk, A. Hermoso, F. X. Aviles, and L. D. Fricker, “A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases.,” *FASEB J*, vol. 21, no. 3, pp. 836–850, 2007.
- [29] M. R. de la Vega *et al.*, “Nna1-like proteins are active metallo-carboxypeptidases of a new and diverse M14 subfamily.,” *FASEB J*, vol. 21, no. 3, pp. 851–865, 2007.
- [30] D. Raybin and M. Flavin, “Enzyme which specifically adds tyrosine to the alpha chain of tubulin.,” *Biochemistry*, vol. 16, no. 10, pp. 2189–2194, 1977.
- [31] N. Kumar and M. Flavin, “Preferential action of a brain detyrosinating carboxypeptidase on polymerized tubulin.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 256, no. 14, pp. 7678–7686, 1981.
- [32] D. Wloga *et al.*, “TTLL3 Is a Tubulin Glycine Ligase that Regulates the Assembly of Cilia,” *Dev. Cell*, vol. 16, no. 6, pp. 867–876, 2009.
- [33] L. Peris *et al.*, “Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin

- tyrosination.,” *J. Cell Biol.*, vol. 185, no. 7, pp. 1159–1166, 2009.
- [34] A. E. Prota *et al.*, “Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase.,” *J. Cell Biol.*, vol. 200, no. 3, pp. 259–70, Feb. 2013.
- [35] A. Konno, M. Setou, and K. Ikegami, “Ciliary and Flagellar Structure and Function—Their Regulations by Posttranslational Modifications of Axonemal Tubulin,” in *International review of cell and molecular biology*, vol. 294, 2012, pp. 133–170.
- [36] K. Rogowski *et al.*, “A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration.,” *Cell*, vol. 143, no. 4, pp. 564–578, 2010.
- [37] I. Berezniuk *et al.*, “Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing ??- and ??-tubulin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 9, pp. 6503–6517, 2012.
- [38] S. Raunser and C. Gatsogiannis, “Deciphering the Tubulin Code,” *Cell*, vol. 161, no. 5, pp. 960–961, 2015.
- [39] B. Edde, J. Rossier, J. P. Le Caer, E. Desbruyeres, F. Gros, and P. Denoulet, “Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin.,” *Science (80-. )*, vol. 247, no. 4938, pp. 83–85, 1990.
- [40] V. Redeker, J. P. Le Caer, J. Rossier, and J. C. Prome, “Structure of the polyglutamyl side chain posttranslationally added to alpha-tubulin.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 34, pp. 23461–23466, 1991.
- [41] Y. Bobinnec, M. Moudjou, J. P. Fouquet, E. Desbruyeres, B. Edde, and M. Bornens, “Glutamylation of centriole and cytoplasmic tubulin in proliferating non-neuronal cells.,” *Cell Motil Cytoskelet.*, vol. 39, no. 3, pp. 223–232, 1998.
- [42] C. Bonnet *et al.*, “Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 16, pp. 12839–12848, 2001.
- [43] D. Boucher, J. C. Larcher, F. Gros, and P. Denoulet, “Polyglutamylation of tubulin as a progressive regulator of in vitro interactions between the microtubule-associated protein tau and tubulin,” *Biochemistry*, vol. 33, no. 41, pp. 12471–12477, 1994.
- [44] J. C. Larcher *et al.*, “[Microtubules: Functional polymorphisms of tubulin and

- associated proteins (structural and motor MAP's)].," *C R Seances Soc Biol Fil*, vol. 190, no. 2–3, pp. 255–268, 1996.
- [45] T. Kubo, H. Yanagisawa, T. Yagi, M. Hirono, and R. Kamiya, "Tubulin polyglutamylation regulates axonemal motility by modulating activities of inner-arm dyneins.," *Curr Biol*, vol. 20, no. 5, pp. 441–445, 2010.
- [46] V. Redeker *et al.*, "Polyglycylation of tubulin: A posttranslational modification in axonemal microtubules.," *Science (80-. )*, vol. 266, no. 5191, pp. 1688–1691, 1994.
- [47] J. Mary, V. Redeker, J. P. Le Caer, J. Rossier, and J. M. Schmitter, "Posttranslational modifications in the C-terminal tail of axonemal tubulin from sea urchin sperm.," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 17, pp. 9928–9933, 1996.
- [48] J. Mary, V. Redeker, J. P. Le Caer, J. Rossier, and J. M. Schmitter, "Posttranslational modifications of axonemal tubulin.," *J. Protein Chem.*, vol. 16, no. 5, pp. 403–407, 1997.
- [49] M. B. Grau *et al.*, "Tubulin glycylation and glutamylation have distinct functions in stabilization and motility of ependymal cilia.," *J. Cell Biol.*, vol. 202, no. 3, pp. 441–451, 2013.
- [50] C. Janke *et al.*, "Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family.," *Science (80-. )*, vol. 308, no. 5729, pp. 1758–1762, 2005.
- [51] J. van Dijk, K. Rogowski, J. Miro, B. Lacroix, B. Edde, and C. Janke, "A targeted multienzyme mechanism for selective microtubule polyglutamylation.," *Mol Cell*, vol. 26, no. 3, pp. 437–448, 2007.
- [52] K. Rogowski *et al.*, "Evolutionary divergence of enzymatic mechanisms for posttranslational polyglycylation.," *Cell*, vol. 137, no. 6, pp. 1076–1087, 2009.
- [53] M. H. Bre *et al.*, "Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: Widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility.," *J. Cell Sci.*, vol. 109-Pt-, pp. 727–738, 1996.
- [54] A. Wolff, P. Denoulet, and C. Jeantet, "High level of tubulin microheterogeneity in the mouse brain.," *Neurosci Lett*, vol. 31, no. 3, pp. 323–328, 1982.

- [55] V. Redeker, J. P. Le Caer, J. Rossier, and J. C. Promé, “Structure of the polyglutamyl side chain posttranslationally added to  $\alpha$ -tubulin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 34, pp. 23461–23466, 1991.
- [56] A. Wolff *et al.*, “Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335.,” *Eur J Cell Biol*, vol. 59, no. 2, pp. 425–432, 1992.
- [57] M. H. Bré *et al.*, “Axonemal tubulin polyglycylation probed with two monoclonal antibodies: widespread evolutionary distribution, appearance during spermatozoan maturation and possible function in motility.,” *J. Cell Sci.*, vol. 109 ( Pt 4, pp. 727–738, 1996.
- [58] J. Vinh *et al.*, “Structural characterization by tandem mass spectrometry of the posttranslational polyglycylation of tubulin.,” *Biochemistry*, vol. 38, no. 10, pp. 3133–3139, 1999.
- [59] J. Vinh, D. Loyaux, V. Redeker, and J. Rossier, “Sequencing branched peptides with CID/PSD MALDI-TOF in the low-picomole range: application to the structural study of the posttranslational polyglycylation of tubulin.,” *Anal. Chem.*, vol. 69, no. 19, pp. 3979–85, 1997.
- [60] C. H. Li, H. M. Evans, and M. E. Simpson, “ISOLATION AND PROPERTIES OF THE ANTERIOR HYPOPHYSEAL GROWTH HORMONE\*.”
- [61] M. E. SIMPSON, C. W. ASLING, and H. M. EVANS, “Some endocrine influences on skeletal growth and differentiation.,” *Yale J. Biol. Med.*, vol. 23, no. 1, pp. 1–27, Sep. 1950.
- [62] J. Devesa, C. Almengló, and P. Devesa, “Multiple Effects of Growth Hormone in the Body: Is it Really the Hormone for Growth?”
- [63] A. Vijayakumar, R. Novosyadlyy, Y. Wu, S. Yakar, and D. LeRoith, “Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism.,” *Growth Horm. IGF Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–7, Feb. 2010.
- [64] K. Gunawardane, T. Krarup Hansen, J. Sandahl Christiansen, and J. O. Lunde Jorgensen, *Normal Physiology of Growth Hormone in Adults*. MDText.com, Inc., 2000.
- [65] C. H. LI and H. P APKOFF, “Preparation and properties of growth hormone from

- human and monkey pituitary glands.," *Science*, vol. 124, no. 3235, pp. 1293–4, Dec. 1956.
- [66] C. H. Li and J. S. Dixon, "Human pituitary growth hormone. 32. The primary structure of the hormone: revision.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 146, no. 1, pp. 233–6, Sep. 1971.
- [67] Z. Karaca, B. A. Laway, H. S. Dokmetas, H. Atmaca, and F. Kelestimur, "Sheehan syndrome," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 2, p. 16092, Dec. 2016.
- [68] G. P. Baumann, "Growth hormone isoforms," *Growth Horm. IGF Res.*, vol. 19, no. 4, pp. 333–340, 2009.
- [69] F. M. DeNoto, D. D. Moore, and H. M. Goodman, "Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 9, no. 15, pp. 3719–30, 1981.
- [70] G. BAUMANN, "Growth Hormone Heterogeneity: Genes, Isohormones, Variants, and Binding Proteins," *Endocr. Rev.*, vol. 12, no. 4, pp. 424–449, Nov. 1991.
- [71] B. K. Jones, B. R. Monks, S. A. Liebhaber, and N. E. Cooke, "The human growth hormone gene is regulated by a multicomponent locus control region.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 15, no. 12, pp. 7010–21, 1995.
- [72] G. Baumann *et al.*, "Nucl. Med. Biol.," vol. 21, no. 3, 1994.
- [73] P. M. Sussman, R. J. Tushinski, and F. C. Bancroft, "Pregrowth hormone: product of the translation in vitro of messenger RNA coding for growth hormone.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 73, no. 1, pp. 29–33, Jan. 1976.
- [74] J. A. Martial, R. A. Hallewell, J. D. Baxter, and H. M. Goodman, "Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria.," *Science*, vol. 205, no. 4406, pp. 602–7, Aug. 1979.
- [75] F. E. Cohen and I. D. Kuntz, "Prediction of the three-dimensional structure of human growth hormone.," *Proteins*, vol. 2, no. 2, pp. 162–166, 1987.
- [76] S. S. Abdel-Meguid, H. S. Shieh, W. W. Smith, H. E. Dayringer, B. N. Violand, and L. A. Bentle, "Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no.

- 18, pp. 6434–7, 1987.
- [77] A. M. de Vos, M. Ultsch, and A. A. Kossiakoff, “Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex.,” *Science*, vol. 255, no. 5042, pp. 306–12, Jan. 1992.
- [78] L. S. Haro, U. J. Lewis, M. Garcia, J. Bustamante, A. O. Martinez, and N. C. Ling, “Glycosylated Human Growth Hormone (hGH): A Novel 24 kDa hGH-N Variant,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 228, no. 2, pp. 549–556, 1996.
- [79] J. J. Bustamante *et al.*, “O-Glycosylated 24 kDa human growth hormone has a mucin-like biantennary disialylated tetrasaccharide attached at Thr-60,” *Proteomics*, vol. 9, no. 13, pp. 3474–3488, 2009.
- [80] F. Giorgianni, S. Beranova-Giorgianni, and D. M. Desiderio, “Identification and characterization of phosphorylated proteins in the human pituitary,” *Proteomics*, vol. 4, no. 3, pp. 587–598, 2004.
- [81] E. CORPAS, S. M. HARMAN, and M. R. BLACKMAN, “Human Growth Hormone and Human Aging,” *Endocr. Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 20–39, Feb. 1993.
- [82] D. Cummings and G. Merriam, “Age-Related Changes in Growth Hormone Secretion: Should the Somatopause Be Treated?,” *Semin. Reprod. Med.*, vol. 17, no. 04, pp. 311–325, Dec. 1999.
- [83] J.-O. JANSSON, S. EDÉN, and O. ISAKSSON, “Sexual Dimorphism in the Control of Growth Hormone Secretion\*,” *Endocr. Rev.*, vol. 6, no. 2, pp. 128–150, Apr. 1985.
- [84] J. R. Davidson, H. Moldofsky, and F. A. Lue, “Growth hormone and cortisol secretion in relation to sleep and wakefulness.,” *J. Psychiatry Neurosci.*, vol. 16, no. 2, pp. 96–102, Jul. 1991.
- [85] Y. Takahashi, D. M. K1rnis, and W. H. Daughaday, “Growth Hornone Secretion during Sleep.”
- [86] E. Van Cauter, M. Kerkhofs, A. Caufriez, A. Van Onderbergen, M. O. Thorner, and G. Copinschi, “A quantitative estimation of growth hormone secretion in normal man: reproducibility and relation to sleep and time of day.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 74, no. 6, pp. 1441–1450, Jun. 1992.

- [87] L. M. WINER, M. A. SHAW, and G. BAUMANN, “Basal Plasma Growth Hormone Levels in Man: New Evidence for Rhythmicity of Growth Hormone Secretion\*,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 70, no. 6, pp. 1678–1686, Jun. 1990.
- [88] Y. Kato, Y. Murakami, M. Sohmiya, and M. Nishiki, “Regulation of human growth hormone secretion and its disorders.,” *Intern. Med.*, vol. 41, no. 1, pp. 7–13, Jan. 2002.
- [89] V. E. Chaves, F. M. Júnior, and G. L. Bertolini, “The metabolic effects of growth hormone in adipose tissue,” *Endocrine*, vol. 44, no. 2, pp. 293–302, Oct. 2013.
- [90] J. Spiess, J. Rivier, and W. Vale, “Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor.,” *Nature*, vol. 303, no. 5917, pp. 532–5.
- [91] M. Barinaga, G. Yamonoto, C. Rivier, W. Vale, R. Evans, and M. G. Rosenfeld, “Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone-releasing factor.,” *Nature*, vol. 306, no. 5938, pp. 84–5.
- [92] F. Camanni, E. Ghigo, and E. Arvat, “Growth Hormone-Releasing Peptides and Their Analogs,” *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 19, no. 1, pp. 47–72, Jan. 1998.
- [93] C. Y. BOWERS, F. A. MOMANY, G. A. REYNOLDS, and A. HONG, “On the *in Vitro* and *in Vivo* Activity of a New Synthetic Hexapeptide that Acts on the Pituitary to Specifically Release Growth Hormone\*,” *Endocrinology*, vol. 114, no. 5, pp. 1537–1545, May 1984.
- [94] M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, and K. Kangawa, “Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach,” *Nature*, vol. 402, no. 6762, pp. 656–660, Dec. 1999.
- [95] K. Takaya *et al.*, “Ghrelin Strongly Stimulates Growth Hormone Release in Humans,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 12, pp. 4908–4911, Dec. 2000.
- [96] M. Bermann, C. A. Jaffe, W. Tsai, R. DeMott-Friberg, and A. L. Barkan, “Negative feedback regulation of pulsatile growth hormone secretion by insulin-like growth factor I. Involvement of hypothalamic somatostatin.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 94, no. 1, pp. 138–45, Jul. 1994.
- [97] C. J. Romero *et al.*, “Insulin-like growth factor 1 mediates negative feedback to

- somatotroph GH expression via POU1F1/CREB binding protein interactions.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 32, no. 21, pp. 4258–69, Nov. 2012.
- [98] A. C. S. FARIA, J. D. VELDHUIS, M. O. THORNER, and M. L. VANCE, “Half-Time of Endogenous Growth Hormone (GH) Disappearance in Normal Man After Stimulation of GH Secretion by GH-Releasing Hormone and Suppression with Somatostatin\*,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 68, no. 3, pp. 535–541, Mar. 1989.
- [99] G. Baumann, M. L. Vance, M. A. Shaw, and M. O. Thorner, “Plasma Transport of Human Growth Hormone In Vivo\*,” 1990.
- [100] D. Caicedo *et al.*, “Growth Hormone (GH) and Cardiovascular System,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 1, p. 290, Jan. 2018.
- [101] P. D. GLUCKMAN, M. M. GRUMBACH, and S. L. KAPLAN, “The Neuroendocrine Regulation and Function of Growth Hormone and Prolactin in the Mammalian Fetus\*,” *Endocr. Rev.*, vol. 2, no. 4, pp. 363–395, Oct. 1981.
- [102] J. Wang, J. Zhou, and C. A. Bondy, “Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy.,” *FASEB J.*, vol. 13, no. 14, pp. 1985–90, Nov. 1999.
- [103] O. G. Isaksson, J. O. Jansson, and I. A. Gause, “Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly.,” *Science*, vol. 216, no. 4551, pp. 1237–9, Jun. 1982.
- [104] N. L. Schlechter, S. M. Russell, E. M. Spencer, and C. S. Nicoll, “Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. 20, pp. 7932–4, Oct. 1986.
- [105] M. B. Ranke and V. Popović-Brkić, *Skeletal muscle as a response target : the link between growth and metabolism : 9th KIGS/KIMS Expert Meeting on Growth Hormone and Growth Disorders, Stresa Italy, March, 2006*. Karger, 2006.
- [106] O. E. Rooyackers and K. S. Nair, “HORMONAL REGULATION OF HUMAN MUSCLE PROTEIN METABOLISM,” *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 17, no. 1, pp. 457–485, Jul. 1997.

- [107] S. Welle, C. Thornton, M. Statt, and B. Mchenry, "Growth Hormone Increases Muscle Mass and Strength but Does Not Rejuvenate Myofibrillar Protein Synthesis in Healthy Subjects over 60 Years Old\*."
- [108] R. C. Cuneo, F. Salomon, M. Wiles, and P. H. S&ouml;nksen, "Skeletal Muscle Performance in Adults with Growth Hormone Deficiency," *Horm. Res.*, vol. 33, no. 4, pp. 55–60, 1990.
- [109] H. DE BOER, G.-J. BLOK, and E. A. VAN DER VEEN, "Clinical Aspects of Growth Hormone Deficiency in Adults," *Endocr. Rev.*, vol. 16, no. 1, pp. 63–86, Feb. 1995.
- [110] R. C. Cuneo, F. Salomon, C. M. Wiles, R. Hesp, and P. H. Sonksen, "Growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults. I. Effects on muscle mass and strength," *J. Appl. Physiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 688–694, Feb. 1991.
- [111] R. C. Cuneo, F. Salomon, C. M. Wiles, R. Hesp, and P. H. Sonksen, "Growth hormone treatment in growth hormone-deficient adults. II. Effects on exercise performance," *J. Appl. Physiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 695–700, Feb. 1991.
- [112] P. J. Jenkins, "Growth hormone and exercise," *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 50, no. 6, pp. 683–9, Jun. 1999.
- [113] A. Vijayakumar, S. Yakar, D. Leroith, S. Radovick, and R. Salvatori, "The intricate role of growth hormone in metabolism," 2011.
- [114] H. C. Mertani, M. C. Delehay-Zervas, J. F. Martini, M. C. Postel-Vinay, and G. Morel, "Localization of growth hormone receptor messenger RNA in human tissues," *Endocrine*, vol. 3, no. 2, pp. 135–142, Feb. 1995.
- [115] M. L. Adamo and R. P. Farrar, "Resistance training, and IGF involvement in the maintenance of muscle mass during the aging process," *Ageing Res. Rev.*, vol. 5, no. 3, pp. 310–331, Aug. 2006.
- [116] N. Murras and B. Beaufrere, "Recombinant human insulin-like growth factor-I enhances whole body protein anabolism and significantly diminishes the protein catabolic effects of prednisone in humans without a diabetogenic effect.," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 80, no. 3, pp. 869–874, Mar. 1995.
- [117] N. Murras, V. Martinez, A. Rini, and J. Guevara-Aguirre, "Recombinant Human Insulin-Like Growth Factor I Has Significant Anabolic Effects in Adults with

- Growth Hormone Receptor Deficiency: Studies on Protein, Glucose, and Lipid Metabolism<sup>1</sup>,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 9, pp. 3036–3042, Sep. 2000.
- [118] J. F. Bak, N. Moller, and O. Schmitz, “Effects of growth hormone on fuel utilization and muscle glycogen synthase activity in normal humans,” *Am. J. Physiol. Metab.*, vol. 260, no. 5, pp. E736–E742, May 1991.
- [119] N. L. Brooks *et al.*, “Low utilization of circulating glucose after food withdrawal in Snell dwarf mice,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 48, pp. 35069–77, Nov. 2007.
- [120] R. Lindberg-Larsen *et al.*, “The Impact of Pegvisomant Treatment on Substrate Metabolism and Insulin Sensitivity in Patients with Acromegaly,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 92, no. 5, pp. 1724–1728, May 2007.
- [121] A. A. Sakharova *et al.*, “Role of growth hormone in regulating lipolysis, proteolysis, and hepatic glucose production during fasting,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 93, no. 7, pp. 2755–9, Jul. 2008.
- [122] P. Greene, “Anterior Pituitary Gland,” 2006. [Online]. Available: <https://slideplayer.com/slide/8888873/>. [Accessed: 27-May-2006].
- [123] D. V Goeddel *et al.*, “Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone,” *Nature*, vol. 281, no. 5732, pp. 544–8, Oct. 1979.
- [124] J. A. Ascacio-Martínez and H. A. Barrera-Saldaña, “Genetic Engineering and Biotechnology of Growth Hormones,” *Genet. Eng. - Basics, New Appl. Responsib.*, no. 2, pp. 1–25, 2012.
- [125] A. M. Lewis, M. Yu, S. J. DeArmond, W. P. Dillon, B. L. Miller, and M. D. Geschwind, “Human Growth Hormone–Related Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease With Abnormal Imaging,” *Arch. Neurol.*, vol. 63, no. 2, p. 288, 2006.
- [126] B. S. Appleby *et al.*, “Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease from Commercial Cadaveric Human Growth Hormone,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 4, pp. 682–684, 2013.
- [127] H. Wood, “Prion disease: A $\beta$  pathology in human growth hormone recipients,” *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 13, no. 6, pp. 319–319, Apr. 2017.

- [128] C. J. Peel *et al.*, “Somatotropin and lactation.,” *J. Dairy Sci.*, vol. 70, no. 2, pp. 474–86, Feb. 1987.
- [129] “Qu’est-ce que le dopage ? | Organisation des Nations Unies pour l’éducation, la science et la culture.” [Online]. Available: <http://www.unesco.org/new/fr/social-and-human-sciences/themes/anti-doping/youth-space/what-is-doping/>. [Accessed: 13-Sep-2018].
- [130] P. Bacquaert, “Le Dopage et son Histoire | Dopage du Sportif - IRBMS,” 2016. [Online]. Available: <https://www.irbms.com/histoire-dopage/>. [Accessed: 19-May-2016].
- [131] WADA, “LISTE DES INTERDICTIONS,” 2018.
- [132] A. Momaya, M. Fawal, and R. Estes, “Performance-Enhancing Substances in Sports: A Review of the Literature,” *Sport. Med.*, vol. 45, no. 4, pp. 517–531, Apr. 2015.
- [133] C. Ayotte, J. Miller, and M. Thevis, “Challenges in Modern Anti-Doping Analytical Science.,” *Med. Sport Sci.*, vol. 62, pp. 68–76, 2017.
- [134] M. Bidlingmaier and P. U. Freda, “Measurement of human growth hormone by immunoassays: Current status, unsolved problems and clinical consequences,” *Growth Horm. IGF Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 19–25, 2010.
- [135] M. Bidlingmaier and C. J. Strasburger, “Growth hormone assays: Current methodologies and their limitations,” *Pituitary*, vol. 10, no. 2, pp. 115–119, 2007.
- [136] A. Weltman, J. Y. Weltman, R. Schurrer, W. S. Evans, J. D. Veldhuis, and A. D. Rogol, “Endurance training amplifies the pulsatile release of growth hormone: effects of training intensity,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 72, no. 6, pp. 2188–2196, Jun. 1992.
- [137] M. Bidlingmaier, Z. Wu, and C. J. Strasburger, “Test method: GH,” *Bailliere’s Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 14, no. 1, pp. 99–109, 2000.
- [138] Z. Wu, M. Bidlingmaier, R. Dall, and C. J. Strasburger, “Detection of doping with human growth hormone,” *Lancet*, vol. 353, no. 9156, p. 895, Mar. 1999.
- [139] M. Bidlingmaier *et al.*, “High-Sensitivity Chemiluminescence Immunoassays for Detection of Growth Hormone Doping in Sports METHODS :,” vol. 453, pp.

445–453, 2009.

- [140] J. D. Wallace *et al.*, “Changes in non-22-kilodalton (kDa) isoforms of growth hormone (GH) after administration of 22-kDa recombinant human GH in trained adult males,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, no. 4, pp. 1731–1737, 2001.
- [141] G. P. Baumann, “Growth hormone doping in sports: A critical review of use and detection strategies,” *Endocr. Rev.*, vol. 33, no. 2, pp. 155–186, 2012.
- [142] “Premier cas de dopage à l’hormone de croissance en France (AFLD).” [Online]. Available: <http://www.europe1.fr/sport/premier-cas-de-dopage-a-lhormone-de-croissance-en-france-afl-d-2754946>. [Accessed: 12-Oct-2018].
- [143] J. K. Powrie *et al.*, “Detection of growth hormone abuse in sport,” *Growth Horm. IGF Res.*, vol. 17, no. 3, pp. 220–226, 2007.
- [144] H. D. Cox *et al.*, “Interlaboratory agreement of insulin-like growth factor 1 concentrations measured by mass spectrometry,” *Clin. Chem.*, vol. 60, no. 3, pp. 541–548, 2014.
- [145] R. Dall *et al.*, “The Effect of Four Weeks of Supraphysiological Growth Hormone Administration on the Insulin-Like Growth Factor Axis in Women and Men <sup>1</sup>,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 11, pp. 4193–4200, Nov. 2000.
- [146] S. Longobardi *et al.*, “Growth Hormone (GH) Effects on Bone and Collagen Turnover in Healthy Adults and Its Potential as a Marker of GH Abuse in Sports: A Double Blind, Placebo-Controlled Study <sup>1</sup>,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 4, pp. 1505–1512, Apr. 2000.
- [147] I. Erotokritou-Mulligan *et al.*, “The use of growth hormone (GH)-dependent markers in the detection of GH abuse in sport: Physiological intra-individual variation of IGF-I, type 3 pro-collagen (P-III-P) and the GH-2000 detection score,” *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 72, no. 4, pp. 520–526, Apr. 2010.
- [148] W. I. S. Hgh, W. Effect, C. A. N. Hgh, H. On, and A. Performance, “HUMAN GROWTH HORMONE ( HGH ) TESTING,” pp. 17–20, 2017.
- [149] M. Bidlingmaier, “New Detection Methods of Growth Hormone and Growth Factors,” in *Endocrine development*, vol. 23, 2012, pp. 52–59.
- [150] L. Bailly-Chouriberry, G. Pinel, P. Garcia, M. A. Popot, B. Le Bizec, and Y.

- Bonnaire, "Identification of recombinant equine growth hormone in horse plasma by LC MS/MS: A confirmatory analysis in doping control," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 21, pp. 8340–8347, 2008.
- [151] G. Pinel, F. André, and B. Le Bizec, "Discrimination of recombinant and pituitary-derived bovine and porcine growth hormones by peptide mass mapping.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 3, pp. 407–14, 2004.
- [152] C. G. Arsene, J. Kratzsch, and A. Henrion, "Mass Spectrometry-An Alternative in Growth Hormone Measurement," 2014.
- [153] F. Hepner, E. Csaszar, E. Roitinger, A. Pollak, and G. Lubec, "Massspectrometrical analysis of recombinant human growth hormone Norditropin?? reveals amino acid exchange at M14\_V14 rhGH," *Proteomics*, vol. 6, no. 3, pp. 775–784, 2006.
- [154] F. Hepner, E. Csaszar, E. Roitinger, and G. Lubec, "Mass spectrometrical analysis of recombinant human growth hormone (Genotropin®) reveals amino acid substitutions in 2% of the expressed protein," *Proteome Sci.*, vol. 3, no. 2004, p. 1, 2005.
- [155] G. Such-Sanmartín, N. Bache, J. Bosch, R. Gutiérrez-Gallego, J. Segura, and O. N. Jensen, "Detection and differentiation of 22 kDa and 20 kDa Growth Hormone proteoforms in human plasma by LC-MS/MS," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1854, no. 4, pp. 284–290, 2015.
- [156] M. Kohler, A. Thomas, K. Puschel, W. Schanzer, and M. Thevis, "Identification of human pituitary growth hormone variants by mass spectrometry.," *J. Proteome Res.*, vol. 8, no. 2, pp. 1071–1076, 2009.
- [157] J. Griffiths, "A Brief History of Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, 2008.
- [158] "Spectrométrie de Masse: introduction à l instrumentation utile en analyse protéomique - PDF." [Online]. Available: <https://docplayer.fr/15837674-Spectrometrie-de-masse-introduction-a-l-instrumentation-utile-en-analyse-proteomique.html>. [Accessed: 08-Oct-2018].
- [159] W. J. Griffiths, A. P. Jonsson, S. Liu, D. K. Rai, and Y. Wang, "Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry," 2001.
- [160] P. Kebarle, "A brief overview of the present status of the mechanisms involved

- in electrospray mass spectrometry,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 35, no. 7, pp. 804–817, Jul. 2000.
- [161] S. Banerjee and S. Mazumdar, “Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte,” *Int. J. Anal. Chem.*, vol. 2012, pp. 1–40, 2012.
- [162] B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V Shmikk, and V. A. Zagulin, “The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution,” 1973.
- [163] “Spectromètre de masse à temps de vol (TOF).” [Online]. Available: [https://masse-spec.fr/analyseur-temps-de-vol#\\_ftnref1](https://masse-spec.fr/analyseur-temps-de-vol#_ftnref1). [Accessed: 07-Oct-2018].
- [164] “Spectrométrie de masse.”
- [165] J. Pól, M. Strohalm, V. Havlicek, and M. Volny, *Molecular Mass Spectrometry Imaging in Biomedical and Life Science Research*, vol. 134. 2010.
- [166] F. W. McLafferty, “Tandem mass spectrometry (MS/MS): a promising new analytical technique for specific component determination in complex mixtures,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 13, no. 2, pp. 33–39, Feb. 1980.
- [167] M. Lj Ranković, “Photon and electron action spectroscopy of trapped biomolecular ions-From isolated to nanosolvated species,” 2016.
- [168] L. Sleno and D. A. Volmer, “Ion activation methods for tandem mass spectrometry,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 39, no. 10, pp. 1091–1112, Oct. 2004.
- [169] Roman A. Zubarev, and Neil L. Kelleher, and F. W. McLafferty\*, “Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations. A Nonergodic Process,” 1998.
- [170] J. E. P. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, and D. F. Hunt, “Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 26, pp. 9528–9533, Jun. 2004.
- [171] K. Biemann, “Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure.,” *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, vol. 16, no. 1–12, pp. 99–111, Oct. 1988.

- [172] P. Roepstorff and J. Fohlman, "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides," *Biol. Mass Spectrom.*, vol. 11, no. 11, pp. 601–601, Nov. 1984.
- [173] V. H. Wysocki, K. A. Resing, Q. Zhang, and G. Cheng, "Mass spectrometry of peptides and proteins," 2005.
- [174] K. Biemann, "Four decades of structure determination by mass spectrometry: from alkaloids to heparin," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 13, no. 11, pp. 1254–1272, Nov. 2002.
- [175] M. Bowers, "The Bowers Group - University of California at Santa Barbara." [Online]. Available: [https://labs.chem.ucsb.edu/bowers/michael/theory\\_analysis/ion-mobility/index.shtml](https://labs.chem.ucsb.edu/bowers/michael/theory_analysis/ion-mobility/index.shtml). [Accessed: 09-Oct-2018].
- [176] V. Gabelica, "Intérêt de la spectrométrie de mobilité ionique pour l'étude de la conformation et des assemblages non-covalents de biomolécules I-Introduction."
- [177] C. S. Hoaglund-Hyzer, J. Li, and D. E. Clemmer, "Mobility labeling for parallel CID of ion mixtures," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 13, pp. 2737–2740, 2000.
- [178] N. C. Polfer, B. C. Bohrer, M. D. Plasencia, B. Paizs, and D. E. Clemmer, "On the dynamics of fragment isomerization in collision-induced dissociation of peptides," *J. Phys. Chem. A*, vol. 112, no. 6, pp. 1286–1293, 2008.
- [179] K. Giles, S. D. Pringle, K. R. Worthington, D. Little, J. L. Wildgoose, and R. H. Bateman, "Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 18, no. 20, pp. 2401–2414, 2004.
- [180] A. Shvartsburg and R. Smith, "Fundamentals of traveling wave ion mobility spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 24, pp. 9689–9699, 2008.
- [181] P. M. Lalli *et al.*, "Baseline resolution of isomers by traveling wave ion mobility mass spectrometry: investigating the effects of polarizable drift gases and ionic charge distribution," *J. Mass Spectrom.*, vol. 48, no. 9, pp. 989–997, Sep. 2013.
- [182] "STEPWAVE Enhancing MS Sensitivity and Robustness."
- [183] K. Giles, J. P. Williams, and I. Campuzano, "Enhancements in travelling wave

- ion mobility resolution,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 25, no. 11, pp. 1559–1566, Jun. 2011.
- [184] C. Horváth, W. Melander, and I. Molnár, “Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases,” *J. Chromatogr. A*, vol. 125, no. 1, pp. 129–156, Sep. 1976.
- [185] G. Karlsson, K. Eriksson, A. Persson, H. Månsson, and S. Söderholm, “The separation of recombinant human growth hormone variants by UHPLC,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 51, no. 10, pp. 943–949, 2013.
- [186] M. Castoldi and A. V Popov, “Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization–depolymerization in a high-molarity buffer,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 32, no. 1, pp. 83–88, 2003.
- [187] F. Rusconi, J.-M. Schmitter, J. Rossier, and M. le Maire, “Chromatographic Separation and Sample Preparation in One Step for MALDI Mass Spectrometric Analysis of Subpicomole Amounts of Heterogeneous Protein Samples,” *Anal. Chem.*, vol. 70, no. 14, pp. 3046–3052, 1998.
- [188] C. Wu, W. F. Siems, J. Klasmeier, and H. H. H. Jr, “Separation of isomeric peptides using electrospray ionization/high-resolution ion mobility spectrometry,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 2, pp. 391–395, 2000.
- [189] L. Chen, Y. Q. Gao, and D. H. Russell, “How alkali metal ion binding alters the conformation preferences of gramicidin A: A molecular dynamics and ion mobility study,” *J. Phys. Chem. A*, vol. 116, no. 1, pp. 689–696, 2012.
- [190] S. Gadadhar *et al.*, “Tubulin glycylation controls primary cilia length,” *J. Cell Biol.*, vol. 216, no. 9, pp. 2701–2713, Jul. 2017.
- [191] F. Rusconi, M. C. Potier, J. P. Le Caer, J. M. Schmitter, and J. Rossier, “Characterization of the chicken telokin heterogeneity by time-of-flight mass spectrometry,” *Biochemistry*, vol. 36, no. 36, pp. 11021–11026, 1997.
- [192] D. M. Simpson and R. J. Beynon, “Acetone Precipitation of Proteins and the Modification of Peptides research articles,” pp. 444–450, 2010.
- [193] G. Karlsson *et al.*, “Separation of oxidized and deamidated human growth hormone variants by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 855, no. 1, pp. 147–155, 1999.

- [194] M. Girard and N. Mousseau, "Analysis of Human Growth Hormone By Hydrophobic Interaction Hplc. Method Development, Validation, and Comparative Selectivity To Reversed Phase Hplc," *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 22, no. 8, pp. 1103–1116, 1999.
- [195] P. Oroszlan, S. Wicar, G. Teshima, S. L. Wu, W. S. Hancock, and B. L. Karger, "Conformational effects in the reversed-phase chromatographic behavior of recombinant human growth hormone (rhGH) and N-methionyl recombinant human growth hormone (Met-hGH).," *Anal. Chem.*, vol. 64, no. 14, pp. 1623–31, 1992.
- [196] F. Mulinacci, E. Poirier, M. A. H. Capelle, R. Gurny, and T. Arvinte, "Influence of methionine oxidation on the aggregation of recombinant human growth hormone," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 85, no. 1, pp. 42–52, 2013.
- [197] S. Wu, H. Amato, R. Biringer, G. Choudhary, P. Shieh, and W. S. Hancock, "Targeted Proteomics of Low-Level Proteins in Human Plasma by LC/MS n : Using Human Growth Hormone as a Model System," *J. Proteome Res.*, vol. 1, pp. 459–465, 2002.
- [198] S.-L. Wu, I. Jardine, W. S. Hancock, and B. L. Karger, "A new and sensitive on-line liquid chromatography/mass spectrometric approach for top-down protein analysis: the comprehensive analysis of human growth hormone in an E. coli lysate using a hybrid linear ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance ma," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 18, no. 19, pp. 2201–2207, 2004.
- [199] C. T. Mant, N. E. Zhou, and R. S. Hodges, "Correlation of protein retention times in reversed-phase chromatography with polypeptide chain length and hydrophobicity.," *J. Chromatogr.*, vol. 476, pp. 363–75, Aug. 1989.
- [200] U. J. Lewis, J. T. Dunn, L. F. Bonewald, B. K. Seavey, and W. P. Vanderlaan, "A naturally occurring structural variant of human growth hormone," *J Biol Chem*, vol. 253, no. 8, pp. 2679–2687, 1978.
- [201] C. Arcelloni, I. Fermo, G. Banfi, A. E. Pontiroli, and R. Paroni, "Capillary Electrophoresis for Protein Analysis: Separation of Human Growth Hormone and Human Insulin Molecular Forms," *Anal. Biochem.*, vol. 212, no. 1, pp. 160–167, Jul. 1993.

[202] X. Zhan, F. Giorgianni, and D. M. Desiderio, "Proteomics analysis of growth hormone isoforms in the human pituitary," *Proteomics*, vol. 5, no. 5, pp. 1228–1241, 2005.

Titre : Analyse par spectrométrie de masse des tubulines et de l'hormone de croissance

Mots clés : tubulines, hormone de croissance, spectrométrie de masse, mobilité ionique, chromatographie, peptides, dopage.

Résumé : Les tubulines sont des protéines impliquées dans des processus biologiques essentiels à la vie cellulaire. Elles sont polymodifiées en leurs extrémités C-terminales. Différentes techniques ont été utilisées pour caractériser les polymodifications des tubulines. Mais certaines difficultés persistent concernant l'identification fine de plusieurs structures. Le couplage de spectrométrie de masse à la mobilité ionique représente une avancée technique plus pertinente pour la séparation d'isomères de structures. En effet, la mobilité ionique peut séparer des ions de même rapport  $m/z$  en fonction de leur conformation. Dans la première partie de cette thèse, une analyse par mobilité ionique et spectrométrie de masse en tandem a permis la séparation de deux peptides de synthèse mimant des peptides C-terminaux de tubuline  $\alpha$  diglycylés. L'hormone de croissance (GH) est une hormone

anabolique et un agent dopant pour les sportifs. La disponibilité de la hGH recombinante (rhGH) dans le marché noir a augmenté la fréquence du dopage à la GH. Les tests anti-dopage approuvés par l'agence mondiale d'antidopage sont confrontés à certaines limites. Dans la deuxième partie de ma thèse, des analyses comparatives de la hGH naturelle et la rhGH ont été réalisées par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide en phase inverse pour trouver une différence chimique entre la hGH naturelle et la rhGH. La hGH naturelle extraite des glandes pituitaires de cadavres est glycosylée alors que la rhGH n'est pas modifiée. De manière intéressante, cette glycosylation se trouve sur un peptide protéospécifique de la hGH. Ce travail ouvre une piste pour le développement d'une nouvelle méthodologie pour les tests anti-dopage à la GH.

Title : Analysis of tubulins and growth hormone by mass spectrometry

Keywords : tubulins, growth hormone, mass spectrometry, ion mobility, chromatography, peptides, doping.

Abstract : The tubulins are proteins involved in cellular processes that are essential for cell life. The tubulins are polymodified at their C-terminal extremities. Different techniques has been used to characterize the polymodifications of tubulins. However, some challenges remain in the fine identification of some structures. In fact, mass spectrometry ion mobility can separate ions of the same  $m/z$  ratio depending on their conformations. In the first part of this thesis, an ion mobility mass spectrometry analysis allowed the separation of two synthetic peptides that mimic the structure of C-terminal peptides of biglycylated  $\alpha$ -tubulins. In order to extrapolate this type of experiment to the C-terminal peptides purified from biological tubulins, we employed an analytical process to analyze these peptides from purified brain tubulins. Growth hormone (GH) is an anabolic hormone

and a doping agent used by athletes. The availability of rhGH in the black-market has continuously increased because of doping in sports. The natural and the biosynthetic hGH have identical peptidic sequences. So far, the valid hGH anti-doping tests by the world anti-doping agency are based on immunological recognition. However, Immunoassays have their own limitations. Therefore, the next generation analysis of GH has to be more specific and accurate. In the second part of this thesis, mass spectrometry coupled to reversed phase chromatography was used to find chemical differences between the pituitary hGH and the rhGH. The pituitary extracted hGH is glycosylated whereas the biotech product is sugar free. The present work represents an opening towards a novel methodology for a novel hGH anti-doping test.