

N° d'ordre : 3686

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par Fabien XUEREB

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENT

**LA SPECTROMETRIE DE MASSE APPLIQUEE A LA
QUANTIFICATION DES PROTEINES MEDICAMENTS DANS LE
PLASMA**

Soutenu le 1^{er} Décembre 2008

Après avis de :

Mr Robert FARINOTTI	Professeur, Université de Paris XI
Mr Olivier LAPREVOTE	Professeur, Université Paris Descartes

Devant la commission d'examen formée de :

Mr Robert FARINOTTI	Professeur, Université Paris-Sud XI	rapporteur
Mr Olivier LAPREVOTE	Professeur, Université Paris Descartes	rapporteur
Mme Hélène BUDZINSKI	Directeur de Recherches CNRS	examinateur
Mme Marie-Claude SAUX	Professeur, Université de Bordeaux II	examinateur
Mme Dominique BREILH	Professeur, Université de Bordeaux II	co-directeur de thèse
Mr Jean-Marie SCHMITTER	Professeur, Université de Bordeaux I	co-directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Institut Européen de Chimie et de Biologie (IECB) dans l'équipe de Spectrométrie de Masse des Macromolécules Biologiques sous la codirection du Professeur Dominique Breilh et du Professeur Jean-Marie Schmitter.

A Monsieur le Professeur Jean-Marie Schmitter

En m'accueillant dans votre équipe de Spectrométrie de Masse, vous m'avez permis de réaliser ce travail de thèse dans des conditions optimales. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée pendant ces années de recherche et pour vos conseils. Grâce à vos grandes compétences en chimie analytique, j'ai beaucoup appris à vos côtés, toujours dans une ambiance agréable et dans une équipe toujours très dévouée. Je tiens à vous exprimer le plaisir que j'ai ressenti à travailler avec vous. Veuillez trouver, ici, l'expression de mes très sincères remerciements et de toute ma considération.

A Madame le Professeur Dominique Breilh

Vous avez eu l'idée de cet ambitieux travail mais dont l'aboutissement n'en a été que meilleur. Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe hospitalo-universitaire de pharmacie clinique et de pharmacocinétique que vous avez toujours su maintenir en constante évolution. Ce fut et c'est toujours un honneur et un plaisir de travailler à vos côtés étant donné votre dynamisme, vos compétences et votre rigueur. Vous m'avez beaucoup appris, tant sur le plan humain que professionnel. J'espère que nous aurons encore de nombreuses occasions de travailler ensemble. Soyez assurée de ma reconnaissance et de toute ma considération.

A Madame Le Professeur Marie-Claude Saux

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Vous m'avez chaleureusement accueilli dans votre service de Pharmacie du Groupe Hospitalier Haut-Lévêque au début de mon internat puis offert de poursuivre comme pharmacien. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée. Vous m'avez guidé et toujours très bien conseillé durant mon cursus hospitalo-universitaire et vous m'avez donné l'occasion de réaliser ce travail de thèse dans de très bonnes conditions. J'ai pu apprécier votre immense savoir, votre rigueur et vos qualités humaines. Je suis fier d'en avoir bénéficié. Veuillez trouver ici, l'expression de ma profonde gratitude et de mon admiration.

A Monsieur le Professeur Robert Farinotti

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse et c'est un honneur que de vous compter parmi les membres de ce jury.

A Monsieur le Professeur Olivier Laprèvote

Merci de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail en acceptant d'être rapporteur et de l'honneur que vous me faites en participant à ce jury.

A Madame le Docteur Hélène Budzinski

J'ai été très sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu accorder à ce travail en acceptant de le juger. C'est avec plaisir que je vous adresse mes très sincères remerciements.

A Stéphane Chaignepain

Merci pour ta disponibilité permanente, tes compétences, tes conseils, tes critiques, tes encouragements et ton humour. Tu as largement pris sur ton temps de recherche pour m'aider. Ce travail n'aurait pu aboutir sans ton aide et ton dévouement. Sois assuré de ma profonde reconnaissance pour tout ce que tu as fait pour moi et de mon amitié la plus sincère.

A Natalia Canelo-Vaquero

Cela a été un grand plaisir de travailler avec toi durant la dernière année de ma thèse. Merci pour l'aide précieuse que tu m'as apportée dans la réalisation de ce travail, pour ta gentillesse et ta joie de vivre.

A Katell Bathany, Corinne Bure, Emmanuel Geneste, Sophie Aycirieux, Armelle Ballade, Adéline Delcambre, Yorgos Papastamoulis et Benoît Plet.

A la mémoire d'Anne Chobelet.

Ce fut un grand plaisir de travailler avec vous dans le laboratoire de spectrométrie de masse. Merci à tous pour votre gentillesse, votre aide, votre soutien, vos conseils et vos critiques. Vous avez tous contribué à rendre mes années de thèse bénéfiques et agréables.

Au Professeur Marc Bonneau, à Stéphane Claverol, ainsi qu'à l'équipe du Pôle Protéomique de la Plateforme Génomique Fonctionnelle de Bordeaux

Votre collaboration à ce travail, par les analyses qui ont pu être menées avec le spectromètre LTQ XL™ ThermoFisher, a été précieuse. J'ai pu, à plusieurs reprises, bénéficier de vos conseils avisés. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

A Matthias Glückmann et Christof Lenz de la société Applied Biosystems

Vous avez collaboré à ce travail par la réalisation des expériences sur l'instrument 4000 Q-TRAP™ dont nous ne disposons pas sur le site de Bordeaux. Merci pour l'aide précieuse que vous nous avez apportée.

A Frédéric Godde

Tu as collaboré à ce travail par la synthèse de nos réactifs de marquage chimique, éléments clés de notre technique de dosage des protéines médicaments. Merci pour ton aide et ton travail.

A Sarah Djabarouti, Jean-Baptiste Gordien, Jean-Marc Bernadou, Arsène Zogo, Aude Berroneau et à toute l'équipe de la Pharmacie Centrale du Groupe Hospitalier Haut-Lévêque

Merci pour votre soutien et pour tout ce que vous m'avez apporté dans la réalisation de ce travail, à travers votre présence réconfortante au quotidien.

A mes parents

Vous m'avez soutenu et encouragé tout au long de ma vie et de mes études. Je ne vous remercierai jamais assez de la gentillesse, de la patience et de l'amour qui ont accompagné mon avancée dans ce monde. Je n'aurai, sans vous, pas pu réaliser tout ce travail.

A mon frère, Aurélien, pour son soutien et pour tous les grands moments que nous avons passés ensemble. Je souhaite que tes projets se concrétisent.

A mes amis et ceux qui m'ont supporté durant cette épreuve...

Résumé

Le nombre croissant de médicaments protéiques utilisés en thérapeutique a créé des besoins dans le domaine de leur quantification, principalement dans le plasma, un milieu de composition protéique complexe.

Le dosage, essentiel aux études pharmacocinétique/pharmacodynamique, ainsi qu'à l'optimisation de ces traitements, est compliqué par la nature protéique de ces médicaments et par les faibles concentrations auxquelles ils sont attendus dans ces milieux complexes.

La méthodologie proposée se démarque des méthodes de dosage usuelles par son caractère universel. Elle fait appel à la spectrométrie de masse adaptée à la quantification des protéines grâce à l'utilisation d'un marquage isotopique différentiel des peptides : après enrichissement et protéolyse, l'échantillon à doser est marqué sur les lysines par la version légère d'un réactif de dérivation. En parallèle, les peptides de la protéine médicament pure marqués par la version lourde du réactif, servent d'étalon interne. La possibilité de quantifier la protéine à partir de plusieurs de ses peptides améliore la fiabilité du dosage.

Appliquée à l'époétin beta aux concentrations attendues en thérapeutique (autour de 0,5 femtomole/ μ L de plasma), la stratégie proposée permet de situer la limite de quantification à environ 50 attomoles d'époétin beta/ μ L de plasma avec une méthodologie de spectrométrie de masse nano-LC-ESI-Q-TRAP fonctionnant en mode MRM.

Pour étendre l'universalité de cette approche au champ des protéines médicaments pégylées, une seconde molécule a été étudiée. Il s'agit de l'interféron alfa-2b pégylé qui a permis de mettre en place une stratégie d'extraction spécifique du médicament utilisant sa pégylation.

Mots-clés : Protéines médicaments, spectrométrie de masse, MRM, marquage chimique isotopique, quantification, protéines pégylées.

Abstract

The growing number of therapeutic proteins has created needs in the field of their quantification, mainly in plasma, which is a complex protein environment.

Quantitative analysis of these proteins is essential for pharmacokinetics/pharmacodynamics studies, and for the optimization of treatments. However, the nature itself of the analyte and the low concentrations that are expected in plasma complicate the quantitative analysis.

The proposed methodology differs from usual methods on its universal applicability. It relies on mass spectrometry adapted to the quantification of proteins by using peptides differential isotope labelling : after enrichment and proteolysis, the therapeutic protein and the plasmatic proteins are labelled on lysine residues by the light reagent. In parallel, peptides of the pure therapeutic protein, labelled by heavy version of reagent, are used as internal standard. The ability to quantify the protein with several of its peptides improves the reliability of the analysis.

When applied to epoetin beta at expected therapeutic concentrations (about 0.5 femtomole/ μL of plasma), the proposed strategy leads to a quantification limit close to 50 attomoles of epoetin beta/ μL plasma, with a nano-LC-ESI-Q-TRAP mass spectrometry methodology operating in MRM.

To extend the universal character of this approach to the field of pegylated protein drugs, a second therapeutic protein model has been studied. This model is a pegylated interferon alfa-2b which allowed developing a strategy for specific extraction of the drug relying on its pegylation.

Key words : protein drugs, mass spectrometry, MRM, chemical isotope labelling, quantification, pegylated proteins.

Sommaire

SOMMAIRE	11
LISTE DES ABREVIATIONS	17
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	23
I.Les protéines.....	23
II.Les médicaments protéiques.....	25
A.Généralités.....	25
B.L'érythropoïétine beta.....	27
C.L'interféron alfa-2b pégylé.....	28
III.Les techniques actuelles de dosage des médicaments protéiques.....	29
A.Les techniques de type bioassay.....	30
B.Les techniques de type immunoassay.....	31
C.Un technique combinant la focalisation isoélectrique à un double immunoblot.....	33
D.Les techniques utilisant la spectrométrie de masse.....	34
IV.Objectifs de la thèse.....	36
CHAPITRE 2 : REVUE DES METHODES DE QUANTIFICATION DES PROTEINES FAISANT APPEL A LA SPECTROMETRIE DE MASSE	41
I.Techniques employées en protéomique pour séparer les protéines et les peptides en vue de les quantifier par spectrométrie de masse.....	42
A.Méthodes basées sur la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle.....	42
B.Méthodes utilisant des puces à protéines.....	44
C.Méthodes basées sur l'isolement des protéines par chromatographie multidimensionnelle en phase liquide.....	46
D.Méthodes basées sur l'isolement des peptides par chromatographie multidimensionnelle en phase liquide.....	46
II.Techniques de séparation ou d'enrichissement des protéines ou des peptides en vue de leur quantification absolue dans un milieu biologique.....	48
A.Techniques de séparation des protéines.....	48
B.Techniques de séparation des peptides.....	50
III.Détail des techniques de quantification des protéines utilisant la spectrométrie de masse.....	52
A.Méthodes de quantification relative.....	53

1.Le marquage chimique.....	54
2.Marquage métabolique : <i>Stable Isotope Labelling with Amino acid in Cell culture</i> – SILAC.....	59
3.Comparaison des méthodes de quantification relative.....	59
4.Interprétation quantitative des spectres de masse.....	60
B.Méthodes de quantification relative et absolue.....	61
1.Marquage chimique : <i>Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation</i> – iTRAQ.....	61
2.Marquage enzymatique : incorporation de ¹⁸ O.....	62
3.Critères de choix des peptides utilisés pour la quantification absolue.....	64
C.Méthodes de quantification absolue exclusivement.....	65
1.La stratégie Protein AQUA™.....	65
2.Une stratégie n'utilisant pas de marquage chimique mais un peptide de structure et de masse proche.....	68
3.Nature et place de l'étalon interne dans les stratégies de quantification absolue des protéines.....	68
IV.Quelle technique de spectrométrie de masse paraît la mieux adaptée pour doser une protéine dans le plasma ?.....	70

CHAPITRE 3 : INSTRUMENTATION.....75

I.Spectrométrie de masse MALDI.....	76
A.La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI).....	76
1.Principe de l'ionisation MALDI.....	76
2.Préparation de l'échantillon pour une analyse par MALDI.....	77
B.L'analyseur à temps de vol (<i>Time of Flight</i> , TOF).....	80
1.Analyseur à temps de vol linéaire.....	80
2.Principe de l'extraction retardée.....	81
3.Analyseur à temps de vol en mode réflectron.....	82
4.Utilisation de l'analyseur TOF avec une source MALDI.....	83
C.L'analyseur quadripolaire.....	84
D.L'analyseur hybride quadripôle-temps de vol.....	86
1.Fonctionnement en mode <i>full-scan</i>	87
2.Fonctionnement en mode MS/MS.....	87
3.Utilisation du Q-TOF avec une source MALDI.....	88
E.Avantages et inconvénients de la technique MALDI-Q-TOF.....	89
II.Spectrométrie de masse ESI.....	90
A.La source électrospray (ESI).....	90
1.Principe de l'électrospray.....	90
2.Le nanospray.....	94
3.Couplage à la chromatographie en phase liquide.....	95
B.Les analyseurs couplés à une source électrospray.....	95
1.Le piège ionique quadripolaire.....	95

2.Le piège linéaire à éjection radiale LTQ XL™	99
3.Le piège ionique à éjection axiale 4000 Q-TRAP™	100
III.Fragmentation des peptides en MS/MS	103

CHAPITRE 4 : VERS LA MISE AU POINT D'UNE METHODE UNIVERSELLE DE DOSAGE DE PROTEINES MEDICAMENTS : CAS DE L'EPOETIN BETA.....107

I.Les enjeux	107
II.Choix de la stratégie	108
III.Application au cas de l'epoetin beta	110
A.Pharmacologie de l'érythropoïétine	110
B.Production de l'epoetin beta	112
C.Indications thérapeutiques et posologies	112
D.Profil pharmacocinétique	113
E.Effets indésirables	114
F.Echappement thérapeutique	114
G.Concentrations plasmatiques attendues pour l'epoetin beta	116
H.Structure de l'epoetin beta (NEORECORMON®)	116
IV.Mise au point de l'extraction de l'epoetin beta du plasma humain	117
A.Le choix de la méthode de déplétion des protéines majeures du plasma humain et ses conséquences	117
1.La protéolyse est elle efficace dans le tampon A ?	120
2.Influence de la concentration en trypsine et du temps de protéolyse	122
3.L'epoetin beta est-elle perdue sur la Spin Cartridge Hu7® ?	122
B.Mise au point de l'étape de concentration précédant la protéolyse trypsique	124
1.Concentrateurs à membrane	124
2.Microchromatographie C4 sur ZipTip™	125
3.Chromatographie sur colonne C4	127
4.Traitement de la fraction d'epoetin beta purifiée par chromatographie Vydac® C4 avant protéolyse	131
C.Etude préliminaire de sensibilité et analyse par MALDI-Q-TOF des fractions purifiées par mini-chromatographie C4 Aquapore® Brownlee	132
1.Etude préliminaire de sensibilité	132
2.Analyse de plasma surchargé en epoetin beta	135
V.Introduction d'une méthode de quantification universelle par marquage peptidique	137
A.Principe et choix du réactif	137
B.Sélectivité de la réaction de dérivation	139
C.Effet d'orientation des fragmentations en mode MS/MS	141
D.Etude de la dérivation chimique des peptides de l'EPO	142
1.Choix des peptides pouvant servir à doser l'EPO	142

2.Précaution importante pour l'étape de protéolyse.....	144
E.Contrôle de l'absence des peptides marqués de l'epoetin beta dans un plasma non surchargé en EPO.....	146
F.Confirmation de l'identité des espèces de <i>m/z</i> 995,50 et 999,53 en MS/MS.....	147
G.Limite de détection en MALDI-Q-TOF (mode MS) après marquage chimique.....	149
VI.Contrôles du protocole.....	151
A.Contrôle de sélectivité de l'étape de chromatographie sur support C4.....	151
B.Evaluation des pertes d'epoetin beta au cours des étapes d'enrichissement.....	153
C.Tentatives de limitation des pertes d'epoetin beta liées à la concentration avant protéolyse.....	155
VII.Quantification de l'epoetin beta par nano LC-ESI-MS/MS au moyen d'un piège ionique linéaire.....	157
A.Limite de détection avec le piège ionique linéaire pour une solution aqueuse d'epoetin beta.....	157
B.Confirmation de l'identité des espèces d'intérêt pour la quantification.....	160
C.Résultats obtenus avec le piège ionique linéaire pour des échantillons chargés à 300 fmoles/ μ L d'epoetin beta.....	161
1.Analyse d'un échantillon aqueux d'epoetin beta soumis à la chromatographie C4 uniquement.....	161
2.Analyse d'un échantillon plasmatique d'epoetin beta.....	162
3.Analyse d'un échantillon plasmatique sans addition d'epoetin beta.....	162
D.Résultats obtenus sur des échantillons plasmatiques d'epoetin beta à 150 fmol/ μ L, limite de détection du MALDI-Q-TOF.....	164
VIII.Analyse quantitative de l'epoetin beta par nano LC-ESI-Q-TRAP.....	165
A.Limite de détection du spectromètre Q-TRAP pour une solution aqueuse d'epoetin beta.....	166
B.Résultats obtenus en mode MRM avec le spectromètre Q-TRAP pour des échantillons plasmatiques d'epoetin beta.....	170
IX.Conclusion.....	172

CHAPITRE 5 : MISE AU POINT DE L'EXTRACTION SPECIFIQUE DU PEG

INTERFERON ALFA-2b.....177

I.Introduction.....	177
A.Structure de l'interféron alfa-2b humain.....	178
B.Structure du peginterféron alfa-2b.....	178
II.Stratégie d'analyse.....	182
A.Intérêt potentiel de la spectrométrie de masse pour le dosage d'une forme « retard » d'interféron alfa-2 dans le plasma.....	182
B.Présentation de l'approche proposée.....	183

C.Chromatographie d'exclusion de taille.....	184
D.Concentration par ultracentrifugation.....	185
E.Rupture des liaisons PEG/Peptide.....	186
F.Préparation des échantillons pour analyse par spectrométrie de masse.....	186
III.Résultats.....	186
A.Etude de l'interféron non pégylé.....	186
B.Etude de l'interféron pégylé protéolysé.....	189
C.Etude de l'interféron dépegylé protéolysé.....	192
IV.Discussion.....	194
V.Conclusion.....	194

CHAPITRE 6 : DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....199

CHAPITRE 7 : ANNEXE : PARTIE EXPERIMENTALE215

I.L'époetin beta : versant expérimental de la stratégie de quantification.....	215
A.ETAPE 1 : déplétion des protéines majoritaires du plasma.....	215
1.Protocole de déplétion sur Spin Cartridge Agilent Hu7®.....	215
2.Etude préliminaire du comportement de l'époetin beta sur la Spin Cartridge Hu7®.....	216
B.ETAPE 2 : concentration de l'échantillon déplété.....	216
1.Concentration par les différents types de concentrateurs.....	216
2.Concentration par microchromatographie ZipTip™ C4.....	217
3.Concentration par mini-chromatographie Aquapore® Brownlee C4 BU-300.....	218
4.Protocole de concentration par chromatographie Vydac® C4 214TP.....	219
C.ETAPE 3 : protéolyse trypsique.....	220
1.Etude préliminaire d'efficacité de la protéolyse trypsique dans le tampon A d'Agilent.....	221
2.Etude préliminaire de l'influence de la concentration en trypsine et du temps de protéolyse.....	221
3.Conditions de protéolyse après concentration par mini-chromatographie Aquapore® Brownlee C4.....	222
4.Conditions de protéolyse trypsique totale après concentration par chromatographie Vydac® C4.....	222
D.ETAPE 4 : marquage chimique isotopique.....	223
E.ETAPE 5 : analyse par spectrométrie de masse.....	223
1.Conditions d'analyse en protéine entière par MALDI-TOF en mode linéaire.....	223
2.Conditions d'analyse par MALDI-Q-TOF en mode MS ou MS/MS.....	224
3.Conditions d'analyse par nano LC-ESI-Piège ionique linéaire (LTQ).....	224
4.Conditions d'analyse par nano LC-ESI-Piège ionique linéaire (Q-TRAP).....	225
II.L'interféron pégylé alfa 2b : versant expérimental du protocole d'isolement spécifique des peptides pégylés en vue de leur analyse par MALDI-Q-TOF en mode MS.....	226

A.ETAPE 1 : protéolyse du PEGinterféron et de l'interféron.....	226
1.Réduction.....	226
2.Alkylation.....	226
3.Protéolyse.....	226
B.ETAPE 2 : chromatographie d'exclusion de taille.....	226
C.ETAPE 3 : concentration par concentrateurs.....	227
D.ETAPE 4 : rupture des liaisons PEG/Peptide.....	227
E.ETAPE 5 : analyse par spectrométrie de masse.....	228
1.Conditions d'analyse en protéine entière par MALDI-TOF en mode linéaire.....	228
2.Conditions d'analyse par MALDI-Q-TOF en mode MS ou MS/MS.....	228
CHAPITRE 8 : ANNEXE : INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES.....	231
I.La composition du sang et du plasma humains.....	231
II.Informations complémentaires concernant les différentes spécialités pharmaceutiques d'érythropoïétine.....	233
A.Les spécialités d'epoetin alfa, beta, delta ou omega : érythropoïétine de première génération.....	233
B.Formes pharmaceutiques biosimilaires à l'epoetin alfa : érythropoïétine de première génération.....	233
C.La darbépoétin alfa : érythropoïétine de deuxième génération.....	233
D.La méthoxy polyéthylène glycol-époétine bêta : érythropoïétine de troisième génération.....	234
III.Informations complémentaires concernant les différentes spécialités pharmaceutiques d'interféron.....	235
A.Pharmacologie de l'interféron.....	235
B.Production.....	236
C.Indications thérapeutiques.....	237
D.Profil pharmacocinétique des interférons alfa-2b.....	237
1.L'interféron alfa-2b.....	237
2.L'interféron alfa-2b pégylé.....	238
E.Effets indésirables de l'interféron.....	238
F.Echappement thérapeutique aux interférons alfa-2b.....	239
G.Les différentes spécialités d'interféron actuellement sur le marché.....	239
IV.Publication.....	241
CHAPITRE 9 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	245

Liste des abréviations

- 1D-GE** : Electrophorèse uni-dimensionnelle (*one-Dimensional -Gel Electrophoresis*)
- 2D-GE** : Electrophorèse bi-bimensionnelle (*two-Dimensional -Gel electrophoresis*)
- 2D-PAGE** : Electrophorèse bi-bimensionnelle sur gel de polyacrylamide (*two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*)
- 4-HCCA** : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (*α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*)
- ACN** : Acétonitrile
- ADN** : Acide Desoxyribonucléique
- AMS** : Accelerator Mass Spectrometry
- amole** : attomole
- CHEM** : Chemiluminescent immunoassay
- cICAT** : Cleavable Isotope-Coded Affinity Tag
- CID** : Fragmentation Induite par Collision (*Collision Induced Dissociation*)
- Da** : Dalton
- DCI** : Dénomination Commune Internationale
- DPO** : Darbepoétin- α
- EGFR** : Récepteur au Facteur de Croissance Epidermique (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
- EIA** : Enzyme Immunoassay
- ELISA** : Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
- EPO** : Erythropoïétine
- ESI** : Ionisation ElectroSpray (*ElectroSpray Ionization*)
- FAB** : Fast Atom Bombardment
- FDA** : Food and Drug Administration
- fmole** : femtomole
- FWHM** : Largeur à mi-hauteur (*Full Width at Half Maximum*)
- HBV ou VHB** : Hepatitis B Virus ou Virus de l'Hépatite B
- HCV ou VHC** : Hepatitis C Virus ou Virus de l'Hépatite C
- HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance (*High Performance Liquid Chromatography*)
- ICAT** : Isotope-Coded Affinity Tag
- ICPL** : Isotope-Coded Protein Label
- IEF** : Focalisation Isoélectrique ou Iso électro focalisation (*Isoelectric focusing*)
- IFN** : Interféron
- Ig** : Immunoglobuline

IL : Interleukine

I.M.: Voie d'administration Intra-Musculaire

I.N. : Voie d'administration Intra-Nasale

IRMA : ImmunoRadiometric Assay

I.S. : Etalon Interne ou Standard Interne (*Internal Standard*)

iTRAQ : Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation

I.V. : Voie d'administration Intra-Veineuse

KIRA : Kinase Receptor Activation Assay

LC : Chromatographie Liquide (*Liquid Chromatography*)

LC-MS : Couplage Chromatographie Liquide-Spectrométrie de Masse (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

LOD : Limite de détection (*Limit of detection*)

LOQ : Limite de quantification (*Limit of quantification*)

LTQ : Spectromètre de masse à piège ionique linéaire (*Linear Ion-Trap Mass Spectrometer*)

GC : Chromatographie Gazeuse (*Gas Chromatography*)

MALDI : Spectrométrie de masse à ionisation par désorption laser à partir d'une matrice ou Désorption Ionisation Laser Assistée par Matrice (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*)

MARS : Multiple Affinity Removal System

MRM : Suivi alterné de plusieurs transitions métastables (*Multiple Reaction Monitoring*)

MS : Spectrométrie de Masse (*Mass Spectrometry*)

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem, combinant deux ou n analyseurs : MSⁿ (*Mass Spectrometry-Mass Spectrometry*)

MudPIT : Multidimensional Protein Identification Technology

m/z : nombre sans dimension mesurant le rapport de la masse d'un ion (en unités atomiques) à son nombre de charges

PD : Désorption à Plasma

pmole : picomole

pI : Point Isoélectrique

PK : Pharmacocinétique

PK/PD : Pharmacocinétique/Pharmacodynamique

P.O. : Voie Orale (*Per Os*)

ppm : parties par million

Q : Quadripôle

rHuEPO : Erythropoïétine Recombinante Humaine (*Recombinant Human Erythropoietin*)

R&D : Recherche et Développement

RF : Radio Fréquence

RIA : RadiolImmunoAssay
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SA : Acide Sinapinique (Sinapinic acid)
S.C. : Voie d'administration Sous-Cutanée
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SELDI : Surface Enhanced Laser Desorption Ionization
SIM : Détection sélective d'un ion (*Selective Ion Monitoring*)
SISCAPA : Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies
SPR : Surface Plasmon Resonance
SRM : Détection ou suivi sélectif d'une transition métastable (*Single Reaction Monitoring*)
TFA : Acide Trifluoroacétique (*Trifluoroacetic acid*)
TIC : Courant ionique total (*Total Ion Current*)
TOF : Temps de Vol (*Time Of Flight*)
TOF/MS : Spectrométrie de masse à temps de vol (*Time Of Flight Mass Spectrometry*)
Tr : Temps absolu de rétention d'un soluté issu d'une colonne de chromatographie
TSP : Thermospray
UI : Unités Internationales
UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography
UV : UltraViolet (détecteur Ultraviolet)
VHC : Virus de l'Hépatite C

Nomenclature des acides aminés :

Ala Alanine (A)
Arg Arginine (R)
Asn Asparagine (N)
Asp acide Aspartique (D)
Cys Cystéine (C)
Gln Glutamine (Q)
Glu acide Glutamique (E)
Gly Glycine (G)
His Histidine (H)
Ile Isoleucine (I)
Leu Leucine (L)
Lys Lysine (K)
Met Méthionine (M)
Phe Phénylalanine (F)

Pro	Proline (P)
Pyr	acide Pyroglutamique (Z)
Ser	Sérine (S)
Thr	Thréonine (T)
Trp	Tryptophane (W)
Tyr	Tyrosine (Y)
Val	Valine (V)

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 :

INTRODUCTION

Au cours des dernières années, des médicaments produits par biotechnologie incluant des protéines, des peptides, des anticorps monoclonaux, des fragments d'anticorps, des oligonucléotides antisens et des préparations d'ADN pour la thérapie génique ont intégré l'arsenal thérapeutique. Ces médicaments occupent actuellement une grande place dans le secteur recherche et développement (R&D) de l'industrie pharmaceutique (Tang *et al.*, 2004).

I. Les protéines

Les protéines sont des polymères linéaires constitués d'acides aminés mais ayant une structure spatiale différente les unes des autres. L'enchaînement des acides aminés constitue la structure primaire de la biomolécule. Les protéines adoptent une orientation spatiale locale bien précise (hélice, feuillet, ...) qui correspond à leur structure secondaire. L'association de ces conformations locales forme la structure tertiaire, ou structure tridimensionnelle de la protéine. La conformation adoptée est celle d'une énergie libre minimale. Enfin, la structure quaternaire est issue de l'assemblage de plusieurs biomolécules (Lehninger, 1973 ; Sakiz, 1986).

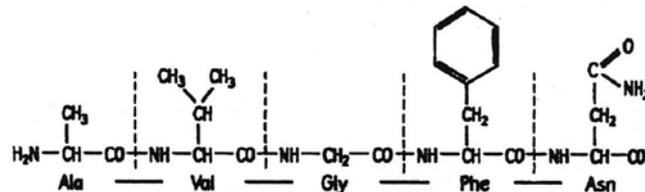
Il existe 20 acides aminés naturels, plusieurs types de structures secondaires et des modifications post-traductionnelles (phosphorylations, glycosylations, acétylations, ...). Le très grand nombre de combinaisons possibles entraîne une diversité quasi-infinie (Lehninger, 1973 ; Scott et Mercer, 1997). De la structure quaternaire découle la fonction de la protéine (Sakiz 1986 ; Lehn 1997). La figure I.1 montre les différentes structures des protéines.

Les édifices quaternaires sont maintenus par des liaisons non-covalentes, de faible énergie comme par exemple les liaisons hydrogène, les forces de Van Der Waals, les liaisons ioniques et les interactions hydrophobes (Lehn, 1997). Ces entités supramoléculaires ont souvent une haute masse moléculaire allant de 5 000 à plus de 1 000 000 Da.

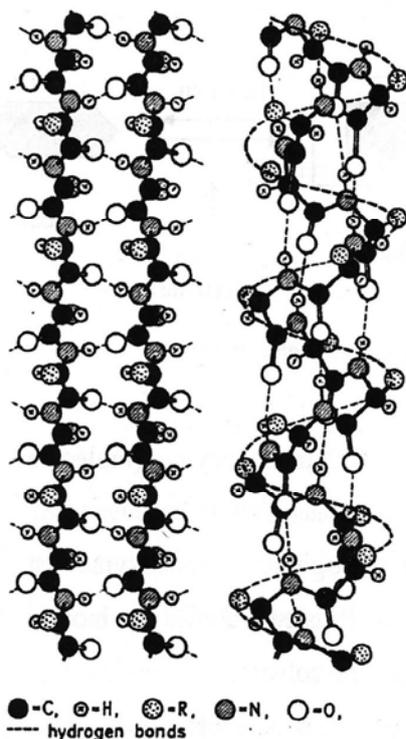
De nombreuses entités biologiques formant des complexes non-covalents ont des fonctions biologiques bien définies et sont de grande importance : le stockage (ovalbumine, caséine), le transport (hémoglobine, sérum albumine), la structure des organes et des tissus (collagène, élastine), l'envoi et la réception de messages (réplication, transcription,

translation), la production d'énergie, la défense de nos cellules vis-à-vis des cellules porteuses de marqueurs étrangers (virus), la contraction musculaire (actine, myosine)...

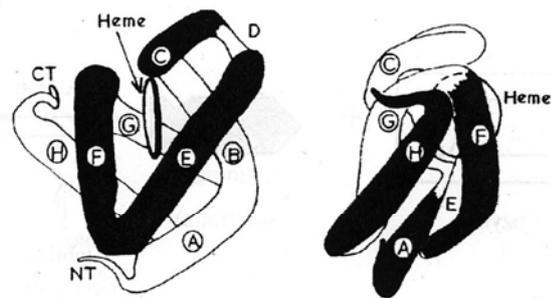
Bien souvent, des complexes non-covalents mettent en jeu une protéine et une molécule cible : une autre protéine, un ligand, l'ADN, un ion métallique... Des associations telles que protéine/ligand, enzyme/substrat, antigène/anticorps sont alors obtenues. De la structure de ce complexe découle l'activité biologique de l'entité (Lehn, 1997 ; Scott et Mercer, 1997).



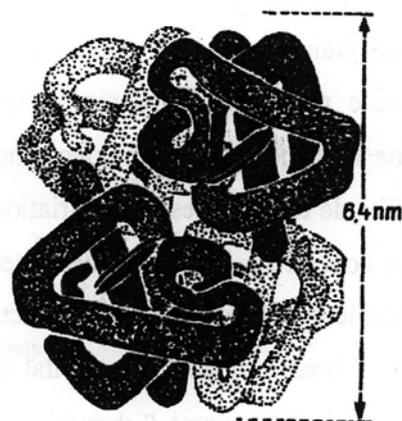
a) Structure primaire d'une protéine (à partir du N-terminal).



b) Structure secondaire des protéines : à gauche, structure en feuillet ; à droite, structure en hélice α .



c) Structure tertiaire de la Myoglobine. Les lettres de A à H montrent les 8 hélices α .



d) Structure quaternaire de l'hémoglobine. Les disques noirs représentent les hèmes.

Figure I.1. De la structure primaire à la structure quaternaire des protéines (figure modifiée d'après Lehninger, 1973)

II. Les médicaments protéiques

A. Généralités

Les médicaments produits par biotechnologie ont représenté plus de 35 % des nouvelles substances actives introduites en 2001 (Tang *et al.*, 2004) et les anticorps, des thérapeutiques ciblées, représenteront à eux seuls dans les 10 à 15 années à venir la moitié des nouvelles substances actives (Arlington *et al.*, 2002). L'époétin alfa, une érythropoïétine humaine recombinante, l'abciximab et le trastuzumab, deux anticorps monoclonaux, sont des exemples de médicaments issus de biotechnologie qui ont révolutionné la thérapeutique. Actuellement, quatorze anticorps monoclonaux sont sur le marché et utilisés en thérapeutique dans des indications variées telles que l'oncologie, l'inflammation, l'infectiologie et les pathologies cardiovasculaires. Le nombre de ces d'anticorps monoclonaux va d'ailleurs beaucoup augmenter dans les dix années à venir puisqu'au moins une centaine sont déjà en développement clinique (Dubois *et al.*, 2008). Le tableau I.1 présente une classification des principaux médicaments issus de biotechnologies.

Tableau I.1. Les différentes classes de médicaments issus de biotechnologies (d'après Tang *et al.*, 2004 ; Dorosz, 2007 ; Vidal, 2008)

Classe	DCI / NOM DE SPECIALITE	Fabricant	Voie d'administration
Agalsidase alfa	Agalsidase alfa/REPLAGAL®	TKT Europe	IV
	Agalsidase beta/FABRAZYME®	Genzyme	IV
Alglucosidase	Alglucosidase alfa/MYOZYME®	Genzyme	IV
Antianémiques	Epoetin alfa/EPREX®	Janssen Cilag	IV/SC
	Epoetin beta/NEORECORMON®	Roche	IV/SC
	Epoetin delta/DYNEPO®	Shire	IV/SC
	Darbepoetin alfa/ARANESP®	Amgen	IV/SC
	Epoetin beta pégylée/MIRCERA®	Roche	SC
Anticancéreux et immunosuppresseurs (Agonistes de la LH-RH)	Goséréline/ZOLADEX®	AstraZeneca	Implant SC
	Cétreorex/CETROTIDE®	Merck	SC
Anticorps monoclonaux (antineoplasiques)	Alemtuzumab/MABCAMPATH®	Bayer	IV
	Bévacizumab/AVASTIN®	Roche	IV
	Cétuximab/ERBITUX®	Merck	IV
	Infliximab/REMICADE®	Centocor	IV
	Rituximab/MABTHERA®	Roche	IV
	Trastuzumab/HERCEPTIN®	Roche	IV
Antigonadotrophin Releasing Hormone	Ganirelix/ORGALUTRAN®	Organon	SC
Antithrombotiques	Drotrecogin- α /XIGRIS®	Lilly	IV
Antithrombotique (Anti GPIIb/IIIa)	Eptifibatide/INTEGRILIN®	GlaxoSmithKline	IV
Antinéoplasiques	Asparaginase/KIDROLASE®	OPI	IV/IM

Classe	DCI / NOM DE SPECIALITE	Fabricant	Voie d'administration
Cytokine (facteurs de croissance hématopoïétiques)	Filgrastim/NEUPOGEN®	Amgen	IV/SC
	PegFilgrastim/NEULASTA®	Amgen	SC
Cytokine et immunomodulateurs (interférons)	Interferon α -2a/ROFERON-A®	Roche	IM/SC
	Interferon α -2b/INTRONA®	Schering	IM/SC
	Interferon β -1a/REBIF®	Merck	SC
	Interferon β -1a/AVONEX®	Biogen	IM
	Interferon β -1b/BETAIFERON®	Bayer	SC
	PegInterferon α -2a/PEGASYS®	Roche	SC
	PegInterferon α -2b/VIRAFERONPEG®	Schering-Plough	SC
Gonadotrophines	Interferon γ -1b/IMUKIN®	Boehringer	SC
	Follitropin alfa/GONAL-F®	Merck	SC
	Follitropin beta/PUREGON®	Organon	IM/SC
Hormones glyco-génolytiques	Urofollitropine/FOSTIMON®	Genévrier	SC
	Glucagon/GLUCAGEN®	Novonordisk	IV/IM/SC
Hydrolase lysosomiale	Laronidase/ALDURAZYME®	Genzyme	IV
Imiglucérase	Imiglucérase/CEREZYME®	Genzyme	IV
Immunoglobulines	Palivizumab/SYNAGIS®	Abbott	IM
Immunostimulants, cytokines	Aldesleukin/PROLEUKIN®	Novartis	IV/SC
Immunosuppresseurs sélectifs (Inhibiteur du TNF- α)	Adalimumab/HUMIRA®	Abbott	SC
	Etanercept/ENBREL®	Wyeth	SC
	Infliximab/REMICADE®	Schering-Plough	IV
Immunosuppresseur	Anakinra/KINERET®	Amgen	S.C.
Immunosuppresseurs sélectifs	Ciclosporine/NEORAL®	Novartis	PO
	Ciclosporine/SANDIMMUN®	Novartis	IV/PO
	Daclizumab/ZENAPAX®	Roche	IV
Inhibiteur des Ig E	Omalizumab/XOLAIR®	Novartis	SC
Inhibiteurs des interleukines	Basiliximab/SIMULECT®	Novartis	IV
Thrombolytiques	Alteplase/ACTILYSE®	Boehringer	IV
	Reteplase/RAPILYSIN®	Roche	IV
	Tenecteplase/METALYSE®	Boehringer	IV
	Urokinase/UROKINASE CHOAY®	Sanofi-Aventis	IV

L'analyse et la quantification des médicaments protéiques est indispensable pour mener des études pharmacocinétiques (PK) et pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD). Ces études interviennent lors du développement préclinique et clinique du médicament ainsi que tout au long de son utilisation. Le choix de la voie d'administration la plus appropriée nécessite d'étudier les caractéristiques d'absorption du médicament, sa stabilité chimique et métabolique au niveau du site d'absorption, la fraction biologiquement active et les processus d'excrétion. La connaissance des relations effet-concentration du médicament et exposition-réponse sont cruciales. Les conditions de distribution et les procédés d'élimination, directement liés à la fixation du médicament sur sa cible et à son effet pharmacologique, doivent être déterminés précisément.

Cependant, les études PK/PD sont compliquées dans le cas de ces médicaments par leur ressemblance et leurs interactions avec des protéines ou des peptides endogènes, ainsi que par les mécanismes physiologiques de régulation par rétrocontrôle, de protéolyse ou d'endocytose (Tang *et al.*, 2004). Ainsi, la mise au point de techniques analytiques sensibles et spécifiques de ces médicaments permettant leur quantification dans des matrices biologiques fait partie des principaux challenges dans ce domaine actuellement (Tang *et al.*, 2004).

Notre étude porte particulièrement sur deux protéines produites par biotechnologie et actuellement très utilisées en thérapeutique : l'érythropoïétine beta et l'interféron alfa-2b pégylé.

B. L'érythropoïétine beta

L'érythropoïétine beta ou epoetin beta est une glycoprotéine humaine recombinante de masse moléculaire 34 kDa environ, ayant la même action que l'érythropoïétine humaine (hormone sécrétée par les cellules de l'épithélium vasculaire des capillaires péri-tubulaires rénaux principalement) c'est-à-dire qui stimule les précurseurs érythroblastiques. Sa production est réduite en cas d'insuffisance rénale chronique. Administrée par voie intraveineuse ou sous-cutanée, elle permet de corriger l'anémie des patients insuffisants rénaux chroniques, dialysés aux doses faibles de 150 à 300 UI/kg par semaine. Administrée par voie sous-cutanée aux doses plus élevées de 450 à 900 UI/kg par semaine, l'érythropoïétine beta permet de prévenir et de traiter l'anémie induite par la chimiothérapie anticancéreuse chez des adultes atteints de tumeurs solides et liquides (Dorosz, 2007).

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au traitement de l'anémie des patients sous traitements myélosuppresseurs tels que la radiothérapie et la plupart des chimiothérapies cytotoxiques pour laquelle l'érythropoïétine humaine recombinante (rHuEPO) est le traitement de choix. Mais l'EPO est une thérapie coûteuse et tous les patients ne répondent pas au traitement (Bokemeyer *et al.*, 2004 ; Bokemeyer *et al.*, 2007). La dose initiale d'epoetin beta recommandée est de 30 000 UI par semaine administrée en une fois ou répartie en 3 à 7 injections, les deux modalités d'administration ayant la même efficacité (Glaspy et Beguin, 2005 ; Prontazo *et al.*, 2006). Cette dose initiale peut être doublée après 4 semaines de traitement chez les patients non répondeurs (Vidal, 2008). Parmi les patients non répondeurs (40 % en moyenne) après un mois de traitement, 28 % obtiennent une réponse complète avec une double dose d'érythropoïétine humaine recombinante. Cependant, les risques d'accidents thromboemboliques et d'hypertension artérielle sont

élevés avec des doses importantes d'EPO et aucune étude n'a examiné l'effet d'un traitement sur une longue période à dose initiale (Bokemeyer *et al.*, 2004 ; Bokemeyer *et al.*, 2007). Malgré l'utilisation croissante en oncologie de l'érythropoïétine humaine recombinante à forte dose une fois par semaine sans effets secondaires sérieux (Suzuki *et al.*, 2008), peu de données de pharmacocinétique sont disponibles (Fujisaka *et al.*, 2006). C'est pourquoi une méthode de dosage plasmatique sensible et spécifique de l'érythropoïétine beta s'impose pour individualiser et optimiser les traitements chez les patients non répondeurs, mais aussi chez les répondeurs pour déterminer les doses d'entretien efficaces.

C. L'interféron alfa-2b pégylé

L'interféron alfa-2b pégylé ou Peginterféron alfa-2b de masse moléculaire 33,5 kDa environ est une protéine humaine recombinante analogue à l'interféron alfa endogène (cytokine produite par les macrophages et les lymphocytes non T non B). La pégylation consiste à conjuguer l'interféron à du polyéthylène glycol, ce qui modifie la pharmacocinétique de l'interféron (demi-vie d'élimination 10 fois plus longue que celle de l'interféron non pégylé, qui permet de limiter les injections à une par semaine) (Doros, 2007).

L'interféron alfa-2b pégylé possède une triple action : antivirale (inhibition de la réplication virale dans les cellules), immunomodulatrice portant sur l'immunité cellulaire (augmentation de l'activité des cellules NK et des macrophages) et antiproliférative (allongement de toutes les phases du cycle cellulaire). Administré par voie sous-cutanée à la dose de 1,5 µg/kg une fois par semaine le soir pendant 6 mois, l'interféron alfa-2b permet de traiter l'hépatite C chronique de l'adulte en association à la ribavirine ou en monothérapie si le patient contre-indique la ribavirine. Administré pendant 12 mois, il permet de traiter l'hépatite B chronique à antigène HBe positif ou négatif.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au traitement des patients porteurs du virus de l'hépatite C. Le taux de réponse aux traitements actuels de l'hépatite C est de l'ordre de 100 % chez les patients porteurs des génotypes 2 et 3 du virus de l'hépatite C (VHC) après 6 mois de traitement alors qu'il n'est que de 63 % chez les patients porteurs du génotype 1 après 12 mois de traitement (Baker, 2003). Certaines études de cinétique virale suggèrent que cette mauvaise réponse au traitement serait liée à une sensibilité diminuée du virus au médicament et/ou à des concentrations plasmatiques en interféron alfa-2 non adaptées. Par conséquent, des études pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et des études dose d'interféron-cinétique virale s'avèrent nécessaires pour les patients porteurs du VHC génotype 1. Il faut pour cela être capable de doser

spécifiquement et précisément dans le plasma humain l'interféron alfa-2 sous sa forme pégylée.

La présence dans le plasma humain d'interféron endogène comme d'érythropoïétine endogène rend ces deux médicaments très difficiles à doser de manière spécifique, d'autant plus que leurs concentrations plasmatiques sont très faibles (Vrolijk *et al.*, 2003). Les concentrations plasmatiques maximales attendues pour l'epoetin beta sont de l'ordre de 1 fmole/ μ L de plasma (Fugisaka *et al.*, 2006), celles attendues pour le peginterféron alfa-2b de l'ordre de 2000 pg/mL soit 60 attomoles/ μ L (Glue *et al.*, 2000).

III. Les techniques actuelles de dosage des médicaments protéiques

Les techniques analytiques employées pour les études de pharmacocinétique des agents produits par biotechnologie requièrent différents critères : exactitude (ou accuracy), précision, spécificité, sensibilité, reproductibilité et stabilité, recommandés par la FDA (Shah *et al.*, 2000 ; CDER/FDA, 2001 ; Wiswanathan *et al.*, 2007). Certains de ces critères sont spécifiques aux techniques d'analyse des macromolécules (Miller *et al.*, 2001). Malheureusement, les techniques d'analyse utilisées pour détecter et quantifier les protéines et les peptides sont souvent inexactes, imprécises et non spécifiques, ce qui peut conduire à l'obtention de mauvais résultats ainsi qu'à des évaluations pharmacocinétiques erronées. De plus, la conjugaison fréquente de ces médicaments produits par biotechnologie, de type glycosylation ou pégylation le plus souvent, complique l'analyse (Tang *et al.*, 2004).

Les techniques communément utilisées pour l'analyse des petites molécules (techniques chromatographiques GC ou HPLC couplées à des détecteurs UV/visible) ne sont pas applicables pour l'analyse des produits de biotechnologie. Les méthodes habituellement utilisées pour l'analyse des protéines et des peptides sont des techniques de type bioassay, immunoassay et des techniques faisant appel à la spectrométrie de masse. Les techniques de type immunoassay sont actuellement les plus couramment employées pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques de ce type de médicaments (Wei *et al.*, 2007).

A. Les techniques de type bioassay

Les techniques de bioassay sont définies comme des procédés analytiques mesurant l'activité biologique d'une substance et basées sur une réponse biologique spécifique et fonctionnelle (Mire-Sluis, 2001 ; Thorpe *et al.*, 1999). Il existe des tests *in vivo* et des tests *in vitro*.

Les tests *in vivo* consistent à administrer les agents à analyser à des animaux et à en mesurer la réponse. Cependant, ces tests présentent plusieurs inconvénients : un coût élevé, un manque de spécificité, une grande variabilité inter-animale et un temps de mise en œuvre important.

Les tests *in vitro* sont basés sur une réponse cellulaire quantifiable après stimulation par un agent (Rose *et al.*, 2000).

Plusieurs variantes de tests *in vitro* sont utilisées :

- Une technique basée sur la prolifération d'une lignée cellulaire induite par le médicament à étudier. Cette prolifération est mesurée par l'intermédiaire de thymidine tritiée ou d'un composé non radioactif (méthylthiotétrazole par exemple) introduit dans l'ADN cellulaire. Wei *et al.* ont développé cette technique utilisant la thymidine tritiée pour quantifier une érythropoïétine recombinante humaine dans le plasma (Wei *et al.*, 2007).
- Une technique basée sur l'activation d'un gène rapporteur après liaison du médicament à analyser utilisant la β -galactosidase ou la luciférase comme marqueur d'activation du gène. La quantification du médicament est indirecte et fonction de la liaison médicament-récepteur (Meager, 2002). Vrolijk *et al.* ont développé une technique de ce type pour doser l'interféron- α , basée sur l'activation d'un gène du virus de l'hépatite C (HCV) relié à une luciférase (Vrolijk *et al.*, 2003).
- Une technique basée sur l'activation d'un récepteur aux kinases ou *Kinase Receptor Activation Assay* (KIRA). Les récepteurs cibles du médicament sont liés à une enzyme qui est activée par la liaison médicament-récepteurs cibles. L'activité de l'enzyme, fonction de la quantité de médicament, est mesurée par immunoassay (Sadick, 1999).
- Une technique appelée *Surface Plasmon Resonance* (SPR) destinée à améliorer les problèmes d'altération des capacités d'activation des récepteurs dans les cultures de cellules. Le ligand se lie à la molécule d'intérêt thérapeutique emprisonnée dans une maille de dextran et déposée à la surface d'une puce recouverte d'or. L'activité de

l'échantillon contenant le médicament est mesurée par la modification de réflexion de la lumière sur la puce (Cooper, 2002).

Grâce à l'apparition des lignées cellulaires immortelles, les tests *in vitro* offrent l'avantage de présenter une moindre variabilité que les tests *in vivo*. D'autre part, les techniques de génie génétique (ADN recombinant) ont permis la synthèse de lignées cellulaires exprimant de manière sélective des récepteurs spécifiques à un médicament donné. Malgré ces avantages sur les tests *in vivo*, les tests *in vitro* ne sont que des indicateurs d'une activité biologique et ne sont pas le reflet exact de la situation *in vivo* (Tang *et al.*, 2004).

Les techniques de type bioassay, en plus de demander une main d'œuvre lourde et intensive, présentent une importante variabilité liée aux conditions de culture des cellules. Cette variabilité peut cependant être minimisée par une surveillance morphologique et un entretien soigneux des lignées cellulaires en suivant des protocoles stricts (Wei *et al.*, 2007). De plus, ces techniques présentent l'inconvénient d'être sujettes à des interférences avec de nombreux facteurs comme les métabolites actifs des médicaments étudiés, les conditions environnementales et les matrices biologiques.

B. Les techniques de type immunoassay

Les techniques d'immunoassay sont basées sur un signal de réponse obtenu suite à une réaction antigène-anticorps. Ce signal est généré par une étiquette enzymatique, fluorescente, luminescente ou radioisotopique fixée sur un antigène ou sur un anticorps (Findlay *et al.*, 2000). Ce sont les techniques analytiques les plus fréquemment utilisées pour quantifier les peptides et les protéines dans les liquides biologiques, puisqu'elles présentent une haute sensibilité, une assez bonne spécificité, sont précises et faciles à utiliser (Tang *et al.*, 2004). L'utilisation de ces techniques pour la bioanalyse des molécules thérapeutiques de basse masse moléculaire a décliné depuis l'arrivée de la spectrométrie de masse présentant une meilleure spécificité. Cependant, elles restent une bonne alternative économique dans le cas où leur spécificité a été validée par spectrométrie de masse (Findlay *et al.*, 2000). Ces techniques faisant intervenir des anticorps mono- et polyclonaux comprennent essentiellement les techniques *Enzyme-Linked Immunosorbant Assay* (ELISA), *RadioImmunoAssay* (RIA), *Chemiluminescent immunoassay* (CHEM), *ImmunoRadioMetric Assay* (IRMA) et *Enzyme ImmunoAssay* (EIA). Les plus couramment employées pour les études PK/PD des médicaments issus de biotechnologies sont les techniques ELISA et RIA (Tang *et al.*, 2004).

La technique ELISA est la plus employée pour détecter et quantifier les médicaments produits par biotechnologie comme par exemple :

- des cytokines humaines (Piscitelli *et al.*, 1997)
- des activateurs tissulaires du plasminogène (t-PA) : alteplase, tenecteplase (Tanswell *et al.*, 2002)
- des anticorps monoclonaux chimériques tels que le rituximab, un anticorps anti-CD20 (Blasco *et al.*, 2007)
- des érythropoïétines recombinantes humaines (Cheung *et al.*, 2001)

Cependant, malgré son grand nombre d'applications, la méthode ELISA a des limites. Elle présente tout d'abord un manque de spécificité envers les formes actives (intactes), inactives (dénaturées) et métabolisées (partiellement dégradées) des produits de biotechnologie en raison du manque de spécificité de l'épitope de l'anticorps (Toon, 1996). D'autre part, cette technique présente un manque de discrimination entre les composés endogènes et exogènes pouvant conduire à une surestimation de la concentration. Enfin, des anticorps naturels dirigés contre le médicament peuvent interférer avec les tests ELISA (Tang *et al.*, 2004).

La technique RIA utilise des acides aminés ayant subi soit un marquage externe à l'¹²⁵I, soit un marquage interne au ³H, au ¹⁴C ou au ³⁵S (Wills et Ferraiolo, 1992). L'inconvénient du marquage externe avec un ou plusieurs atomes d'iode est qu'il peut modifier la pharmacocinétique de certains composés (Wallis *et al.*, 1993). En ce qui concerne le marquage interne des protéines, le métabolisme de ces protéines peut libérer l'acide aminé radiomarqué qui peut être ensuite incorporé à une protéine endogène et fausser l'analyse (Nadeau *et al.*, 1995).

Ces techniques ELISA et RIA ont en commun plusieurs défauts. D'une part, des biotransformations telles que la protéolyse peuvent modifier l'antigénicité de la protéine médicament et conduire à des résultats faussement négatifs (Findlay *et al.*, 2000). D'autre part, l'apparition d'auto anticorps résultant de l'administration répétée de la protéine thérapeutique peut causer des interférences analytiques (Findlay *et al.*, 2000). La technique ELISA, d'efficacité similaire à la technique RIA, présente l'avantage de ne pas utiliser d'éléments radioactifs (Sakata *et al.*, 1995).

En ce qui concerne particulièrement l'identification et la quantification des érythropoïétines humaines recombinantes (rHuEPO) et de la darbepoétin- α (DPO) dans les milieux biologiques (plasma ou urine), les techniques de type immunoassay sont très utilisées pour les contrôles anti-dopage humains, équins ou canins, étant donné leur

sensibilité et leur rapidité de mise en œuvre pour faire des *screening* rapides. Cependant ces techniques ne suffisent pas pour confirmer la présence de rHuEPO ou de DPO dans les prélèvements à cause du risque de réaction croisée avec d'autres protéines et de l'impossibilité de différencier l'érythropoïétine endogène de l'érythropoïétine exogène (Stanley et Poljak, 2003 ; Guan *et al.*, 2007 ; Guan *et al.*, 2008). Certains auteurs ont montré que les techniques de type CHEM (*Chemiluminescent immunoassay*) paraissent plus fiables que les techniques de type ELISA pour les contrôles anti-dopage humains à l'EPO (Abellan *et al.*, 2004 ; Benson *et al.*, 2000). Des techniques ELISA ont été récemment développées pour quantifier l'EPO recombinante humaine, mais ne semblent pas régler le problème des réactions croisées (Yanagihara *et al.*, 2008).

En ce qui concerne particulièrement la quantification de l'interféron-alfa pégylé (PEG-IFN- α), les techniques de type immunoassay exactes et précises pour des analyses *in vitro*, perdent de leur sensibilité et de leur spécificité lorsque cette cytokine est analysée dans un échantillon humain. Ceci est certainement dû à la présence de certains inhibiteurs comme des anticorps hétérophiles (dirigés contre d'autres espèces), des facteurs rhumatoïdes ou des formes solubles des récepteurs aux IFN- α/β . Des faux positifs peuvent apparaître si les anticorps utilisés pour reconnaître l'IFN- α se lient à une protéine inactive. Notons ici que les résultats obtenus avec les techniques de type immunoassay sont exprimés en Unités Internationales par mL (UI/mL) alors que les quantités d'interférons pégylés sont exprimées sur la base du poids moléculaire, en ng/mL (Vrolijk *et al.*, 2003).

C. Une technique combinant la focalisation isoélectrique à un double immunoblot

Une technique combinant la Focalisation Isoélectrique (IEF) à un double immunoblot pour la détection des érythropoïétines recombinantes humaines dans les urines présente l'avantage de distinguer l'EPO endogène des rHuEPO moins négativement chargées (Guan *et al.*, 2007). Cependant, il a été montré que ce test largement utilisé, détectait parfois des faux positifs d'epoetin beta dans des urines riches en protéines prélevées consécutivement à un effort physique. Ce phénomène est lié au fait que les anticorps monoclonaux anti-EPO utilisés dans les techniques immunologiques ne sont pas mono spécifiques et reconnaissent également dans ces urines certaines protéines présentant une homologie structurale avec l'epoetin beta (Beullens *et al.*, 2006).

D'autre part, la détection et la quantification des rHuEPO et de la DPO est préférable sur des échantillons plasmatiques car leurs concentrations attendues dans le plasma sont toujours supérieures à celles attendues dans les urines (Guan *et al.*, 2007).

Les analyses de la plupart des produits dopants dans les milieux sportifs sont essentiellement basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse pour une détection sensible et spécifique des molécules. Les grands enjeux actuels dans le contrôle antidopage sont principalement liés à l'usage des produits pharmaceutiques identiques aux molécules endogènes et l'érythropoïétine en est un bon exemple. En effet, pour la détection des hormones peptidiques telles que l'EPO, les besoins analytiques n'étaient jusqu'à présent pas couverts par les techniques de spectrométrie de masse. La détection des érythropoïétines humaines recombinantes est à défaut réalisée par la technique ELISA sur le plasma et l'urine et par la technique combinant focalisation isoélectrique/double immunoblot sur les urines. Mais ces techniques intéressantes pour la recherche rapide de l'EPO ne permettent pas par manque de spécificité de déterminer la quantité exacte d'EPO réellement présente (faux positifs et faux négatifs), et de distinguer l'EPO endogène de l'EPO exogène (Guan *et al.*, 2008). Il n'est donc pas possible avec ces méthodes de confirmer la présence d'EPO exogène et de déterminer la nature précise de l'EPO détectée. Une technique couplant la chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse apparue récemment permet de différencier la darbepoétin alfa (EPO de synthèse de deuxième génération) des EPO recombinantes humaines alfa et beta (EPO de synthèse de première génération) et donc de l'EPO endogène à de faibles concentrations dans le plasma (Guan *et al.*, 2008). En ce qui concerne l'époétin beta pégylée (EPO de synthèse de troisième génération) un test mis au point en septembre 2008 dont le principe n'est pas communiqué, permet de la détecter dans le plasma.

Si à ce jour, la spectrométrie de masse ne permet pas de distinguer l'EPO recombinante humaine de l'EPO endogène, elle permet grâce à sa meilleure sélectivité pour l'EPO par rapport aux techniques immunologiques, d'identifier et de quantifier l'EPO avec une meilleure précision. La spectrométrie de masse pourra certainement trouver sa place dans le dosage plasmatique de l'époétin beta pégylée, après extraction spécifique utilisant le groupement polyéthylène glycol.

D. Les techniques utilisant la spectrométrie de masse

Les techniques faisant appel à la spectrométrie de masse (MS) sont également utilisées pour l'analyse biologique de peptides et de protéines. Les techniques de

spectrométrie de masse couramment employées pour quantifier des peptides ou des protéines dans un milieu biologique utilisent des modes d'ionisation MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) (Muller *et al.*, 1999) ou ESI (*Electro Spray Ionization*) (Feng *et al.*, 2002). Le mode ESI est souvent couplé à la chromatographie liquide (LC-ESI-MS).

La spectrométrie de masse est une technique de référence en protéomique en raison de sa grande reproductibilité, de la large gamme de masses analysable, de l'exactitude et de la précision des mesures (Yang *et al.*, 2007). Même si les techniques de LC-MS présentent une sensibilité comparable aux techniques de type immunoassay, elles présentent la plupart du temps une meilleure sélectivité (McMartin, 1992 ; Tang *et al.*, 2004). En effet, alors que les techniques immunologiques sont appliquées sans extraction de la molécule à doser de son milieu biologique, les techniques chromatographiques incluant une étape de séparation préalable sont beaucoup plus sélectives (Findlay *et al.*, 2000). Les techniques de spectrométrie de masse en tandem de type LC-MS/MS quant à elles peuvent permettre d'abaisser les limites de détection et surtout d'améliorer la sélectivité de la méthode de dosage grâce à l'information supplémentaire donnée par les ions fragments (ce point particulier sera détaillé dans les chapitres 2 et 3). La spécificité de la technique choisie est une considération importante pour des études de pharmacocinétique, de bioéquivalence et de toxicocinétique des médicaments protéiques. Cet argument fait de la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse en tandem une technique de choix pour la quantification en milieu biologique des médicaments issus de biotechnologies pour la plupart semblables à des agents biologiques présents dans l'organisme (versions recombinantes) et présents à de faibles concentrations.

L'apport de la spectrométrie de masse pour l'identification et le dosage de l'érythropoïétine dans les milieux biologiques est double. Par rapport aux techniques de type immunologique employées habituellement, la spectrométrie de masse doit permettre d'atteindre des sensibilités aussi bonnes voire meilleures avec surtout une meilleure spécificité (absence de faux négatifs ou de faux positifs). Ces objectifs peuvent être atteints avec des techniques de spectrométrie de masse en tandem permettant de travailler en *Multiple Réaction Monitoring* ou MRM.

L'apport de la spectrométrie de masse pour l'identification et le dosage des interférons alfa-2 pégylés dans le plasma, par rapport aux techniques immunologiques utilisées habituellement, pourrait surtout résider dans l'amélioration de la spécificité de la technique analytique en exploitant la présence du greffage de polyéthylène glycol sur l'interféron.

IV. Objectifs de la thèse

Le défi analytique que représente la mise au point d'une technique d'analyse d'une protéine thérapeutique en milieu biologique nécessite la plupart du temps d'isoler le médicament le plus spécifiquement possible avec une perte minimale au cours des différentes étapes de l'analyse. Cette difficulté vient essentiellement de la présence dans les milieux biologiques, d'équivalents endogènes aux médicaments protéiques utilisés, ainsi que de la composition essentiellement protéique de ces matrices biologiques. Cela vient aussi de la sensibilité assez faible de détection des protéines entières, voire de l'impossibilité de les détecter en milieu complexe et de les identifier avec certitude. Le défi particulier de la sensibilité reste en effet l'un des plus difficiles à relever dans la mesure où les protéines médicaments sont le plus souvent présentes à de très faibles concentrations dans les fluides biologiques (de l'ordre de quelques attomoles/ μL à quelques centaines d'attomoles/ μL).

Ces limites, qui compliquent actuellement beaucoup la conception des études pharmacocinétiques et l'interprétation des données qui en découlent, peuvent être levées par la spectrométrie de masse. Nous avons ainsi cherché à atteindre cet objectif pour deux médicaments très employés actuellement en thérapeutique dans des indications capitales, l'érythropoïétine recombinante humaine sous sa forme beta et l'interféron pégylé sous sa forme alfa-2b. D'emblée, les choix techniques ont cependant été effectués de manière à privilégier le caractère universel de la méthode de dosage mise en œuvre, tenant ainsi compte du nombre croissant de médicaments protéiques mis sur le marché.

Contrairement aux techniques immunologiques, une technique de quantification de type LC-MS/MS peut être rapide à développer et présenter en plus l'avantage de ne pas être limitée à une seule protéine dans un seul type de matrice. Une méthode de quantification par LC-MS/MS est donc applicable à des échantillons de différentes natures (plasma, urine...) et provenant de différentes espèces (humain, animal...) et à quelques variantes près à différentes protéines médicaments. Ainsi, une même méthode de LC-MS/MS pourra être utilisable au niveau de toutes les phases du développement d'un médicament (Yang *et al.*, 2007). De plus, la faible quantité de matériel nécessaire, la rapidité, la sensibilité et l'automatisation des procédures sont des arguments importants en faveur de son utilisation. La spectrométrie de masse présente de meilleures performances lorsque l'analyse porte sur les peptides issus d'une protéine soumise à protéolyse que sur la protéine entière (Aussedat *et al.*, 2006 ; Dubois *et al.*, 2008). En effet, une analyse reposant sur les peptides permet d'obtenir une meilleure sensibilité, une meilleure spécificité et permet également de quantifier la protéine via ses peptides. Le fait que nous ayons souhaité que la méthode de

dosage repose sur l'analyse de plusieurs peptides, et non pas d'un seul comme c'est le cas pour d'autres méthodes, constitue une originalité supplémentaire conférant à notre approche une plus grande fiabilité de quantification.

Dans le deuxième chapitre nous présenterons une revue des techniques de séparation et de quantification des protéines par spectrométrie de masse.

Dans un troisième chapitre, nous présenterons les différentes techniques de spectrométrie de masse auxquelles nous avons eu recours pour notre étude.

La méthodologie d'analyse quantitative souhaitée universelle que nous avons mise au point sur l'érythropoïétine beta sera exposée dans le quatrième chapitre.

Enfin, dans le chapitre cinq, la problématique du dosage de protéines médicaments pégylées sera abordée via le cas particulier de l'interféron pégylé alfa-2b pour lequel une méthodologie d'extraction spécifique tirant profit de la pégylation sera présentée.

Une dernière partie, présentée sous la forme d'une discussion, sera consacrée à la synthèse des succès et des échecs que nous avons connus au cours de l'élaboration et de la mise en œuvre de la méthodologie et des enseignements qui en ont été tirés. Nous nous demanderons en particulier si les objectifs ont été atteints, notamment en matière de sensibilité de détection. Ce sera l'occasion de recenser et d'évaluer les performances de notre approche, mais aussi d'en révéler les limites et les lacunes, voire de remettre en question certains choix méthodologiques. Enfin, dans une partie consacrée aux perspectives, des solutions destinées à améliorer certaines étapes clés ou critiques de la méthode pourront être proposées. De même des alternatives pourront être envisagées.

CHAPITRE 2

REVUE DES METHODES DE QUANTIFICATION DES PROTEINES FAISANT APPEL A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

CHAPITRE 2 :

REVUE DES METHODES DE QUANTIFICATION DES PROTEINES FAISANT APPEL A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

La quantification par spectrométrie de masse a d'abord concerné les petites molécules analysées le plus souvent avec des méthodes couplant la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse en mode *Single Ion Monitoring* (SIM). Ces techniques faisaient appel à des standards porteurs d'un marquage isotopique permettant la quantification. Puis, après l'avènement de l'analyse protéomique, les méthodes d'analyse quantitative existantes ont été adaptées aux caractéristiques particulières des peptides et des protéines.

C'est en 1996 que Wilkins et al. ont introduit le mot « protéome » qui signifie complément PROTEinique d'un génOME (Wilkins *et al.*, 1996). L'analyse protéomique est définie comme la comparaison quantitative de protéomes similaires sous différents *stimuli* permettant une meilleure compréhension des processus biologiques complexes. La protéomique est le passage obligé entre le génome et les nouveaux médicaments. Plusieurs champs d'investigation visant à étudier la formation des protéines, leur fonction et leur structure sont menés :

- étude des niveaux d'expression des protéines par modification d'un paramètre. Il est en effet devenu utile de suivre l'évolution des protéines d'une cellule soumise à différents stimuli. En comparant des réponses données, on peut voir les changements dans l'expression de certaines biomolécules : certaines disparaissent au profit d'autres (Hardouin, 2003).
- réalisation de la cartographie des protéines d'une cellule : il s'agit de déterminer leur localisation, leur séquence et leurs interactions. De façon à comprendre le rôle des protéines au sein d'un réseau, leurs interactions doivent être caractérisées quantitativement.
- identification et quantification de biomarqueurs protéiques exprimés dans certaines pathologies (à une fin de diagnostic dans certaines formes de cancer par exemple) (Koomen et Shih, 2005).

Un des principaux objectifs de la recherche en protéomique est ainsi d'effectuer une identification et une quantification systématiques des protéines exprimées dans les systèmes biologiques. Les approches standard font appel à des techniques de séparation des protéines à l'aide de l'électrophorèse bidimensionnelle, des puces à protéines ou de la chromatographie en phase liquide (LC) bi ou multidimensionnelle, pouvant être couplée à la spectrométrie de masse (Wu *et al.*, 2006).

Cependant, la quantification des protéines commence à être appliquée aux médicaments étant donné l'utilisation croissante en thérapeutique de médicaments protéiques. Les différentes études préalables à la mise sur le marché d'un médicament (toxicité, pharmacocinétique, pharmacodynamie...), les études postérieures à la mise sur le marché et les dosages pharmacologiques de routine nécessitent de disposer de méthodes fiables de quantification de ces médicaments.

Nous présenterons dans un premier temps les techniques utilisées en analyse protéomique pour séparer les protéines ou les peptides en vue de les quantifier. Nous aborderons dans un second temps les méthodes employées lorsqu'il s'agit de doser des protéines ou des peptides d'intérêt thérapeutique à partir de fluides ou de tissus biologiques. Dans un troisième temps, nous passerons en revue les techniques de quantification actuellement commercialisées et utilisant la spectrométrie de masse (quantification relative et/ou absolue). Enfin, nous discuterons au regard de la bibliographie l'apport des différentes techniques de spectrométrie de masse pour quantifier un médicament protéique dans le plasma humain.

I. Techniques employées en protéomique pour séparer les protéines et les peptides en vue de les quantifier par spectrométrie de masse

A. Méthodes basées sur la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle

Les méthodes basées sur l'électrophorèse bidimensionnelle ont été des méthodes de choix pendant des décennies et sont encore largement utilisées. L'électrophorèse

bidimensionnelle appelée également 2D-PAGE (Electrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide) sépare les protéines par :

- focalisation isoélectrique (IEF ou *Iso Electro Focalisation*) dans la première dimension ; les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique (pI), c'est-à-dire le pH pour lequel leur charge nette est nulle (Leclercq, 1999).
- électrophorèse en conditions dénaturantes en deuxième dimension ; la séparation s'effectue selon le poids moléculaire (SDS-PAGE ou *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Leclercq, 1999).

Une étape de coloration permet de mettre en évidence les protéines. Elle est effectuée par divers moyens : colorants (bleu de Coomassie, ...), ions Ag⁺ ou fluorescence (technique DIGE ou *Difference Gel Electrophoresis* par exemple) (Wu *et al.*, 2006). Les protéines sont **quantifiées** selon l'intensité de cette coloration (quantification relative d'une protéine par rapport à l'ensemble de la carte) (Rabilloud et Charmont, 2000 ; Hardoin, 2003).

Les tâches (protéines) obtenues dans le gel sont excisées manuellement ou de manière automatique, les colorants, sels et détergents sont éliminés et les protéines sont soumises à une protéolyse. La trypsine est l'endoprotéase spécifique la plus couramment utilisée ; elle clive en C-terminal la chaîne peptidique des acides aminés qui ont le pK le plus élevé (lysine et arginine).

Les protéines sont **identifiées** par spectrométrie de masse, soit par empreinte peptidique (mesure de masses de peptides en mode MALDI ou ESI-MS) si la séquence de la protéine est référencée dans une base de données (Poutanen *et al.*, 2001 ; Domon et Aebersold, 2006), soit en faisant appel à des analyses en mode MS/MS qui ont l'avantage de permettre un séquençage *de novo* si la protéine n'est pas référencée (Tang *et al.*, 1993 ; Jones *et al.*, 1994 ; Hardouin, 2003).

Les techniques de quantification couplées à l'électrophorèse bidimensionnelle sont généralement les techniques colorimétriques ou basées sur la fluorescence. Cependant, ces techniques classiques de quantification des protéines sur gel d'électrophorèse hautement sélectives pour les protéines abondantes, ne conviennent pas pour quantifier les protéines peu abondantes telles que les protéines de régulation (protéines kinases, facteurs de transcription...) (Gerber *et al.*, 2003). C'est pourquoi des techniques de marquage chimique isotopique sont également employées après une séparation des protéines sur gel d'électrophorèse, en vue de quantifier les protéines par spectrométrie de masse (Gerber *et al.*, 2003). Les techniques de marquage chimique utilisées sont par exemple l'ICAT (*Isotope Coded Affinity Tag*) (Wu *et al.*, 2006), l'iTRAQTM (*Isobaric Tag for Relative and Absolute*

Quantitation) (Wu *et al.*, 2006), le SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino acid in Cell Culture*) (Qiu et Wang, 2008) ou encore la méthode Protein AQUA™ (Gerber *et al.*, 2003). Ces méthodes de quantification utilisant la spectrométrie de masse seront décrites ultérieurement.

L'électrophorèse bidimensionnelle présente l'avantage de posséder un pouvoir de séparation élevé ce qui permet le couplage à une technique de quantification. Cependant, malgré une certaine standardisation des protocoles opératoires, la disponibilité de *strips* de première dimension et de gels de deuxième dimension commerciaux, l'électrophorèse bidimensionnelle est une méthode lente, coûteuse, qui demande beaucoup de main d'œuvre, présente une reproductibilité moyenne, et ne peut séparer des protéines de même pI ou de même poids moléculaire, hautement acides ou basiques, des protéines hydrophobes ou de tailles extrêmes (< 7 000 Da ou > 200 000 Da). D'autre part, l'image quantitative obtenue n'est pas toujours reproductible et exacte (il existe des biais spécifiques aux différents modes de révélation).

Cette technique conduit d'autre part à une perte d'information, puisque pour identifier et quantifier les protéines, il faut préalablement cliver les protéines dans le gel puis extraire les peptides qui seront utilisés pour la quantification.

Dans les dernières années, ces techniques ont été complétées par des techniques alliant rapidité et quantification, et utilisant la chromatographie liquide multidimensionnelle, en particulier dans le domaine du haut-débit (Wu *et al.*, 2006).

Les plus grandes avancées techniques concernant le traitement des peptides car peu d'évolutions à part la méthodologie Beckman sont à noter en ce qui concerne la séparation et la quantification directes des protéines.

B. Méthodes utilisant des puces à protéines

Les méthodes basées sur l'utilisation des puces à protéines ou *Protein Chips* sont impliquées dans de nombreux domaines comme la recherche médicale (diagnostics immunologiques), la recherche fondamentale (interactions protéines/protéines...) et la quantification (seuil de détection de l'ordre de la fmole) (Lee, 2001 ; Hardouin, 2003). Le principe de cette technique est présenté dans la figure II.1. Une plaque métallique est recouverte de ligands spécifiques (puce) des protéines à analyser. Les puces sont mises en contact avec l'échantillon, puis lavées pour éviter les interactions non-spécifiques. Une fois

les protéines capturées, différents systèmes de lecture sont mis en œuvre : fluorescence, radioactivité, électrochimie ou spectrométrie de masse (Hardouin, 2003).

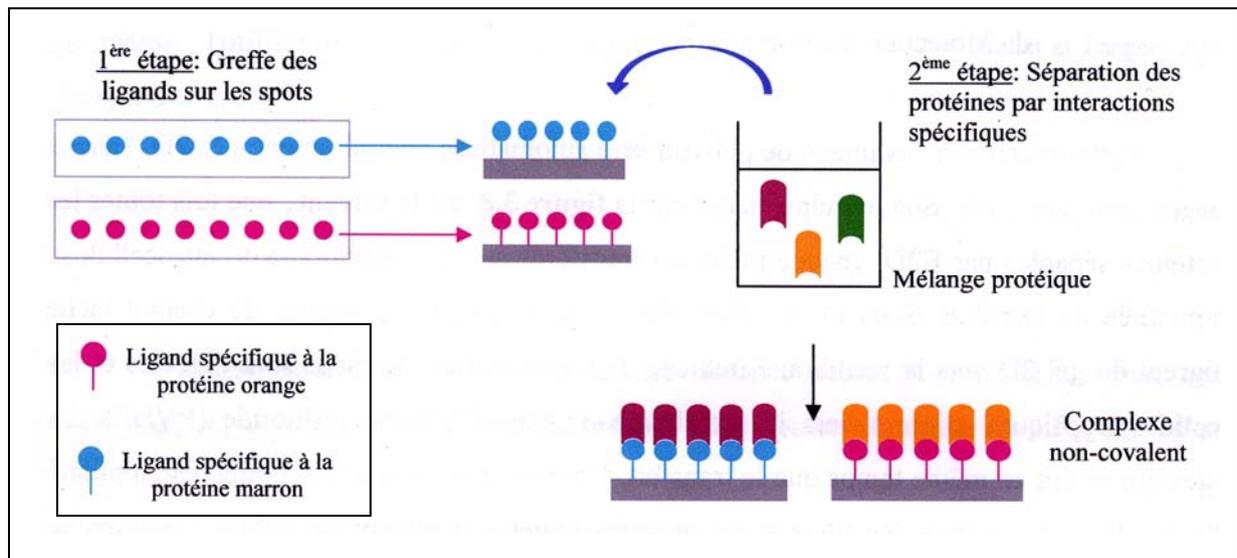


Figure II.1. Principe de la puce à protéines ou *Protein Chips* (figure modifiée d'après Hardouin, 2003).

Dans le cas de l'analyse des biomolécules par spectrométrie de masse, l'analyse est effectuée directement sur la puce : cette approche est le SELDI-TOF-MS ou *Surface Enhanced Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*. Un laser frappe la plaque ce qui conduit à la désorption et à l'ionisation des biomolécules.

Cette méthodologie développée par la société Ciphergen repose sur la comparaison de profils protéiques. Elle permet de détecter et mesurer la masse des protéines présentes dans un mélange complexe (sérum, plasma...). Pour une protéine donnée, le signal mesuré par le spectromètre de masse étant proportionnel à l'abondance de cette protéine, la comparaison de profils de masse permet de mettre en évidence des variations quantitatives entre deux ou plusieurs échantillons (www.ICIM.marseille.inserm.fr).

L'échantillon à analyser est déposé sur une plaque SELDI qui a la particularité de présenter une surface chromatographique (phase inverse, échange d'ions, affinité...) qui permet de retenir spécifiquement des sous-populations de protéines et de simplifier la complexité de l'échantillon. Pour simplifier davantage la complexité des extraits protéiques, des techniques de fractionnement protéique peuvent être utilisées en amont du dépôt sur cible SELDI.

Cependant, cette technique présente l'inconvénient de permettre difficilement l'identification des protéines sans adaptation de la méthodologie (www.ICIM.marseille.inserm.fr).

C. Méthodes basées sur l'isolement des protéines par chromatographie multidimensionnelle en phase liquide

Les protéines peuvent être également séparées par des techniques de chromatographie liquide multidimensionnelle. Le système ProteomeLab™ PF 2D est un système à deux dimensions commercialisé par Beckman Coulter. Il combine deux étapes de chromatographie consécutives : une première étape de chromatofocalisation suivie d'une seconde étape de chromatographie en phase inversée permettant la séparation de mélanges protéiques complexes. Les fractions liquides obtenues peuvent être collectées en vue de leur analyse par spectrométrie de masse. Cette technique automatique permet de traiter des échantillons de taille importante, améliore la détection des espèces de faible abondance et présente une bonne reproductibilité (www.beckmancoulter.com). Elle est cependant peu utilisée en pratique du fait des problèmes techniques fréquemment rencontrés.

Il existe d'autres techniques de séparation des protéines suivant deux dimensions. Il s'agit cette fois de systèmes hybrides combinant une première étape (première dimension) de focalisation isoélectrique ou *Iso Electro Focalisation* (Rotofor Purification System® Bio-Rad par exemple) suivie d'une étape de chromatographie liquide (seconde dimension). Une technique telle que le Rotofor® n'est pas très efficace pour séparer des échantillons complexes de protéines mais convient mieux pour séparer des protéines lors d'un dernier stade de purification (Ayala *et al.*, 1998).

D. Méthodes basées sur l'isolement des peptides par chromatographie multidimensionnelle en phase liquide

Les méthodes basées sur la chromatographie en phase liquide des peptides ont un pouvoir de séparation supérieur aux méthodes qui prennent en compte les protéines. En effet, elles offrent la possibilité de choisir dans une large gamme de phases stationnaires et de phases mobiles pour analyser des mélanges complexes de peptides. Néanmoins, cet avantage est tout à fait théorique. En effet, si nous considérons un protéome constitué de 6000 protéines différentes (cas d'organismes simples tels que le colibacille ou la levure), une protéolyse enzymatique produit une cinquantaine de peptides par protéine. L'analyste est donc confronté à la séparation d'environ 300 000 peptides, un nombre bien supérieur aux capacités de séparation de pics atteintes à l'aide de la chromatographie en phase liquide.

Une approche classique consiste à associer la chromatographie échangeuse de cations (SCX, greffage de type sulfopropyl, élution par un gradient de force ionique) en première dimension à la chromatographie en phase inversée en deuxième dimension (greffage C18, dessalage et élution par un gradient de modifiant organique) (Peng et Gygi, 2001). Cette combinaison repose sur des modes de séparation orthogonaux (charge et hydrophobicité) et les peptides en sortie de colonne C18 peuvent être directement introduits dans la source d'un spectromètre de masse fonctionnant en mode d'ionisation par électronébulisation.

Une variante de la chromatographie multidimensionnelle classique désignée par l'abréviation MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*), a été développée par Yates *et al.* Il s'agit d'une colonne biphasique dont la partie initiale est configurée en échangeuse de cations et la partie terminale en phase inverse (Washburn *et al.*, 2001 ; Wolters *et al.*, 2001).

D'autres combinaisons ont été testées, en cherchant à utiliser une première dimension plus sélective que l'échange de cations. Ainsi la combinaison de deux colonnes fonctionnant en chromatographie à polarité de phase inversée à deux pH différents semble une solution intéressante et de mise en œuvre plus facile (Hardouin, 2003).

A l'issue de ces étapes de séparation des protéines et/ou des peptides, intervient l'étape de quantification des protéines. La quantification des protéines par densitométrie réalisée directement sur gel d'électrophorèse est une technique dont la mise en œuvre est facile mais dont l'utilisation est restreinte principalement aux protéines abondantes.

Dans le cas de faibles quantités de protéines, une technique de quantification par spectrométrie de masse sera préférée imposant souvent un marquage isotopique. Le marquage par dérivation chimique, ou le marquage métabolique ou enzymatique des protéines ou des peptides permettent leur quantification relative ou absolue par LC-MS (Wu *et al.*, 2006). Les techniques de marquage chimique communément utilisées car faisant appel à des kits commerciaux sont l'ICAT et le cICAT pour le marquage des protéines, l'iTRAQ™ et la stratégie Protein AQUA™ pour le marquage des peptides. Les principales techniques de marquage métabolique et enzymatique sont respectivement la technique SILAC et la stratégie d'incorporation de l'¹⁸O. Ces techniques seront présentées ultérieurement.

Une technique alternative peut permettre la quantification par spectrométrie de masse sans nécessiter de marquage isotopique : il s'agit de la chromatographie Liquide Ultra Performance™ quantitative couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPL/MS/MS) (Yu *et al.*, 2006). La condition pour quantifier des protéines avec cette technique sans

marquage isotopique est que la chromatographie UPL soit bien contrôlée du point de vue des temps de rétention. Cependant, les techniques mettant en œuvre un marquage isotopique sont beaucoup plus employées étant donné leur plus grande fiabilité.

II. Techniques de séparation ou d'enrichissement des protéines ou des peptides en vue de leur quantification absolue dans un milieu biologique

En considérant le seul aspect de la complexité, l'examen de la situation indique que le plasma humain comporte 237 protéines connues qui donnent après protéolyse trypsique 10 203 peptides (Anderson *et al.*, 2004). Cependant, le problème est fortement compliqué par la gamme de concentrations de ces protéines. En effet, moins d'une dizaine de protéines constituent à elles seules 97 % des protéines plasmatiques. Une étape de séparation des protéines de l'échantillon plasmatique en vue de l'enrichir en protéine à quantifier semble incontournable. Cette étape peut intervenir soit sur l'échantillon plasmatique brut, soit suivant l'étape de digestion sur l'échantillon peptidique (Heudi *et al.*, 2008).

A. Techniques de séparation des protéines

Pour la quantification de petites molécules thérapeutiques dans le plasma, les composés d'intérêt peuvent être extraits du plasma après précipitation des protéines plasmatiques. Cependant, cette approche n'est pas applicable aux anticorps monoclonaux et aux protéines recombinantes de grande taille qui précipiteraient avec les protéines plasmatiques (Becher *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2007).

Certains auteurs ont appliqué des techniques classiques d'analyse protéomique pour isoler des protéines dans des mélanges complexes en vue d'en faire la quantification absolue. Ils ont enrichi leurs échantillons protéiques soit directement par une technique basée sur l'électrophorèse sur gel soit par une technique basée sur la chromatographie liquide après protéolyse (Havlis et Shevchenko, 2004). La technique de quantification absolue ¹⁸O Proteome Profiler (présentée ultérieurement) a permis de comparer les deux techniques de préparation de l'échantillon. Ces auteurs ont observé que pour un échantillon protéique protéolysé en milieu liquide puis séparé par chromatographie liquide, les intensités des pics correspondant à la protéine à doser et à son étalon interne indiquaient un rendement de

100 %. Par contre, pour l'échantillon protéique séparé par électrophorèse et protéolysé dans le gel le rendement de chacun des peptides obtenus pris individuellement et provenant de la même protéine varie fortement. Cette perte de peptides après protéolyse dans le gel proviendrait d'une part de la protéolyse, moins efficace dans un gel qu'en milieu liquide, et d'autre part d'une perte de peptides lors de leur extraction de la matrice polyacrylamide avant l'analyse. La quantification absolue d'une protéine séparée par une méthode électrophorétique sur gel est possible mais sa précision et son efficacité sont limitées. Dans ce type de situation, où les rendements de plusieurs peptides provenant d'une même protéine sont différents, il est important d'utiliser plusieurs peptides pour la quantification (Havlis et Shevchenko, 2004). Cependant, d'autres auteurs ont montré que pour certaines protéines telles que la myoglobine (Gerber *et al.*, 2003), la quantification absolue précise après séparation électrophorétique et protéolyse sur gel est possible.

Une alternative à l'électrophorèse sur gel est l'électrophorèse capillaire qui a été appliquée à l'analyse des protéines thérapeutiques. Cette technique présente l'avantage d'être rapide, automatisable et de meilleure résolution que les techniques électrophorétiques classiques (Ma, 2005).

Une autre stratégie d'enrichissement en vue de la quantification d'une protéine consiste à effectuer une immunocapture de la protéine d'intérêt avant l'analyse par spectrométrie de masse (Becher *et al.*, 2007 ; Dubois *et al.*, 2007 ; Hoos *et al.*, 2006, Duriez *et al.*, 2008). Une telle approche présente cependant les inconvénients des techniques immunologiques, spécifiques du composé à analyser. De plus, une telle approche est nécessairement longue à développer car elle requiert la fabrication d'un anticorps et d'un système de capture (billes magnétiques par exemple) (Yang *et al.*, 2007 ; Heudi *et al.*, 2008). Par exemple, Dubois *et al.* ont isolé un anticorps monoclonal (cetuximab) du plasma humain par une technique d'immunocapture basée sur l'affinité de cet anticorps avec la région extracellulaire du récepteur au facteur de croissance épidermique humain (EGFR). Des billes magnétiques micrométriques fonctionnalisées avec des récepteurs solubles au facteur de croissance épidermique humain permettent l'extraction de l'anticorps monoclonal en vue de sa quantification par une technique de spectrométrie de masse permettant de travailler en *Single Reaction Monitoring* ou SRM (Dubois *et al.*, 2008).

Pour l'analyse d'une protéine dans le plasma humain, une autre approche consiste à enrichir l'échantillon en protéine d'intérêt en supprimant une partie des protéines plasmatiques les plus abondantes au moyen d'une étape de chromatographie d'affinité (Anderson et Hunter, 2006). Il existe pour cela des kits de déplétion des protéines majoritaires

du plasma humain, tels que le système MARS® (*Multiple Affinity Removal System*) commercialisé par Agilent technologies. Les protéines majoritaires du plasma subissent une immunodéplétion en étant retenues sur la phase stationnaire ; l'éluât contenant les protéines plasmatiques minoritaires est dessalé et concentré (par exemple avec une membrane de porosité de 5 kDa). Le système MARS existe sous différentes formes : des cartouches pour centrifugation ou « Spin Cartridge® » réutilisables (capacité jusqu'à 14 µL de plasma ; figure II.2 à gauche) et des colonnes de chromatographie (capacité jusqu'à 325 µL de plasma ; figure II.2 à droite). Ces supports d'affinité permettent de supprimer du plasma environ 94 % des protéines majoritaires en utilisant soit une version qui a pour cible l'albumine, les immunoglobulines G, l'alpha1-antitrypsine, les immunoglobulines A, la transferrine et l'haptoglobine), soit une version destinée à éliminer 14 protéines qui a pour cibles supplémentaires le fibrinogène, l'alpha2-macroglobuline, l'alpha1-glycoprotéine acide, les IgM, l'apolipoprotéine A1, l'apolipoprotéine A2, le complément C3 et la transthyrétine.

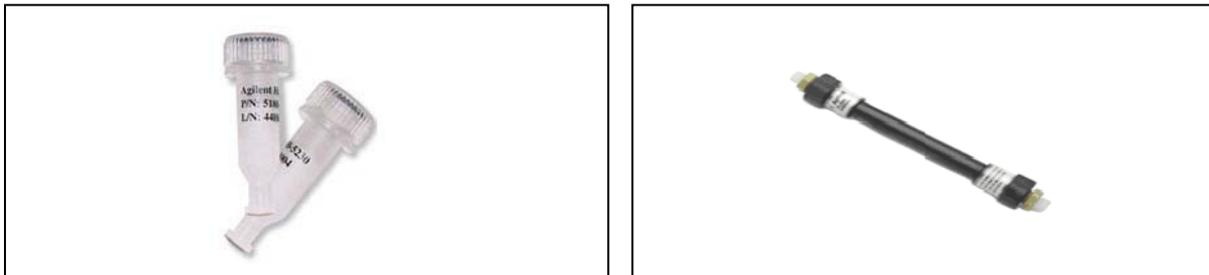


Figure II.2. Système MARS dans sa version cartouche pour centrifugation ou « Spin Cartridge® » (à gauche) et dans sa version colonne de chromatographie (à droite) (www.chem.agilent.com)

En conclusion, en considérant la mise en œuvre délicate et le manque de fiabilité des méthodes électrophorétiques classiques appliquées à des mélanges protéiques complexes, l'impossibilité d'employer une technique de précipitation pour isoler des protéines de grande taille (l'érythropoïétine beta et le Peginterféron alfa-2b que nous étudions ont des masses moléculaires importantes de l'ordre de 34 kDa), la complexité de mise au point d'une technique d'immunocapture et sa mauvaise sélectivité, un procédé de déplétion tel que le système MARS® paraît être une technique particulièrement intéressante à intégrer dans une stratégie d'analyse quantitative dans un milieu complexe tel que le plasma.

B. Techniques de séparation des peptides

Les techniques de séparation des protéines dans un échantillon plasmatique peuvent être suivies d'une étape de protéolyse et d'une séparation des peptides obtenus. L'échantillon plasmatique peut aussi être directement soumis à protéolyse, puis les peptides

sont séparés avant d'être analysés (Yang *et al.*, 2007). L'étalon interne peptidique permettant la quantification doit être ajouté avant cette étape d'enrichissement.

Une première technique d'enrichissement d'un peptide dans un mélange complexe est l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre le ou les peptides à analyser suivi d'une élution rapide dans le spectromètre de masse. Il existe une solution commerciale dénommée SISCAPA (*Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies*) qui permet la quantification de peptides dans un mélange peptidique complexe. Les anticorps employés sont recyclables. La figure II.3 montre le principe général de cette technique qui combine quatre étapes : **(1)** la protéolyse de l'échantillon protéique en peptides, **(2)** l'ajout des peptides marqués par un isotope stable et servant d'étalon interne, **(3)** l'enrichissement en peptides à quantifier qui sont généralement en faible abondance par rapport aux protéines plasmatiques, **(4)** la quantification par spectrométrie de masse.

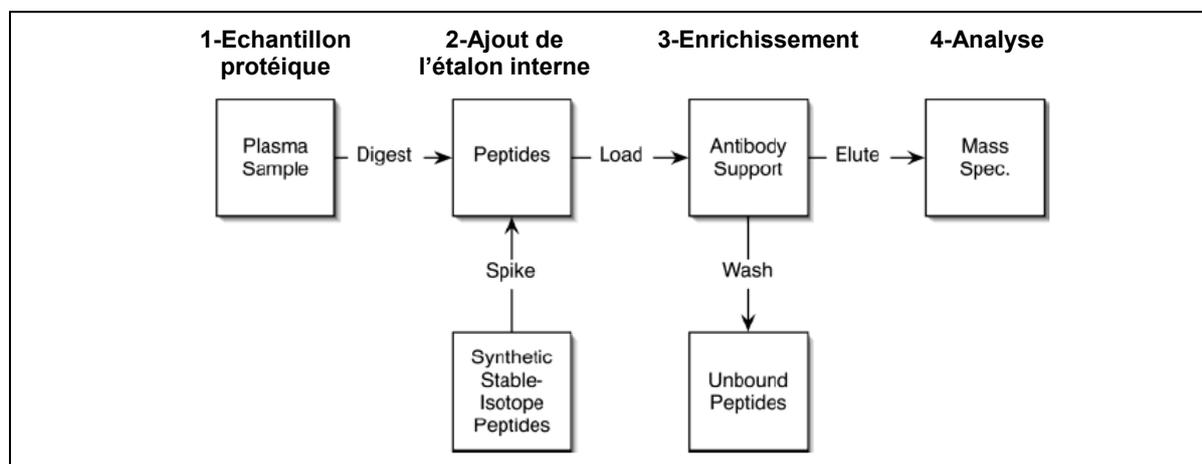


Figure II.3. Diagramme de la méthode SISCAPA (*Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies*) pour la quantification des peptides (figure modifiée d'après Anderson *et al.*, 2004)

Les anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les peptides d'intérêt (peptides de la protéine à quantifier et peptides étalons interne marqués) sont immobilisés sur un support (POROS® Applied Biosystems). La phase de capture et d'élution des peptides d'intérêt est suivie d'une chromatographie C18 couplée à un spectromètre de masse MS/MS pour la quantification. Cette étape d'immunocapture des peptides à quantifier permettrait un taux d'enrichissement moyen de 120 fois (Anderson *et al.*, 2004). Cependant, cette technique intéressante par son rendement, présente les inconvénients déjà mentionnés des techniques de type immunologique.

Des techniques de chromatographie liquide unidimensionnelle (chromatographie échangeuse de cations Oasis MCX® ou chromatographie en phase inverse C18) ou

bidimensionnelle (chromatographie en phase inverse C18 et chromatographie échangeuse de cations) (Yang *et al.*, 2007) sont couramment utilisées pour l'enrichissement de peptides. Ces techniques présentent l'inconvénient de nécessiter de longs gradients d'élution allant de 30 minutes à plusieurs heures ce qui peut être contraignant pour traiter d'importantes quantités d'échantillons. Cependant, associée à des techniques de séparation préalable des protéines, une technique de séparation des peptides après clivage des protéines peut permettre un gain en spécificité et en sensibilité d'une méthode de dosage.

III. Détail des techniques de quantification des protéines utilisant la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est devenue un outil puissant pour la quantification des protéines dans un mélange grâce à sa haute sensibilité, sa rapidité d'exécution et sa spécificité. Les techniques de spectrométrie de masse permettant l'analyse des protéines entières n'étant pas sensibles, les quantités de protéines sont plutôt déduites des quantités de peptides obtenues par clivage de la protéine après sa séparation en solution ou dans un gel (Havlis *et al.*, 2004).

Cependant, en fonction des conditions d'analyse, de la complexité de l'échantillon, de la présence dans l'échantillon de composants pouvant gêner l'ionisation, l'intensité du signal obtenu à partir d'une quantité donnée d'une molécule peut changer. Comme le montre la figure II.4 pour une ionisation par électronebulisation, deux peptides de masses quasiment identiques mais de structures différentes et mélangés en quantités identiques peuvent donner en spectrométrie de masse deux signaux d'intensités différentes (www.sigma-aldrich.com, rubrique *Protein AQUA Strategy*, consulté le 03/08/2008).

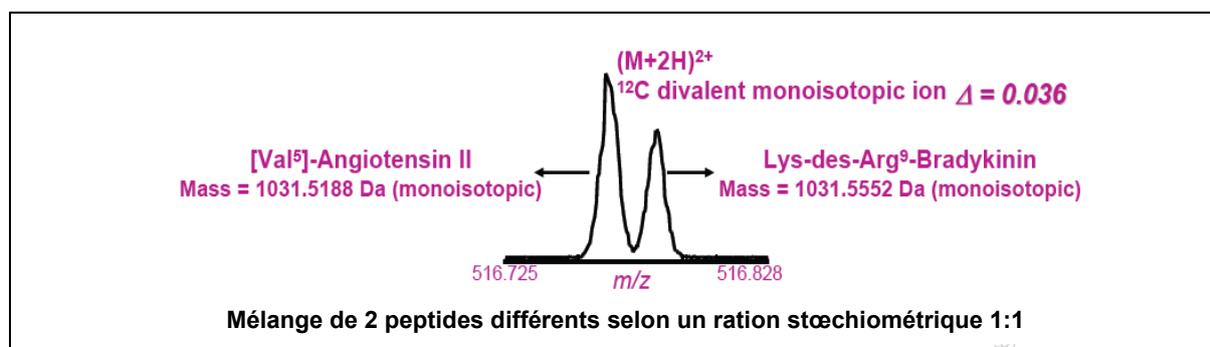


Figure II.4. Schéma montrant qu'en spectrométrie de masse, l'intensité d'un ion correspondant à un peptide ne reflète pas exactement la quantité de peptide contenu dans l'échantillon (www.sigma-aldrich.com).

Or, l'un des atouts de la spectrométrie de masse réside dans la possibilité d'introduire des isotopes stables dans une molécule de référence utilisée pour la quantification. Deux peptides (ou protéines) identiques dont l'un des deux ne diffère que par un isotope stable ou qui ne diffèrent tous les deux que par un isotope stable différent sont quantifiables en spectrométrie de masse.

Les différentes techniques de marquage isotopique basées sur la spectrométrie de masse qui ont été introduites et qui ont évolué, ont permis d'améliorer l'efficacité, la précision, la reproductibilité et le débit des approches quantitatives (Chen *et al.*, 2007).

Deux types de quantifications sont ainsi possibles :

- la quantification relative (ou comparative ou différentielle) qui détermine les taux d'une protéine donnée entre un échantillon expérimental et un échantillon contrôle. Les quantités relatives de plusieurs protéines peuvent être déterminées parallèlement (Havlis et Shevchenko, 2004).
- la quantification absolue qui détermine la quantité absolue d'une protéine analysée, exprimée soit en moles soit en masse par cellule ou par volume de solution purifiée. Ainsi, les quantités de différentes protéines présentes dans un échantillon peuvent être déterminées et comparées.

Parmi l'ensemble des techniques actuellement sur le marché pour quantifier les protéines en spectrométrie de masse, nous distinguerons successivement des techniques permettant d'effectuer de la quantification relative, puis des techniques qui permettent d'effectuer de la quantification relative et absolue, et enfin des techniques permettant d'effectuer de la quantification absolue exclusivement.

A. Méthodes de quantification relative

Les techniques de **quantification relative** (appelées également techniques de **quantification différentielle ou comparative**) sont utilisées en protéomique pour déterminer l'abondance relative des protéines entre deux échantillons (par exemple un échantillon tumoral versus un échantillon non tumoral), pour déterminer des modifications dans l'expression des protéines après la perturbation d'un échantillon (par exemple par un médicament), pour quantifier la différence d'abondance des protéines entre deux échantillons et pour quantifier l'expression d'une protéine durant un traitement ou durant la progression d'une maladie.

Les protéines sont généralement marquées par un isotope stable par voie métabolique lors de la croissance des cellules en milieu enrichi avec un acide aminé marqué. Les cellules provenant de l'échantillon expérimental et de l'échantillon contrôle sont mélangées, les protéines à étudier sont enrichies par différentes méthodes analytiques qui n'affectent pas la précision de l'analyse et au cours desquelles les protéines natives et les protéines marquées par un isotope stable vont se comporter de façon identique. Une autre approche consiste à traiter séparément les protéines provenant des cellules expérimentales avec un réactif portant une étiquette isotopique, alors qu'un réactif non modifié est utilisé pour les cellules contrôles.

Les pools de protéines dérivées sont ensuite mélangés, soumis à une protéolyse puis les peptides modifiés sont quantifiés par spectrométrie de masse après une étape éventuelle d'enrichissement par chromatographie d'affinité (Havlis et Shevchenko, 2004).

1. Le marquage chimique

a) Isotope-Coded Affinity Tag – ICAT

Le procédé *Isotope-Coded Affinity Tag* ou ICAT a été introduit en 1999 par Gygi *et al.* et permet de quantifier et d'identifier les protéines en très faible proportion dans un mélange (Gygi *et al.*, 1999). Son principe, présenté dans la figure II.5, repose sur l'analyse simultanée de deux échantillons biologiques à deux états donnés. Le résidu cible du réactif est la cystéine. La relative rareté de cet acide aminé dans les protéines (abondance moyenne d'environ 2 %) est utilisée pour diminuer considérablement la complexité du mélange de peptides à analyser, en faisant appel à une stratégie d'isolement des peptides marqués par chromatographie d'affinité.

Le réactif ICAT comporte trois éléments fonctionnels : une fonction iodoacétamide spécifique des cystéines, un espaceur éthylène glycol disponible en version « lourde » (^2H ou ^{13}C) ou « légère » (forme normale ^1H ou ^{12}C) et une biotine destinée à la purification par chromatographie d'affinité sur support modifié par la streptavidine. Le réactif modifié par ^{13}C (commercialisation par Applied Biosystems) a été rapidement préféré au réactif deutéré, car il n'introduit pas de différence de rétention en chromatographie. Les protéines provenant des deux états à comparer sont marquées sur leurs cystéines soit par le réactif ICAT « lourd » soit par le réactif ICAT « léger ». Après ajustement des concentrations, les deux solutions sont mélangées et protéolysées par la trypsine. Après une chromatographie d'échange de cations pour éliminer l'excès de réactif, la chromatographie d'affinité permet d'isoler les peptides portant une biotine et contenant par conséquent une cystéine. Les peptides sont

analysés par LC-MS/MS pour réaliser la quantification (aire ou hauteur de pic des ions moléculaires des peptides « lourds » et « légers ») et l'identification à partir des ions fragments issus de ces précurseurs (Comuzzi et Sadar, 2006).

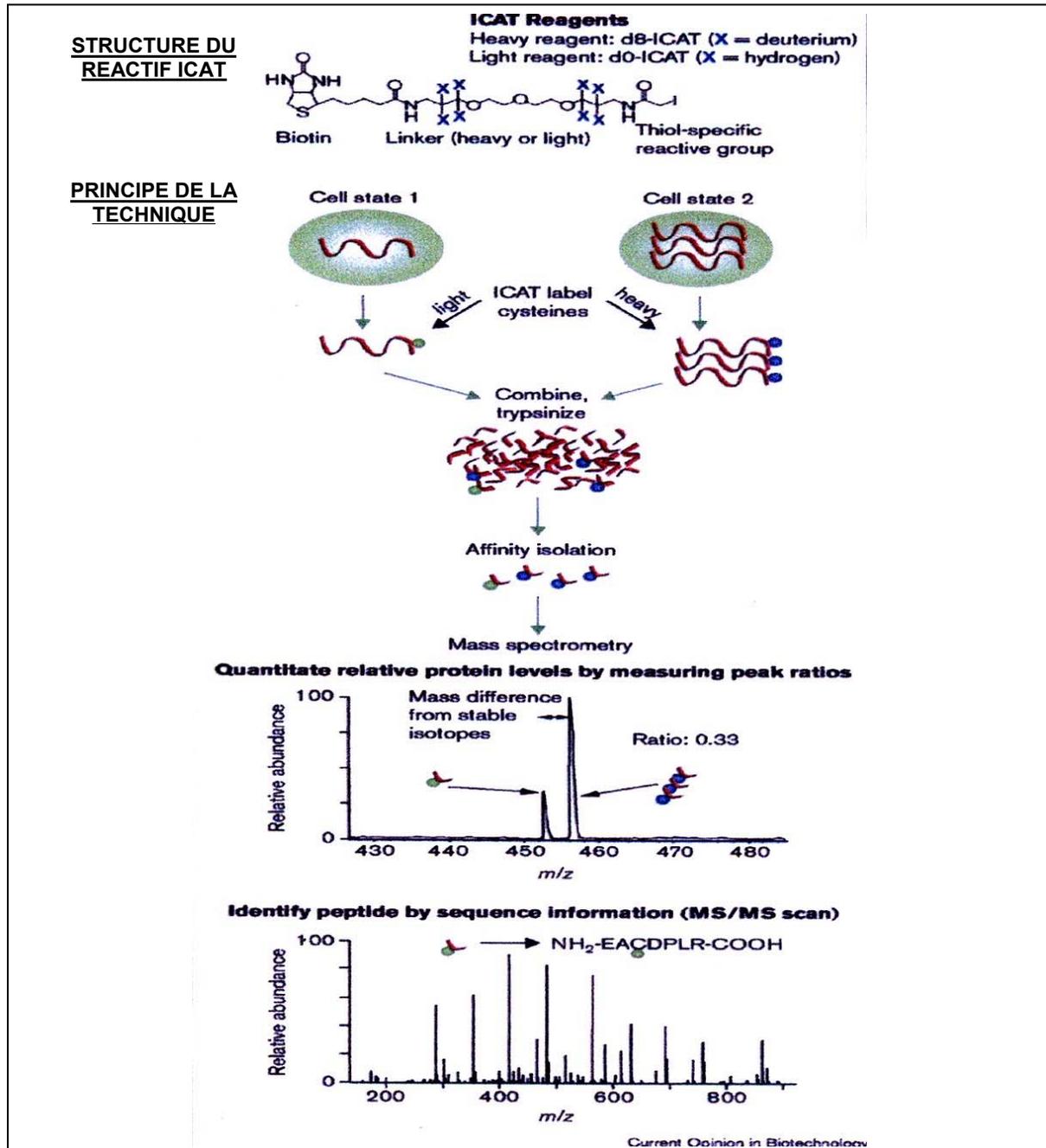


Figure II.5. Principe de l'ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tag*) (figure modifiée d'après Gygi et al., 2000)

L'ICAT permet d'identifier quantitativement les protéines acides et basiques, les protéines membranaires, les protéines peu abondantes et les protéines de haut poids moléculaire, mais cette technique présente beaucoup de limites (Wu *et al.*, 2006) :

- elle ne permet qu'une quantification relative d'un échantillon par rapport à un autre, et cette quantification repose parfois sur un seul peptide
- elle ne permet pas d'identifier les protéines qui ne contiennent pas de cystéine
- certains peptides à cystéine peuvent être perdus lors de la chromatographie d'affinité
- elle ne permet pas de prendre en compte les modifications post-traductionnelles des protéines
- la taille de l'ICAT (500 Da) représente une gêne pour l'analyse des ions fragments en mode MS/MS (le groupement reste accroché sur les peptides).

b) Cleavable Isotope-Coded Affinity Tag - cICAT

Le procédé *Cleavable Isotope-Coded Affinity Tag* ou cICAT a été introduit après l'ICAT pour résoudre les problèmes liés à la grande taille du réactif ICAT. Cette version améliorée de l'ICAT fait intervenir un réactif de marquage utilisant des isotopes du ^{13}C et une biotine clivable par l'action d'un acide (Wu *et al.*, 2006).

c) Isotope-Coded Protein Label - ICPL

L'approche ICAT qui procède par un marquage isotopique des rares résidus cystéines des protéines, présente l'inconvénient de perdre beaucoup d'informations sur la séquence des protéines, surtout par la non prise en compte des modifications post-traductionnelles. L'approche ICPL (*Isotope-Coded Protein Label*) permet de contourner ce problème puisqu'elle est basée sur le marquage isotopique des groupes amine libres beaucoup plus fréquents. Cette technique, applicable à n'importe quel échantillon protéique est compatible avec toutes les méthodes de séparation employées en protéomique. Elle permet une quantification reproductible et plus précise des protéines car elle permet une meilleure couverture de séquence ainsi que la détection des modifications post-traductionnelles (Schmidt *et al.*, 2005).

Le principe de cette approche est présenté sur la figure II.6. Les protéines provenant de deux différents milieux cellulaires ou tissulaires sont extraites, les deux échantillons individuellement alkylés puis marqués sur les amines libres des protéines (figure II.7) soit par le réactif isotopique (lourd), soit par le réactif ne contenant pas d'isotope (léger). Après

mélange des deux échantillons protéiques marqués, n'importe quelle méthode de séparation peut être appliquée aux protéines (1D-GE, 2D-GE, LC par exemple), ou aux peptides issus d'une protéolyse enzymatique (chromatographie liquide multidimensionnelle par exemple) avant l'analyse par spectrométrie de masse.

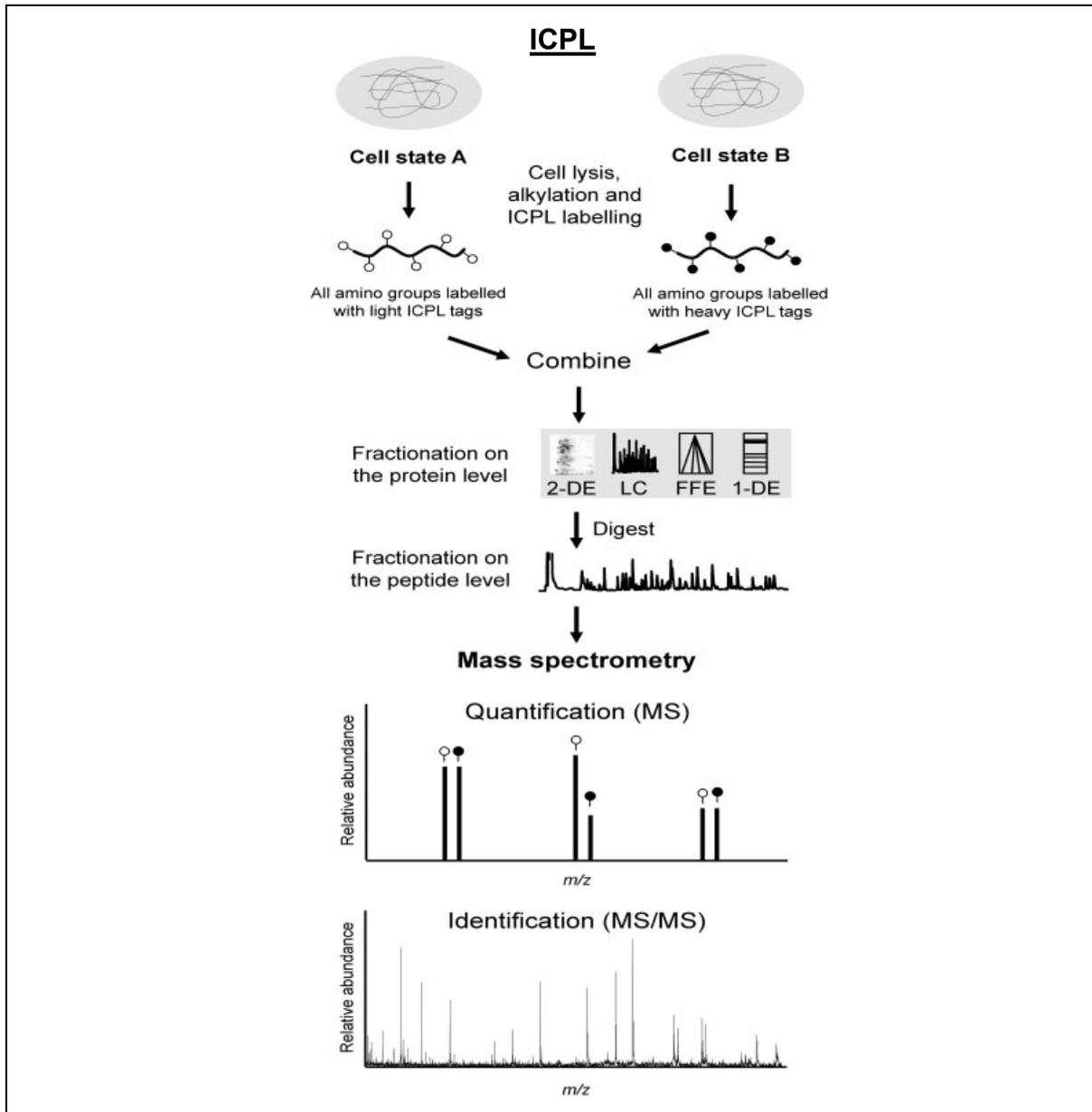


Figure II.6. Schéma du principe de la technique ICPL (*Isotope-Coded Protein Label*) (figure modifiée d'après Schmidt *et al.*, 2005).

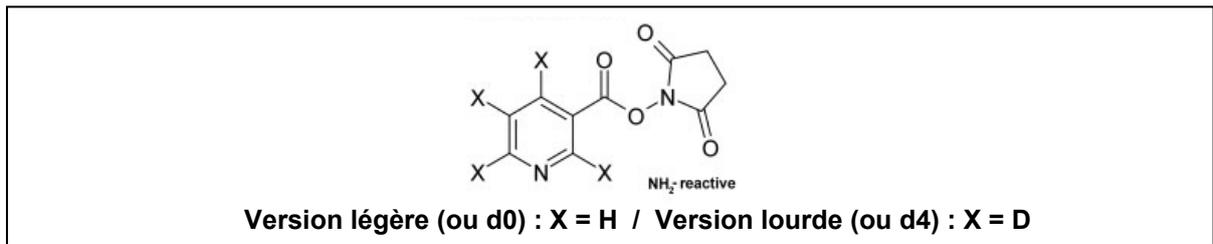


Figure II.7. Structure du réactif utilisé pour le marquage des groupes amine libres dans sa version légère (d0) avec 4 hydrogènes et dans sa version lourde (d4) avec 4 deutériums (figure modifiée d'après Schmidt *et al.*, 2005).

Etant donné que les peptides identiques dérivés de chaque échantillon protéique sont modifiés soit par le réactif ICPL lourd (d4) ou léger (d0) respectivement, ils apparaissent sous forme de doublets en spectrométrie de masse (doublets séparés de 8 Da pour des ions de peptides monochargés contenant une lysine et de 4 Da pour des ions de peptides sans lysine). Le ratio des intensités des pics pour chacune des paires permet d'en déduire une information quantitative relative concernant les protéines des échantillons de départ.

De même que pour le réactif ICAT, le marquage avec les réactifs d0 et d4 présentés sur la figure II.7 induit une légère différence de rétention lors de la chromatographie liquide en phase inverse, ce qui crée un biais lors de la quantification. C'est pourquoi une autre version du réactif ICPL, présentée sur la figure II.8, a été synthétisée en introduisant 6 atomes de ^{13}C (différence de masse de 6,0204 Da entre le réactif ICPL marqué et le réactif non marqué). Ce réactif, commercialisé par la société Bruker, permet un co-élution des paires de peptides (marqué et non marqué) et ainsi une quantification plus précise.

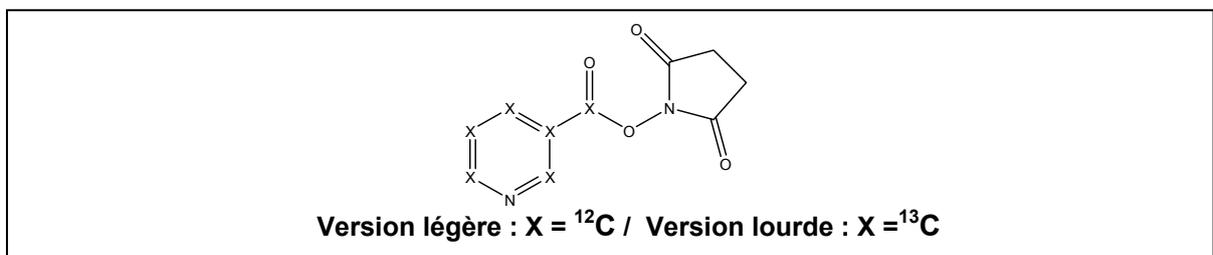


Figure II.8. Structure du réactif utilisé pour le marquage des groupes amine libres (version légère X= ^{12}C et version lourde avec 6 ^{13}C ; <http://www.bruker>).

2. Marquage métabolique : *Stable Isotope Labelling with Amino acid in Cell culture* - SILAC

Le procédé *Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture* ou SILAC repose sur l'incorporation *in vivo* dans les protéines (ou incorporation métabolique) d'un marquage isotopique (Ong *et al.*, 2002). Son principe est présenté sur la figure II.9. Un acide aminé marqué par un agent isotopique stable (deutérium, ^{13}C ou ^{15}N par exemple) est ajouté dans le milieu de culture et se trouve ainsi incorporé aux protéines lors de leur synthèse. L'analyse par spectrométrie de masse permet l'identification et la quantification à partir des paires de peptides marqués/non marqués. Cette stratégie a notamment été utilisée pour étudier les voies de signalisation cellulaire et les interactions protéine-protéine (Ong et Mann, 2007 ; Comuzzi et Sadar, 2006).

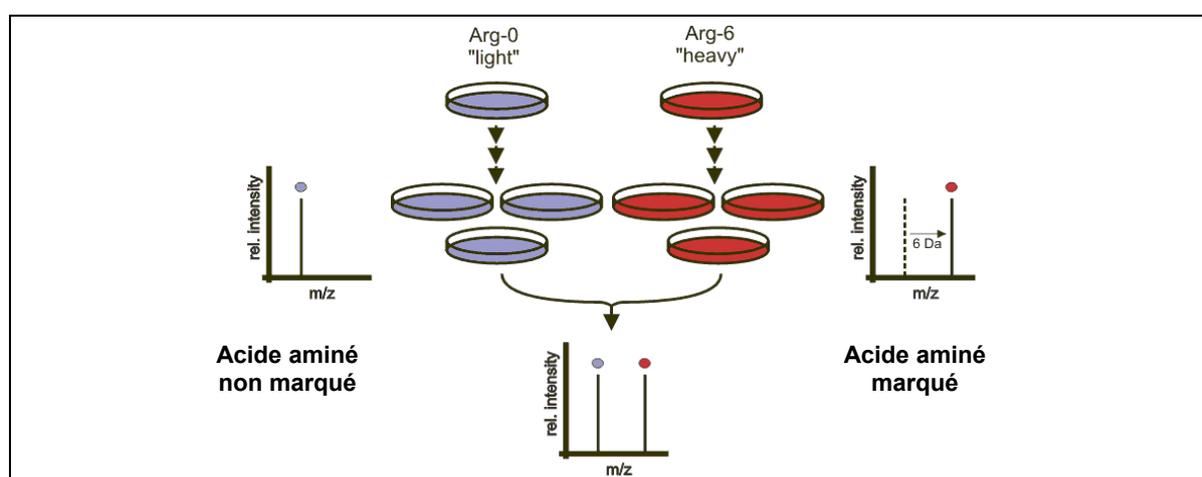


Figure II.9. Principe du procédé *Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture* ou SILAC, mettant en jeu une incorporation d'arginine marquée (figure modifiée d'après www.silac.org).

Qiu *et al.* ont employé cette technique pour quantifier des protéines membranaires de surface avec une technique de LC-MS/MS comprenant un analyseur LTQ (*Linear Ion Trap Mass Spectrometer*). Ils ont comparé manuellement l'abondance relative des ions (aires des pics) correspondant aux peptides marqués et non marqués sur une moyenne d'au moins trois scans MS, et ont confirmé leurs résultats en MS/MS sur les trois fragments les plus abondants de chaque peptide précurseur (Qiu et Wang, 2008).

3. Comparaison des méthodes de quantification relative

Les deux techniques de quantification relative actuellement les plus couramment utilisées en protéomique sont les techniques DIGE (quantification par fluorescence et

identification par spectrométrie de masse) et ICAT (ou cICAT) dans les méthodes de protéomique quantitative basées sur l'électrophorèse (2D DIGE) et la chromatographie liquide respectivement. L'iTRAQ™ est une technique plus récente permettant la quantification relative et absolue des protéines. L'iTRAQ™ est de plus en plus employée comme alternative à l'ICAT. Les techniques ICAT ou cICAT, limitées aux espèces contenant des cystéines, sont au moins aussi sensibles que la technique DIGE (fluorescence) dont la précision de quantification est compromise par la co-migration totale ou partielle des protéines. La technique ICPL présente l'avantage par rapport à la technique ICAT de pouvoir quantifier un plus grand nombre de protéines incluant les modifications post-traductionnelles et les isoformes des protéines étant donné que la fixation du réactif de marquage n'est pas limitée aux cystéines (Schmidt *et al.*, 2005). La technique iTRAQ™, beaucoup plus sensible que les techniques ICAT et DIGE, présente l'avantage de permettre la quantification absolue des protéines (Wu *et al.*, 2006).

Enfin, alors que les premières approches, pour différencier les réactifs de marquage lourds des réactifs de marquage légers, remplacent des atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium, les approches plus récentes emploient des isotopes tels que ¹³C ou ¹⁵N. Ces deux isotopes permettent d'éviter les différences de temps d'éluion lors de la chromatographie en phase inverse des formes lourdes et légères des peptides et de permettre une quantification plus précise (Schmidt *et al.*, 2005).

4. Interprétation quantitative des spectres de masse

Dans ces approches, les protéines sont quantifiées par comparaison des intensités ou des aires des pics de peptides de la forme portant une étiquette isotopique et de la forme native. Dans le cas où plusieurs paires de peptides provenant de la même protéine sont obtenues et analysées, la quantité de la protéine est obtenue en moyennant les valeurs d'intensité ou d'aires issues des différents peptides. Ces approches permettent donc la comparaison relative précise des quantités d'une même protéine; par contre il n'est pas possible de réaliser la quantification relative de différentes protéines étant donné que la réponse d'un spectromètre de masse dépend fortement de la composition d'un peptide en acides aminés et de leur séquence (Havlis et Shevchenko, 2004).

Ces premières techniques de marquage sont adaptées à l'analyse protéomique dans ses applications de quantification d'une même protéine dans différents états, mais ne permettent pas de déterminer la quantité de cette protéine dans son milieu (ou quantification

absolue). Dans notre objectif de dosage de protéine en milieu plasmatique, nous retiendrons cependant de ces techniques le principe du marquage isotopique.

B. Méthodes de quantification relative et absolue

Les méthodes permettant la **quantification absolue** sont plus exigeantes techniquement puisqu'elles nécessitent pour quantifier un peptide donné, d'avoir un étalon interne. En considérant que cet étalon interne doit nécessairement posséder la même séquence que le peptide à doser, les solutions passent par la voie d'un étiquetage isotopique. Deux stratégies de quantification absolue sont actuellement disponibles à partir de sources commerciales (Havlis et Shevchenko, 2004):

- Soit le peptide choisi comme étalon interne est obtenu par protéolyse trypsique d'une solution stock de la protéine d'intérêt puis marqué avec le réactif $H_2^{18}O$ (kit ^{18}O Protéome Profiler, Sigma-Aldrich) pendant cette protéolyse enzymatique ; le réactif iTRAQ™ (Applied Biosystems) peut aussi être utilisé ici.
- Soit le peptide jouant le rôle d'étalon interne peut être synthétisé et marqué avec un isotope stable par une réaction chimique ou enzymatique (kit Protein AQUA™, Sigma-Aldrich)

Les méthodologies iTRAQ™ et ^{18}O Protéome Profiler qui permettent d'effectuer selon leur mode d'utilisation de la quantification absolue ou de la quantification relative de protéines seront présentées successivement ci-dessous, suivies de la stratégie Protein AQUA™, qui permet d'effectuer une quantification absolue de protéines.

1. Marquage chimique : *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation* – iTRAQ™

Le procédé *Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation* ou iTRAQ™ fait appel au marquage de tous les peptides générés par une protéolyse trypsique des protéines au moyen d'un réactif de modification des groupements amino. Le premier kit de réactif proposé par Applied Biosystems permet de réaliser quatre marquages isobares différents. A présent il existe un kit pour étudier huit conditions différentes (Applied) ou dix (Perkin Elmer)

En considérant le cas du système prévu pour quatre échantillons, chaque réactif de marquage comporte une partie dite « rapporteur » réactif, et une partie « balance » qui fixe la masse totale de chaque étiquette à 145 Da quelque soit le réactif (figure II.10). Les échantillons marqués sont mélangés puis fractionnés par nano LC et analysés par MS/MS. Etant donné la masse totale de 145 Da de chaque étiquette quelque soit le réactif, la MS

simple ne peut pas distinguer les différentes étiquettes isobares, ce qui confère un avantage en matière de sensibilité et de complexité de l'échantillon à analyser. L'interrogation des bases de données avec les spectres d'ions fragments obtenus permet l'identification des peptides et par conséquent des protéines d'où ils sont issus. La fragmentation en MS/MS des peptides marqués génère les ions rapporteurs de bas poids moléculaire correspondant au réactif de marquage utilisé. Ces ions, localisés dans la plage de m/z 114 à 117 (zone spectrale normalement dépourvue de signaux dans le cas de peptides non modifiés) fournissent l'information quantitative après intégration de l'aire des pics (www.appliedbiosystems.com ; Wu *et al.*, 2006).

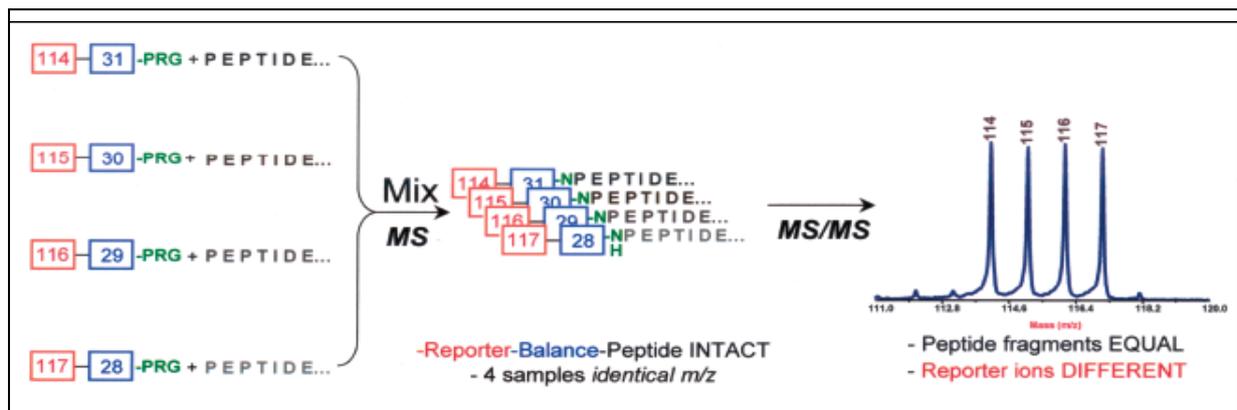


Figure II.10. Principe de l'iTRAQ™ : chaque échantillon est marqué avec un des 4 réactifs iTRAQ™ (www.appliedbiosystems.com)

2. Marquage enzymatique : incorporation de ^{18}O

La technique utilisant le kit ^{18}O Protéome Profiler commercialisé par Sigma-Aldrich est basée sur l'incorporation enzymatique d'une étiquette isotopique stable (^{18}O) aux peptides lors de la digestion trypsique. Après dénaturation, réduction et alkylation, les protéines sont clivées et l'activité enzymatique de la trypsine est utilisée pour incorporer l' ^{18}O pour l'échantillon marqué aux peptides trypsiques. Dans le cas de l'échantillon marqué, la trypsine fonctionne en deux « tours » et est donc capable d'incorporer deux atomes d' ^{18}O par peptide au groupement carboxylique en C-terminal (figure II.11) (Antonov *et al.*, 1981).

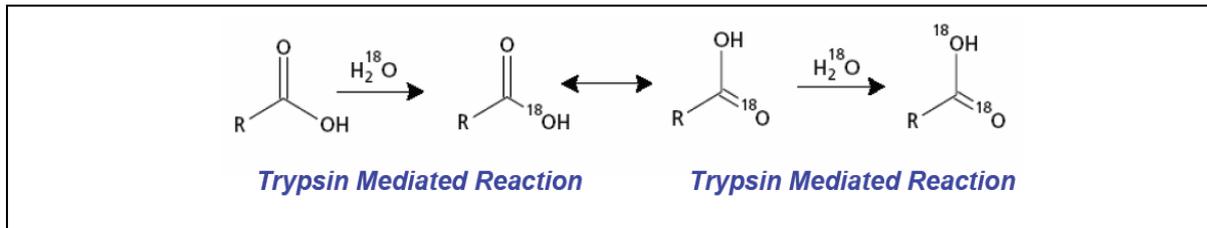


Figure II.11. Incorporation d'¹⁸O catalysée par la trypsine aux deux atomes d'oxygène des groupements carboxyliques en C-terminal des peptides (www.sigma-aldrich.com).

Les deux échantillons préparés sont ensuite mélangés puis analysés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS ou LC-MS). Le peptide marqué (¹⁸O) présente un incrément de masse de + 4 Da par rapport au peptide non marqué (¹⁶O) et la quantification est effectuée par comparaison de l'intensité ou de l'aire de chacun des deux pics intégrés (figure II.12).

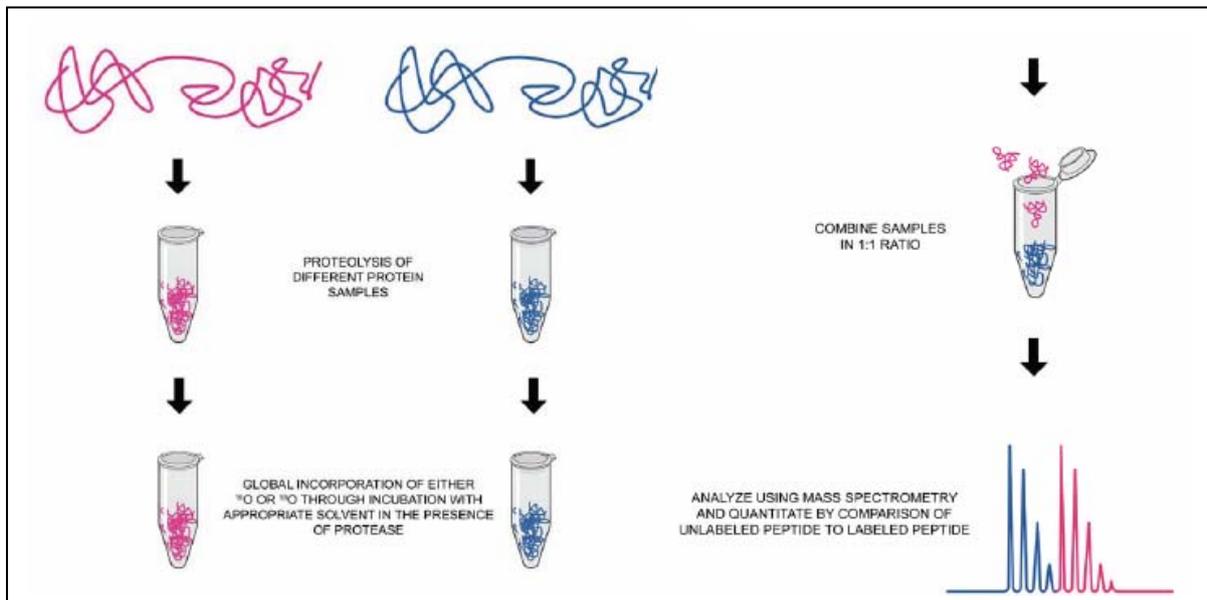


Figure II.12. Les deux échantillons sont préparés parallèlement jusqu'à la protéolyse incorporant une étiquette ¹⁶O ou ¹⁸O puis mélangés et analysés par spectrométrie de masse (www.sigma-aldrich.com).

Le kit ¹⁸O Proteome Profiler utilisé pour la quantification relative est une technique d'efficacité comparable à l'ICAT et paraît plus économique. Cependant, l'étape supplémentaire de chromatographie d'affinité dans la technique ICAT présente l'avantage de diminuer la complexité de l'échantillon avant l'analyse par spectrométrie de masse.

La technique ¹⁸O Protéome Profiler permet également d'effectuer la quantification absolue d'une protéine dans son milieu. La quantification absolue nécessite un étalon interne, que cette technique permet de fournir par protéolyse trypsique d'une solution stock

de la protéine d'intérêt dans un tampon contenant $H_2^{18}O$. Lors de la protéolyse, les atomes d' ^{18}O sont incorporés aux peptides tryptiques en C-terminal. La plupart des peptides qui comportent des lysines en C-terminal incorporent un atome d' ^{18}O alors que les peptides qui comportent des arginines en C-terminal incorporent deux atomes d' ^{18}O , et leur différence de masse par rapport à la masse du même peptide non marqué est de 2 ou de 4 Da respectivement (Havlis et Shevchenko, 2004). Les peptides ainsi marqués par l' ^{18}O sont ajoutés au mélange de peptides issus de la protéine à quantifier et servent de référence pour la quantification absolue par comparaison des aires du peptide marqué de référence et de l'analyte (Havlis et Shevchenko, 2004). La concentration de la protéine d'intérêt est directement proportionnelle à la moyenne des concentrations de chacun des peptides tryptiques, dans des conditions expérimentales pour lesquelles le rendement de protéolyse est voisin de 100 %. Cette méthode est simple, robuste et compatible avec les techniques MALDI- et ESI-MS (Havlis et Shevchenko, 2004).

3. Critères de choix des peptides utilisés pour la quantification absolue

Les peptides de chaque paire (le peptide à quantifier et son homologue marqué par exemple servant d'étalon interne) utilisés pour la quantification absolue doivent être stables et abondants. Les peptides possédant une arginine en C-terminal bénéficient d'une détection favorable en spectrométrie de masse MALDI, et l'écart de masse de 4 Da généré par le marquage à l' ^{18}O (kit ^{18}O Proteome Profiler) en fait des étalons internes plus intéressants.

Le choix d'un ou de plusieurs peptides comme étalons internes doit prendre en compte la modification possible de certains acides aminés. Certains peptides sont à exclure s'ils :

- sont susceptibles de subir une oxydation sur les méthionines ou les tryptophanes ou une désamidation des asparagines (Havlis et Shevchenko, 2004)
- contiennent des séquences susceptibles d'être partiellement clivées telles que RK, RR, ou KK
- contiennent des séquences instables telles que Asp-Gly, Asp-Pro
- contiennent des séquences avec des cystéines et pouvant subir des modifications chimiques
- contiennent des séquences ayant Gln ou Asn en N-terminal.

Cependant, les critères de sélection du peptide étalon interne les plus pertinents sont son efficacité d'ionisation ainsi que ses propriétés de fragmentation en MS/MS (Heudi *et al.*, 2008).

D'autre part, les séquences des peptides retenus pour la quantification d'une protéine dans le plasma doivent être recherchées dans les bases de données, telles que *UniProt/Swissprot*, de façon à s'assurer qu'ils sont absents du plasma de l'espèce concernée (Heudi *et al.*, 2008).

C. Méthodes de quantification absolue exclusivement

1. La stratégie Protein AQUA™

La stratégie Protein AQUA™ a été introduite en 2003 par Gygi *et al.* (Gerber *et al.*, 2003) et commercialisée par Sigma-Aldrich. Cette technique permet l'étude quantitative des protéines dans des échantillons biologiques complexes ; elle est applicable par exemple à l'étude de l'expression d'une protéine spécifique. Elle permet d'effectuer la quantification absolue des protéines par LC-MS en utilisant comme étalon interne un peptide dont la composition isotopique a été modifiée, appelé AQUA™ peptide.

L'AQUA™ peptide est un peptide tryptique synthétique correspondant au peptide d'intérêt. Chaque AQUA™ peptide possède une étiquette isotopique stable. Il s'agit d'un acide aminé modifié par un ou plusieurs isotopes, créant une incrémentation de masse de 6 à 10 Da. Les différents acides aminés et la nature de leurs marquages possibles sont présentés dans le tableau II.1.

Tableau II.1. Différents acides aminés marqués pouvant constituer l'AQUA™ peptide (www.sigma-aldrich.com)

Acides aminés marqués par des isotopes stables (¹³ C, ¹⁵ N)	Différence de masse entre le peptide natif et l'AQUA peptide
L-Arginine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	10 Daltons
L-Isoleucine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N	7 Daltons
L-Leucine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N	7 Daltons
L-Lysine- ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂	8 Daltons
L-Phénylalanine- ¹³ C ₉ , ¹⁵ N	10 Daltons
L-Proline- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	6 Daltons
L-Valine- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	6 Daltons

Ainsi, l'AQUA™ peptide et le peptide natif co-éluent en chromatographie, migrent en même temps en électrophorèse et s'ionisent en spectrométrie de masse avec la même intensité.

Le choix du meilleur peptide candidat au marquage doit respecter plusieurs critères :

- Peptide de 6 à 20 acides aminés (voire entre 8 et 15) pour une rétention chromatographique et une fragmentation favorables
- Elimination des peptides contenant des résidus chimiquement réactifs (C, M, V) et des résidus chimiquement instables (NG, DG, QG, N-term N, N-term Q)
- Elimination des peptides comportant des lysines et des arginines internes susceptibles d'être clivées par la trypsine (« *missed-cleavages* » potentiels)
- Elimination des peptides présentant un Temps de rétention (Tr) trop bas (inférieur à 3 minutes) ou trop haut (supérieur à 30 minutes), l'idéal étant entre 10 et 20 minutes.
- Elimination des peptides ayant des sites connus de modifications post-traductionnelles

La stratégie dans son ensemble est présentée sur la figure II.13.

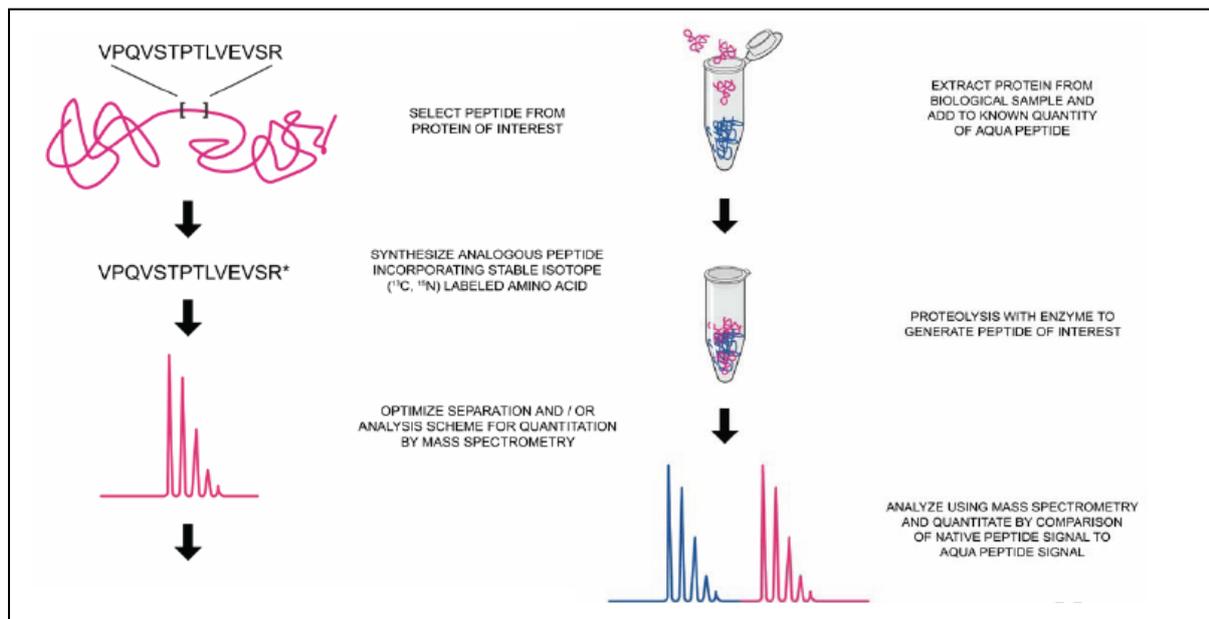


Figure II.13. Schéma de synthèse de la stratégie Protein AQUA™ (www.sigma-aldrich.com).

Les chromatogrammes correspondant au peptide natif à quantifier et à l'AQUA™ peptide sont extraits (figure II.14 gauche), ainsi que les spectres correspondant à chacune des deux espèces (figure II.14 droite).

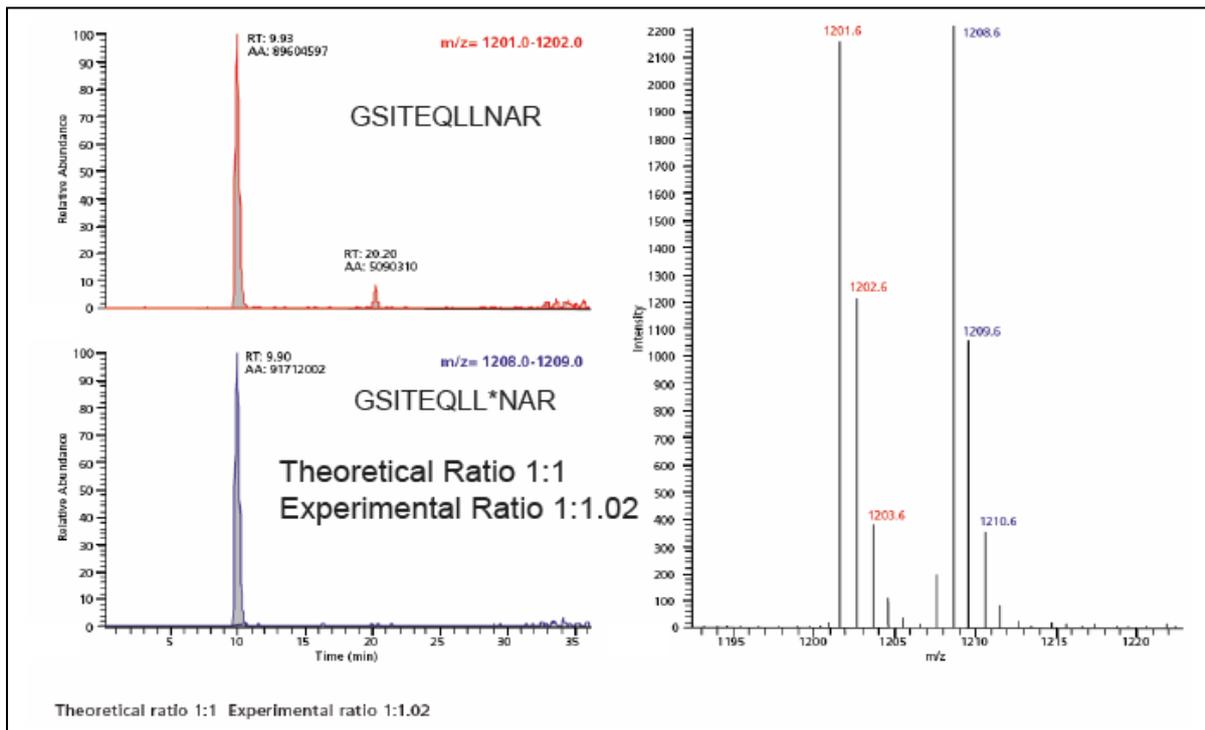


Figure II.14. Chromatogrammes correspondant au peptide natif et à l'AQUA™ peptide (à gauche) et spectre de masse correspondant à chacune des deux espèces (à droite) (www.sigma-aldrich.com).

La quantification du peptide natif est effectuée en calculant soit le ratio des aires de pics chromatographiques (AA sur la figure), soit le ratio des intensités des ions sur le spectre de masse.

La technique de quantification nécessite donc l'ajout systématique à l'échantillon à analyser d'une quantité connue d'un autre composé dont le pic d'éluion est proche du pic du composé à quantifier

Havlis et Shevchenko ont appliqué parallèlement les techniques de quantification absolue Protein AQUA™ et ¹⁸O Proteome Profiler à des échantillons protéiques séparés préalablement par une technique électrophorétique puis protéolysés par la trypsine. Ils ont montré des résultats de quantification similaires pour les deux échantillons et ont conclu que les résultats de quantification ne dépendaient pas du type d'étalon interne employé (Havlis et Shevchenko, 2004).

2. Une stratégie n'utilisant pas de marquage chimique mais un peptide de structure et de masse proches

Colgrave *et al.* ont mis au point une technique de quantification dans le plasma de rat par spectrométrie de masse MALDI-TOF d'un peptide macrocyclique végétal à propriétés thérapeutiques. Après précipitation des protéines plasmatiques à l'acétonitrile et centrifugation, le surnageant est directement déposé sur une cible MALDI-TOF. La quantification du peptide est effectuée au moyen d'un peptide macrocyclique étalon qui diffère du peptide à doser par cinq mutations (différence de masse de 63,03 Da). L'étalon interne est ajouté à l'échantillon plasmatique avant la précipitation. La limite de quantification du peptide macrocyclique par cette méthode est de 9 fmoles déposées. (Colgrave *et al.*, 2005).

Yang *et al.* ont mis au point une technique de quantification absolue dans le plasma humain d'une hormone de croissance humaine (la somatropine) et d'un anticorps monoclonal (mAbX) en utilisant comme étalon interne des peptides d'une autre protéine. Les peptides servant d'étalon interne sont sélectionnés sur la base de la proximité de leur temps de rétention avec les temps de rétention des peptides choisis pour quantifier la protéine, et de l'absence d'interférence avec le plasma. La recherche du caractère unique des peptides servant à la quantification est effectuée dans les bases de protéines humaines. Le plasma à analyser est soumis à protéolyse trypsique puis les peptides sont séparés par chromatographie. La quantification est effectuée au moyen de l'aire des pics chromatographiques. D'après ces auteurs, la technique utilisant comme étalon interne des peptides non marqués donnerait des résultats similaires à l'ajout d'un peptide deutéré et présenterait l'avantage de prendre en compte la variabilité liée à la préparation de l'échantillon et à la protéolyse (Yang *et al.*, 2007).

3. Nature et place de l'étalon interne dans les stratégies de quantification absolue des protéines

L'utilisation d'un étalon interne est nécessaire pour la quantification absolue précise et reproductible, particulièrement lorsque la préparation de l'échantillon nécessite de nombreuses étapes. La quantification des protéines basée sur les peptides, l'emploi d'un peptide marqué par un isotope stable et l'analyse en LC-MS/MS a déjà fait ses preuves dans de nombreuses thématiques. En effet, de nombreux groupes ont appliqué cette approche pour la quantification dans le plasma humain de l'antigène spécifique de la prostate (Barnidge *et al.*, 2004), de protéines d'abondance intermédiaire (Lin *et al.*, 2006), de la protéine C réactive (Kuhn *et al.*, 2004) et des apolipoprotéines (Kay *et al.*, 2007). Dans toutes ces approches,

l'étalon interne est un peptide marqué par un isotope stable, ajouté à l'échantillon plasmatique après l'étape de protéolyse trypsique. Dans ce cas, la quantité de l'étalon interne n'est pas affectée par une éventuelle variabilité de la protéolyse enzymatique (Heudi *et al.*, 2008).

Pour contourner ce problème, des protéines analogues ont été utilisées comme étalon interne pour doser par exemple la myoglobine dans le sérum humain (Mayr *et al.*, 2006) ou un anticorps monoclonal dans le sérum de rat (Yang *et al.*, 2007 ; Dubois *et al.*, 2008). Cependant, les protéines analogues n'ont pas des propriétés biochimiques strictement identiques à la protéine à quantifier et ne permettent pas de corriger précisément les pertes qui ont lieu lors de la préparation de l'échantillon. Une étude de quantification absolue d'un biomarqueur de la polyarthrite rhumatoïde a montré que le taux de récupération de la protéine dans le plasma n'était que de 60 % (Kuhn *et al.*, 2004). D'autres études portant sur la quantification de quatre protéines en LC-MS/MS ont montré que des pertes significatives de protéines durant la phase de préparation de l'échantillon pouvaient survenir (Lin *et al.*, 2006).

C'est pourquoi, certains auteurs ont développé des méthodes de quantification absolue d'une protéine en utilisant comme étalon interne la même protéine marquée par un isotope stable. Une telle approche présente deux avantages par rapport à l'utilisation d'un peptide synthétique marqué : d'une part elle permet de prendre en compte les pertes lors de la préparation de l'échantillon, et d'autre part, elle permet lors de la mise au point de la technique de choisir et de changer de peptide servant à la quantification. Ainsi, Heudi *et al.* ont mis au point une méthode de quantification d'un anticorps monoclonal dans du sérum de marmouset en utilisant comme étalon interne le même anticorps monoclonal mais dont chaque thréonine est marquée par quatre ^{13}C et un ^{15}N (Heudi *et al.*, 2008).

Enfin, signalons qu'une étude préliminaire de quantification du metelimumab, un autre anticorps monoclonal, mais utilisant comme étalon interne le même anticorps marqué au ^{14}C un isotope radioactif, a été effectuée chez le rat en utilisant comme technique analytique l'*Accelerator Mass Spectrometry* (AMS). La quantification basée sur le ratio $^{12}\text{C} : ^{14}\text{C}$ mesuré en protéine entière présente une limite (LOQ) approximativement quinze fois plus faible que celle obtenue en ELISA, malgré le très faible taux d'incorporation du ^{14}C à l'anticorps (Lappin *et al.*, 2006).

Il ressort de l'examen de ces différentes stratégies de quantification absolue qu'un étalon interne doit prendre en compte le plus possible d'étapes de la préparation de l'échantillon, et que l'utilisation d'un marquage par un isotope stable reste le système le plus fiable en vue d'une analyse par spectrométrie de masse.

IV. Quelle technique de spectrométrie de masse paraît la mieux adaptée pour doser une protéine dans le plasma ?

Au sein d'un mélange, des protéines entières présentent en MALDI-TOF une limite de détection de l'ordre de 100 fmoles à 1 pmole. Le dosage de protéines intactes a été pratiqué en LC-ESI-MS et présente une sensibilité suffisante (20 ng/mL ; la valeur en moles n'est pas communiquée) et une bonne reproductibilité pour être applicable aux études de pharmacocinétique (Dubois *et al.*, 2008). Mais actuellement, ces méthodes sont limitées aux petites protéines de masses moléculaires inférieures à 10 000 Da, et leur extension à des protéines plus grosses ou aux anticorps monoclonaux reste un défi à relever (Dubois *et al.*, 2008).

Une stratégie alternative consiste à doser les peptides obtenus par clivage protéolytique. La sensibilité est alors bien meilleure (sub-femtolaire) et les fragments obtenus en MS/MS à partir des peptides précurseurs permettent d'identifier sans ambiguïté une protéine.

Les technologies de type MALDI utilisées en mode MS ou MS/MS permettent d'effectuer des mesures de masses exactes mais sont plus adaptées à l'identification qu'à la quantification de protéine. La quantification en MALDI est cependant réalisable avec l'introduction d'au moins un peptide marqué par un isotope qui est indispensable pour le dosage. Mais les techniques MALDI sont limitées en sensibilité pour des échantillons peptidiques complexes étant donné que la totalité de l'acquisition d'un échantillon se retrouve sur un seul spectre chargé d'espèces. D'autre part, une technologie de type MALDI présente l'inconvénient de la suppression spectrale dans le cas de mélanges. Ce phénomène, variable en fonction de la concentration des espèces, peut fortement affecter la LOD. Aussedat *et al.* ont quantifié des peptides capables de pénétrer dans des cellules en MALDI-TOF-MS en utilisant un étalon interne de même séquence que le peptide d'intérêt mais marqué par un isotope stable (Aussedat *et al.*, 2006).

Pour un échantillon complexe tel que le plasma, le couplage de la spectrométrie de masse à la chromatographie liquide permet en une seule analyse de détecter plus d'espèces séparées par la chromatographie et non visibles en MALDI sur un unique dépôt (Koomen et Zhao, 2005). Une technique de LC-MS/MS paraît indispensable pour quantifier des protéines dans un mélange hautement complexe (Havlis et Shevchenko, 2004), en utilisant la sensibilité et la spécificité du mode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) qui sera décrit dans le chapitre 3 (Janecki *et al.*, 2007 ; Heudi *et al.*, 2008).

Par ailleurs, le fractionnement ou l'enrichissement de l'échantillon protéique plasmatique à analyser paraît indispensable pour réduire la complexité des mélanges de peptides avant l'analyse par spectrométrie de masse et pour améliorer la détection de protéines peu abondantes (Koomen et Zhao, 2005).

Les deux principaux modes d'ionisation utilisés pour quantifier des protéines et des peptides en spectrométrie de masse sont donc les modes MALDI et ESI. Ces deux technologies sont intéressantes car complémentaires, la première permettant d'effectuer des analyses simples et rapides d'un échantillon simplement déposé sur une cible métallique, le second généralement couplé à la chromatographie liquide permettant d'atteindre de meilleures sensibilités. Les sources MALDI et ESI seront présentées dans le chapitre 3 avec les modes de fonctionnement des analyseurs simples et complexes qui leur sont associés.

CHAPITRE 3

INSTRUMENTATION

CHAPITRE 3 :

INSTRUMENTATION

L'utilisation des spectromètres de masse pour décrire les processus biologiques remonte à la fin des années 1930, mais les améliorations techniques apportées ces deux dernières décennies ont rendu ces instruments incontournables pour l'étude des molécules biologiques. En effet, à partir de la fin des années 1980, l'apparition de deux processus d'ionisation peu énergétiques, a révolutionné la spectrométrie de masse des biomolécules. Ces deux processus sont la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) (Karas et Hillenkamp, 1988) et l'ionisation électrospray (ESI) (Fenn *et al.*, 1989). Nous avons utilisé ces deux méthodes complémentaires dans l'approche de l'analyse des biomolécules et nous les décrirons brièvement ici, ainsi que les analyseurs utilisés.

Un spectromètre de masse se compose de trois parties distinctes : une source, un analyseur et un détecteur. Les espèces ionisées amenées en phase gazeuse au sein de la source sont séparées par l'analyseur suivant leur rapport masse sur charge (m/z) avant d'atteindre le détecteur. Pour notre étude, nous avons utilisé quatre types d'analyseurs : à temps de vol (TOF), piège ionique (IT ou *Ion Trap*) et hybrides quadripôle-temps de vol (Q-TOF) et quadripôle-piège ionique (Q-TRAP).

Les modes d'ionisation ESI et MALDI présentent la particularité de produire des ions stables à partir de biomolécules. Pour espérer obtenir une information sur la structure de ces molécules, il faut déstabiliser ces ions. C'est le rôle attribué à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Le mode MS/MS implique au moins deux étapes d'analyse de masse, ainsi qu'un processus de Dissociation Induite par Collision (CID). Un premier analyseur (MS1) sert à isoler un ion précurseur qui ensuite subit spontanément ou par activation une fragmentation donnant des ions produits et des fragments neutres (Equation III.1). Un second analyseur (MS2) analyse les ions produits.



L'intérêt de la MS/MS réside tout d'abord dans l'étude des filiations ioniques (scan descendant). La sélection des ions les uns après les autres permet l'étude des voies de fragmentation et l'accès à une information structurale fiable. Un autre intérêt de la MS/MS

découle de la possibilité de sélectionner un ion par le premier analyseur et de l'isoler ainsi au sein d'un mélange. Enfin d'autres modes de balayages (scan ascendant ou analyse des pertes de neutres) complètent l'ensemble des expériences réalisables en mode MS/MS. Notons aussi que cette dernière peut fonctionner dans l'espace (deux analyseurs séparés par une cellule de collision). C'est le cas des triples quadripôles [QqQ] et des spectromètres de masse hybrides tels que Q-TOF et Q-TRAP. Par opposition, le piège ionique offre la possibilité d'opérer avec un mode MS/MS dans le temps.

I. Spectrométrie de masse MALDI

A. La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

1. Principe de l'ionisation MALDI

L'introduction en 1988 de la source de désorption et d'ionisation laser assistée par matrice (MALDI pour *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) est due principalement à Karas et Hillenkamp (Karas et Hillenkamp, 1988 ; Hillenkamp *et al.*, 1991). Tanaka a obtenu en 2002 le prix Nobel de chimie pour le développement de méthodes d'ionisation par désorption douce pour l'analyse par spectrométrie de masse de macromolécules biologiques (Tabet et Rebuffat, 2003).

Dans la phase de préparation d'échantillon, la substance à analyser est mélangée à une solution de petites molécules organiques, appelées matrice, possédant une bande d'absorption à la longueur d'onde d'émission du laser (le plus souvent dans l'UV). Cette solution est déposée sur une surface métallique, appelée cible MALDI, et le solvant est alors évaporé avant l'analyse. Le résultat est un dépôt de matrice/analyte co-cristallisé où les cristaux de matrice sont dopés en molécules d'analyte. La cible est ensuite introduite dans la source du spectromètre de masse, maintenue sous vide.

Dans la source du spectromètre de masse, qui fonctionne sous un vide de l'ordre de 10^{-7} Torr environ pour le mode MALDI classique, l'échantillon est irradié par de brèves impulsions laser. La matrice a une concentration environ 10 000 fois supérieure à celle de l'analyte, et c'est elle qui absorbe la majeure partie de l'énergie des photons laser. Les molécules de matrice amenées dans un état excité induisent l'accumulation d'une grande quantité d'énergie dans la phase condensée. Cette énergie est rapidement convertie en mouvements thermiques des molécules de matrice dans un volume de cristal situé à proximité de la surface, qui engendre la sublimation des cristaux de matrice puis l'expansion de la matrice en phase gazeuse entraînant l'analyte intact. Pendant l'expansion du nuage moléculaire formé, l'analyte s'ionise par transfert de protons de la matrice vers l'analyte ou encore par

collision des molécules entre elles. Notons que l'ionisation de l'échantillon peut également avoir lieu dans la phase solide, avant l'irradiation. Les protons proviennent majoritairement de la matrice (protons labiles des groupements carboxyliques ou hydroxyliques) mais aussi du solvant de l'analyte. La figure III.1 représente une vue schématique du processus de désorption et d'ionisation MALDI. Les ions formés en phase gazeuse sont majoritairement des ions monochargés $[M+H]^+$.

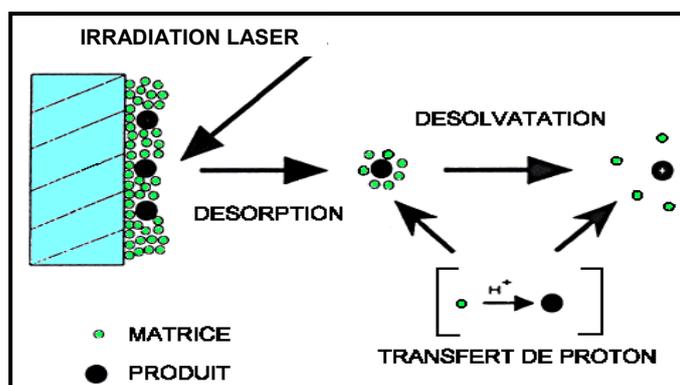


Figure III.1. Schéma de principe de l'ionisation MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) (figure modifiée d'après de Hoffmann, 2005).

L'utilisation d'impulsions laser (impulsions de durée 3 à 5 ns pour un laser N_2) permet de transférer de l'énergie aux cristaux en un temps très court, ce qui réduit la possibilité de décomposition thermique de l'analyte.

Les ions produits sont extraits de la source par une différence de potentiel élevée (de l'ordre de 20 à 30 kV), et amenés ainsi vers l'analyseur. Ce dernier est le plus souvent un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF).

2. Préparation de l'échantillon pour une analyse par MALDI

Le choix de la matrice et du protocole de préparation de l'échantillon sont les étapes les plus importantes dans l'analyse MALDI, car la production d'ions et la qualité des résultats obtenus dépendent fortement de ces deux facteurs.

a) Choix de la matrice

Le choix de la matrice MALDI dépend de la longueur d'onde du laser utilisé. Le type de laser utilisé pour l'analyse de protéines et peptides est le plus souvent un laser UV à azote (longueur d'onde d'émission 337 nm). Ce choix dépend aussi des caractéristiques

physico-chimiques des analytes (par exemple critère de taille des peptides *versus* celle des protéines). Pour certaines applications telles que l'analyse d'ions métastables (*Post Source Decay*), il faut aussi tenir compte de l'affinité protonique de la matrice. Les matrices couramment utilisées dans les applications de protéomique sont présentées dans le tableau III.1.

Tableau III.1. Différentes matrices utilisées en MALDI et leurs applications.

Matrices	Analytes	Affinités protoniques (kJ.mol ⁻¹)
Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)	Peptides Protéines de faibles masses Glycopeptides	841
Acide 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique) (SA)	Protéines de hautes masses Peptides	887
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (acide gentisique) (DHB)	Peptides Oligosaccharides Glycopeptides	943
Acide 2-hydroxy-4-phénylazobenzoïque	Peptides Protéines Glycoprotéines	943

Pour l'analyse des peptides et l'obtention d'une carte peptidique, l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique est la matrice la plus couramment employée. Par contre, pour l'analyse des composés de hautes masses dont les protéines, l'acide sinapinique est mieux adapté (Beavis et Chait, 1989).

Il faut également noter que la matrice, et en particulier l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique a tendance à co-cristalliser de manière préférentielle avec les peptides et protéines, ce qui permet une tolérance intéressante envers des quantités assez importantes de contaminants (tableau III.2).

Tableau III.2. Valeurs supérieures de concentration de différents contaminants tolérées par la technique MALDI-TOF.

Contaminant	Concentration maximale tolérée
Urée	0,5M
Guanidine-HCl	0,5M
Dithiotréitol	0,5M
Glycérol	1%
Tampon Tris	0,05M
NH ₄ HCO ₃	0,05M
Tampon Phosphate	0,01M
Détergent (sauf SDS)	0,1%
SDS	0,01%

b) Méthode de préparation de l'échantillon

Un grand nombre de méthodes de préparation d'échantillon ont été décrites. Les principales méthodes de dépôts sont : la goutte séchée (figure III.2), la couche mince et le sandwich (figure III.3). La méthode de préparation originelle qui est toujours la plus largement répandue est celle dite de la « goutte séchée » (*dried droplet*). C'est la seule technique que nous ayons employée, n'ayant pas trouvé d'avantage particulier aux autres méthodes pour le type d'analyse effectué. Dans ce cas, une solution de matrice (entre 3 et 10 mg/mL dans H₂O/ACN 50/50 v/v 0,1 % TFA) est mélangée à la solution d'échantillon de façon à obtenir un rapport matrice/échantillon compris entre 5000/1 et 10 000/1 environ. Ce mélange (0,5 à 1 µL) est alors déposé sur la cible métallique (acier inoxydable dans notre cas). La gouttelette est séchée à température ambiante, et quand le liquide s'est complètement évaporé pour former des cristaux, l'échantillon peut être chargé dans le spectromètre de masse. Pour ces techniques de dépôt, une étape supplémentaire de rinçage sur cible peut être effectuée après la cristallisation du mélange matrice-échantillon, dans le but d'éliminer certains contaminants (notamment les sels non volatils) avant l'analyse pour améliorer la sensibilité.

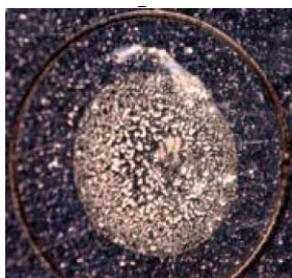


Figure III.2. Aspect d'un dépôt effectué avec la méthode de la goutte séchée.



Figure III.3. Aspect d'un dépôt effectué avec la méthode de la couche mince (à gauche), et avec la méthode sandwich (à droite).

B. L'analyseur à temps de vol (*Time of Flight*, TOF)

De par son principe, l'analyseur à temps de vol est le plus simple de tous. C'est Dempster en 1918 qui le premier a introduit l'usage de faisceaux monoénergétiques en appliquant une différence de potentiel (V_0) à la sortie d'une source d'ions. Mais il a fallu attendre 1955 pour voir l'élaboration par Wiley et McLaren d'un spectromètre à temps de vol proche de ceux qui sont utilisés actuellement (de Hoffmann, 2005).

1. Analyseur à temps de vol linéaire

Le schéma de principe est donné sur la Figure III.4. La différence de potentiel V_0 appliquée à la sortie de la source d'ions confère une énergie cinétique au faisceau ionique ($\frac{1}{2}mv^2$) homogénéisée à la valeur zV_0 :

$$\frac{1}{2}mv^2 = zV_0 = \text{constante} \quad (\text{Equation III.2})$$

Cette égalité contient le rapport m/z que l'on peut déduire directement de la vitesse v , donc du temps t (temps de vol) que met l'ion à franchir une distance fixe d pour atteindre le détecteur :

$$m/z = 2V_0 t^2/d^2 \quad (\text{Equation III.3})$$

L'équation III.2 montre que deux ions de masses différentes et de même charge auront des vitesses différentes, puisqu'ils ont la même énergie cinétique. Ils auront donc dans l'analyseur des temps de vol différents, ce qui permet donc de les trier selon leur valeur de m/z . La longueur du tube de vol peut varier selon la résolution recherchée ; elle est couramment de l'ordre du mètre pour les spectromètres utilisés en analyse protéomique. L'étalonnage du spectromètre est réalisé à l'aide d'un mélange de molécules de masses connues, permettant d'associer un temps de vol donné à un rapport m/z .

Ceci constitue le mode linéaire de détection utilisé notamment pour l'analyse de protéines de haut poids moléculaire. En théorie, la gamme de masse accessible grâce à l'analyseur TOF est infinie. En pratique, les détecteurs couramment utilisés sont des galettes à multicanaux, dont la sensibilité décroît très fortement pour les composés de hautes masses (au-dessus de 100 kDa). L'utilisation d'une nouvelle génération de détecteur a

cependant permis de mesurer avec succès la masse de molécules telles que des IgM aux environs de 1 MegaDaltons (détecteur hautes masses CovalX [www.covalx.com]).

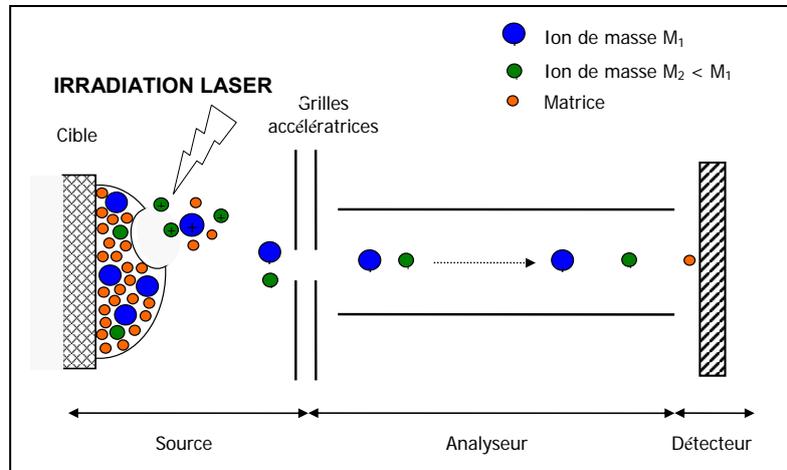


Figure III.4. Schéma de principe d'un analyseur à temps de vol linéaire (figure modifiée d'après de Hoffmann, 2005).

En ce qui concerne la résolution, celle-ci est définie par la distribution du temps de vol d'une population d'ions de même masse. Différents facteurs sont susceptibles d'altérer cette résolution, notamment la distribution des énergies cinétiques initiales des ions au sortir de la source et la dispersion angulaire du faisceau ionique.

La mise au point de l'extraction retardée, qui consiste à homogénéiser les énergies cinétiques des ions dans la source avant leur injection dans l'analyseur a beaucoup amélioré les performances instrumentales. Il en est de même de l'interposition de miroirs électrostatiques sur le trajet ionique. Ces miroirs appelés aussi « réflectrons » compensent les différences de vitesse pour une valeur m/z donnée en imposant des trajets à parcourir d'autant plus longs que les ions sont plus rapides.

2. Principe de l'extraction retardée

Dans les premiers spectromètres MALDI-TOF vers 1990, les ions formés dans la source étaient immédiatement extraits par une tension appliquée sans interruption. Dans ces conditions, des ions de même m/z mais ayant une énergie cinétique différente (parce qu'ils ont été formés avec des positions différentes dans la source, et/ou avec des directions différentes) atteignent le détecteur à des temps légèrement différents, ce qui conduit à une détérioration de la résolution.

En mode d'extraction retardée (Brown et Lennon, 1995), le champ d'extraction est appliqué avec un temps de retard (de quelques dizaines de ns à environ 200 ns) par rapport à l'éjection des ions. La figure III.5 montre le principe de l'extraction retardée. En l'absence de champs électrique, les ions se déplacent sous l'effet de leur propre énergie cinétique dans la région libre de champ (en a sur la figure III.5). Durant cette période, pour les ions de même m/z , les ions initialement les plus rapides se rapprocheront plus du détecteur que les ions initialement les plus lents. Selon leur localisation dans la source au moment de l'application de l'impulsion électrique, les ions ne recevront pas la même énergie. En sortie de source, la tension d'extraction appliquée après un certain laps de temps transmettra une énergie plus importante lors de l'accélération aux ions qui initialement possédaient moins d'énergie cinétique (en b sur la figure III.5).

D'autre part, les ions qui initialement possédaient moins d'énergie cinétique et qui sont donc les plus distants du détecteur resteront plus de temps dans la zone d'accélération puisqu'ils doivent parcourir une plus longue distance, mais auront une vitesse de vol plus élevée à la sortie puisqu'ils subissent l'accélération plus longtemps. Même si ces ions sortent de la zone d'accélération avec du retard, ils vont grâce à leur plus grande vitesse de vol rejoindre les ions de plus forte énergie initiale au niveau du détecteur (en c sur la figure III.5).

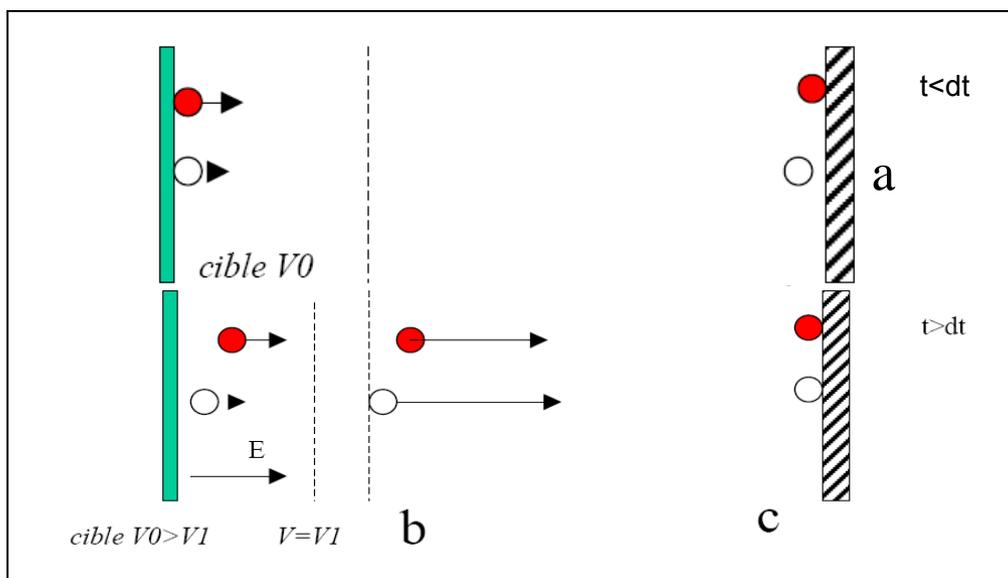


Figure III.5. Schéma de principe de l'extraction retardée (figure modifiée d'après de Hoffmann, 2005).

3. Analyseur à temps de vol en mode réflectron

L'extraction retardée n'est cependant pas suffisante pour corriger la dispersion énergétique des ions dans le mode de détection linéaire. L'utilisation d'un réflectron ou miroir

électrostatique permet d'améliorer notablement la résolution. Le réflectron est constitué d'une série de grilles ou d'électrodes annulaires portées à des potentiels croissants et qui définissent un champ électrique homogène de sens opposé au champ électrique d'accélération. La différence de potentiel appliquée ralentit les ions jusqu'à obtenir une vitesse nulle et leur réflexion vers un autre détecteur que le détecteur du trajet linéaire (Figure III.6)

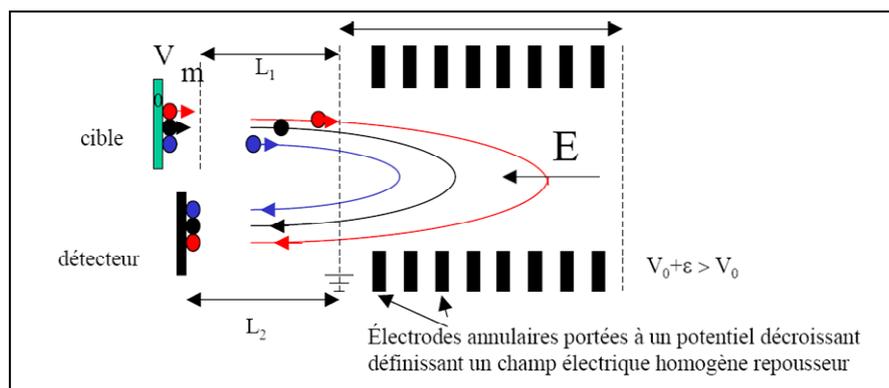


Figure III.6. Schéma d'un instrument à temps de vol équipé d'un réflectron. Les ions ayant une énergie cinétique plus élevée ont un trajet plus long et donc un temps de vol corrigé. Par contre les ions les plus lents atteignent le réflectron plus tard, mais en sortent plus tôt avec la même énergie cinétique qu'à l'entrée (figure modifiée d'après de Hoffmann, 2005).

Cependant, si le réflectron permet d'augmenter la résolution et d'allonger la distance de vol sans agrandir les dimensions du spectromètre de masse TOF, il le fait aux dépens de la sensibilité, et sa gamme de masse utile reste limitée par la stabilité des ions. En pratique, ce mode d'analyse est utilisé pour l'analyse des peptides, pour lesquels on obtient une résolution des pics d'un massif isotopique jusqu'à la masse de 5 000 Da environ.

4. Utilisation de l'analyseur TOF avec une source MALDI

Il existe une adéquation parfaite entre la source MALDI et l'analyseur de type TOF. En effet, l'ionisation MALDI est discontinue et génère des « paquets » d'ions successifs. L'analyseur de type TOF nécessite une introduction de type discontinu des ions pour que la mesure d'un temps de vol soit possible, à partir d'un temps initial tel que l'impulsion laser.

L'appareil sur lequel nous avons travaillé est un spectromètre Bruker Reflex III (figure III.7). Sa résolution, de 5 000 FWHM à 1 000 m/z en mode linéaire, est proche de 20 000

FWHM à 3 000 m/z en mode réflectron et sa précision approche 1 ppm en mode réflectron avec étalonnage interne. L'exactitude de masse est d'environ 0,02 % en mode linéaire et de 0,001 % en mode réflectron pour l'analyse des peptides.



Figure III.7. Photographie du spectromètre de masse MALDI-TOF Bruker Reflex III

C. L'analyseur quadripolaire

Le quadripôle fait partie des appareils qui utilisent la stabilité des trajectoires dans un champ électrique oscillant pour séparer les ions selon leur m/z . Le piège ionique (*ion trap*) utilise le même principe de base.

Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres parfaitement parallèles ayant une section circulaire ou, idéalement, hyperbolique (figure III.8). Un ion positif pénétrant entre les barres sera attiré vers la barre négative. Si le potentiel change de signe avant que l'ion ne se soit déchargé sur cette barre, il changera de direction.

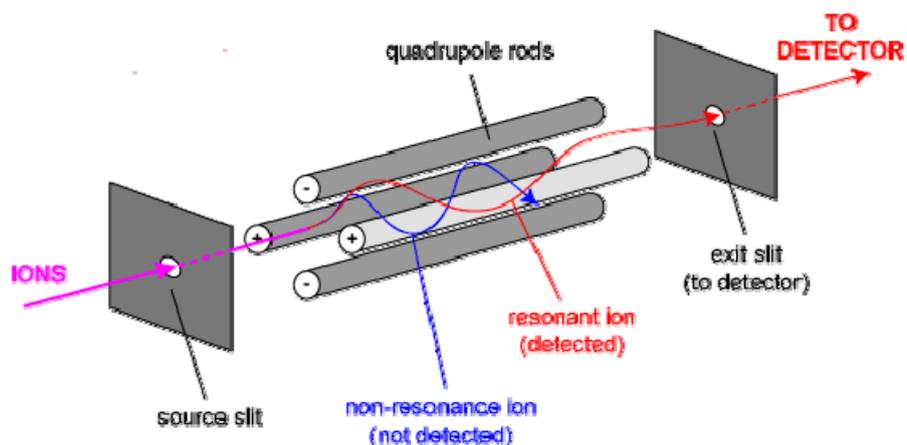


Figure III.8. Représentation schématique d'un analyseur quadripolaire (barres cylindriques ici du quadripôle) (figure modifiée d'après de Hoffmann, 2005).

Le principe du quadripôle a été décrit par Paul et Steinwedel en 1953 et a été appliqué à des instruments commerciaux à la suite des travaux de Shoulders, Finnigan et Story. Le quadripôle est constitué de quatre électrodes qui sont soumises deux à deux à un potentiel $\pm\Phi_0$ composé d'une tension continue U et d'une tension alternative V (figure III.9). Ainsi les ions cheminant suivant l'axe des z sont soumis à l'influence du champ alternatif quadripolaire superposé au champ constant créé par l'application sur les barres respectivement des potentiels :

$$\Phi_0 = +(U - V \cdot \cos \omega t) \quad (\text{Equation III.4})$$

$$-\Phi_0 = -(U - V \cdot \cos \omega t) \quad (\text{Equation III.5})$$

Dans ces équations, Φ_0 représente la tension appliquée aux barres, ω la fréquence angulaire (en radians / s = $2\pi f$ où f est la fréquence du champ RF [Radio Fréquence]), U est la tension continue et V est l'amplitude « zéro à pic » du voltage RF. Typiquement, U variera de 500 à 2 000 Volts et V de 0 à 3000 Volts (de $-3\,000$ à $+3\,000$ Volts de pic à pic).

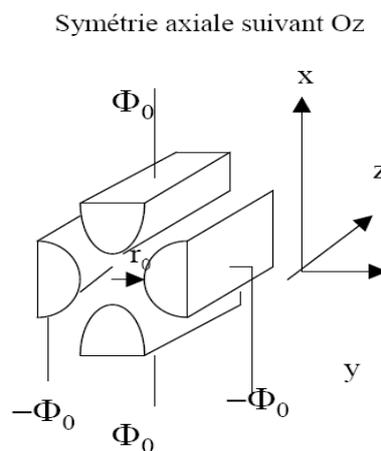


Figure III.9. Quadripôle à barres hyperboliques et potentiels appliqués (figure modifiée d'après de Hoffmann, 2005).

Les ions accélérés suivant l'axe z pénètrent entre les barres du quadripôle et conservent leur vitesse suivant cet axe, mais ils sont soumis suivant x et y aux accélérations résultantes des forces dues aux champs électriques. Leur trajectoire oscillante obéit aux équations différentielles de Mathieu (1886) :

$$(d^2u/d\xi^2) + (a_u - 2q_u \cdot \cos 2\xi) \cdot u = 0 \quad (\text{Equation III.6})$$

Avec

$$\begin{aligned} u &= x \text{ ou } y \\ \xi &= \omega t/2 \\ a_u &= 8zeU/mr_0^2\omega^2 \\ q_u &= 4zeV/mr_0^2\omega^2 \end{aligned}$$

r_0 le rayon du cercle inscrit entre les 4 barres

ω la fréquence angulaire telle que $\omega = 2\pi f$ ou f est la fréquence du champ alternatif

En résumé, les équations de Mathieu établissent une relation entre les coordonnées d'un ion et le temps. Pour qu'un ion traverse le quadripôle, il faut que les valeurs de x et de y restent inférieures à r_0 . Ces valeurs (représentées par u dans l'équation de Mathieu) étant liées aux paramètres a_u et q_u eux-mêmes fonctions des tensions U et V , il est possible de définir selon les valeurs a_u et q_u des zones dans lesquelles les ions seront stables : c'est le diagramme de stabilité. Hors de la zone de stabilité, si un ion touche les barres, il s'y décharge et ne sera pas détecté. Le mode de balayage d'une gamme de rapport m/z couramment adopté consiste à appliquer les tensions U et V en maintenant un rapport U/V constant. Dans le cas où tous les ions se trouvent compris dans le diagramme de stabilité, ils traversent simultanément le quadripôle. Ce mode dit radiofréquence seule (*rf only*) est très utile pour transmettre des ions d'une partie d'un appareil vers une autre (guide ionique ou cellules de collision quadripolaires). Ce mode est notamment employé dans l'analyseur hybride quadripôle-temps de vol présenté dans le chapitre suivant.

D. L'analyseur hybride quadripôle-temps de vol

Des spectromètres de masse hybrides ont été conçus pour le mode MS/MS en cumulant si possible les avantages respectifs de chaque analyseur. Tel est le cas des spectromètres Q-TOF associant un analyseur quadripolaire (Q) à un analyseur à temps de vol (TOF) à injection orthogonale.

Cet instrument hybride se compose d'un quadripôle Q1 (premier analyseur) suivi d'un quadripôle Q2 (chambre de collision), puis d'un analyseur à temps de vol avec injection orthogonale des ions (second analyseur) (Figure III.10). L'impulsion de l'accélérateur orthogonal (*pusher*) fournit le temps de départ pour la mesure du temps de vol dans l'analyseur TOF.

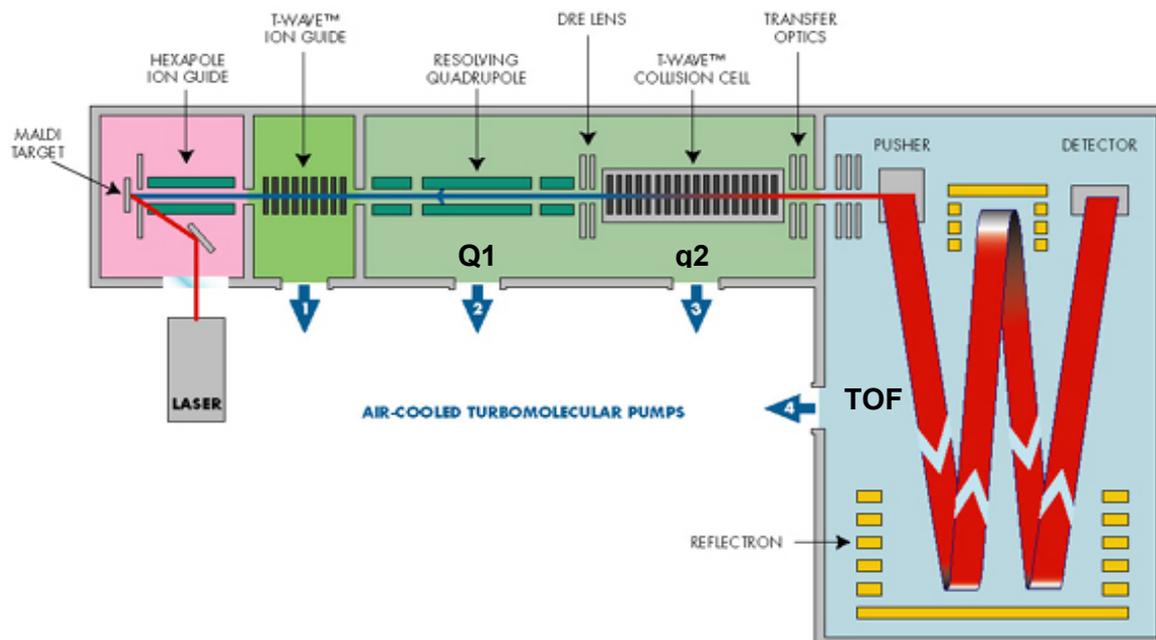


Figure III.10. Schéma d'un instrument hybride Q-TOF (Waters)

1. Fonctionnement en mode *full-scan*

En mode *full scan*, le quadripôle Q1 agit uniquement comme un guide d'ions (*rf only*) et l'analyseur à temps de vol sert à déterminer les rapports m/z des ions, tirant ainsi bénéfice de la haute résolution et de l'exactitude du TOF. Dans ce mode le quadripôle q2 utilisé comme cellule de collision, travaille également en mode *rf only* en présence d'un gaz de collision (argon). Cependant, tous les paramètres sont réglés de manière à éviter toute fragmentation. Par des collisions élastiques, la faible pression d'argon provoque le refroidissement des ions transmis, permettant une focalisation spatiale et énergétique du faisceau d'ions avant l'entrée dans le tube de vol.

2. Fonctionnement en mode MS/MS

Dans le cas d'un Q-TOF, l'analyse par MS/MS a lieu dans l'espace puisqu'elle fait appel à deux analyseurs successifs (figure III.11).

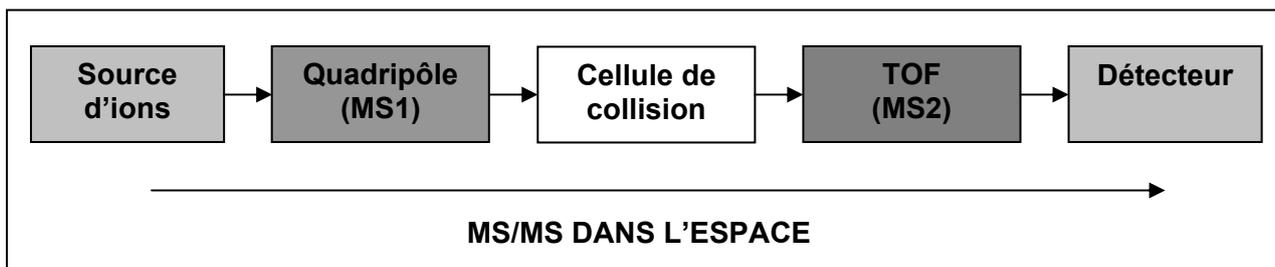


Figure III.11 : Représentation schématique du spectromètre de masse Q-TOF

Le quadripôle Q1 sert de filtre de masse pour sélectionner les ions précurseurs. Ces ions sont alors accélérés à une énergie entre 20 et 200 eV avant d'entrer dans le quadripôle Q2, utilisé comme cellule de collision où ils sont fragmentés efficacement par collision avec de l'argon. Les ions fragments obtenus et les ions parents survivants sont focalisés puis envoyés de manière pulsée dans l'analyseur à temps de vol orthogonal à la trajectoire de ces ions (application d'une tension sur le *pusher*, figure III.10).

3. Utilisation du Q-TOF avec une source MALDI

L'appareil que nous avons utilisé est un MALDI-Q-TOF Premier™ Waters Micromass (Figure III.12). L'adaptation au mode d'ionisation MALDI a été réalisée en insérant une étape de refroidissement des ions par collision (*collisional cooling*) avec des atomes d'argon avant l'entrée dans le premier quadripôle.

Les cibles MALDI de cet appareil permettent d'effectuer 96 dépôts d'échantillon et 24 dépôts d'étalons. Un dépôt d'étalon est effectué au centre de quatre dépôts d'échantillons (Figure III.13).



Figure III.12. Photographie du spectromètre de masse MALDI-Q-TOF Premier™ (Waters)

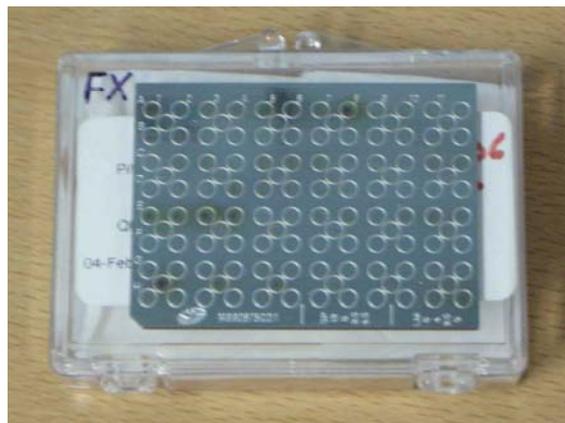


Figure III.13. Photographie d'une cible 96 puits pour analyse sur MALDI-Q-TOF Premier™ (Waters)

L'utilisation d'étalons en mode *Lockmass* permet d'atteindre en mode MS une exactitude de l'ordre de 3 ppm pour l'analyse de peptides. En mode MS-MS, l'exactitude de masse pour les ions fragments est d'environ 0,02 Da dans la gamme de m/z utilisée.

E. Avantages et inconvénients de la technique MALDI-Q-TOF

L'analyseur Q-TOF, comparé à un analyseur TOF-TOF, a l'inconvénient de présenter lors de la sélection de l'ion à fragmenter une gamme de masse limitée par la transmission du quadripôle Q1, et l'avantage d'une meilleure sélection des ions précurseurs (Q1 pour le Q-TOF, *ion gate* pour le TOF-TOF).

Par rapport aux instruments de type triple quadripôle, les avantages du Q-TOF sont une augmentation de la sensibilité, de la résolution et de l'exactitude de masse pour les scans descendants. Cependant, le gain de sensibilité est dû à la capacité de l'analyseur à temps de vol à accélération orthogonale à analyser simultanément l'ensemble des ions produits contrairement aux quadripôles qui effectuent un balayage successif des ions au cours du temps. Dès lors, le gain en sensibilité n'est important que si l'acquisition se fait sur un large domaine de masse. Ainsi, cet avantage ne s'applique pas lors de la détection d'ions sélectionnés ou de la détection de réactions sélectionnées. De par sa conception le Q-TOF est avant tout destiné à une utilisation en scan descendant. Des modes adaptés d'analyse assimilables à des scans ascendants ou des analyses de pertes de neutres sont cependant réalisables. N'ayant pas utilisé ces fonctions avec le Q-TOF Premier, nous les détaillons pas ici.

Malgré son exactitude de mesure, sa bonne sensibilité et sa rapidité d'analyse, la méthodologie MALDI-Q-TOF présente un inconvénient notable lors de l'analyse d'un échantillon complexe. En effet, un phénomène de désorption-ionisation sélective caractéristique du mode MALDI dans le cas de mélanges complexes de peptides, peut conduire à une perte de signal (Belghazi *et al.*, 2001). Cet inconvénient peut être levé en faisant appel à une technologie couplée de type LC-MALDI, mais nous n'en disposons pas au cours nos travaux.

II. Spectrométrie de masse ESI

A. La source électrospray (ESI)

L'électrospray est une technique de production des ions qui a été décrite pour la première fois par Fenn et ses collaborateurs (Fenn *et al.*, 1989). Au début, l'électrospray a été considéré comme un mode d'ionisation dédié à l'analyse des protéines, mais très rapidement son utilisation a été élargie non seulement à l'analyse d'autres polymères et biopolymères, mais également à l'analyse de petites molécules polaires. Il est surtout très vite apparu que l'électrospray est la méthode de choix pour réaliser un couplage avec la chromatographie liquide.

1. Principe de l'électrospray

a) La formation des gouttelettes

L'électrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit (couramment 1 à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$). L'échantillon liquide est introduit dans la source via ce capillaire à l'aide d'un gaz de nébulisation chaud (azote). Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de 3 à 6 kV entre ce capillaire et la contre-électrode, séparés de 0,3 à 2 cm (figure III.14).

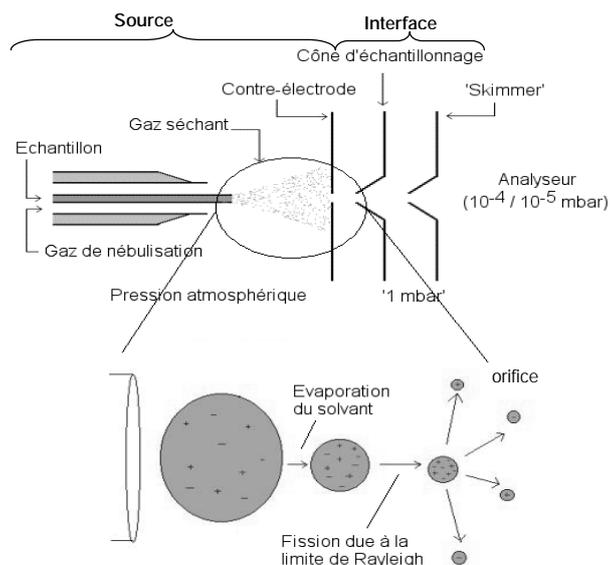


Figure III.14. Schéma général d'une source électrospray (Micromass)

La source d'ionisation par électronébulisation peut être considérée comme une cellule électrolytique. En effet, le champ électrique que subit le liquide impose un mouvement électrochimique des ions (figure III.15). Par exemple, en mode positif, les cations vont vers la surface à l'inverse des anions qui migrent vers le capillaire métallique. L'émission continue des gouttelettes fortement surchargées positivement qui forment le spray génère un excès de charges négatives qui est contrebalancé par une réaction d'oxydation à l'interface capillaire/liquide.

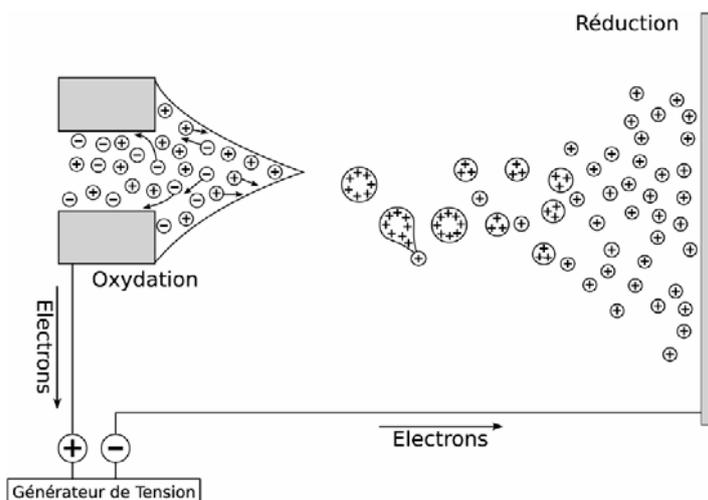


Figure III.15. Représentation schématique du processus électrochimique de l'électrospray pour la formation des ions positifs (figure modifiée d'après Kebarle, 2000)

Lorsqu'un potentiel, par exemple positif, est appliqué à la solution au niveau du capillaire, l'interface air/liquide se polarise et forme quasiment un cône. Lorsque l'équilibre entre les forces électrostatiques et la tension de surface du liquide est atteint, on parle alors de cône de Taylor (figure III.16).

L'induction du processus d'électronébulisation nécessite l'application d'un champ électrique minimal : cette valeur critique de champ électrique engendre la déstabilisation du cône de Taylor et l'émission des gouttelettes chargées. Lorsque ces valeurs critiques sont atteintes, le cône de Taylor se déforme et génère des gouttelettes dites primaires possédant un excès de charges dépendant du mode de polarité (figure III.16).

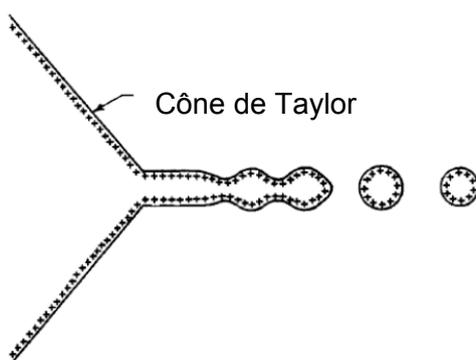


Figure III.16. Limite de stabilité du cône de Taylor au-delà de laquelle des gouttelettes primaires sont émises (figure modifiée d'après Kebarle, 2000)

Ces gouttelettes contiennent les composants (analytes, électrolytes...) de la solution introduite dans le capillaire.

b) La génération des ions en phase gaz

A ce stade de formation des gouttelettes primaires, les ions unimoléculaires qui nous intéressent sont encore fortement solvatés. Sous l'action d'un courant d'azote concomitant à la production des gouttelettes, de la température de la source ou d'un gaz séchant à contre courant, le solvant va s'évaporer et les gouttes vont rétrécir jusqu'à ce que la tension de surface du liquide ne supporte plus les répulsions coulombiennes induites par les charges réparties à la surface. Ce point de rupture est appelé limite de Rayleigh. Cette limite de stabilité de la goutte correspond à son rayon minimum en fonction de l'excès de charges qu'elle contient. A la limite de Rayleigh, la goutte devient instable et explose en gouttelettes

de taille plus petite et de densité de charge moins élevée. Ce procédé se poursuit en cascade jusqu'à la libération des ions unimoléculaires en phase gazeuse.

Après de multiples cycles d'évaporation-fission coulombienne de la goutte primaire, les ions sont générés en phase gazeuse et guidés par le champ électrique jusqu'à la contre-électrode. Depuis la fin des années 1960, ce processus a fait l'objet de nombreux débats qui ne sont toujours pas tranchés (Kearle, 2000 ; Cole, 2000). Deux modèles théoriques présentés sur la figure III.17 permettent d'expliquer le passage des ions solvatés vers la phase gazeuse :

- **Le modèle de Dole**

Selon ce modèle, appelé modèle de la charge résiduelle (*Charge Residue Model* ou CRM), plusieurs fissions successives aboutissent à des gouttelettes très petites (de rayon 1 nm environ) contenant une ou plusieurs charges élémentaires mais une seule molécule d'analyte. Après évaporation du solvant résiduel, les charges se localisent sur les sites permettant de générer l'ion le plus stable en phase gazeuse.

- **Le modèle d'Iribarne et Thomson (Iribarne et Thomson, 1976)**

Selon ce modèle, appelé modèle de l'évaporation ionique (*Ion Evaporation Model* ou IEM), lorsque le rayon des gouttelettes filles atteint un certain rayon inférieur à la limite de Rayleigh (< 10 nm par exemple), le champ électrique est suffisamment important pour que des ions solvatés soient émis dans la phase gazeuse.

Un consensus semble atteint pour considérer que l'ionisation des molécules de hautes masses s'effectue selon le modèle CRM alors que le mécanisme dominant pour les petites molécules est l'IEM.

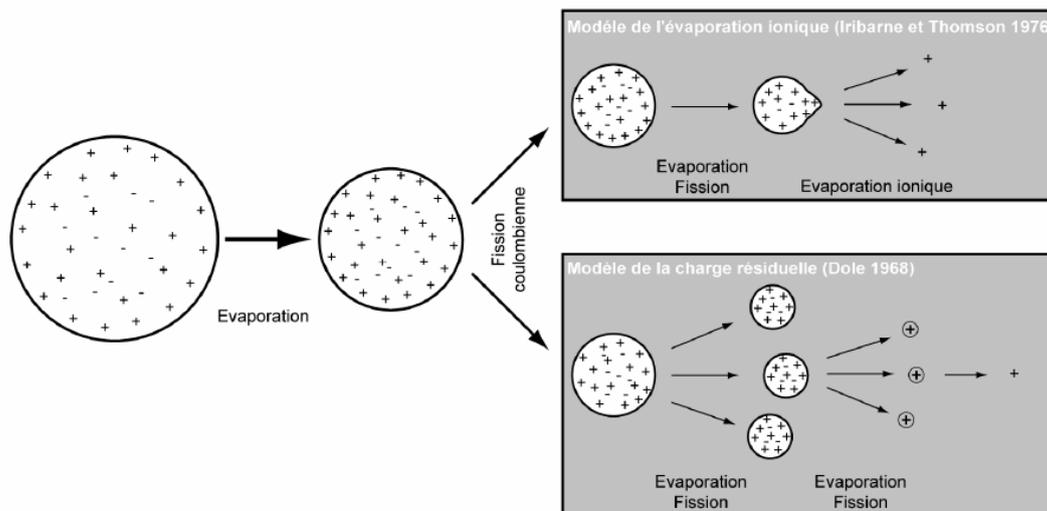


Figure III.17. Schéma récapitulatif des deux modèles pour l'obtention d'ions en phase gazeuse par ESI

Les ions ainsi produits sont porteurs d'un grand nombre de charges s'il existe plusieurs sites ionisables suffisamment séparés sur la molécule. Cependant, l'ionisation peut être obtenue autrement que par protonation, grâce à la formation d'adduits sodiques, potassiques, ammonium ou en ions négatifs d'adduits chlorure, acétate.... Les ions formés à pression atmosphérique dans la chambre d'ionisation sont ensuite transmis dans une zone de pression décroissante, jusqu'à leur accélération vers l'analyseur de masse où règne un vide secondaire (10^{-4} à 10^{-5} mbar) (figure III.14).

2. Le nanospray

Les sources électrospray classiques fonctionnent avec un débit de solution allant de 1 à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ et même supérieur, en adaptant le processus de désolvatation (température, capillaire chauffé, gaz à contre-courant). L'équipe de Matthias Mann a montré qu'il était possible de diminuer considérablement le débit, introduisant le terme de nanospray, tout en obtenant une excellente sensibilité (Wilm et Mann, 1996). Une première version consiste à utiliser des capillaires de verre métallisés, étirés de sorte à avoir un orifice à la pointe du capillaire d'environ 1 à 4 μm , ce qui permet d'établir un débit spontané dans la source de l'ordre de 20 à 100 nL/min. La seconde version fonctionne en mode continu de couplage avec un chromatographe en phase liquide qui délivre un nano-débit (200 à 300 nL/min pour une colonne de 75 μm de diamètre intérieur).

L'efficacité totale d'ionisation/désorption en spectrométrie de masse en mode électrospray est une combinaison des efficacités d'ionisation, de désolvatation et de

transfert. Or, la source nanospray présente une amélioration de ces trois facteurs par rapport à une source électrospray conventionnelle. L'ionisation totale 500 fois plus importante en nanospray contribue à une plus grande sensibilité et à une réduction du bruit de fond. L'efficacité de désolvatation est également plus importante car les gouttelettes sont plus petites. L'efficacité d'ionisation/désolvatation est renforcée puisque le rapport charge/volume de ces nano gouttelettes est plus important (Wilm et Mann, 1996).

3. Couplage à la chromatographie en phase liquide

Le signal obtenu en électrospray dépend de la concentration de l'échantillon et non d'un débit massique. Il n'y a donc pas d'avantage à utiliser des débits de chromatographie élevés. Par contre, le couplage avec des systèmes nano et capillaires HPLC permet un gain important en sensibilité.

Néanmoins, les conditions de chromatographie ne sont pas toujours compatibles avec l'électrospray qui ne tolère pas de hautes concentrations en sel, tensioactifs et agents susceptibles de former des paires d'ions. Les acides utilisés seront donc plutôt des acides de forte volatilité comme l'acide formique ou acétique (0,1 à 0,5 %) ; l'acide trifluoroacétique est utilisable à une concentration ne dépassant pas 0,05 %.

B. Les analyseurs couplés à une source électrospray

1. Le piège ionique quadripolaire

L'analyseur quadripolaire décrit précédemment est parfaitement adapté au couplage avec une source électrospray. Mais Paul et Steinwedel ont aussi décrit en 1960 un « *ion trap* », modifié plus tard pour en faire un spectromètre de masse utilisable par Stafford et ses collaborateurs de la Finnigan Corporation. Ensuite, l'optimisation du piège ionique quadripolaire par l'équipe de Graham Cooks (extension de la gamme de masse, MS^n , haute résolution) a permis d'améliorer grandement les performances de l'outil (Riter *et al.*, 2002).

a) Principe

Cet analyseur est constitué de trois électrodes : une électrode circulaire de section hyperbolique et deux électrodes chapeau (*end cap* de géométrie hyperbolique) de part et d'autre comme le représente la figure III.18.

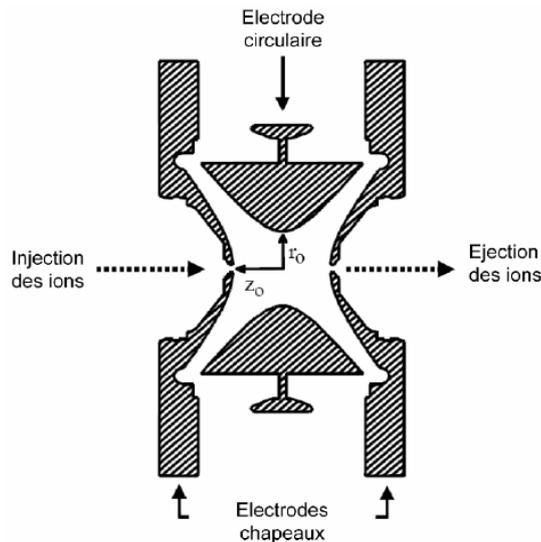


Figure III.18. Schéma en coupe du piège ionique quadripolaire (figure modifiée d'après de Hoffmann, 2005).

Les ions issus de la source d'ionisation passent dans l'analyseur à travers un orifice percé dans l'une des électrodes chapeaux. Leur sortie s'effectue au centre de l'électrode chapeau opposée. La superposition de tensions continues et alternatives permet d'obtenir une sorte de « quadripôle à trois dimensions » dans lequel les ions sont gardés captifs sur une trajectoire formant une sorte de huit dans l'espace (figure III.19). Un gaz tampon (hélium) présent dans le piège à une pression voisine de 0,1 Pa permet de piéger efficacement les ions injectés en les désactivant par des collisions élastiques pour les rassembler au centre du piège.

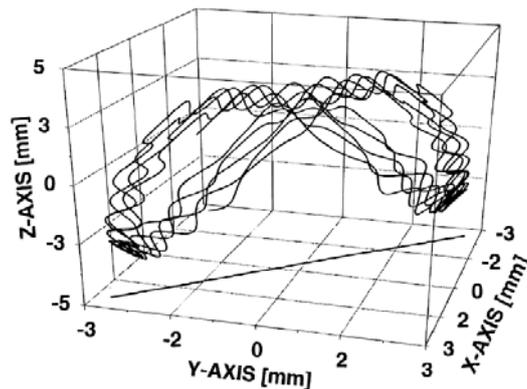


Figure III.19. Trajectoire d'un ion dans le champ électrique d'un piège à ion (figure modifiée d'après de Hoffmann, 2005).

Comme dans un quadripôle classique, on peut appliquer une tension $+\Phi_0$, superposition d'une tension continue et d'une tension alternative sur les électrodes chapeaux d'une part, et $-\Phi_0$ sur l'électrode circulaire d'autre part, ce qui a pour effet de créer un champ

quadripolaire au sein du piège ionique. Dans les quadripôles, on règle les potentiels de manière telle que les ions d'une masse déterminée seulement soient stables et puissent traverser les barres. Dans le cas du piège ionique, les ions de différentes masses sont présents simultanément, et on cherche à les expulser en fonction de leur masse pour obtenir le spectre en faisant appel par exemple à des fréquences de résonance selon z .

A l'intérieur de ce piège, les ions suivent une trajectoire oscillante close qui obéit aux équations de Mathieu. L'analyse mathématique des équations de Mathieu conduit à la détermination dans l'espace de zones de stabilité des ions de masses différentes. Il est possible de déterminer des valeurs de paramètres a_u et q_u fonctions des valeurs de U (tension continue) et de V_{RF} (amplitude de la tension alternative), pour lesquelles les trajectoires des ions n'excèdent jamais les dimensions z_0 et r_0 de la trappe. Le diagramme de stabilité que l'on en déduit présente toutefois un aspect différent de celui obtenu avec les quadripôles linéaires. Dans le cas du piège ionique, le couple (a_u, q_u) considéré se réfère à r_0 et z_0 (au lieu de x et y).

b) Fonctionnement en mode Full scan

En mode *full scan*, la fonction de balayage de masse (*scan function*) utilise une variation des potentiels appliqués aux électrodes pour réaliser l'éjection des ions vers le détecteur. Une fonction de régulation appelée *Automatic Gain Control* (AGC) sur les spectromètres Thermo-Finnigan est destinée à limiter le nombre d'ions admis dans le piège. Elle permet d'éviter le phénomène de charge d'espace dû aux répulsions électrostatiques entre ions porteurs de charges de même signe. L'une des limitations du piège ionique en matière de sensibilité est donc liée aux valeurs de r_0 et z_0 .

c) Fonctionnement en mode MSⁿ

Dans le cas d'un piège ionique, l'analyse par MS/MS ne repose pas sur des régions distinctes de l'appareil mais sur des séquences successives au sein de la même enceinte (ici les analyseurs 1 et 2 ainsi que la cellule de collision sont virtuels). La MS/MS a lieu dans le temps (figure III.20).

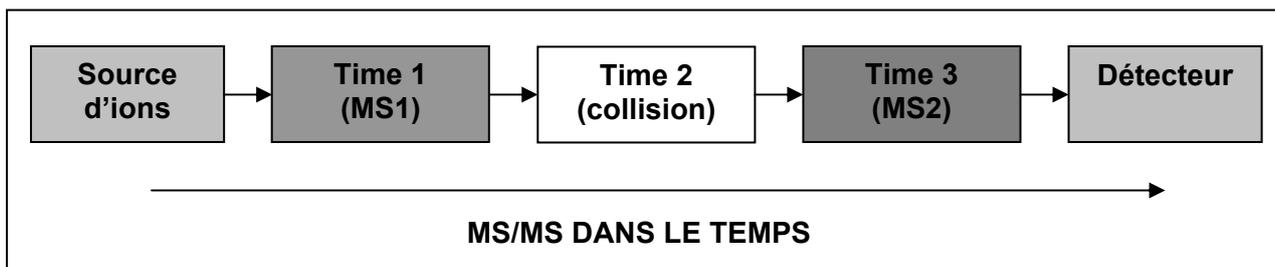


Figure III.20 : Représentation schématique du spectromètre de masse à piège ionique en « tandem »

La sélection des valeurs de potentiels appliqués aux électrodes permet de ne conserver dans le piège que les ions d'une masse choisie et d'expulser du piège tous les autres. Après excitation, les ions précurseurs sélectionnés vont se fragmenter au cours du temps, *via* des collisions multiples avec les atomes d'hélium présents dans le piège. Les ions fragments produits sont ensuite expulsés. Ainsi, la MS/MS est réalisée dans le temps au lieu de l'espace comme cela est le cas des analyseurs couplés. De plus, le processus peut être répété plusieurs fois en sélectionnant des ions fragments qui deviennent à leur tour précurseurs d'autres fragments : c'est le principe de la MSⁿ.

d) Principe du piège linéaire

Les pièges ioniques linéaires (Douglas *et al.*, 2005) sont des variantes à deux dimensions des pièges ioniques classiques. Le filtre de masse comporte les quatre barres d'un quadripôle, mais celui-ci est fermé par des électrodes d'entrée et de sortie. Ces électrodes permettent de conserver les ions à l'intérieur du quadripôle, en appliquant des tensions continues positives pour piéger les ions positifs, et inversement en appliquant des tensions continues négatives pour piéger les ions négatifs. Les ions sont refroidis par collision avec un gaz inerte à faible pression. Ils effectuent des allers-retours entre les électrodes terminales suivant z , et simultanément oscillent dans le plan xy par application d'une tension RF sur les barres. Le diagramme de stabilité est identique à celui d'un quadripôle : il est donc symétrique par rapport à l'axe q_z .

Un grand avantage des pièges ioniques linéaires est d'accepter beaucoup plus d'ions que les pièges 3D avant d'avoir un effet de charge d'espace notable. Ceci est dû à la fois à un plus grand volume disponible et à une focalisation autour de l'axe des z plutôt qu'autour d'un point central. Un autre avantage des pièges linéaires est l'efficacité supérieure lors de

l'introduction des ions dans le quadripôle, le long de l'axe des z. Ces facteurs conjugués augmentent considérablement la sensibilité.

Les deux instruments auxquels nous avons eu recours pour nos expérimentations opèrent avec des modes d'expulsion des ions différents :

- **L'éjection radiale des ions** : alternativement, les ions sont expulsés radialement à travers des fentes creusées dans deux barres opposées du quadripôle, en appliquant une tension alternative adaptées sur ces deux barres (deux détecteurs sont utilisés). C'est le cas du **LTQ XL™ Linear Ion Trap (Thermo-Finnigan)**.
- **L'éjection axiale des ions** : les ions sont expulsés axialement suivant z, en utilisant les effets de champs à l'extrémité du piège, en appliquant une tension alternative appropriée entre les barres du quadripôle et l'électrode de sortie. C'est le cas du **4000 Q-TRAP™ (Applied Biosystems)**.

2. Le piège linéaire à éjection radiale LTQ XL™

L'éjection radiale à travers des fentes (30 x 0.25 mm) creusées dans les deux barres opposées a été décrite pour la première fois par Senko et Schwartz de Thermo Finnigan en 2002 (Schwartz *et al.*, 2002) (figure III.21). Les détecteurs sont placés hors axe à la sortie des fentes comme le montre le schéma.

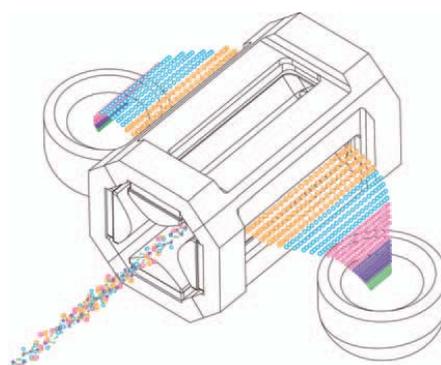


Figure III.21. Piège ionique linéaire à éjection radiale (www.thermo.com).

L'efficacité de la capture des ions à l'injection est de 55 à 70 % contre seulement 5 % pour un piège classique 3D. Le gaz tampon est de l'hélium. A la vitesse de balayage de 27 Th/sec, δm est de 0,05 à m/z 1520, correspondant à une résolution de 30 000 FWHM. La capacité en ions est d'environ 20 000, soit 40 fois plus qu'un piège ionique classique. Nous

avons utilisé l'appareil LTQ XL™ (Thermo-Finnigan ; figure III.22) sur le site de la plateforme de protéomique de génomique Fonctionnelle de Bordeaux. Cet instrument comporte une source ESI de type nanospray couplée à un système de nanochromatographie en phase liquide.



Figure III.22. Photographie du LTQ XL™ *Linear Ion Trap* (Thermo-Finnigan).
(www.thermo.com)

3. Le piège ionique à éjection axiale 4000 Q-TRAP™

Le piège ionique linéaire à éjection axiale a été développé par la société MDS SCIEX en 2002 (Hager, 2002). La figure III.23 représente l'analyseur 4000 Q-TRAP™ dans lequel un piège ionique linéaire à éjection axiale remplace le quadripôle Q3 d'un triple quadripôle classique.

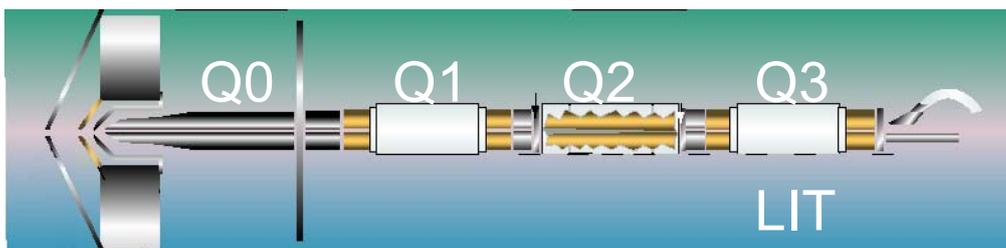


Figure III.23. Représentation schématique du 4000 Q-TRAP™ trappe linéaire (en q2) incluse dans un triple quadripôle (www.appliedbiosystems.com)

Cet appareil peut être utilisé comme un triple quadripôle classique (QqQ) avec ses possibilités de *scans* ascendants, descendants et de perte de neutres, mais le piège ionique linéaire (LIT) en lieu et place d'un Q3 offre aussi l'accès à la MS³. La gamme de masse analysable est comprise entre 5 et 2 800 *m/z*. L'appareil 4000 Q-TRAP™ commercialisé par Applied Biosystems - MDS SCIEX est présenté sur la figure III.24. Il été utilisé en couplage

avec un système de nanochromatographie en phase liquide. Les mesures ont été réalisées dans le laboratoire d'Applied Biosystems à Francfort par Matthias Glückmann et Christof Lenz.



Figure III.24. Photographie du 4000 Q TRAP™ (www.appliedbiosystems.com)

Dans le cas d'un analyseur à triple quadripôles, l'analyse par MS/MS repose sur les régions distinctes de l'appareil. La MS/MS a donc lieu dans l'espace puisqu'elle fait appel à deux analyseurs successifs (figure III.25).

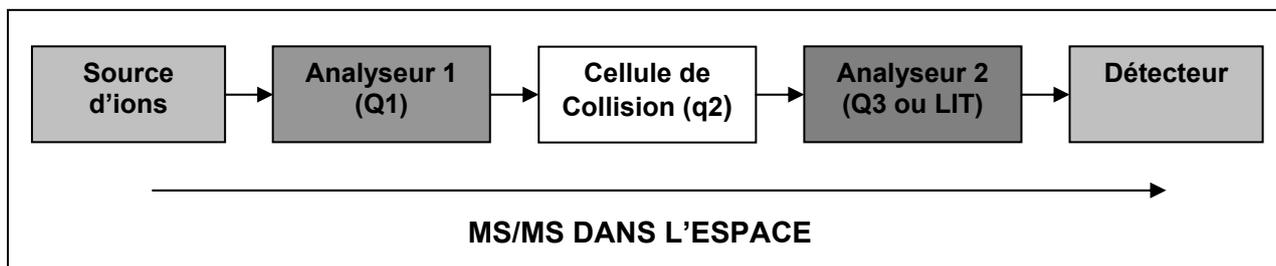


Figure III.25 : Représentation schématique d'un spectromètre de masse à triple quadripôle

Dans un mode de *scan* descendant, le quadripôle Q1 et le piège linéaire remplissent des fonctions d'analyseurs de masse, et le quadripôle central q2 est une cellule de collision (*rf only*). Un ion parent est sélectionné dans le premier quadripôle et envoyé dans la cellule de collision. Le gaz de collision (généralement de l'argon, plus efficace que l'hélium pour les collisions, car il a une masse atomique supérieure) est utilisé à une pression telle qu'un ion entrant subisse une ou plusieurs collisions. L'énergie transférée à l'ion en convertissant en énergie interne une fraction de l'énergie cinétique acquise par collision peut provoquer la fragmentation (*Collision Induced Dissociation*, CID) et les fragments sont analysés par le piège ionique linéaire. Les autres modes d'acquisition (*scan* ascendant et perte de neutre) fonctionnent également selon le principe du triple quadripôle (de Hoffmann, 1996). Ne les ayant pas utilisés, nous ne les détaillerons pas ici.

Par contre, ayant choisi de réaliser nos expériences d'analyse quantitative à l'aide du mode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) dérivé du mode ascendant, nous allons en décrire le principe, résumé sur le schéma de la figure III.26.

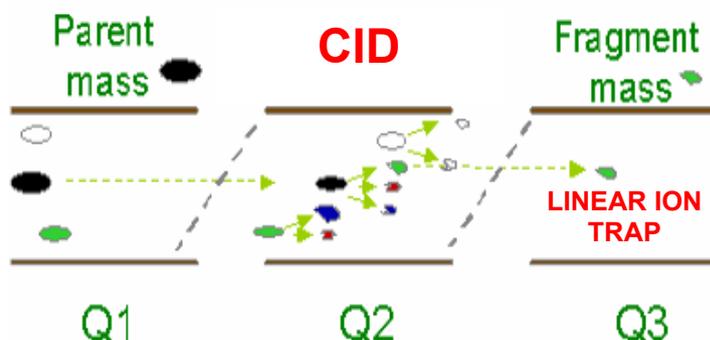


Figure III.26. : Représentation schématique du mode d'analyse *Multiple Reaction Monitoring* (MRM)

En mode MRM, l'ion précurseur à étudier est sélectionné dans le premier analyseur (Q1) et fragmenté dans la cellule de collision (Q2) comme en mode descendant, mais le second analyseur (LIT) sélectionne successivement plusieurs ions fragments issus du même précurseur. Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité par la sélection des ions précurseurs et la sélection des ions fragments, et présente surtout l'avantage d'une excellente sensibilité de détection des ions fragments. Dans le cas du spectromètre 4000 Q-TRAP™, cette succession d'opérations est réalisée de manière très rapide, puisque plusieurs centaines de MRM peuvent être acquises en un seul *scan* de moins de quatre secondes.

Le mode MRM a un potentiel analytique particulièrement intéressant dans le cadre d'une stratégie de dosage de protéine-médicament. En effet, une protéine peut être caractérisée par plusieurs peptides choisis comme précurseurs (un peptide au moins est requis pour la quantification et un autre pour la validation). De plus, chacun de ces précurseurs peut offrir plusieurs transitions, et il est envisageable de réaliser un dosage quantitatif par MRM de plusieurs protéines au cours d'une seule analyse. Enfin, la sélectivité de la méthodologie est renforcée par l'utilisation du couplage avec la chromatographie. Un tel niveau de sélectivité est strictement requis lorsque le dosage doit être effectué dans un milieu aussi complexe que le plasma (Anderson et Hunter, 2006 ; Hashimoto *et al.*, 2008).

III. Fragmentation des peptides en MS/MS

L'identification des protéines s'appuie sur l'analyse des peptides issus d'une protéolyse (*top down*). La connaissance de la masse moléculaire de ces peptides associés à une protéine permet bien souvent l'identification de cette protéine à partir de banques de données protéiques (cartographie peptidique, *Peptide Mass Fingerprint*).

Toutefois, lorsque le taux de couverture de séquence de la protéine est faible ou que la protéine recherchée n'est pas dans la banque de données, il faut obtenir des informations spectrales permettant de remonter à la séquence des différents peptides.

Les peptides se fragmentent à partir de collisions de basse énergie (quelques eV à quelques dizaines d'eV, conditions correspondant aux instruments que nous avons utilisés) par rupture de liaisons peptidiques. Deux types d'ions peuvent être observés ; ils sont désignés par b et y suivant que la charge portée par l'ion se situe dans la région N-terminale ou C-terminale du peptide ; la figure III.27 présente la nomenclature de ces fragmentations.

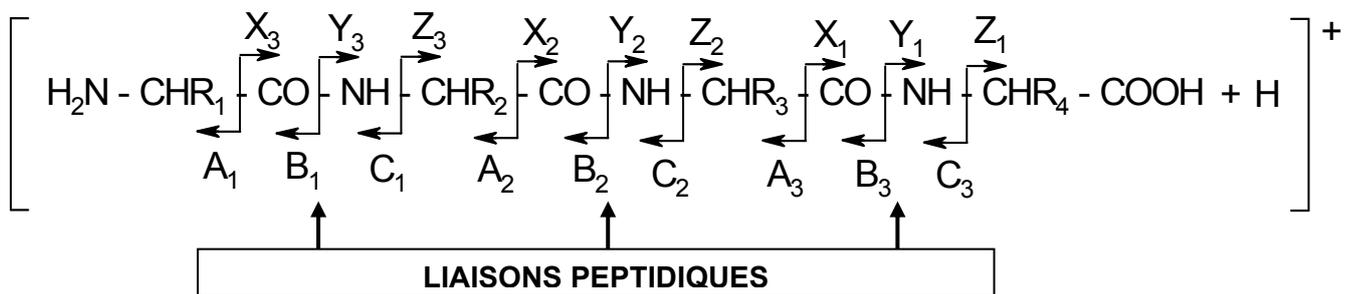


Figure III.27. Nomenclature des ions fragments des peptides selon Roepstorff et Biemann (Roepstorff et Fohlman, 1984 ; Biemann, 1988)

Cette rupture des liaisons peptidiques est le phénomène dominant à basse énergie (Wysocki *et al.*, 2000). Cependant, d'autres fragmentations peuvent intervenir en amont ou en aval de la liaison peptidique. Les fragments obtenus sont notés a (ou x) et c (ou z). Cette fragmentation est dépendante de la séquence, de la présence de résidus basiques (R, K), de certains résidus internes comme la proline (Dongre *et al.*, 1996).

CHAPITRE 4

VERS LA MISE AU POINT D'UNE METHODE UNIVERSELLE DE DOSAGE DE PROTEINES MEDICAMENTS

CHAPITRE 4 :

VERS LA MISE AU POINT D'UNE METHODE UNIVERSELLE DE DOSAGE DE PROTEINES MEDICAMENTS

CAS DE L'EPOETIN BETA

I. Les enjeux

L'objectif de ce travail est la mise au point d'une technique de dosage de protéines médicaments présentant un caractère universel, transposable si c'est possible à la quantification de la plupart des protéines médicaments dans le plasma. Cet objectif ambitieux rend notre approche originale au regard des méthodes de dosage existantes qui sont le plus souvent propres à une protéine médicament donnée. Pouvoir disposer d'une méthode de dosage de protéines médicaments facilement adaptable à toute nouvelle molécule est d'un intérêt évident pour le clinicien dans la mesure où l'analyse quantitative de cette nouvelle molécule ne devra pas faire l'objet d'une mise au point lourde et fastidieuse. En tenant compte de la rapide croissance du nombre de nouveaux médicaments, cet objectif suffit à justifier une telle entreprise, mais il faut garder à l'esprit qu'il apporte son lot de contraintes qui sont autant d'obstacles délicats à franchir. Une stratégie pertinente doit par ailleurs satisfaire de nombreux critères, notamment en matière de :

- sensibilité
- justesse
- rapidité
- robustesse
- reproductibilité
- facilité de mise en œuvre
- limitation du nombre d'étapes afin de minimiser les pertes de protéine à doser
- coût.

Nous avons donc tenté de tenir compte de ces critères pour chaque étape de l'élaboration de la stratégie d'analyse.

II. Choix de la stratégie

Ayant fait le constat que l'analyse par spectrométrie de masse des protéines entières n'est ni assez sensible ni assez sélective pour déterminer de très faibles concentrations de médicaments protéiques dans le plasma humain, nous avons choisi d'établir notre méthode de dosage à partir de l'analyse de peptides issus de la protéine. Ces peptides seront obtenus par clivage trypsique de la protéine d'intérêt.

L'analyse quantitative de ces peptides reposera sur un marquage isotopique introduit par un réactif de dérivation chimique, ayant pour cible les résidus lysine (cet aspect de la stratégie a été pris en compte en faisant le choix de la trypsine pour effectuer la protéolyse). L'universalité de la méthode est ainsi recherchée en ne restreignant pas la technique de quantification à l'usage d'un seul peptide étalon spécifique d'une seule protéine.

Les grandes lignes de la stratégie, présentées de manière schématique sur la figure IV.1, sont les suivantes :

- **Etape 1** : simplification de l'échantillon plasmatique, notamment par déplétion des protéines majeures par chromatographie d'affinité
- **Etape 2** : protéolyse par la trypsine
- **Etape 3** : marquage (réactif léger D0) des lysines C-terminales et internes des peptides
- **Etape 4** : ajout d'étalon interne ; l'étalon interne est une solution de peptides tryptiques de la protéine à doser, dérivés de la même façon, mais avec un réactif lourd deutéré nommé D4 (écart de masse de +4 Da entre le peptide à quantifier marqué par D0 et son étalon interne marqué par D4)
- **Etape 5** : dessalage et concentration des peptides. Cette étape est indispensable avant l'analyse par spectrométrie de masse
- **Etape 6** : analyse quantitative par spectrométrie de masse en mode MS/MS.

Cette stratégie a été appliquée au cas du dosage de l'érythropoïétine humaine recombinante dans le plasma humain. Avant de détailler les différentes phases de la mise au point, nous présentons ici le contexte particulier de cette étude.

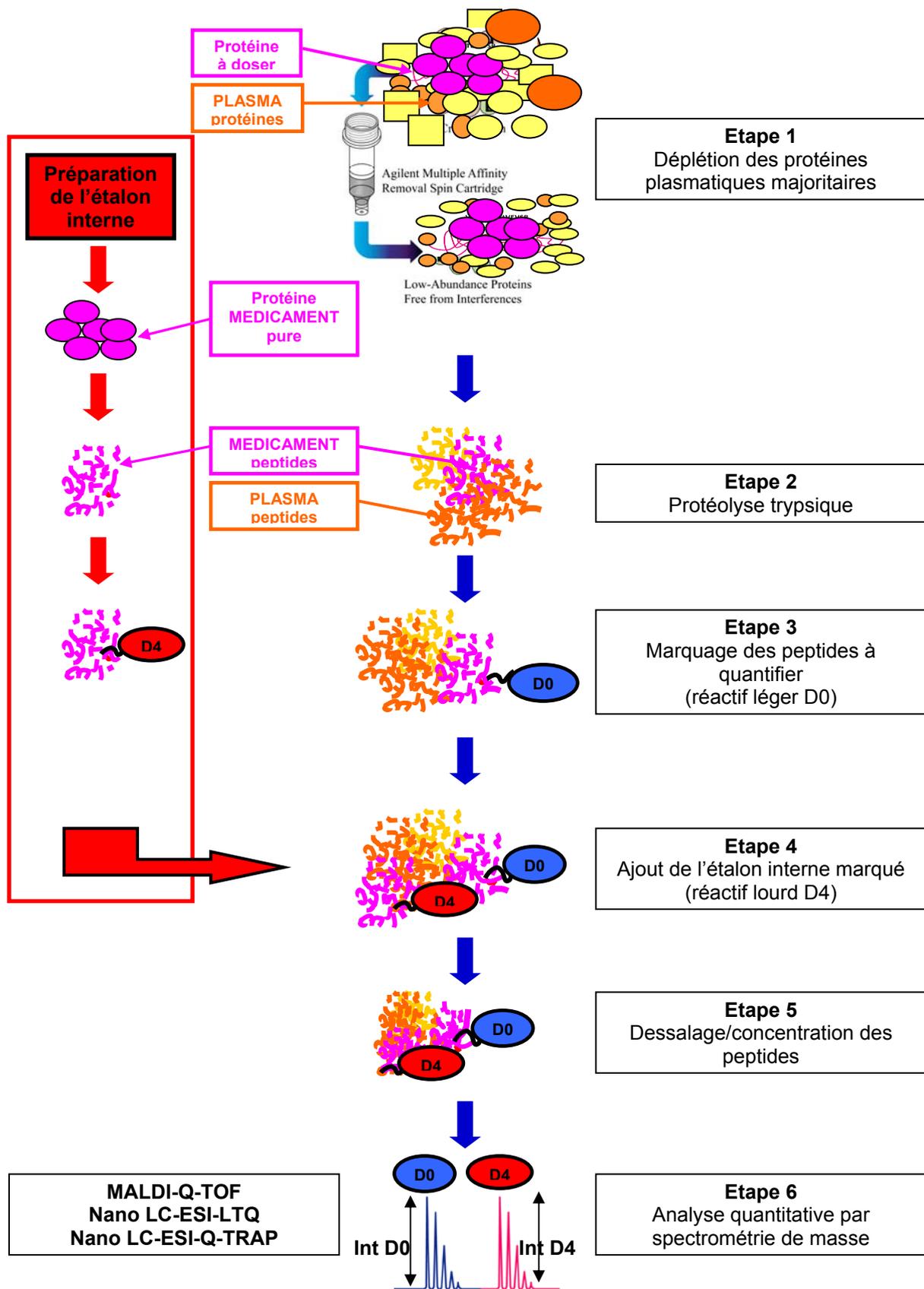


Figure IV.1. Stratégie de dosage d'une protéine médicament dans le plasma.

III. Application au cas de l'époetin beta

A. Pharmacologie de l'érythropoïétine

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone glycoprotéique qui fait partie des facteurs de croissance hématopoïétiques. Le rôle physiologique de l'EPO est de réguler la production des globules rouges en fonction des besoins en oxygène de l'organisme. En cas d'hypoxie, la synthèse d'EPO augmente et stimule la production d'érythrocytes, et inversement, la production d'EPO diminue ainsi que le nombre de globules rouges en cas d'hyper oxygénation tissulaire. Le taux d'érythropoïétine endogène chez un sujet adulte sain est d'environ 10 mUI/mL (soit 0,0024 fmoles/ μ L) avec des variations importantes.

Le rein, sensible à un manque d'oxygène, répond par une augmentation de la sécrétion d'EPO. Pour cela, la transcription du gène de l'EPO (figure IV.3) est induite dans un délai de deux heures, puis la protéine nouvellement synthétisée est sécrétée immédiatement, puisqu'il n'y a pas de réserve intracellulaire d'EPO préexistante. Cette sécrétion est suivie, après un certain temps, par la formation de globules rouges à partir des précurseurs érythrocytaires de la moelle hématopoïétique. L'EPO induit de façon spécifique la prolifération et la maturation des cellules érythrocytaires. La formation des érythrocytes comporte différentes étapes de maturation présentées sur la figure IV.2 :

- l'action de l'EPO débute au niveau des BFU-E (*Burst Forming Unit-Erythroid*), précurseurs des érythroblastes : elle induit leur prolifération.
- l'action de l'EPO s'exerce ensuite et de manière plus importante au niveau des CFU-E (*Colony Forming Unit-Erythroid*) autres précurseurs des érythroblastes. Les CFU-E sont considérés comme la cible primaire de l'EPO.
- l'EPO est indispensable à la différenciation des BFU-E en CFU-E puis en érythroblastes, et son effet diminue au fur et à mesure de la maturation des cellules érythrocytaires de la moelle osseuse.
- l'EPO induit en bout de chaîne la synthèse de l'hémoglobine et la maturation des érythrocytes.

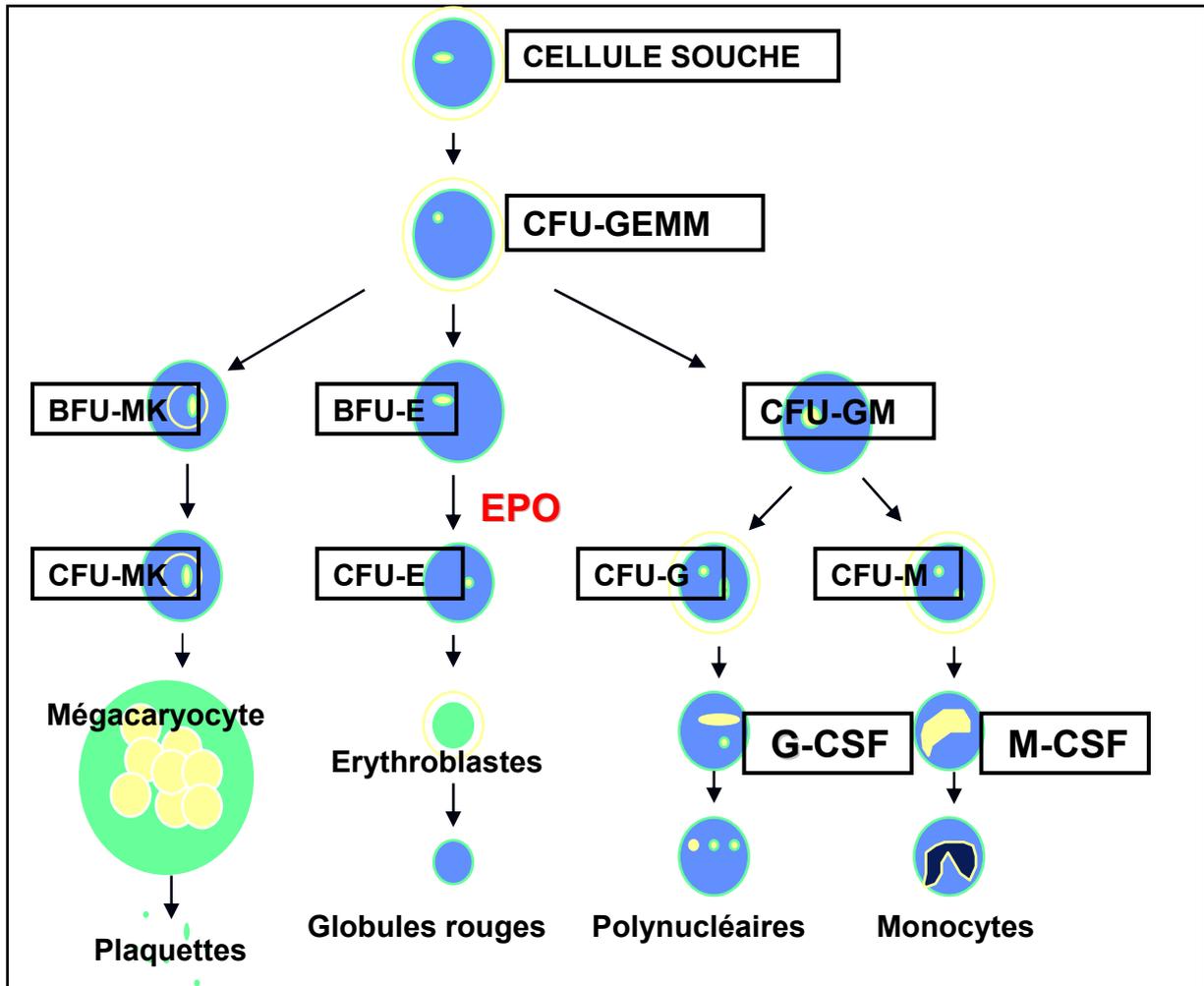


Figure IV.2. Niveau d'action de l'EPO dans la formation des cellules sanguines (figure modifiée d'après Clark et Kamen, 1987).

(E : Erythrocyte/GM : Granulocyte-Macrophage/G : Granulocyte/M : Monocyte-Macrophage/MK : Mega-caryocyte/GEMM : Granulocyte-Erythrocyte-Macrophage-Mégacaryocyte/CSF : Colony Stimulating Factor)

A l'échelon cellulaire, l'EPO se fixe aux récepteurs des cellules précurseurs érythrocytaires. Les récepteurs de l'EPO appartiennent à la famille des récepteurs de l'hormone de croissance. Le signal de transduction induit par l'EPO ne nécessite une liaison qu'avec un petit nombre de récepteurs. La figure IV.3 présente les voies de signalisation de l'EPO après sa fixation aux récepteurs des cellules érythrocytaires. L'hématopoïèse s'accompagne d'une perte des récepteurs durant la différenciation cellulaire (Roche, 1998).

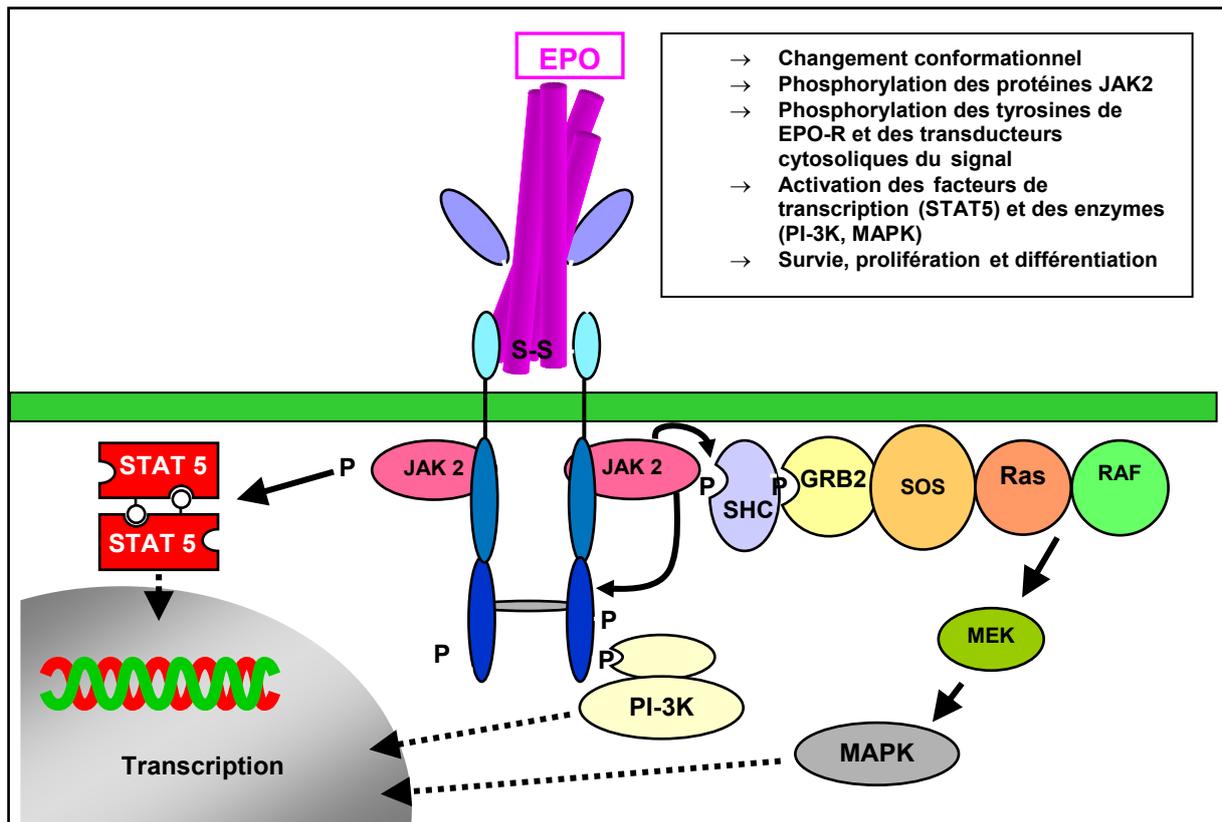


Figure IV.3. Voies de signalisation de l'EPO après fixation aux récepteurs des cellules érythrocytaires (figure modifiée d'après Jelkmann, 2004).

B. Production de l'époetin beta

Les protéines de régulation comme l'érythropoïétine ne sont présentes chez l'homme qu'en très faible quantité, expliquant le fait que cette hormone ne peut être obtenue en quantité suffisante à partir de sources naturelles. Miyake *et al.* ont purifié l'EPO en 1977 (Roche, 1998) à partir d'urine de patients anémiques, ce qui a permis de déterminer sa structure primaire et la séquence du gène codant pour l'EPO. Les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique ont ensuite permis la production de masse de l'EPO avec un degré de pureté très important.

C. Indications thérapeutiques et posologies

La structure de l'époetin beta étant identique à celle de l'érythropoïétine endogène, son activité thérapeutique est identique à celle de l'EPO endogène. L'époetin beta est essentiellement employée pour le traitement de l'anémie selon quatre principales indications :

- Le traitement de l’anémie des insuffisants rénaux chroniques dialysés ou des insuffisants rénaux non encore dialysés (Vidal, 2008) :
 - Par voie SC : 20 UI/kg 3 fois par semaine en phase de correction (augmentation possible) puis diminution de moitié en phase d’entretien
 - Par voie IV : 40 UI/kg 3 fois par semaine en phase de correction (augmentation possible) puis diminution de moitié en phase d’entretien
- Le traitement de l’anémie symptomatique des patients adultes atteints de tumeurs malignes non myéloïdes et traités par chimiothérapie :
 - Dose initiale par voie SC : 30 000 UI (450 UI/kg) 1 fois par semaine
 - Dose maximale par voie SC : 60 000 UI (900 UI/kg) 1 fois par semaine
- L’augmentation du volume des dons de sang autologues chez les malades participant à un programme de transfusions autologues différées (administration 2 fois par semaine pendant 4 semaines, dose fonction du résultat souhaité).
- La prévention de l’anémie du nouveau-né prématuré (poids compris entre 750 et 1000 g) : administration SC de 250 UI/kg 3 fois par semaine.

D. Profil pharmacocinétique

Peu de données sur le métabolisme de l’EPO sont disponibles. Il est probable que la dégradation de l’EPO survienne après clivage enzymatique dans le foie des acides sialiques terminaux des glycanes (la structure de l’EPO est détaillée dans la section H de ce chapitre). L’élimination urinaire joue seulement un rôle mineur.

La pharmacocinétique de l’epoetin beta a été étudiée chez des volontaires sains, des patients hémodialysés et des patients en dialyse péritonéale, ainsi que chez des patients ayant des degrés d’insuffisance rénale différents. Aucune relation n’a été établie entre la pharmacocinétique et le degré d’insuffisance rénale. L’élimination de l’EPO après une administration intraveineuse est biphasique avec une $\frac{1}{2}$ vie de 4 à 12 heures. Le volume de distribution est égal à une ou deux fois le volume plasmatique. Les taux sériques reviennent aux valeurs initiales après 48 heures. La $\frac{1}{2}$ vie de l’epoetin beta se trouve diminuée dans certains cas chez les patients en dialyse péritonéale et lors d’administrations répétées.

Les données de pharmacocinétique présentées dans le tableau IV.1, révèlent des différences notables entre l'administration sous-cutanée (SC) et l'administration intraveineuse (IV).

Tableau IV.1. Données pharmacocinétiques de l'époétin beta (Vidal, 2008)

Paramètre	Voie d'administration SC	Voie d'administration IV
Demi-vie	13 à 28 h	4 à 12 h
Pic de concentration maximale	12 à 28 h	-
Biodisponibilité relative (voie IV : référence)	23 à 42 %	100 %

L'administration intraveineuse se caractérise par des pics sériques élevés alors que l'administration sous-cutanée se caractérise par une résorption et une élimination prolongées conduisant à des concentrations maintenues en plateau (les taux sériques sont maximaux après 12 à 28 heures. Après administration sous-cutanée, la $\frac{1}{2}$ vie moyenne d'élimination est de 13 à 28 heures. Après 72 heures, le taux sérique d'EPO est encore supérieur à la valeur initiale. La pente de la courbe d'élimination et le taux sérique maximum présentent de grandes variations individuelles.

La résorption lente de l'époétin beta à partir des tissus sous-cutanés, et les taux sériques élevés de façon prolongée, semblent mieux correspondre aux besoins physiologiques (Roche, 1998).

E. Effets indésirables

Les effets indésirables, surtout observés au cours du traitement chez les patients présentant une insuffisance rénale chronique ou une tumeur maligne sous-jacente, sont le plus fréquemment une augmentation de la pression artérielle ou une aggravation d'une hypertension préexistante et des céphalées surtout en cas d'élévation rapide de l'hématocrite. Moins de 10 % des patients recevant de l'érythropoïétine présentent des effets indésirables (Vidal, 2008).

F. Echappement thérapeutique

L'érythropoïétine communément utilisée pour le traitement de l'anémie des patients insuffisants rénaux et des patients atteints de tumeurs malignes non myéloïdes sous chimiothérapie, est une thérapie coûteuse et tous les patients ne répondent pas au

traitement (Bokemeyer *et al.*, 2004 ; Bokemeyer *et al.*, 2007). Actuellement, la dose d'érythropoïétine recombinante humaine est ajustée suivant l'évolution de l'hémoglobémie sous traitement (Afssaps, 2005).

La résistance à l'érythropoïétine des patients insuffisants rénaux chroniques est suspectée quand le patient n'atteint pas la cible alors qu'il reçoit plus de 300 UI/kg/semaine d'érythropoïétine ou a un besoin continu de telles doses pour maintenir la cible. Les causes les plus fréquentes de réponse incomplète sont la carence en fer et les maladies infectieuses ou inflammatoires. L'observance doit être vérifiée.

En ce qui concerne le traitement de l'anémie des patients atteints de tumeurs malignes non myéloïdes, la dose initiale recommandée est de 30 000 UI (450 UI/kg) par semaine administrée en une fois ou répartie en 3 à 7 injections, les deux modalités d'administration ayant la même efficacité (Glaspy et Beguin, 2005 ; Prontazo *et al.*, 2006). Cette dose initiale peut être doublée après 4 semaines de traitement chez les patients non répondeurs (Vidal, 2008). Parmi les patients non répondeurs (40 % en moyenne) après un mois de traitement, 28 % obtiennent une réponse complète avec une double dose d'érythropoïétine recombinante humaine. Cependant les risques d'accidents thromboemboliques et d'hypertension artérielle sont importants aux doses élevées d'EPO employées chez les patients cancéreux.

L'individualisation et l'optimisation des traitements chez les patients non répondeurs, mais aussi chez les répondeurs s'avèrent ainsi nécessaires pour déterminer les doses d'entretien efficaces. L'optimisation des traitements, surtout intéressante pour les fortes doses administrées chez les patients cancéreux, permettrait de déterminer la dose minimum efficace et d'éviter les effets secondaires. Malgré l'utilisation croissante en cancérologie de l'EPO à forte dose administrée une fois par semaine sans effets secondaires graves (Suzuki *et al.*, 2008), peu de données pharmacocinétiques sont disponibles (Fugisaka *et al.*, 2006).

Ainsi, une méthode de dosage plasmatique sensible et spécifique de l'érythropoïétine humaine recombinante est nécessaire. Les techniques immunologiques employées couramment pour doser l'EPO recombinante dans le plasma sont sensibles mais présentent une mauvaise spécificité (détection fréquente de faux positifs ou de faux négatifs). L'apport de la spectrométrie de masse pour le dosage de ces médicaments est double puisque cette technique doit permettre d'atteindre des sensibilités aussi bonnes voire meilleures que les techniques immunologiques avec surtout une meilleure spécificité.

G. Concentrations plasmatiques attendues pour l'époetin beta

La concentration plasmatique maximale (Cmax) en epoetin beta attendue dans le plasma après une injection sous-cutanée de 36 000 UI est de l'ordre de 2 000 UI/mL soit environ 0,5 fmole/ μ L de plasma. Pour des doses de 9000 à 36 000 UI administrées, la pharmacocinétique de l'époetin beta est linéaire (Fugisaka *et al.*, 2006). Ainsi, les Cmax attendues pour des injections SC de 30 000 à 60 000 UI d'époetin beta en cancérologie seront de l'ordre de 0,5 à 1 fmole d'EPO/ μ L de plasma.

H. Structure de l'époetin beta (NEORECORMON®)

L'interrogation de la banque *Swiss-Prot/TrEMBL* pour l'érythropoïétine humaine (EPO_HUMAN, P01588) donne la séquence du précurseur de la protéine de masse 21 307 Daltons (Da) pour une longueur de 193 acides aminés (figure IV.4).

10	20	30	40	50	60
<i>MGVHECPAWL</i>	<i>WLLLSLLSLP</i>	<i>LGLPVLGAPP</i>	<i>RLICDSRVLE</i>	<i>RYLLEAKEAE</i>	<i>NITTGCAEHC</i>
70	80	90	100	110	120
<i>SLNENITVPD</i>	<i>TKVNFYAWKR</i>	<i>MEVGQQAQEV</i>	<i>WQGLALLSEA</i>	<i>VLRGQALLVN</i>	<i>SSQPWEPLQL</i>
130	140	150	160	170	180
<i>HVDKAVSGLR</i>	<i>SLTTLLRALG</i>	<i>AQKEAISPPD</i>	<i>AASAAPLRTI</i>	<i>TADTFRKLFR</i>	<i>VYSNFLRGKL</i>
190					
<i>KLYTGEACRT</i>	<i>GDR</i>				

Figure IV.4. Séquence peptidique du précurseur de l'érythropoïétine (*Swiss-Prot/TrEMBL* ; le peptide signal est en italique)

La base de données *Swiss-Prot/TrEMBL* donne aussi des informations sur:

- la longueur de la séquence signal (acides aminés 1 à 27) ; l'érythropoïétine mature comporte donc 166 acides aminés
- deux ponts disulfures (Cys34-Cys188 et Cys56-Cys60)
- trois N-glycosylations en 51, 65 et 110
- une O-glycosylation en 153
- la localisation des boucles (57-57) et hélices (32-34, 36-55)
- les variants connus (131-132, 149)

L'érythropoïétine humaine mature a donc une masse moyenne calculée à partir de sa séquence de 18 396,14 Da, mais la glycosylation amène la masse de la protéine à environ 34 000 Da. Les deux ponts disulfures sont indispensables à son activité biologique.

L'annexe chapitre 8/paragraphe II fournit des informations complémentaires sur les différentes spécialités pharmaceutiques d'EPO recombinantes actuellement sur le marché.

IV. Mise au point de l'extraction de l'epoetin beta du plasma humain

La quantification d'un médicament protéique tel que l'érythropoïétine humaine recombinante dans le plasma humain est une tâche délicate. En effet, le rapport entre la quantité estimée de protéines plasmatiques dans l'échantillon à analyser et la quantité attendue d'epoetin beta est très défavorable.

Compte tenu de la limite de quantification à atteindre, il nous a donc paru indispensable de débiter par une étape d'enrichissement de l'epoetin beta à partir du plasma humain. Cette première étape, réalisée au moyen d'une chromatographie d'affinité, a provoqué une dilution importante de l'échantillon plasmatique, et nous a imposé une étape supplémentaire de concentration et de dessalage. Les sections qui suivent décrivent les différentes étapes et leurs mises au point.

A. Le choix de la méthode de déplétion des protéines majeures du plasma humain et ses conséquences

La plupart des méthodes mises en œuvre pour doser dans le plasma des médicaments de faible masse moléculaire sont impossibles à utiliser dans notre cas, compte tenu de la nature protéique du médicament, et le rapport très faible entre la quantité de protéine médicament et la quantité de protéines plasmatiques complique la tâche. En effet, la concentration totale des protéines s'élève à environ 884 000 fmoles/ μ L de plasma humain (Le Treut, 2001) alors que la concentration attendue pour l'epoetin beta que l'on veut doser dans le plasma est de l'ordre de 0,5 à 1 fmoles/ μ L de plasma (Fujisaka *et al.*, 2006) (la concentration plasmatique de l'érythropoïétine endogène est d'environ 0,0024 fmoles/ μ L).

L'annexe chapitre 8/paragraphe I fournit des renseignements complémentaires sur la composition du sang et du plasma humains.

A partir de l'étude bibliographique qui a été réalisée et parmi la déclinaison de dispositifs de déplétion des protéines majoritaires du plasma humain proposés, nous avons retenu un dispositif conditionné sous forme d'une cartouche pour centrifugation ou « Spin Cartridge® ». Plus le nombre de protéines que le support de chromatographie d'affinité est capable de déléter est important, plus le coût de ce type de dispositif est élevé. Il en va de même pour la capacité de charge. Pour des raisons économiques nous avons opté pour une cartouche permettant de traiter des échantillons plasmatiques de 12 µL et de supprimer du plasma environ 90 % des 7 protéines majoritaires : il s'agit d'une Spin Cartridge Hu7® ou système MARS® (*Multiple Affinity Removal System ; Agilent Technologies*) présentée dans le paragraphe II.A. du chapitre 2. Selon le fabricant, une cartouche Hu7 est réutilisable environ 200 fois, ce qui représente un coût à l'analyse relativement minime. Par ailleurs, le choix d'un système de Spin Cartridge® est intéressant du point de vue de la rapidité d'analyse et de la robustesse de la stratégie.

Les sept protéines plasmatiques majoritaires concernées par l'immunodéplétion sont l'albumine, l'alpha1-antitrypsine, l'haptoglobine, les immunoglobulines G, les immunoglobulines A, la transferrine et le fibrinogène. Etant donné que la Spin Cartridge Hu7® élimine environ 90 % de ces 7 protéines plasmatiques, les quantités estimées de chacune des protéines majoritaires/µL de plasma après déplétion sont les suivantes :

– Albumine : 42 g/L soit 636 pmoles/µL	- 90 % →	<u>63,6 pmoles/µL</u>
– α1 antitrypsine : 1,9 à 3,5 g/L soit 49 pmoles/µL	- 90 % →	<u>4,9 pmoles/µL</u>
– Haptoglobine : 0,5 à 1,5 g/L soit 8,33 pmoles/µL	- 90 % →	<u>0,833 pmoles/µL</u>
– Ig G : 6 à 8 g/L soit 46,6 pmoles/µL	- 90 % →	<u>4,66 pmoles/µL</u>
– Ig A : 2 à 4 g/L soit 18,7 pmoles/µL	- 90 % →	<u>1,87 pmoles/µL</u>
– Transferrine : 1 à 3 g/L soit 26,3 pmoles/µL	- 90 % →	<u>2,63 pmoles/µL</u>
– Fibrinogène : 3 g/L soit 50 pmoles/µL	- 90 % →	<u>5 pmoles/µL</u>

Autrement dit, la cartouche permet d'éliminer 751 pmoles de protéines par µL de plasma. Ainsi, la concentration en protéines plasmatiques restant théoriquement après déplétion passe de 884 pmoles/µL à 133 pmoles/µL (à volumes supposés constants).

Le tampon A fourni dans le kit Spin Cartridge Hu7® favorise la retenue sur la phase stationnaire des protéines plasmatiques majoritaires ; il est utilisé dans les phases de chargement de l'échantillon, de lavage et de conditionnement, alors que le tampon B favorise l'élution des protéines plasmatiques majoritaires. En conséquence, l'EPO se retrouve en sortie de cartouche dans le tampon A. La composition exacte de ce tampon n'a

pas été communiquée par le fournisseur, mais il s'agit d'une solution de sel de phosphate à pH 7,4 contenant 0,02 % de NaN₃. Ce tampon pouvait notamment nuire à l'efficacité de la protéolyse ; il nous fallait donc éliminer ce risque. De plus, le protocole de déplétion conduit à la dilution de l'échantillon d'un facteur supérieur à 80 (12 µL de plasma chargé pour 1 000 µL d'échantillon récupéré en sortie de cartouche dans le tampon A ; Figure IV.5). Nous avons donc soumis la fraction contenant l'EPO à une étape de dessalage et de concentration qui a nécessité des mises au point.

L'annexe chapitre 7/paragraphe I.A.1 fournit des renseignements complémentaires sur le protocole d'utilisation de la Spin Cartridge Hu7®

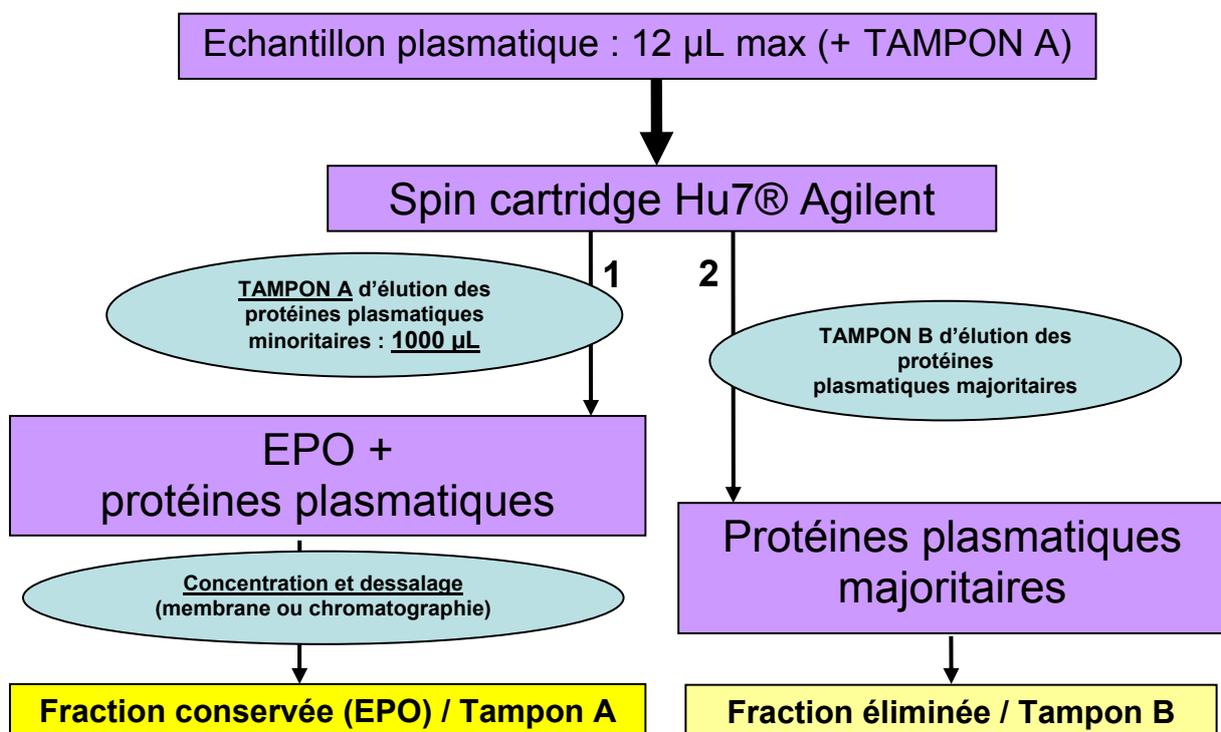


Figure IV.5. Principe de fonctionnement de la Spin Cartridge Hu7® Agilent en deux étapes numérotées 1 et 2.

Il était par conséquent devenu impératif d'évaluer les pertes d'epoetin beta potentielles sur le support d'affinité de la cartouche Hu7, et lors de cette étape de concentration. L'analyse de l'EPO reposant sur celle de ses peptides tryptiques, il fallait aussi évaluer l'efficacité de l'étape de protéolyse.

1. La protéolyse est elle efficace dans le tampon A ?

La trypsine est la seule enzyme protéolytique que nous ayons testée. Cette enzyme présente l'avantage de produire des peptides avec des acides aminés basiques (lysines et arginines) en C-terminal assurant une bonne ionisation du peptide et permettant une bonne efficacité de fragmentation en mode MS/MS pour confirmer l'identité du peptide. De plus, l'agent de dérivation chimique que nous avons choisi pour introduire le marquage isotopique a pour cible les lysines.

L'efficacité de la protéolyse étant conditionnée par le pH de l'échantillon, le rapport quantité de protéines/quantité de trypsine et le temps de réaction, nous avons commencé par vérifier le bon fonctionnement de la trypsine dans le tampon A d'Agilent dans lequel se trouve l'échantillon d'epoetin beta en sortie de cartouche Hu7. Dans un second temps nous avons contrôlé l'influence de la concentration en trypsine et du temps de réaction sur l'efficacité de la digestion.

L'intérêt de ces expériences est de déterminer les conditions optimales de protéolyse permettant de s'assurer que la totalité de l'epoetin beta est protéolysée, condition préalable à une quantification la plus juste possible, et que la trypsine n'est pas autolysée, afin de ne pas rendre plus complexe l'échantillon peptidique. Cette étude est effectuée sur deux échantillons d'epoetin beta préparés dans les mêmes conditions ; dans le premier l'EPO est diluée dans l'eau, dans le second l'EPO est diluée dans le tampon A d'Agilent pur tel qu'il est utilisé pour la déplétion.

L'annexe chapitre 7/paragraphe I.C.1 fournit des renseignements complémentaires sur le protocole de préparation des échantillons d'epoetin beta parallèlement dans l'eau et dans le tampon A Agilent.

Après protéolyse par la trypsine, l'analyse a été effectuée au moyen du spectromètre de masse MALDI-Q-TOF en mode MS. Un spectre caractéristique des peptides tryptiques de l'EPO est présenté sur la figure IV.6.

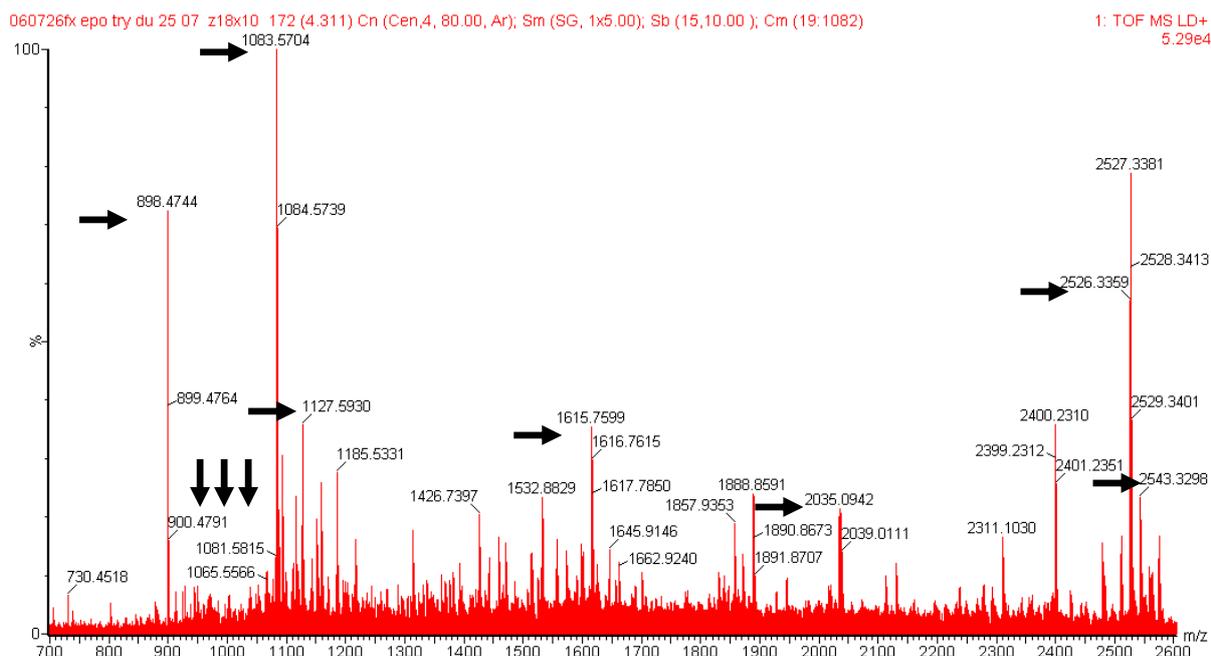


Figure IV.6. Spectre MALDI-Q-TOF obtenu après analyse en mode MS d'une solution de peptides trypsiques d'époetin beta à 144 fmoles/ μ L dans l'eau (les flèches indiquent la position des peptides de l'époetin beta, présentés dans le tableau IV.2).

La confrontation des deux cartes peptidiques obtenues montre des résultats qualitatifs identiques puisque tous les peptides d'époetin beta attendus sont retrouvés avec des intensités similaires voire meilleures en présence de tampon A Agilent (tableau IV.2).

Tableau IV.2. Cartes peptidiques de l'époetin beta clivée par la trypsine observées après analyse en MALDI-Q-TOF (mode MS) pour deux solutions de 144 fmoles/ μ L : dans l'eau et dans le tampon A Agilent (les espèces soulignées sont les plus abondantes).

Masse théorique (ExPASy) (Da)	Epoetin beta dans l'eau		Epoetin beta dans le tampon A Agilent	
	Masses observées (Da)	Intensité lue sur le spectre (valeur relative approximative)	Masses observées (Da)	Intensité lue sur le spectre (valeur relative approximative)
898,4781	<u>898,4749</u>	<u>37 400</u>	<u>898,4751</u>	<u>38 200</u>
912,4244	912,4220	3 210	912,4242	3 300
924,4785	924,4761	2 920	924,4752	2 860
927,4723	927,4700	3 700	927,4756	3 800
1083,5734	<u>1083,5710</u>	<u>51 600</u>	<u>1083,5765</u>	<u>53 000</u>
1127,5990	<u>1127,5936</u>	<u>18 000</u>	<u>1127,5985</u>	<u>16 000</u>
1615,7796	<u>1615,7606</u>	<u>17 900</u>	<u>1615,7663</u>	<u>19 500</u>
2034,0978	2034,0959	9 860	2034,0120	9 000
2526,3384	<u>2526,3374</u>	<u>40 000</u>	<u>2526,3399</u>	<u>42 500</u>
2542,3333	2542,3311	8 630	2542,3365	7 500

La présence du tampon A Agilent à la concentration préconisée par le fabricant ne nuit donc pas à la protéolyse trypsique.

2. Influence de la concentration en trypsine et du temps de protéolyse

Des échantillons d'époetin beta identiques en solution aqueuse sont soumis parallèlement à une protéolyse trypsique avec un rapport trypsine/epoetin beta correspondant à 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 mole/mole. Les cartes peptidiques obtenues par une analyse MALDI-Q-TOF en mode MS de ces échantillons ont été comparées. La meilleure efficacité de protéolyse (intensité de chacun des peptides de l'EPO supérieure) est logiquement atteinte pour la plus grande concentration en trypsine (rapport 1/5). Cependant la contamination par des peptides provenant de l'autolyse de la trypsine survient dès le rapport 1/25. C'est pourquoi le rapport enzyme/substrat de 1/50 a été retenu.

De même le temps de protéolyse optimal a été déterminé. Un compromis entre perte de temps minimale et bonne efficacité a été choisi : 4 h.

L'annexe chapitre 7/paragraphe I.C.1 fournit des renseignements complémentaires sur le protocole de préparation des échantillons d'époetin beta pour les études d'influence de la concentration en trypsine et du temps de protéolyse.

3. L'époetin beta est-elle perdue sur la Spin Cartridge Hu7® ?

De façon à évaluer le comportement de l'époetin beta sur la cartouche de déplétion ainsi que l'effet de l'étape de concentration, une quantité importante d'EPO (9760 fmoles) a été soumise (1) à la procédure de déplétion sur Spin Cartridge Hu7® suivie de concentration ou (2) à l'étape de concentration seule ou (3) à aucune de ces deux étapes. Pour ce premier essai de concentration de l'échantillon recueilli en sortie de cartouche Hu7, nous avons utilisé le dispositif de concentration préconisé par le fournisseur des cartouches de déplétion Hu7 (Spin concentrator® Agilent 5000 Da).

Après protéolyse par la trypsine, l'analyse a été effectuée au moyen du spectromètre de masse MALDI-Q-TOF en mode MS. Le tableau IV.3 présente de gauche à droite les cartes peptidiques de l'époetin beta soumise à la déplétion Hu7 puis concentration, soumise à concentration uniquement et enfin non soumise ni à la déplétion Hu7 ni à la concentration

(échantillon de référence). Seuls les peptides de m/z 898,46 et 924,48 sont retrouvés avec de très faibles intensités après déplétion et concentration. Nous étions donc confrontés à un premier problème majeur.

L'annexe chapitre 7/paragraphe I.A.2 fournit des renseignements complémentaires sur le protocole de préparation des échantillons d'epoetin beta pour les études d'influence des étapes de déplétion et de concentration.

Tableau IV.3. Réponses des peptides tryptiques de l'epoetin beta observées en MALDI-Q-TOF (mode *full scan*) pour une solution de 9760 fmoles non soumise ou soumise à déplétion Hu7.

Masse théorique (ExpASy) (Da)	Echantillon soumis à déplétion Hu7 puis concentration		Echantillon soumis à concentration uniquement		Echantillon de référence non soumis à déplétion Hu7 ni à concentration	
	Masses observées (Da)	Intensité lue sur le spectre (valeur relative)	Masses observées (Da)	Intensité lue sur le spectre (valeur relative)	Masses observées (Da)	Intensité lue sur le spectre (valeur relative)
898,4781	898,45	461	898,46	454	898,42	3 360
912,4244					912,42	4 750
924,4785	924,46	291	924,48	309	924,45	1 130
927,4723					927,47	1 380
1083,5734					1083,55	4 480
1127,5990					1127,58	8 710
1341,6215					1341,62	2 750
1615,7796					1615,78	3 740
2034,0978					2034,09	11 800
2526,3384					2526,35	11 600
2542,3333					2542,34	25 600
2682,4395					2682,45	37 800
2698,4344					2698,43	12 800

La disparition presque totale des peptides d'epoetin beta, lorsque celle-ci a été soumise successivement aux étapes de déplétion et de concentration pourrait indiquer que l'epoetin beta est perdue sur la cartouche de déplétion. Or le même résultat est obtenu lorsque l'EPO subit seulement l'étape de concentration, indiquant que l'étape limitante est au moins l'étape de concentration. Cependant, ce résultat ne démontre en rien que l'étape de déplétion ne conduit pas à une perte partielle de l'EPO.

La perte d'epoetin beta peut résulter d'une adsorption sur la membrane du Spin concentrator® préconisé par Agilent ou de son passage anormal à travers la membrane dans le filtrat malgré une porosité de membrane (5 000 Da) largement en dessous de la taille de l'EPO. Cependant, il ne fallait pas oublier que la cartouche de déplétion doit être utilisée à terme avec un échantillon plasmatique humain, plus complexe et plus concentré que la solution d'EPO dans l'eau.

La même expérience a donc été réalisée à partir de plasma surchargé en epoetin beta, et a donné un résultat encore plus décevant : aucun peptide de l'EPO n'a pu être observé sur le spectre rendu complexe par les peptides issus des protéines plasmatiques. Ainsi, de nouvelles conditions de concentration ont donc dû être explorées.

B. Mise au point de l'étape de concentration précédant la protéolyse trypsique

Le but de ces expériences était de trouver la meilleure méthode de concentration pour obtenir un échantillon enrichi en epoetin beta qui soit compatible avec les conditions de protéolyse en vue de la quantification des peptides.

L'étalon interne n'étant rajouté qu'après l'étape de protéolyse, toutes les étapes antérieures doivent impérativement avoir le meilleur rendement possible. A cette fin, nous avons dans un premier temps évalué plusieurs types de concentrateurs au moyen d'un échantillon d'epoetin beta pure. Dans un second temps, nous avons testé différents procédés chromatographiques pour dessaler puis concentrer notre échantillon.

1. Concentrateurs à membrane

Les dispositifs de concentration ont été testés en respectant les indications données par les fabricants, avec des solutions d'epoetin beta à 9 760 fmoles/1 000 µL de tampon A d'Agilent.

Les systèmes de concentrateur à membrane maintiennent une concentration élevée en sels dans l'échantillon, qui ne permet pas une analyse directe de la protéine entière en MALDI. C'est pourquoi nous avons utilisé les abondances relatives des peptides tryptiques de l'EPO, (analyse au moyen du spectromètre MALDI-Q-TOF en mode MS) pour évaluer de manière approximative le taux de perte d'epoetin beta en comparant un échantillon de référence aux échantillons traités sur concentrateur. Le tableau IV.4 résume brièvement les résultats d'une longue série d'essais.

L'annexe chapitre 7/paragraphe I.B.1 fournit des renseignements complémentaires sur les protocoles de concentration des échantillons d'epoetin beta par les différents types de concentrateurs.

Tableau IV.4 : Résultats des essais de concentration d'une solution aqueuse d'époetin beta menés sur différents concentrateurs à membrane.

<i>Désignation</i>	<i>Fabricant</i>	<i>Seuil de coupure</i>	<i>Capacité (μl)</i>	<i>Résultat / EPO</i>
Spin concentrator®	Agilent	5 000 Da	1 000	Perte > 90%
Vivaspin®	Vivascience	5 000 Da	500	Perte totale
Vivaspin®	Vivascience	3 000 Da	500	Perte ~ 90%
Microcon®	Millipore	10 000 Da	500	Perte ~ 90%
Microcon®	Millipore	3 000 Da	500	Pas de passage dans le filtrat, mais perte ~ 90%

Deux hypothèses pouvaient être avancées pour expliquer la perte de la protéine : son passage à travers la membrane de concentration (malgré une porosité de membrane très inférieure à la taille de la protéine) ou son adsorption sur cette même membrane.

L'analyse des filtrats a permis de confirmer qu'une partie de l'EPO traverse la membrane du concentrateur. En revanche la quantité d'EPO retrouvée dans les filtrats ne permettait pas d'expliquer la totalité de la perte de cette protéine. La preuve en est que l'abaissement du seuil de coupure de 5 000 à 3 000 Da n'a pas apporté d'amélioration notable. La majeure partie de l'EPO était donc adsorbée sur la membrane de concentration.

Dans le but de limiter cette adsorption, une étape préalable de passivation de la membrane par une solution aqueuse à 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) a été ajoutée au protocole. Ces conditions se rapprochaient du contexte réel dans lequel l'EPO plasmatique pouvait être traitée sur un concentrateur. Cependant, malgré cette passivation, la perte d'EPO est restée de l'ordre de 50 % (résultats non présentés).

Les dispositifs de concentration sur membrane étaient donc à proscrire dans le cas particulier de l'époetin beta. En conséquence, nous avons testé une solution faisant appel à la chromatographie à polarité de phase inversée.

2. Microchromatographie C4 sur ZipTip™

Nous avons d'abord tenté d'utiliser un dispositif ZipTip™ (Millipore), avec un support chromatographique greffé en C4. Le ZipTip™ C4 est un cône de 10 μL pour pipette contenant à son extrémité 0,6 μL de phase stationnaire de chromatographie à polarité de

phase inversée. Les avantages de cette solution résident dans une rapidité et une simplicité de mise en œuvre, sans recours à un système chromatographique.

Pour l'adapter au dessalage et à la concentration d'un échantillon de 1 000 μL , le ZipTip™ C4 a été monté à l'extrémité d'un embout de pipette de 1 000 μL . La composition du tampon A d'Agilent lui confère une force éluante nulle envers une protéine sur le support C4 du ZipTip™, qui possède par ailleurs une capacité théoriquement suffisante pour retenir la quantité de protéines restant dans l'échantillon après déplétion du plasma. Nous avons donc décidé de tester ce type de dessalage et concentration malgré le grand volume d'échantillon.

L'analyse de l'EPO entière en mode MALDI-TOF a rapidement montré la limite de cette approche. La figure IV.7 montre le spectre de masse de l'epoetin beta obtenu avec un dépôt d'un peu moins de 5 picomoles de protéine pure. Le pic large de masse moyenne 29 600 Da correspond à l'espèce monochargée de l'epoetin beta et présente une intensité relative moyenne de 700 sur plusieurs dépôts analysés. Après passage sur ZipTip™, la même quantité d'échantillon mais dans un volume de 1 000 μL du tampon A d'Agilent donne un pic d'EPO d'intensité inférieure à 100 (figure IV.8).

L'annexe chapitre 7/paragraphes I.B.2 et I.E.1 fournit des renseignements complémentaires sur les protocoles de concentration des échantillons d'epoetin beta par microchromatographie ZipTip® C4 et sur le principe de l'analyse en protéine entière par MALDI-TOF en mode réflectron.

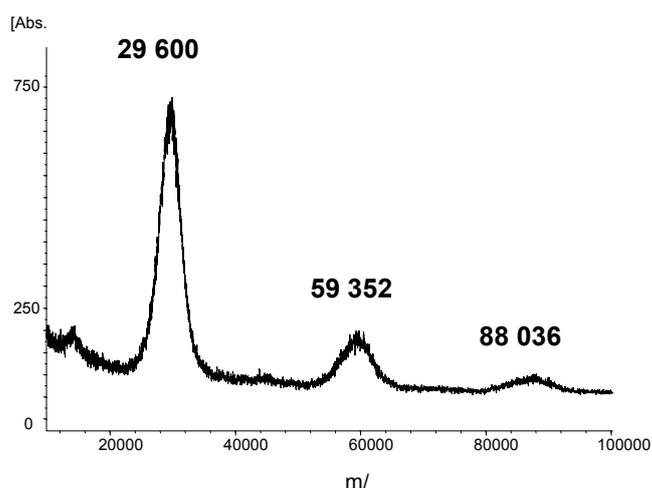


Figure IV.7. Spectre MALDI-TOF obtenu après analyse en mode linéaire d'un dépôt de 4 880 fmoles d'epoetin beta pure (matrice : acide sinapinique)

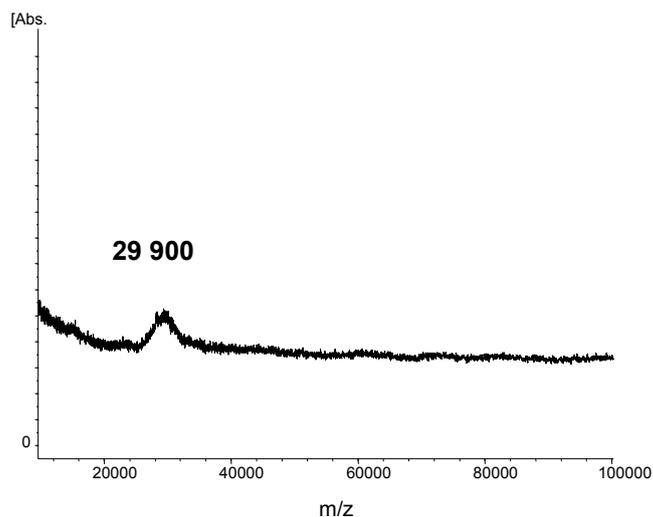


Figure IV.8. Spectre MALDI-TOF obtenu après analyse en mode linéaire d'une solution de 4 880 fmoles d'epoetin beta/1 000 μ L de tampon A dessalée sur ZipTip™ C4 (matrice : acide sinapinique).

Le grand volume d'échantillon chargé sur le ZipTip™ pouvant être à l'origine de cette perte, nous avons traité avec le ZipTip™ C4 des échantillons d'EPO de différents volumes : 20, 100, 200 et 1 000 μ L dans le tampon A d'Agilent. L'analyse MALDI-TOF de la protéine entière (spectres non présentés) montre qu'il n'y a pratiquement pas de perte d'EPO en passant de 20 à 100 μ L, mais que cette perte devient très importante lorsque le volume de l'échantillon dépasse cette valeur. La dénaturation préalable de l'échantillon protéique (concentration finale avant passage sur ZipTip™ d'urée 2 M ou 4 M, ou de guanidine 2 M) n'apporte pas d'amélioration importante.

L'analyse de la carte peptidique obtenue après protéolyse catalysée par la trypsine confirme ce résultat. Nous avons donc décidé d'utiliser une véritable colonne de chromatographie afin de pouvoir traiter de plus gros volumes d'échantillon. Cette solution garde l'avantage de la rapidité, mais requiert un système de chromatographie en phase liquide.

3. Chromatographie sur colonne C4

Nous avons d'abord choisi une minicolonne de chromatographie C4 Aquapore® (30 mm x 2,1 mm ; support Brownlee C4 Bu-300, particules de 7 μ m, utilisée à un débit de 200 μ L/min) permettant de récupérer l'epoetin beta partiellement purifiée au terme d'une analyse de 12 min, temps du même ordre de grandeur que celui consommé par les concentrateurs auxquels nous avons renoncé, permettant de conserver l'objectif d'un protocole ayant la plus courte durée possible.

En sortie de colonne, l'EPO est détectée par mesure de l'absorbance à 280 nm (Figure IV.9). Le volume de la fraction [11-12] min (volume collecté : 200 μ L), a été réduit à 50 μ L par évaporation sous vide (SpeedVac, Savant). La présence d'EPO dans cette fraction a été confirmée par analyse MALDI-TOF en mode linéaire.

L'annexe chapitre 7/paragraphe I.B.3.a fournit des renseignements complémentaires sur le protocole de concentration des échantillons d'epoetin beta par chromatographie Aquapore® Brownlee C4 Bu-300.

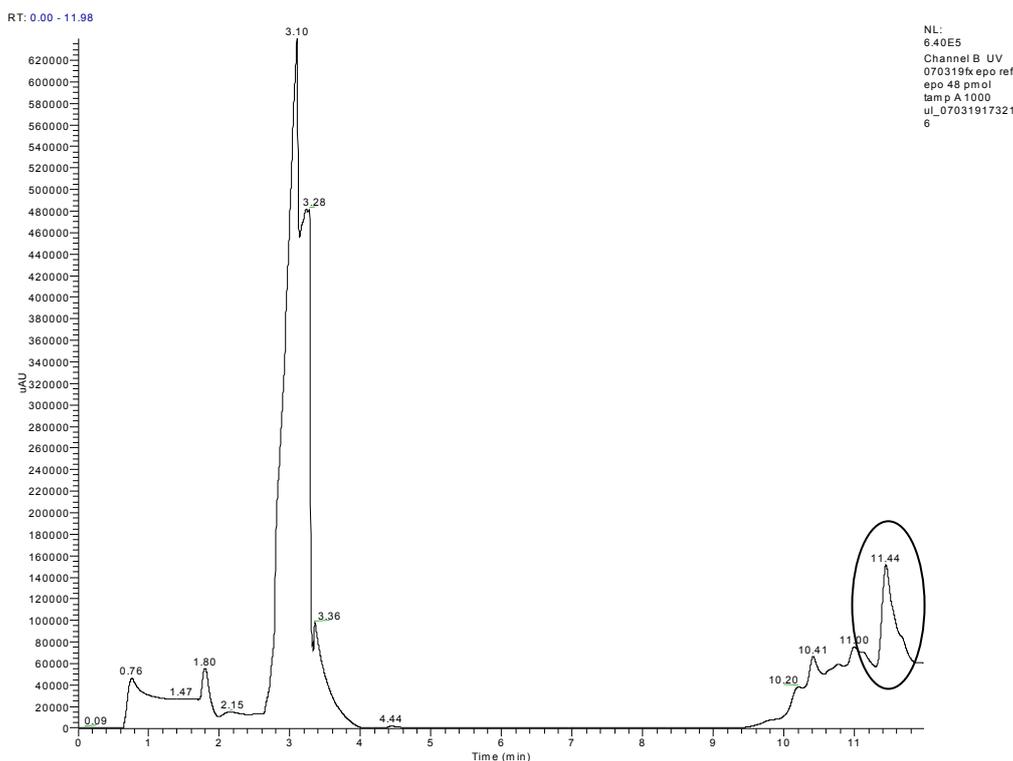


Figure IV.9. Chromatogramme UV à 280 nm (colonne C4 Aquapore®, Brownlee) d'une solution de référence de 48 pmoles d'epoetin beta dans 1 000 μ L de tampon A (sans déplétion préalable). La fraction collectée entre 11 et 12 minutes contient l'EPO (pic entouré)

Ces conditions de chromatographie de l'EPO ayant été établies, il était nécessaire de vérifier qu'elles étaient adaptées à l'analyse de l'epoetin beta en solution dans le plasma. Pour cela un échantillon de plasma surchargé par une quantité connue d'epoetin beta (4,8 pmoles) a été analysé dans les mêmes conditions (figure IV.10). La fraction [11-12] min dans laquelle se trouve l'epoetin beta et une partie des protéines plasmatiques a été collectée. Les fractions [10-11] min et [12-13] min ont été collectées pour contrôle.

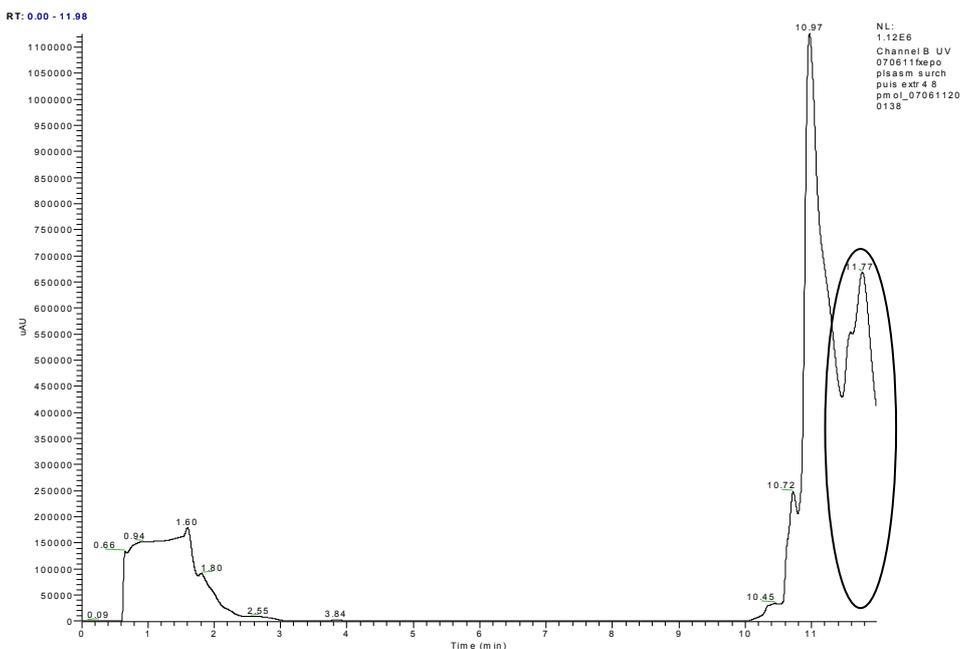


Figure IV.10. Chromatogramme UV à 280 nm (colonne C4 Aquapore®, Brownlee) d'une solution plasmatique d'époétin beta dans 1 000 μ L de tampon A (4,8 pmoles d'époétin beta dans le plasma) après déplétion Hu7.

L'analyse effectuée par spectrométrie de masse MALDI-Q-TOF en mode MS des peptides obtenus après protéolyse a permis de retrouver l'EPO dans la seule fraction [11-12] min. Comme nous le verrons plus loin, une première recherche de sensibilité de détection avec ce mode d'analyse a conduit à une **limite de détection de 400 fmoles d'époétin beta/ μ L de plasma**. Cette valeur était très largement insuffisante, car les concentrations d'époétin beta attendues en thérapeutique sont de l'ordre de 1 fmoles/ μ L. Le phénomène de désorption sélective du mode MALDI était vraisemblablement la cause principale de cette médiocre performance. De plus, la faible longueur de la colonne ne permettait pas de réaliser une séparation efficace lorsque le volume injecté est très grand ; cette absence de séparation se traduit par une trop grande complexité du mélange de peptides à analyser.

Pour tenter d'abaisser la limite de détection, nous avons modifié l'étape de chromatographie de phase inversée en essayant d'améliorer la séparation entre l'EPO et les protéines plasmatiques qui n'ont pas été éliminées par l'étape de déplétion. C'est pourquoi une colonne de plus grand diamètre (4,6 mm), offrant de ce fait une plus grande capacité de charge, ainsi qu'une meilleure efficacité de séparation en raison d'une longueur de 150 mm a été choisie pour purifier l'époétin beta collectée en sortie de cartouche Hu7. Il s'agit d'une colonne de chromatographie Vydac® C4 214TP Reversed Phase à particules de 5 μ m (Grace).

L'annexe chapitre 7/paragraphe I.B.4 fournit des renseignements complémentaires sur le protocole de concentration des échantillons d'epoetin beta par chromatographie Vydac® C4 241 TP.

Afin de trouver les conditions de gradient permettant la meilleure séparation entre EPO et protéines plasmatiques, la mise au point des conditions de chromatographie a été menée d'abord avec un échantillon d'EPO en solution dans le tampon de sortie de colonne Hu7 (tampon A), puis avec un échantillon plasmatique surchargé en epoetin beta. Une quantité importante d'epoetin beta (48 pmoles) a été engagée dans ces étapes de mise au point afin de permettre l'observation d'un pic net d'EPO par détection à 280 nm.

La figure IV.11 présente à droite le chromatogramme UV à 280 nm obtenu avec l'EPO en solution dans le tampon A. A gauche est présenté le contrôle correspondant réalisé avec le tampon A seul. Le pic attribué à l'EPO apparaît à 11 min sur le chromatogramme de droite (la vérification a été effectuée par spectrométrie de masse). Le changement de colonne n'augmente pas le temps d'analyse par rapport à la colonne de 3 cm.

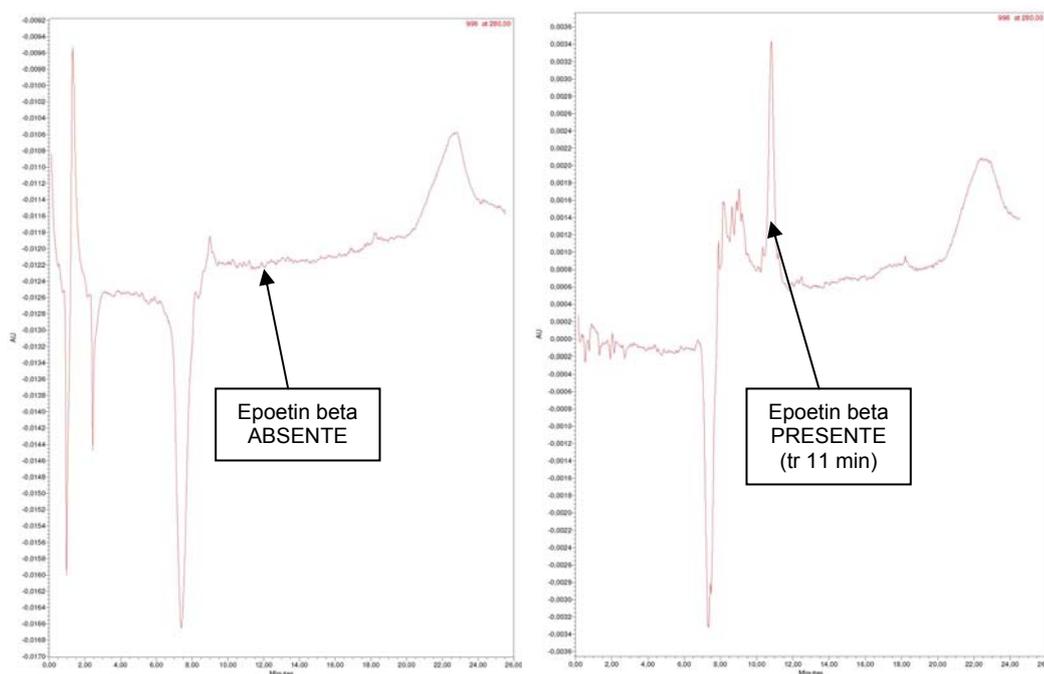


Figure IV.11. Chromatogrammes UV à 280 nm (colonne C4 Vydac® 150 x 4,6 mm) d'une solution de tampon A seul (à gauche) et d'une solution de référence de 48 pmoles d'epoetin beta dans 1 000 µL de tampon A (à droite).

La figure IV.12 à droite présente le chromatogramme obtenu à partir d'un plasma surchargé en epoetin beta (48 pmoles) en sortie de cartouche de déplétion Hu7. Le contrôle obtenu avec du plasma non surchargé en epoetin beta, mais également traité par la

cartouche de déplétion Hu7 est montré à gauche. L'EPO est retrouvée sur le chromatogramme de droite au temps de rétention attendu (11 min). Cette étape de chromatographie C4 de plus grande capacité et plus résolutive permet d'isoler l'epoetin beta de la majeure partie des protéines plasmatiques ; il reste à en vérifier l'efficacité sur le plan quantitatif, et *in fine* sur la limite de détection.

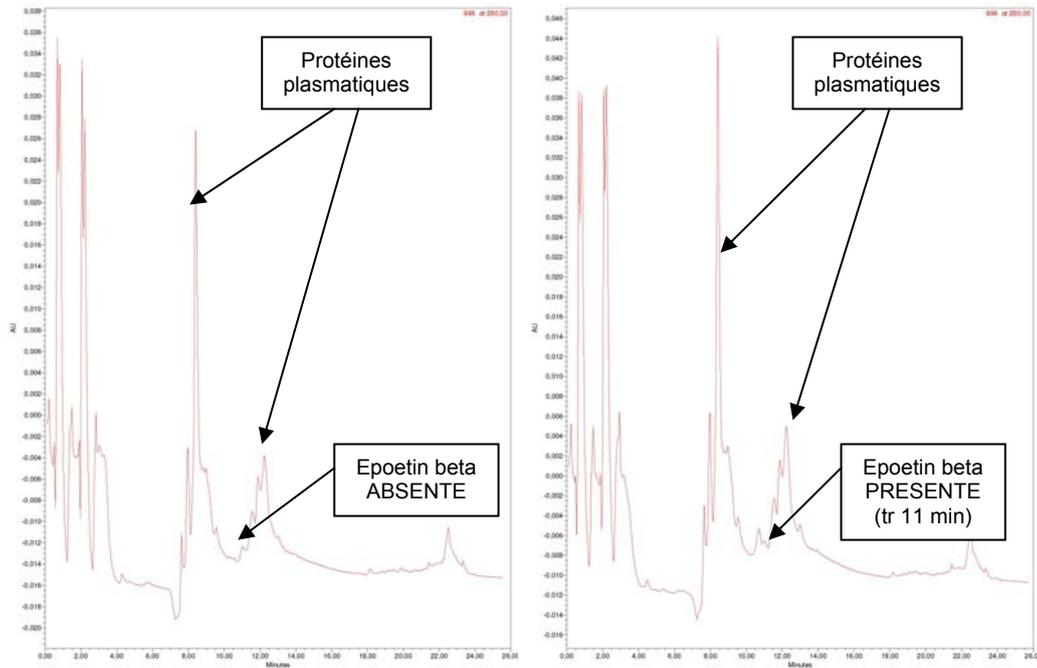


Figure IV.12. Chromatogrammes UV à 280 nm (colonne C4 Vydac® 150 x 4,6 mm) d'un plasma non surchargé en epoetin beta après déplétion Hu7 (à gauche) et d'un plasma surchargé avec 48 pmoles d'epoetin beta après déplétion Hu7 (à droite).

4. Traitement de la fraction d'epoetin beta purifiée par chromatographie Vydac® C4 avant protéolyse

La fraction de la chromatographie Vydac® C4 correspondant à l'epoetin beta (1 mL, soit une minute de collecte) doit être concentrée avant de subir l'étape de protéolyse. Nous avons choisi de mener cette étape par évaporation douce sous vide (SpeedVac, Savant). L'étape d'évaporation à sec et de reprise de l'échantillon collecté en sortie de colonne Vydac® C4 a dû faire l'objet d'une mise au point précise. En ayant tout d'abord voulu éviter d'évaporer à sec par crainte de pertes lors de la remise en solution, nous avons constaté que si le volume non évaporé est supérieur à 10 µL, la protéolyse trypsique est perturbée et de nombreux peptides de l'epoetin beta ne sont pas retrouvés. Devant la difficulté technique à garder de manière reproductible un faible volume non évaporé, les échantillons ont été

amenés à sec. Il a donc fallu optimiser les conditions de remise en solution (analyse par spectrométrie de masse en mode MALDI).

La meilleure solution trouvée consiste en une reprise dans 5 μL d'une solution d'ACN/eau 50/50 (v/v) suivie d'un cycle de vortex 30 sec/centrifugation 30 sec puis addition de 45 μL d'eau suivi d'un second cycle vortex 30 sec/centrifugation 30 sec/ultrasons 30 sec. L'échantillon de 50 μL obtenu après mise en œuvre de notre protocole de concentration/reprise après chromatographie C4 est alors adapté à l'étape de protéolyse qui suit, ainsi qu'à celle de dérivation chimique des peptides.

C. Etude préliminaire de sensibilité et analyse par MALDI-Q-TOF des fractions purifiées par minichromatographie C4 Aquapore® Brownlee

Lors de la première phase d'étude de faisabilité du projet de quantification de l'époetin beta par spectrométrie de masse, le choix de l'appareil s'est arrêté sur une technique MALDI-Q-TOF en raison de sa grande précision de mesure, de sa facilité et de sa rapidité d'utilisation.

1. Etude préliminaire de sensibilité

L'étude de sensibilité de l'appareil a été menée sur une solution aqueuse d'époetin beta soumise à clivage trypsique puis diluée en cascade.

Les peptides tryptiques ont été concentrés sur ZipTip™, puis mélangés à volume égal avec une solution de matrice (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (Sigma) à 3,6 mg/mL dans acétonitrile/eau 1/1 avec 0,1 % de TFA). Un étalon externe, le Glu-fibrinopeptide, de masse monoisotopique 1570,6774 Da, est déposé sur la cible et analysé avant chaque échantillon. Cet étalon externe est utilisé pour un réétalonnage post-acquisition sur un point (*Lockmass*).

Dix peptides appartenant à l'époetin beta sont détectés à partir d'une solution mère à 144 fmoles/ μL (spectre IV.6, présenté plus haut et tableau IV.5 ci-dessous). Notons que l'espèce 1615,77 Da correspond aux deux peptides $^5\text{LICDSR}^{11}$ et $^{155}\text{LYTGEACR}^{162}$ de l'époetin beta reliés par un pont disulfure. En utilisant la correction *Lockmass*, l'exactitude des mesures de masse des peptides est de l'ordre de 3 ppm (2,2 ppm pour les masses du

tableau IV.5). L'identité de ces peptides a été confirmée par une analyse MS/MS des ions fragments de ces peptides.

Tableau IV.5 Caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-Q-TOF des peptides tryptiques de l'EPO (les masses soulignées correspondent aux peptides vus sur le spectre de la figure IV.6 à cette échelle)

Masse théorique (ExPASy) (Da)	Masses observées (Da)	Exactitude (ppm)	Position dans la séquence (numérotation de la protéine mature)
898,4781	898,4749	3,5	144-150
912,4244	912,4220	2,6	155-162
924,4785	924,4761	2,6	132-139
927,4723	927,4700	2,5	46-52
1083,5734	1083,5710	2,2	46-53
1127,5990	1127,5936	4,8	1-10
1615,7796	1615,7606	1,2	5-11 + 155-162 pont S-S
2034,0978	2034,0959	0,9	111-131
2526,3384	2526,3374	0,4	54-76
2542,3333	2542,3311	0,8	54-76

La solution mère de peptides tryptiques d'EPO est ensuite diluée en cascade dans l'eau pour établir une gamme de concentrations allant jusqu'à 0,36 fmole d'epoetin beta/ μ L. **La concentration ultime pour laquelle des peptides de l'epoetin beta sont encore visibles est de 0,72 fmole/ μ L** (figure IV.13, espèces de m/z 898,48, 1083,60 et 1615,74).

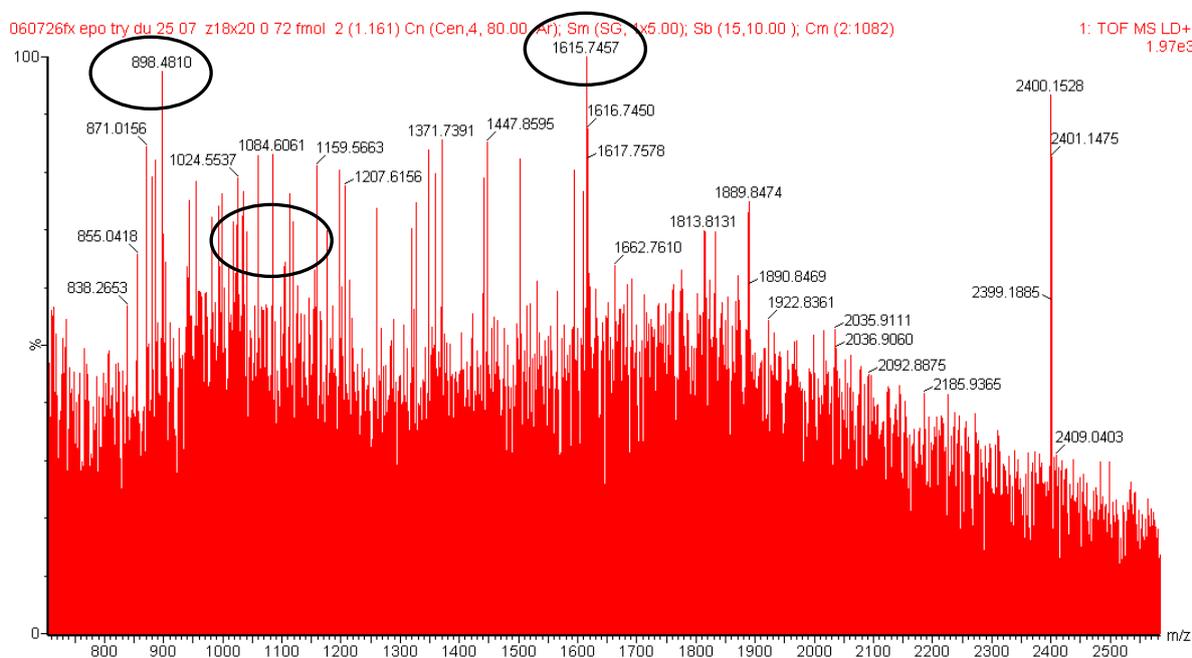


Figure IV.13. Spectre MALDI obtenu après analyse en mode MS d'une solution de peptides tryptiques d'epoetin beta à 0,72 fmole/ μ L (MALDI-Q-TOF, Waters)

Malgré le rapport signal/bruit faible observé dans le cas de l'échantillon à 0,72 fmole/ μ L, le pic de m/z 1615,74 a pu être analysé en mode MS/MS (figure IV.14). Ce peptide est atypique dans la mesure où il correspond à deux peptides tryptiques réunis par un pont disulfure, et peut donc constituer une signature spécifique de l'époetin beta.

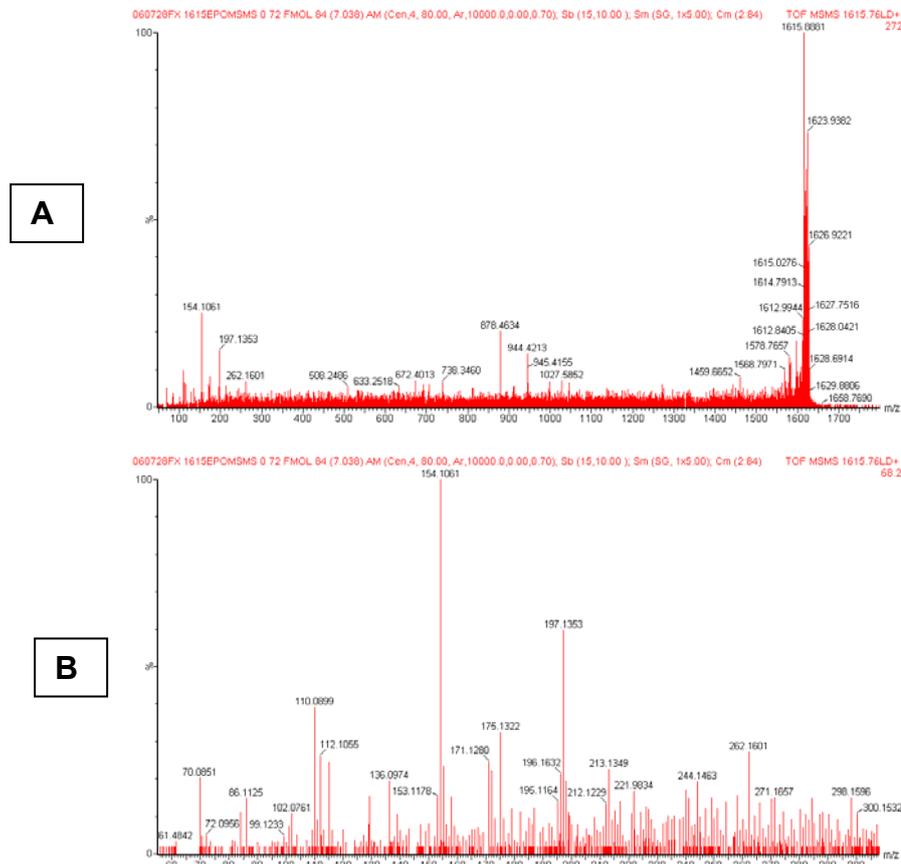


Figure IV.14. (A) Spectre des ions fragments du précurseur m/z 1615,74 Da obtenu après analyse des peptides tryptiques d'époetin beta pour un dépôt de 0,72 fmole/ μ L (B) zoom sur la zone 60-300 m/z (MALDI-Q-TOF Waters)

Le spectre de la figure IV.14 montre les ions fragments obtenus pour l'espèce 1615,74 Da qui sont en accord avec les fragments théoriques issus des deux peptides constituant cette espèce (le module *MS-product* du moteur de recherche *ProteinProspector* a été utilisé pour obtenir la liste des masses théoriques de ces ions fragments).

Le même type d'analyse des peptides tryptiques au moyen du MALDI-Q-TOF a été appliqué à la caractérisation de l'époetin beta après chaque étape du protocole utilisé jusqu'à ce stade, d'abord avec des solutions d'EPO pure, puis à partir de plasma surchargé en EPO.

2. Analyse de plasma surchargé en epoetin beta

Afin de déterminer la limite de détection en MALDI-Q-TOF mode MS, des échantillons plasmatiques surchargés par de l'epoetin beta ont été analysés. L'échantillon plasmatique le moins surchargé en EPO ayant permis l'observation de peptides appartenant à l'epoetin beta contenait 4,88 pmoles d'epoetin beta/12 μ L de plasma humain soit une **limite de détection de 400 fmoles d'epoetin beta par μ L de plasma**. Cette première limite de détection de l'epoetin beta plasmatique avait été déterminée sur un échantillon de plasma surchargé en epoetin beta, déplété puis concentré par minichromatographie Aquapore® Brownlee C4. Le spectre de masse obtenu en mode *full scan* pour cet échantillon plasmatique est présenté figure IV.15.

L'annexe chapitre 7/paragraphes I.B.3.b, I.C.3 et I.E.2 fournissent des renseignements complémentaires sur le protocole de concentration des échantillons d'epoetin beta par chromatographie Aquapore® Brownlee C4 Bu-300, de protéolyse et d'analyse en MALDI-Q-TOF.

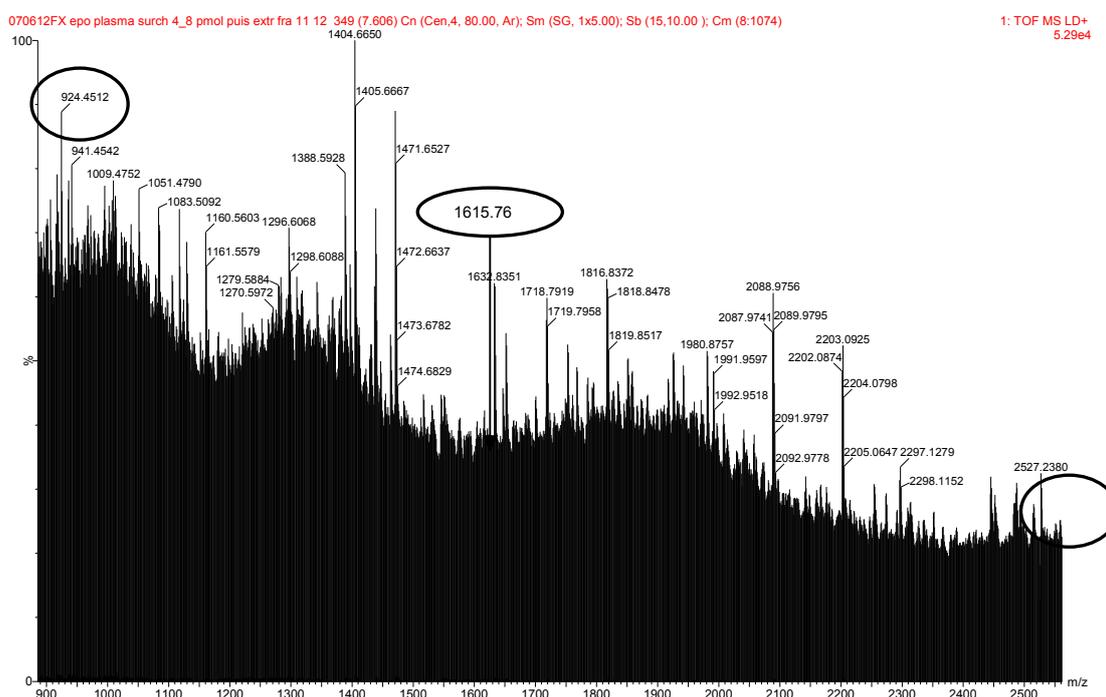


Figure IV.15. Spectre de masse MALDI-Q-TOF mode MS correspondant à la fraction 11-12 min de la chromatographie C4 Aquapore® Brownlee (présentée en figure IV.10) d'une solution plasmatique d'epoetin beta (4,8 pmoles d'epoetin beta dans le plasma) ayant subi la déplétion Hu7.

Sur le spectre de masse figure IV.15, seules trois espèces sur les dix observées dans l'échantillon de référence (tableau IV.5) sont retrouvées après analyse de l'échantillon

d'epoetin beta plasmatique à la limite de détection de la technique (masses entourées, m/z 924,45 1615,76 et 2526,23).

Nous avons vérifié que ces peptides constituent bien une signature authentique de l'epoetin beta, c'est-à-dire qu'aucun de ces peptides n'est présent dans le plasma. Le spectre de masse obtenu en mode *full scan* pour un échantillon plasmatique non surchargé en epoetin beta (spectre non présenté) met en évidence les deux espèces 924,45 et 1615,77 Da. Ces deux peptides ne sont donc pas spécifiques de l'epoetin beta. En revanche le peptide de masse 2526,33 Da, absent du plasma sans epoetin beta, est spécifique du médicament. Il s'agit donc de la seule signature de l'EPO exploitable pour notre objectif de quantification. La confirmation de la séquence du peptide de m/z 2526,33 a été obtenue par une analyse MS/MS (séquence et position du peptide de m/z 2526,33 : ⁵⁴MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR⁷⁶).

Tableau IV.6. Ions fragments identifiés par MALDI-MS/MS pour l'espèce 2526,33 Da

Fragments théoriques (m/z)	Fragments observés pour l'epoetin beta
112,09	
171,11	171,12
175,12	175,13
186,09	
200,10	
227,18	227,18
261,11	261,11
271,19	271,19
285,16	
411,19	411,22
458,31	458,32
595,34	595,31

La limite de sensibilité de 400 femtomoles d'epoetin beta/ μ L de plasma obtenue sur un échantillon déplété, concentré par minichromatographie Aquapore® Brownlee C4 puis analysée en MALDI-Q-TOF en mode MS est décevante.

L'écart observé entre la limite de sensibilité obtenue pour l'epoetin beta purifiée (1 femtomole par microlitre environ) et la limite de sensibilité obtenue pour l'epoetin beta dans le plasma peut s'expliquer par un phénomène de désorption/ionisation sélectives caractéristique du mode MALDI en raison de la complexité du mélange de peptides analysés.

Les développements ultérieurs ont donc porté sur la recherche d'un mode de dérivation chimique des peptides pour tenter d'améliorer la limite de détection en MALDI puis sur l'utilisation du mode d'ionisation ESI en couplage avec la chromatographie devant permettre d'atteindre les objectifs quantitatifs fixés.

V. Introduction d'une méthode de quantification universelle par marquage peptidique

A. Principe et choix du réactif

Nous avons abordé précédemment l'importance que revêtait le dosage de protéines médicaments en thérapeutique. Quels que soient les avantages ou les inconvénients des méthodes de dosage employées en routine un inconvénient majeur ressort : le fait que la méthode de dosage utilisée soit propre à la molécule dosée et ne soit donc pas applicable à toutes les protéines médicaments prescrites actuellement aussi bien qu'à celles qui seront élaborées à l'avenir. La méthode AQUA™ (Sigma-Aldrich) présentée dans le chapitre II est celle qui se rapproche le plus d'un objectif de méthode universelle de quantification absolue des protéines. Cependant, cette méthode requiert la production, pour chaque protéine à doser, d'un peptide synthétique marqué (ou AQUA™ peptide) choisi comme étalon interne.

La stratégie que nous avons élaborée doit permettre d'éviter cet inconvénient dans la mesure où elle ne requiert pas l'ajout d'un peptide de synthèse. En effet, l'étalonnage interne est obtenu directement à partir de la protéine médicament soumise à une protéolyse enzymatique. Les peptides produits sont marqués au moyen d'un réactif spécifique des lysines, utilisé pour introduire le marquage isotopique. Ainsi, tous les peptides marqués peuvent servir d'étalon interne. Une telle stratégie devrait offrir un avantage considérable par rapport à la méthode AQUA™, dans la mesure où le dosage pourra reposer non plus sur un seul peptide mais sur plusieurs.

Le réactif de dérivation chimique est préparé sous deux versions, « légère » et « lourde ». Dans la version lourde, 4 deutérons remplacent 4 atomes d'hydrogène ^1H . Après protéolyse, l'échantillon à doser est marqué par la version légère du réactif. En parallèle, les peptides de la protéine médicament pure, hydrolysée au moyen de la même protéase, sont eux marqués par la version lourde du réactif afin de servir d'étalons internes.

Le réactif de marquage choisi est le 2-méthoxy-4,5-dihydro-imidazole (figure IV.16). Ce réactif est spécifique des groupements $\epsilon\text{-NH}_2$ des lysines, et ne modifie pas les groupements N-terminaux des peptides (Peters *et al.*, 2001). Le réactif a été synthétisé au laboratoire par Frédéric Godde selon la méthode préconisée par Peters *et al.*, dans une version légère (réactif D0, isotope ^1H), qui provoque un incrément de masse de 68,03 Da de chaque lysine modifiée et dans une version lourde (réactif D4, isotope ^2H) produisant un incrément de masse de 72,06 Da par lysine modifiée (figure IV.16).

L'étalon interne destiné au dosage quantitatif est préparé parallèlement à l'échantillon biologique : il s'agit d'une solution d'époetin beta digérée par la trypsine puis marquée par le réactif D4. La quantification absolue de l'époetin beta est réalisée par la mesure des hauteurs relatives des signaux en spectrométrie de masse de peptides tryptiques sous leurs formes D0 et D4.

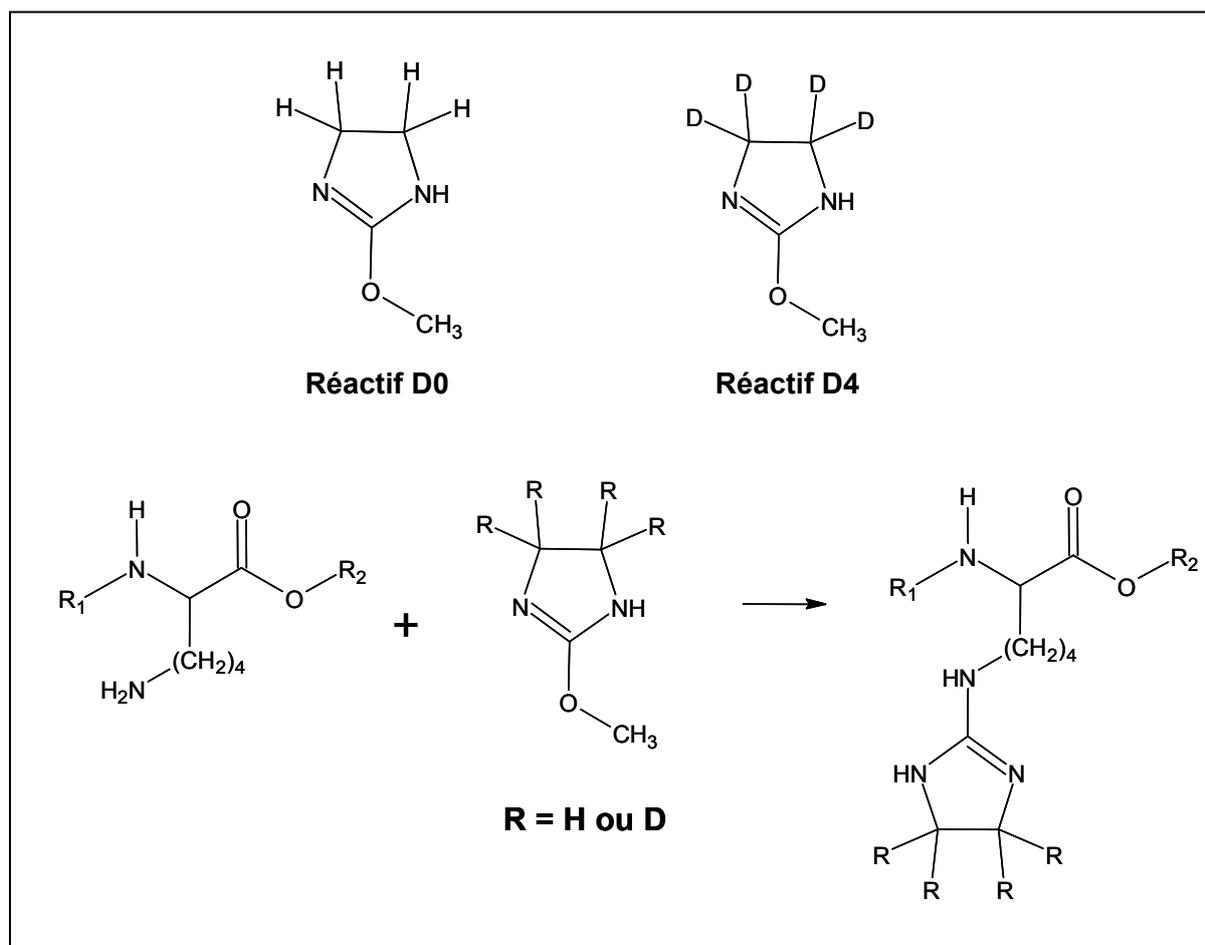


Figure IV.16. Dérivation des lysines par le 2-méthoxy-4,5-dihydro-imidazole

Ce réactif a été choisi pour plusieurs raisons :

- la préparation au laboratoire est possible avec des réactifs commerciaux en peu d'étapes, permettant de disposer d'une quantité importante de réactifs D0 et D4 pour un coût modéré
- la sélectivité de la réaction : seules les lysines sont modifiées selon Peters *et al.* (Peters *et al.*, 2001)

- les peptides marqués D0 et D4 co-éluent lorsqu'ils sont analysés en chromatographie de polarité de phase inversée (colonne C18) ; cet aspect est important pour la justesse de la quantification.
- l'introduction du groupement imidazole favorise la détection des peptides porteurs de lysines terminales, particulièrement en mode MALDI (autrement dit, la suppression spectrale exercée par les peptides ayant un résidu Arg au C-terminal est amoindrie).
- en mode MS/MS, la présence du groupement modifiant au C-terminal oriente les fragmentations. On constate ainsi une prédominance de fragments de type y dans les spectres d'ions fragments. Ceci est un phénomène majeur en mode d'ionisation MALDI.

B. Sélectivité de la réaction de dérivation

Le mélange de peptides issus de la digestion trypsique de la myoglobine (Sigma) a été utilisé pour tester la spécificité de la réaction. L'analyse des peptides a été réalisée par MALDI-TOF. Comme le montrent les spectres enregistrés avant et après dérivation (figure IV.17 et IV.18), les peptides ne contenant pas de lysine ne sont pas modifiés, et ceux qui comportent des lysines, y compris plusieurs lysines (jusqu'à 4 dans cet exemple) sont modifiés sur ces résidus uniquement. Ce dernier point a été vérifié en MS/MS (MALDI-Q-TOF).

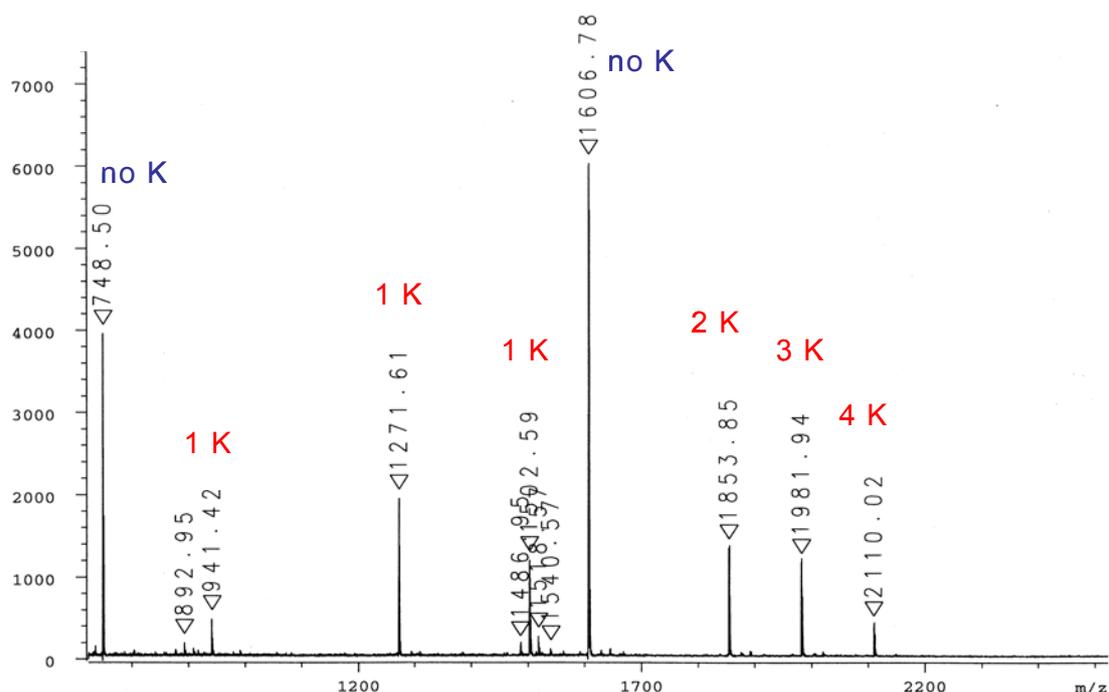


Figure IV.17. Spectre de masse MALDI des peptides tryptiques de la myoglobine avant dérivation chimique : deux peptides ayant une arginine au C-terminal dominent le spectre (m/z 748 et 1606) ; le nombre de lysines au C-terminal des autres peptides est indiqué en rouge.

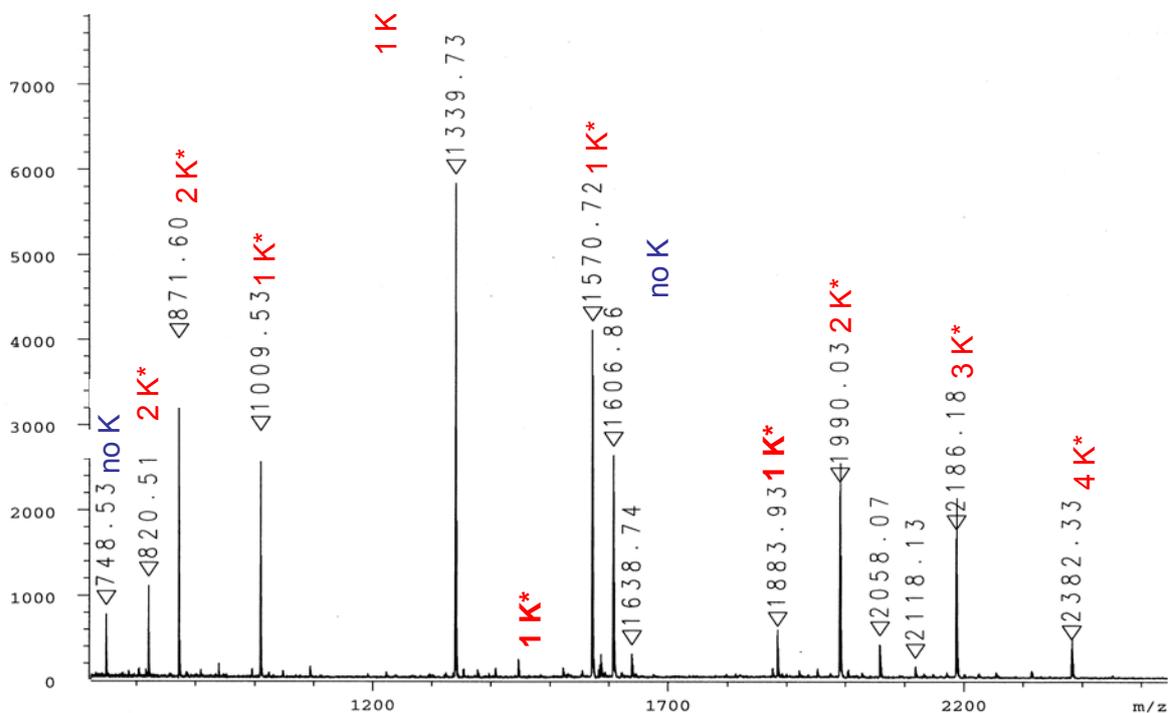


Figure IV.18. Spectre de masse MALDI des peptides tryptiques de la myoglobine après dérivation chimique. Les peptides dérivés (marqués nK* sur le spectre, n étant le nombre de lysines modifiées) sont mieux détectés que les peptides ayant une arginine au C-terminal, qui ne sont pas modifiés (m/z 748 et 1606, cf spectre de la figure IV.17).

C. Effet d'orientation des fragmentations en mode MS/MS

La modification d'un peptide tryptique qui comporte une lysine au C-terminal induit une orientation des fragmentations en mode MS/MS. C'est ce qu'indiquent les spectres de masse MALDI du peptide de séquence LVNELTEFAK (appartenant à la BSA) après dérivation par le réactif D0 et D4 (figure IV.19). La fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire monochargé (m/z 1235.77) conduit de manière dominante à des ions de type y. La nature de ces ions est confirmée par le décalage de 4 uma des principaux ions fragments du spectre lorsque le réactif D4 a été utilisé.

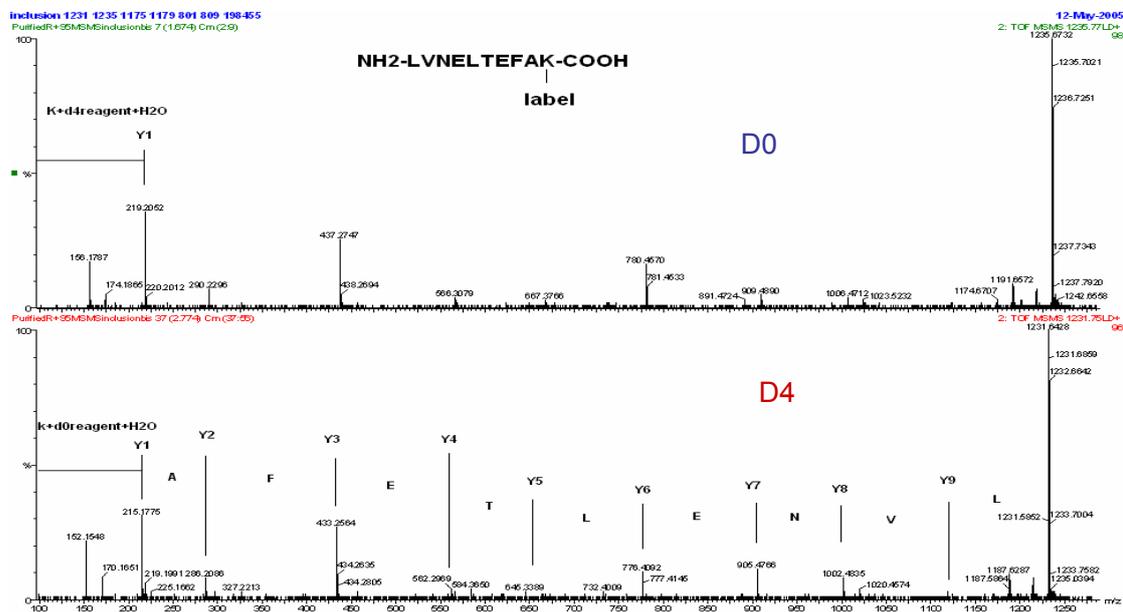


Figure IV.19. Spectres MALDI-MS/MS (spectromètre MALDI-Q-TOF) d'un peptide tryptique de la BSA dérivé par le réactif D0 (en haut) et le réactif D4 (en bas). Le décalage de 4 uma confirme le fait qu'il s'agit en majorité d'ions fragments y qui permettent aisément de décrypter la séquence du peptide.

Le même phénomène se manifeste en mode d'ionisation ESI, mais avec une prédominance moins forte des ions y. Cette différence peut aisément s'expliquer par le fait que les peptides tryptiques ionisés en ESI forment des entités doublement chargées, une charge étant localisée de manière préférentielle à chaque extrémité du peptide. Les spectres MS/MS des peptides dérivés sur les lysines présentent en conséquence une petite proportion d'ions de type b. Cet aspect sera revu plus loin dans le cas des peptides de l'EPO.

Cette simplification des spectres peut représenter un avantage intéressant au moment du choix des peptides servant de base au dosage de la protéine d'intérêt.

D. Etude de la dérivation chimique des peptides de l'EPO

1. Choix des peptides pouvant servir à doser l'EPO

L'étude de la modification de l'époétin beta a été menée sur un échantillon de référence d'époétin beta pure en solution dans l'eau. Cet échantillon a subi une protéolyse par la trypsine dans les conditions standard (rapport enzyme/EPO de 1/50 mole/mole, 4 h), puis a été soumis à la dérivation chimique avant d'être analysé en MALDI-Q-TOF en mode MS.

L'annexe chapitre 7/paragraphe I.D. fournit des renseignements complémentaires sur le protocole de marquage isotopique par nos réactifs D0 et D4.

Pour cette expérience préliminaire de marquage, l'échantillon est divisé en deux parties égales avant marquage, l'une étant soumise au marquage par le réactif D0, l'autre par le réactif D4. Les deux échantillons marqués ont alors été réunis.

Le spectre de masse MALDI-Q-TOF obtenu en mode *full scan* à partir des peptides marqués est présenté dans sa globalité en figure IV.20. La figure IV.21 présente l'agrandissement d'une zone d'intérêt de ce spectre. Sur le spectre, les signaux les plus abondants correspondent aux versions marquées des peptides à lysine terminale de m/z 927,47 et 1083,59. En particulier, le peptide de masse 927,47 Da (Tableau IV.7) donne l'espèce de m/z 995,50 après marquage D0 et l'espèce 999,53 après marquage D4. Les espèces non dérivées de m/z 927,47 et 1083,59 Da ne sont pas visibles sur le spectre de masse (figures IV.20 et IV.21).

Ce résultat confirme le fait que le réactif de dérivation utilisé favorise la désorption/ionisation (et donc la détection) des peptides à lysine C-terminale.

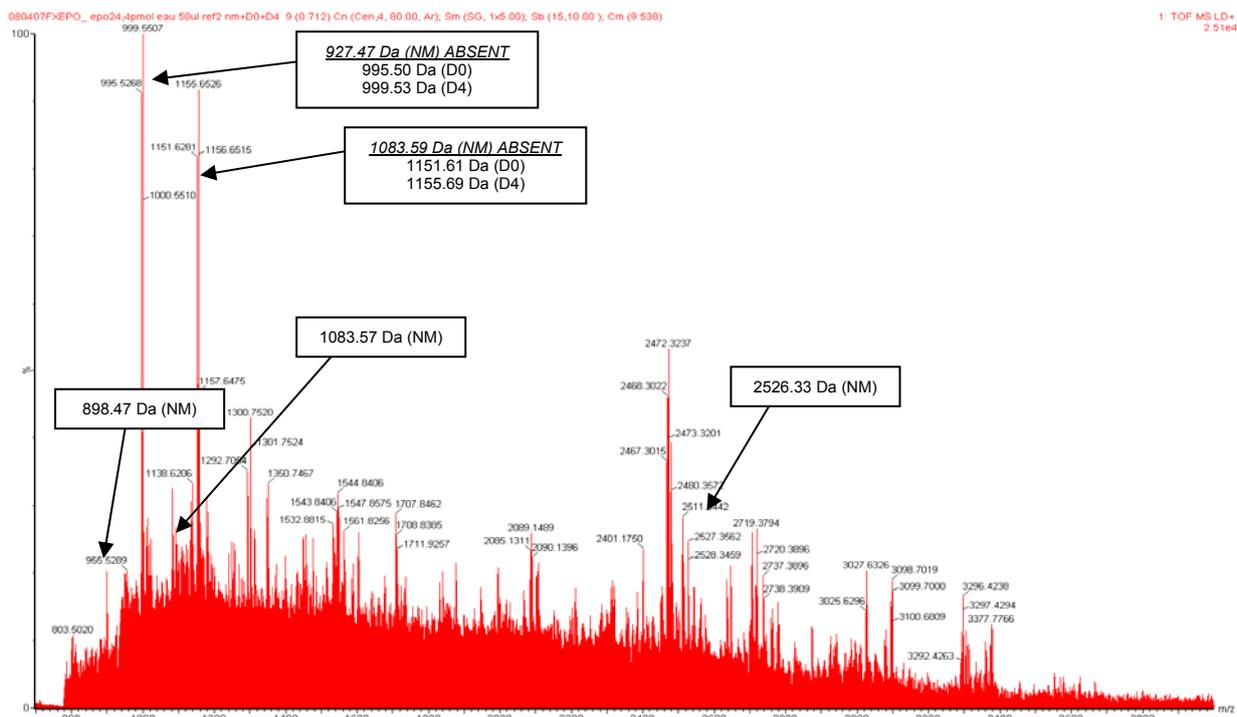


Figure IV.20. Spectre de masse MALDI en mode *full scan* d'un mélange équimolaire de peptides tryptiques d'epoetin beta marqués par D0 et D4. Les peptides non marqués parce qu'ils ne contiennent pas de lysine sont notés NM.

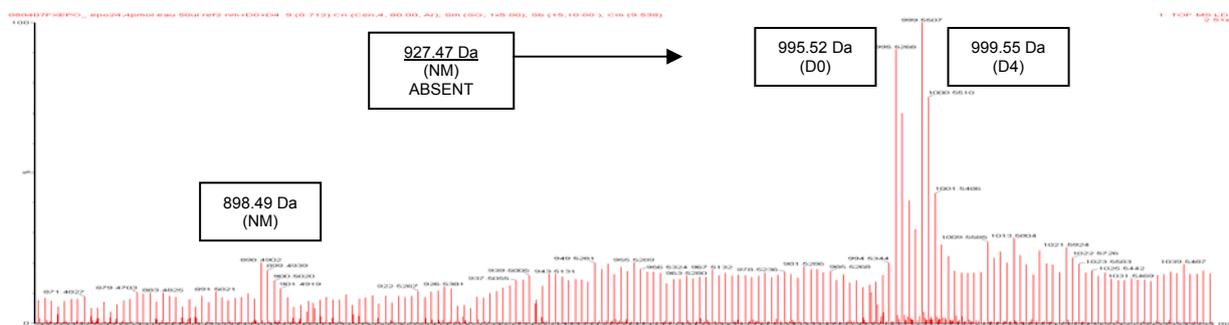


Figure IV.21. Agrandissement d'une zone du spectre présenté figure IV.20.

Le tableau IV.7 présente la liste exhaustive de tous les peptides de l'epoetin beta, marqués ou non, présents sur le spectre de la figure IV.20. Les peptides de faible intensité non observables sur le spectre à cette échelle mais réellement présents sont mentionnés entre parenthèses. C'est le cas des versions marquées des peptides à lysine terminale 736,42 Da, 1052,57 Da et 2359,24 Da. En raison de leur faible abondance, ces trois espèces ne sont donc pas retenues pour servir de base à la quantification.

Tableau IV.7. Liste des peptides de l'époetin beta marqués ou non par D0 ou D4 détectés après ionisation MALDI (mode *full scan* MALDI-Q-TOF)

Séquence du peptide Non marqué	Masse du peptide Non marqué (m/z)	Masse du peptide Marqué par D0 (m/z)	Masse du peptide marqué par D4 (m/z)
YLLEAK	736.424	(804.462)	(808.486)
SLTTLLR	803.498	-	-
VYSNFLR	898.478	-	-
TITADTFR	924.478	-	-
VNFYAWK	927.472	995.510	999.535
TITADTFRK	1052.573	(1120.611)	(1124.636)
VNFYAWKR	1083.573	-	-
VYSNFLRGK	1083.594	1151.611	1155.636
APPRLICDSR	1127.599	-	-
LFRVYSNFLR	1314.732	-	-
EASPPDAASAAPLR	1465.764	-	-
LICDSR/LYTGEACR	1615.779	-	-
ALGAQKEAISPPDAASAAPLR	2034.098	-	-
GQALLVNSSQPWEPLQLHVDK	2359.240	(2427.278)	(2431.303)
MEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLR	2526.338	-	-

Pour rappel, en absence de marquage, les peptides les plus abondants étaient les suivants : m/z 898,48, 1083,57, 1615,78 et 2526,34. Ces quatre peptides ne possèdent pas de lysine et ne présentent de ce fait aucun intérêt pour notre stratégie de dosage.

En conclusion, après marquage chimique, ce sont les versions marquées D0 et D4 des peptides de m/z 927,47 Da et 1083,59 qui vont nous intéresser pour la quantification dans la mesure où ce sont les formes marquées les plus abondantes.

2. Précaution importante pour l'étape de protéolyse

Les premiers résultats de marquage isotopique ont mis en évidence un problème majeur : la protéolyse trypsique menée dans les conditions standard pour les premières expériences de marquage (concentration trypsine/EPO 1/50 mole/mole, tampon bicarbonate d'ammonium 100 mM finale pH8, 37°C, 4 heures) n'est pas totale.

Si la protéolyse n'est pas totale (clivages manqués ou *missed-cleavage*) cela signifie qu'une même séquence d'EPO peut se retrouver portée par plus d'un peptide (le peptide trypsique produit par 0 *missed-cleavage* + les peptides issus d'un ou plusieurs événements de *missed-cleavage*). On voit alors le danger de baser le dosage de l'EPO sur l'un de ces peptides dans la mesure où il ne représente qu'une partie de la quantité initiale de la protéine. Il est donc indispensable de travailler dans des conditions de protéolyse totale et/ou de ne sélectionner comme peptide candidat pour le dosage que des peptides qui ne sont pas

exposés à ce problème de *missed-cleavage*. La fiabilité de la méthode de dosage en dépend. De même travailler en conditions de protéolyse totale permet de tendre vers une meilleure reproductibilité de la méthode.

Le spectre présenté sur les figures IV.20 et IV.21 (agrandissement) montre trois espèces résultant de *missed-cleavage* :

- Les espèces 1151,63 Da (marqué D0) et 1155,65 (marqué D4) correspondent au peptide 1083,59 Da de l'époétin beta. Sa séquence $^{144}\text{VYSNFL}\underline{\text{R}}\text{GK}^{152}$ comporte une arginine interne en position 150, qui est un site de clivage trypsique manqué. En conditions de protéolyse totale, ce peptide serait absent au profit du peptide $\text{VYSNFL}\underline{\text{R}}$ qui ne réagit pas avec nos agents de marquage.
- De même, le peptide de séquence $^{132}\text{TITADTF}\underline{\text{R}}\text{K}^{140}$ (m/z 1052,57, très faible abondance), comporte une arginine interne en position 139. En conditions de protéolyse totale, ce peptide devient le peptide **924,47 Da** de séquence $\text{TITADTF}\underline{\text{R}}$, qui ne réagit pas avec nos agents de marquage.
- Le peptide de séquence $^{46}\text{VNFYAW}\underline{\text{K}}\text{R}^{53}$ (m/z 1083,57) comporte également une lysine interne en position 52. En conditions de protéolyse totale, ce peptide serait absent au profit du peptide **927,47 Da** de séquence $\text{VNFYAW}\underline{\text{K}}$ à lysine terminale (position 46-52) que nous avons retenu pour la quantification.

En tenant compte de ce dernier point, il faut absolument tendre vers des conditions de protéolyse totale pour espérer une bonne justesse de dosage avec le seul peptide qui reste exploitable pour la stratégie de dosage (m/z 927.47, via ses versions marquées à m/z 995.50 et 999.53). L'étape de protéolyse a donc été optimisée en ajustant la quantité de trypsine utilisée.

L'annexe chapitre 7/paragraphe I.C.4 fournit des renseignements complémentaires sur le protocole de protéolyse trypsique totale.

Le résultat obtenu à ce stade était décevant, dans la mesure où nous espérions pouvoir établir le dosage sur plusieurs peptides marqués. Cependant, ce résultat n'engageait que la technologie MALDI, qui n'était pas envisagée comme méthode finale de dosage en milieu plasmatique. La recherche de limite de détection par MALDI-Q-TOF en mode MS après dérivation chimique a renforcé ce choix de méthodologie d'analyse.

E. Contrôle de l'absence des peptides marqués de l'epoetin beta dans un plasma non surchargé en EPO

De la même façon que pour les peptides d'epoetin beta non marqués, nous avons cherché à savoir si le peptide retenu pour la quantification (m/z 995.50 marqué D0 et 999.53 marqué D4) est absent de la carte peptidique obtenue à partir de la protéolyse du plasma sans epoetin beta marqué par D0.

Pour cela, deux échantillons de plasma humain (sans surcharge d'epoetin beta) ont été préparés en suivant la séquence de déplétion, dessalage, purification puis protéolyse. Les spectres MALDI-Q-TOF (mode MS) des peptides sont présentés sur la figure IV.22. La Figure IV.23 présente un agrandissement dans la zone d'intérêt autour du peptide de m/z 995.50.

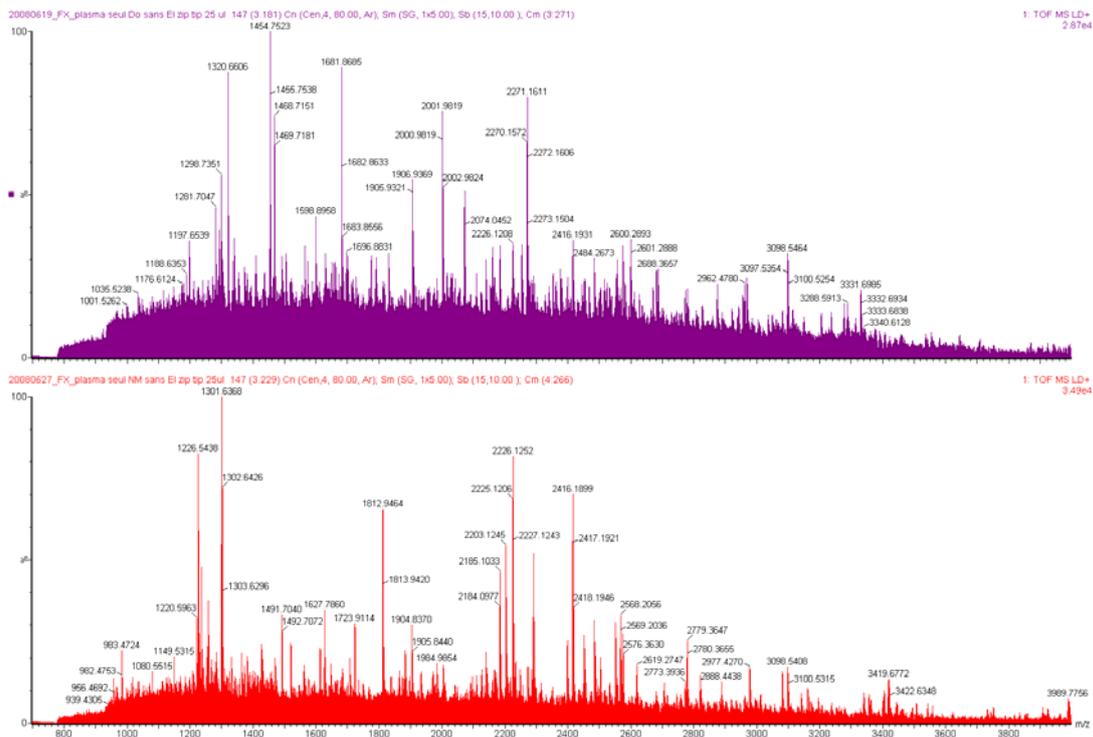


Figure IV.22. Spectres de masse MALDI-Q-TOF mode MS d'un échantillon de plasma non surchargé en EPO traité par le réactif D0 (en haut) ou contrôle non marqué (en bas)

Les espèces de m/z 995,50 et 999,53 Da sont absentes du plasma lorsqu'il n'est pas surchargé en epoetin beta, qu'il ait subi ou non la réaction de marquage isotopique par le réactif D0. Les nombreux autres peptides observés sur les spectres de la figure IV.22 proviennent de la protéolyse des différentes protéines plasmatiques. L'espèce 995,50

Da/999,53 Da est bien spécifique de l'EPO médicament, et pourra être utilisée pour la quantification.

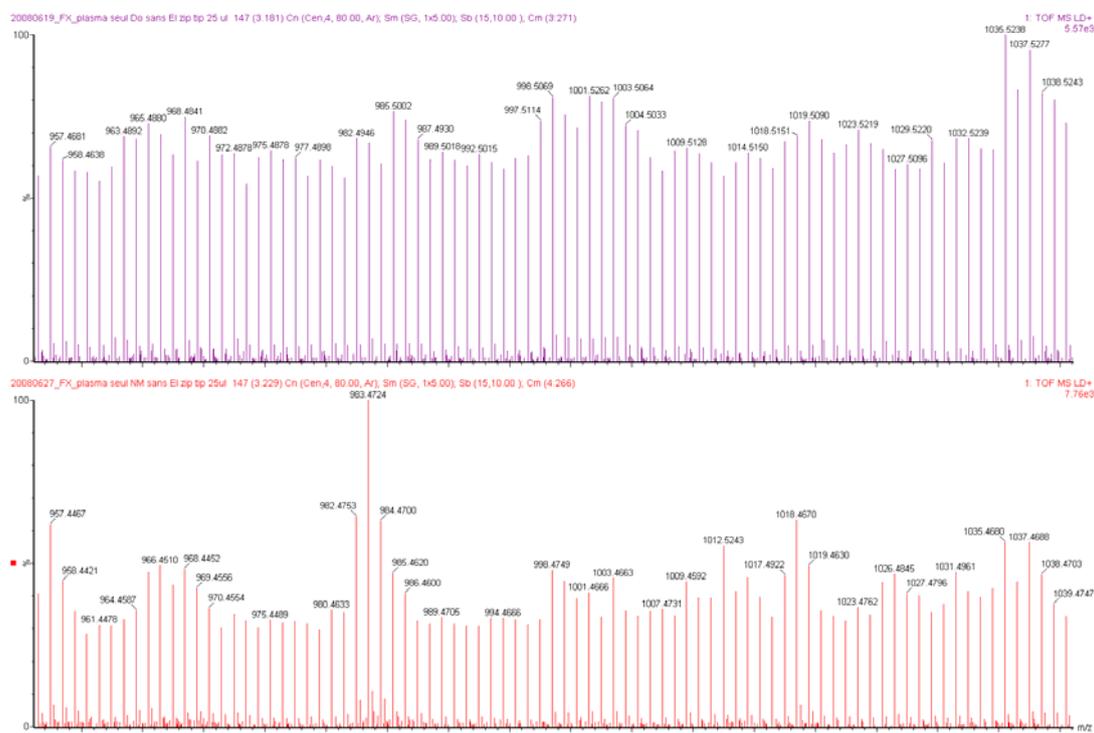


Figure IV.23. Spectres de masse MALDI-Q-TOF mode MS d'un échantillon de plasma non surchargé en EPO traité par le réactif D0 (en haut) ou contrôle non marqué (en bas) (agrandissement de la zone autour de m/z 995)

F. Confirmation de l'identité des espèces de m/z 995,50 et 999,53 en MS/MS

Dans la figure IV.24, le spectre du haut montre les ions obtenus par fragmentation du précurseur m/z 995,50, et celui du bas pour m/z 999,53 dans le cas d'un échantillon d'époetin beta pure. Les fragments caractéristiques de ces deux espèces sont listés dans le tableau IV.8 (deux colonnes de gauche).

Tout comme nous l'avons constaté lors des études de protéines modèles, le réactif ancré sur la lysine terminale oriente la fragmentation vers la production d'ions de séquence de la série y. Ceci ne laisse subsister aucune ambiguïté quant à la nature de l'ion précurseur.

Tableau IV.8. Tableau récapitulatif des fragments obtenus en MS/MS pour les précurseurs de m/z 995,50 et 999,53 (spectromètre MALDI-Q-TOF) dans le cas de l'époetin beta pure en solution aqueuse et dans le cas d'un plasma surchargé en EPO.

Epoetin beta de référence (aqueuse) peptide VNFYAWK (m/z)		Epoetin beta plasmatique peptide VNFYAWK (m/z)
Fragments du 995	Fragments du 999	Fragments du 995
215,15 (y1)	219,19	215,15
401,23 (y2)	405,27	401,23
472,28 (y3)	476,30	472,29
635,36 (y4)	639,41	635,35
782,44 (y5)	786,45	782,42
879,44 (y6-NH ₃)	883,50	
978,57 (MH-NH ₃)	982,57	

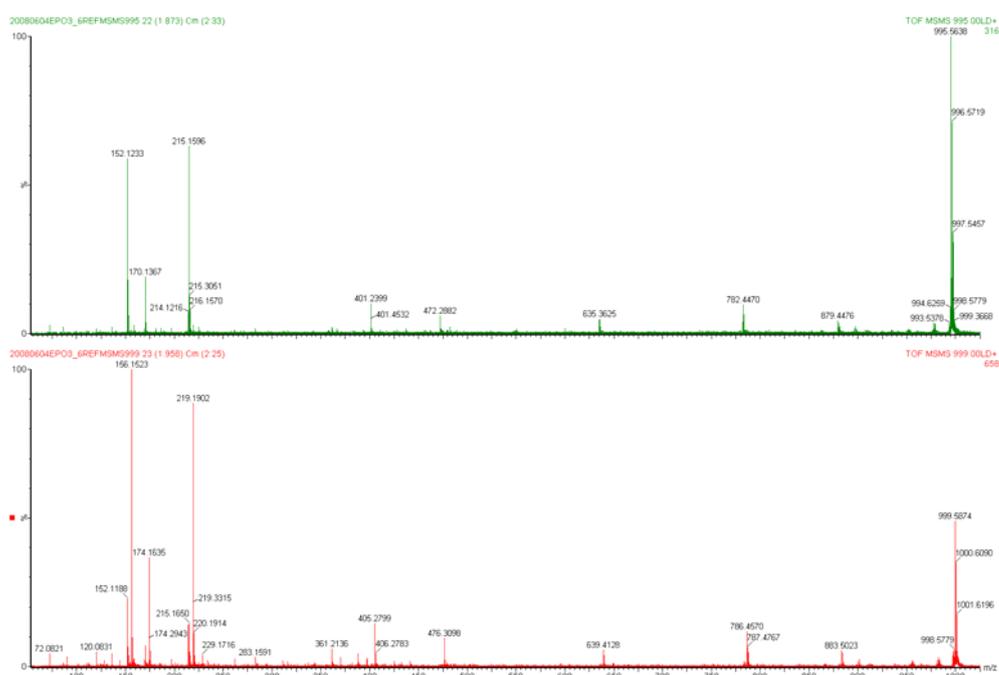


Figure IV.24. Spectres MS/MS montrant les ions fragments obtenus pour les précurseurs de m/z 995,50 (en haut) et 999,53 (en bas) avec le spectromètre MALDI-Q-TOF (mode MS/MS).

Le spectre MS/MS des ions fragments issus du précurseur de m/z 995,50 isolé à partir d'un échantillon de plasma surchargé en epoetin beta est présenté sur la figure IV.25. Les fragments caractéristiques du peptide 995,50 Da sont bien retrouvés (tableau IV.8 colonne de droite).

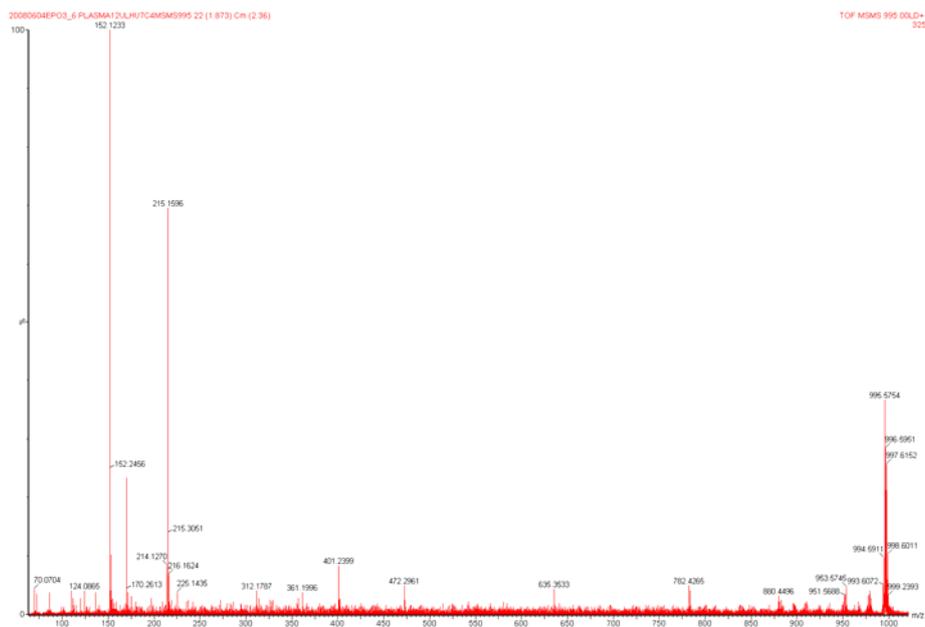


Figure IV.25. Spectres MS/MS montrant les ions fragments obtenus pour le précurseur de m/z 995,50 pour un échantillon de plasma surchargé en d'époetin beta (spectromètre MALDI-Q-TOF en mode MS/MS)

G. Limite de détection en MALDI-Q-TOF (mode MS) après marquage chimique

La recherche de limite de détection est effectuée tout d'abord avec de l'époetin beta pure, en utilisant le peptide de m/z 995.50 (VNFYAWK marqué D0). La figure IV.26 montre les trois spectres de masse obtenus lors de l'analyse en MALDI-Q-TOF (en mode MS) d'échantillons de peptides d'époetin beta marqués aux concentrations de 7,2 fmoles/ μ L, 3,6 fmoles/ μ L et 1,8 fmoles/ μ L.

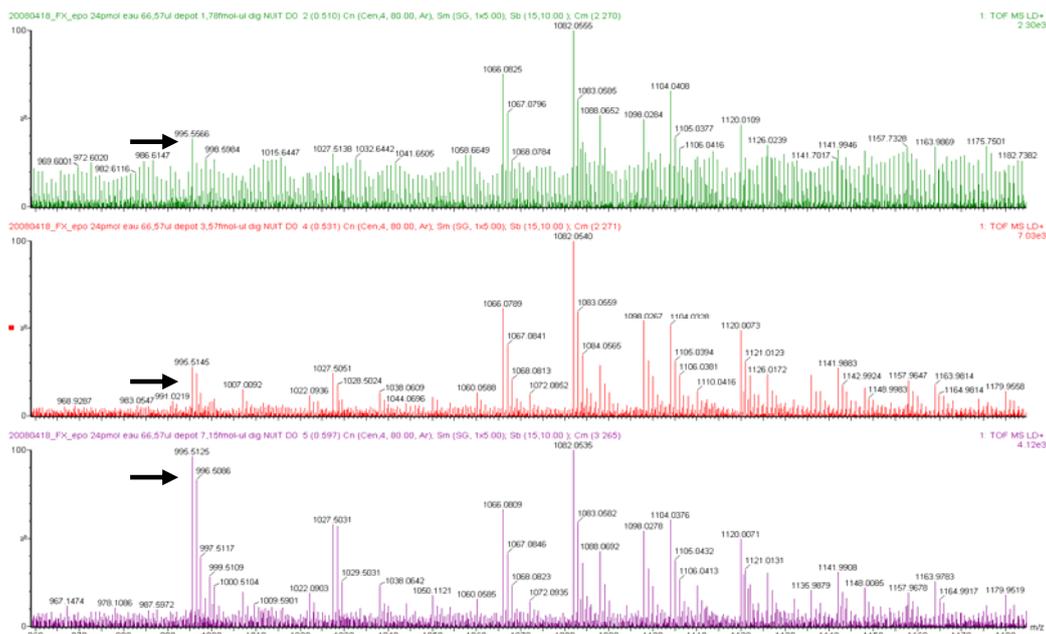


Figure IV.26. Recherche de la limite de détection du peptide marqué 995.50 Da, en mode MALDI-Q-TOF (peptide d'intérêt signalé par une flèche)

La limite de détection pour le peptide de m/z 995,50 est donc d'environ 2 fmoles/ μ L d'epoetin beta, évaluée pour de l'EPO pure avec le spectromètre MALDI-Q-TOF fonctionnant en mode *full scan*. Des essais d'éluion fractionnée des peptides marqués au moyen d'un ZipTip™ C18 (Belghazi *et al.*, 2001) pour diminuer la complexité de la fraction contenant le peptide de m/z 995,50 n'ont pas permis d'abaisser la limite de détection. Cette dernière est peu différente de la valeur obtenue en l'absence de dérivation des peptides tryptiques de l'EPO, évaluée à environ 1 fmoles/ μ L.

Lors de l'analyse d'un échantillon de plasma surchargé par de l'epoetin beta à raison de 1 800 fmoles/12 μ L, nous avons obtenu le résultat présenté sur la figure IV.27 (en haut). Le spectre du bas sur cette même figure correspond à un plasma non surchargé par de l'epoetin beta. Une quantité égale de 1 800 fmoles d'étalon interne a été ajoutée à chacun des échantillons. Cette expérience a permis d'évaluer une nouvelle **limite de détection à environ 150 fmoles d'epoetin beta/ μ L de plasma en utilisant le spectromètre MALDI-Q-TOF** (concentration de l'échantillon plasmatique déplété par chromatographie Vydac® C4 et marquage peptidique). Ceci était bien sûr très insuffisant, compte tenu de l'objectif affiché au départ de ce travail.

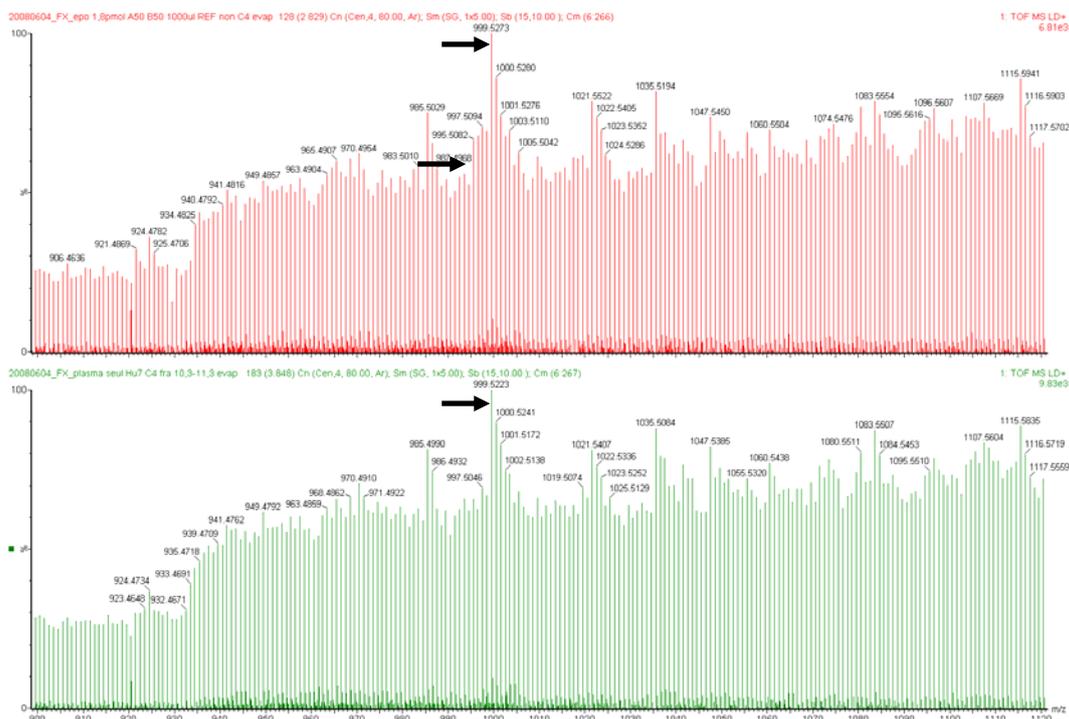


Figure IV.27. Spectres MALDI-Q-TOF mode MS montrant les espèces de m/z 995,50 et 999,53 pour un échantillon d'epoetin beta de 1 800 fmoles/12 μ L de plasma (en haut). Un échantillon de plasma sans epoetin beta préparé et analysé dans les mêmes conditions est présenté en bas.

VI. Contrôles du protocole

Disposant d'un peptide candidat pour la mise en place de notre stratégie de quantification de l'epoetin beta, il était indispensable de vérifier que notre protocole ne conduisait pas à une perte d'EPO. Ce risque concerne en particulier l'étape de déplétion et la chromatographie à polarité de phase inversée sur support C4 (colonne Vydac® C4).

A. Contrôle de sélectivité de l'étape de chromatographie sur support C4

Nous avons vérifié que le temps de rétention de l'epoetin beta rajoutée à un plasma est identique à celui de l'epoetin beta pure, en recherchant la présence éventuelle d'epoetin beta dans les fractions de chromatographie qui encadrent la fraction récoltée.

Sur colonne C4 Vydac®, l'epoetin beta élue dans la zone [10,5-11,5] min. Nous avons contrôlé l'absence d'EPO dans la fraction antérieure [9,5-10,5] min et postérieure [11,5-12,5] min au pic d'EPO. A cette fin, nous avons ajouté (après protéolyse) une solution de peptides d'epoetin beta marqués par le réactif D4 aux fractions à tester, afin de servir

d'étalon interne et de tenir compte d'éventuels phénomènes de désorption/ionisation sélectives. Les figures IV.28 et IV.29 indiquent l'absence de l'ion m/z 995,50 spécifique de l'époetin beta dans ces deux fractions, alors que l'étalon interne est observé à m/z 999.54.

L'EPO en milieu plasmatique est donc bien retrouvée uniquement au temps de rétention déterminé pour la protéine pure, et seule la fraction [10,5-11,5] min sera considérée par la suite pour le dosage.

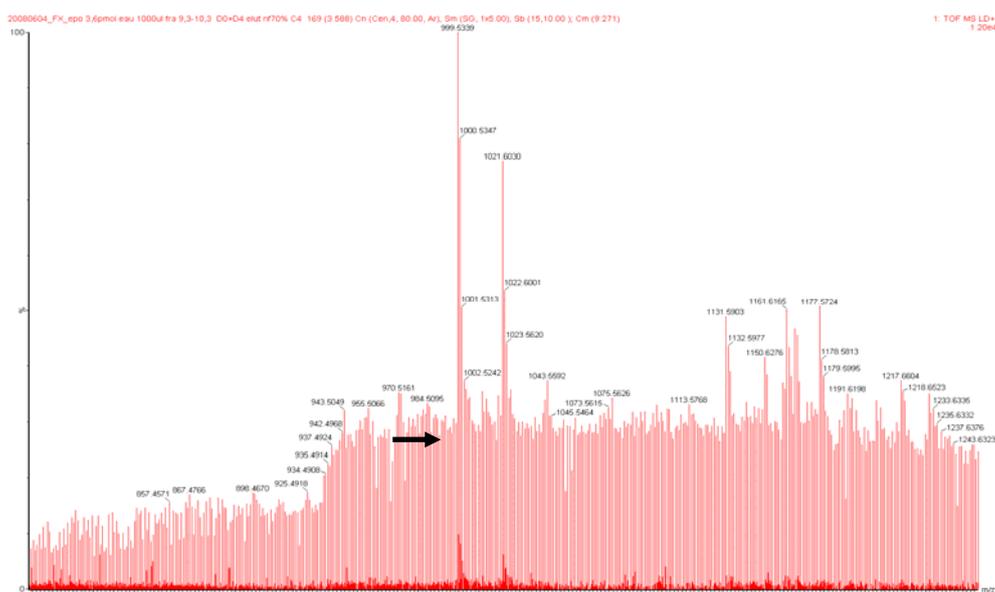


Figure IV.28. Contrôle en mode MALDI de l'absence d'EPO dans la fraction [9,5-10,5] min de la chromatographie C4 (Vydac®) d'une solution d'EPO plasmatique par l'absence d'ion de m/z 995 (étalon interne marqué D4 à m/z 999)

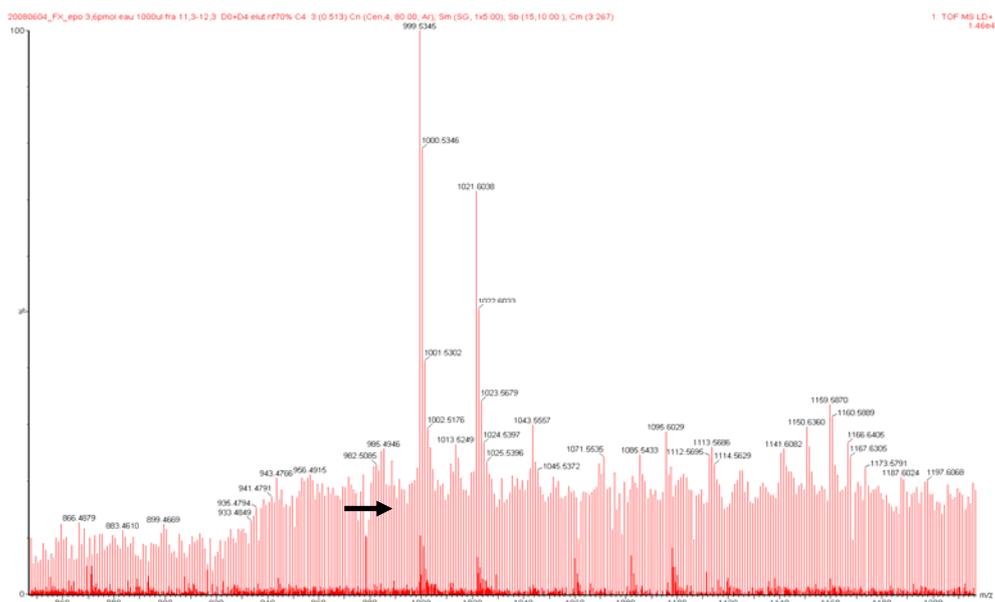


Figure IV.29. Contrôle en mode MALDI de l'absence d'EPO dans la fraction [11,5-12,5] min de la chromatographie C4 (Vydac®) d'une solution d'EPO plasmatique par l'absence d'ion de m/z 995 (étalon interne marqué D4 à m/z 999)

B. Evaluation des pertes d'epoetin beta au cours des étapes d'enrichissement

Afin d'évaluer si l'EPO médicament peut être perdue lors de l'étape de déplétion des protéines plasmatiques majoritaires sur cartouche Hu7, deux échantillons de contrôle ont été préparés :

- 1. epoetin beta non soumise à la déplétion sur Hu7, mais chromatographiée sur colonne C4.** Il s'agit d'un échantillon de plasma déplété (12 μ L), puis surchargé avec de l'epoetin beta (3,6 pmoles) et ensuite dessalé/purifié par chromatographie C4 Vydac®.
- 2. epoetin beta soumise à déplétion Hu7 et chromatographie sur colonne C4.** Il s'agit d'un échantillon de 12 μ L de plasma surchargé avec de l'epoetin beta (3,6 pmoles) puis déplété et ensuite dessalé/purifié par chromatographie C4 Vydac®.

De même afin d'évaluer la perte d'EPO au cours de l'étape de chromatographie sur support C4, deux autres échantillons de contrôle ont été préparés :

- 3. epoetin beta soumise à la chromatographie sur colonne C4 seulement.** Il s'agit d'un échantillon aqueux d'epoetin beta (3,6 pmoles/1000 μ L d'eau) uniquement dessalé/purifié par chromatographie C4 Vydac®.
- 4. epoetin beta non soumise à chromatographie sur colonne C4.** Il s'agit d'un échantillon aqueux d'epoetin beta (3,6 pmoles / 50 μ L d'eau) qui n'est ni déplété ni chromatographié sur C4 Vydac®.

Remarque 1: Les échantillons 1 à 3 correspondent à la fraction [10,5-11,5] min (volume de 1 000 μ L) de la chromatographie C4. La fraction est évaporée à sec sous vide (SpeedVac), reprise, avec 50 μ L d'eau, soumise à protéolyse trypsique totale, puis marquée avec le réactif D0.

L'échantillon 4 est une « référence » qui ne subit aucune des étapes déplétion/dessalage/évaporation/reprise. Il est directement soumis à la protéolyse trypsique totale puis marqué avec le réactif D0. L'étalon interne (peptides d'EPO marqués par D4) est ajouté avant analyse par spectrométrie de masse en quantité égale à la quantité d'epoetin beta présente théoriquement dans l'échantillon (3,6 pmoles).

Remarque 2 : Chaque échantillon contenant 3,6 pmoles d'époetin beta (peptides marqués D0) ainsi que 3,6 pmoles d'étalon interne marqué D4 a été divisé en deux fractions égales, l'une pour l'analyse avec le spectromètre MALDI-Q-TOF en mode MS full scan, l'autre pour l'analyse en couplage nano LC-ESI-MS/MS avec un spectromètre LTQ (ThermoFisher; résultats présentés en VII de ce chapitre 4).

Les valeurs des intensités relatives des pics de m/z 995,50 et 999,53 pour chacune des 4 analyses effectuées avec le spectromètre MALDI-Q-TOF sont reportées dans le tableau IV.9. Le pourcentage approximatif de perte d'époetin beta survenant dans chaque cas en est déduit.

Tableau IV.9. Intensités des espèces de m/z 995,50 et 999,53 pour chacun des échantillons 1 à 4 et perte d'EPO déduite

	Intensité de l'espèce 995,50 Da	Intensité de l'espèce 999,53 Da	Perte approximative de l'espèce 995,50 Da (%)
Echantillon 1	9 060	15 100	33
Echantillon 2	17 160	28 600	33
Echantillon 3	10 750	21 500	44
Echantillon 4	34 200	38 000	0

Pour l'échantillon de référence **(4)** la différence d'intensité entre les pics 995,50 et 999,63 Da ne peut pas être attribuée à une perte puisque cet échantillon ne subit aucune étape de déplétion ou chromatographie. Cet écart a été reporté pour évaluer les pertes approximatives subies par les échantillons 1 à 3. Compte tenu des très faibles volumes manipulés, de l'ordre du microlitre, la différence constatée pour l'échantillon 4 est vraisemblablement imputable à une erreur de pipetage. Il faudra donc impérativement veiller à utiliser des pipettes parfaitement étalonnées, et des solutions étalon de plus grand volume.

Malgré ce problème, nous pouvons observer que :

- la perte d'époetin beta est la même et voisine de 33 % pour un échantillon plasmatique dont l'époetin n'a pas subi la déplétion sur la cartouche Hu7 (échantillon **1**) et un échantillon plasmatique déplété sur la cartouche Hu7 (échantillon **2**). En conséquence, l'étape de déplétion ne produit pas de perte notable d'époetin beta.
- la perte d'époetin beta observée pour les échantillons **1** (plasma surchargé en EPO, perte de 33 %), et **3** (EPO en solution aqueuse, perte de 44 %), qui n'ont subi que la chromatographie C4 montre que cette perte est due

essentiellement aux étapes de chromatographie et évaporation/remise en solution avant protéolyse. L'écart de 33 à 44 % peut s'expliquer par un phénomène de passivation des matériaux (support de chromatographie et parois des tubes Eppendorf notamment) exercé par les protéines plasmatiques.

- la perte d'époetin beta observée pour l'échantillon **3** aqueux étant supérieure à la perte observée pour les échantillons plasmatiques, il paraît peu probable que l'époetin beta se fixe aux protéines plasmatiques.

C. Tentatives de limitation des pertes d'époetin beta liées à la concentration avant protéolyse

Ayant suspecté qu'une perte importante d'époetin beta est liée au processus d'évaporation à sec suivant la chromatographie sur colonne C4, quatre conditions de reprise ont été testées sur un échantillon de 3,6 pmoles d'époetin beta mis en solution dans 500 µL de solvant (mélange des éluants A et B utilisé pour la chromatographie (A/B 50/50 v/v)), puis évaporé à sec sous vide.

Les cinq spectres présentés sur la figure IV.30 permettent de comparer :

- Spectre 1 : échantillon évaporé repris avec 10 µL d'ACN/eau 50/50 v/v + 40 µL d'eau
- Spectre 2 : échantillon évaporé repris avec 5 µL d'ACN/eau 50/50 v/v + 45 µL d'eau
- Spectre 3 : échantillon évaporé repris avec 1 µL d'ACN/eau 50/50 v/v + 49 µL d'eau
- Spectre 4 : échantillon évaporé repris avec 50 µL d'eau
- Spectre 5 : échantillon de référence non évaporé

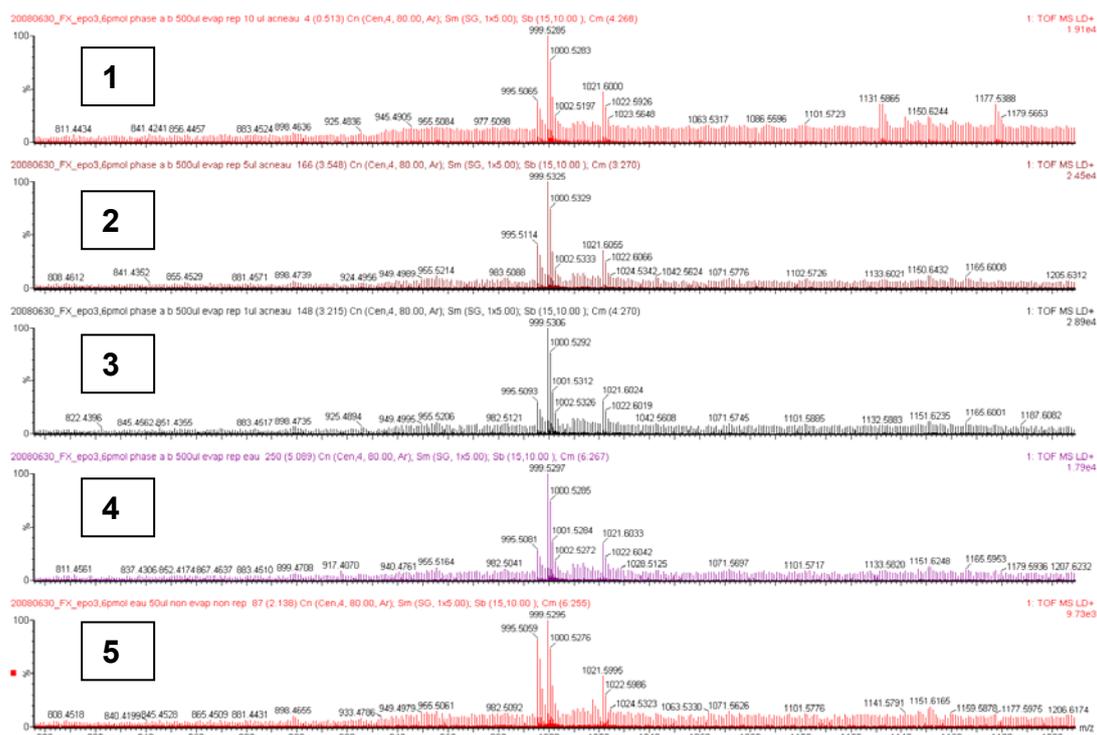


Figure IV.30. Spectres MALDI en mode MS *full scan* montrant les espèces 995,50 et 999,53 Da obtenues avec 4 conditions de reprise d'un échantillon d'epoetin beta de 3,6 pmoles/500 µL évaporé à sec (spectres 1 à 4) et le spectre d'une solution aqueuse de référence non évaporée (spectre 5).

Cette expérience apporte bien la confirmation que la perte d'epoetin beta (figure IV.30 spectres 1 à 4) par rapport à un échantillon de référence non évaporé (spectre 5) est simplement liée au processus d'évaporation qui suit la chromatographie sur colonne C4 Vydac®.

La meilleure condition de reprise de l'échantillon indiquée par la mesure du rapport des intensités m/z 995,50/999,52 est obtenue avec 5 µL d'un mélange ACN/eau 50/50 v/v puis un ajout de 45 µL d'eau, en y associant 2 cycles rapides de [vortex + ultrasons + centrifugation].

Nous n'avons pas trouvé pour l'instant de remède efficace à cette perte d'epoetin beta. Nous devons donc prendre en compte un facteur correctif pour la part d'epoetin beta perdue lors du traitement d'un échantillon plasmatique, mais nous reviendrons sur ce point ultérieurement.

VII. Quantification de l'epoetin beta par nano LC-ESI-MS/MS au moyen d'un piège ionique linéaire

L'analyse quantitative de l'epoetin beta au moyen d'un spectromètre de masse MALDI-Q-TOF avait pour objectif majeur de faciliter la mise au point des différentes étapes de la stratégie d'analyse. Pour espérer atteindre une limite de quantification adéquate, il nous fallait améliorer la limite de détection de l'epoetin beta dans le plasma d'un facteur 1 000 environ. Il nous a semblé qu'une telle performance ne pouvait être atteinte qu'en faisant appel à une méthodologie de dosage par MRM, en utilisant un mode d'ionisation électrospray couplé à une séparation par nanochromatographie parmi ceux qui étaient à notre disposition. L'instrument qui se rapprochait le plus de cette configuration était un spectromètre de type piège ionique linéaire couplé à la nanochromatographie (spectromètre LTQ XLTM (ThermoFisher) de la plateforme protéomique de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux).

Une phase de mise au point sur cet instrument nous a permis de rechercher des ions précurseurs intéressants pour le dosage, en nous attendant à trouver en mode ESI des ions différents de ceux utilisés jusqu'ici en mode MALDI.

A cette fin, nous avons séparé en deux parties égales des échantillons de plasma surchargés en epoetin beta, soumis à déplétion sur cartouche Hu7, purifiés sur colonne Vydac® C4, puis clivés par la trypsine dans des conditions de protéolyse totale. Les résultats obtenus avec le MALDI-Q-TOF pouvaient donc être directement comparés à ceux obtenus en nano-LC-ESI.

L'annexe chapitre 7/paragraphe I.E.3 fournit des renseignements complémentaires sur le protocole d'analyse en nano LC-ESI-Piège ionique linéaire.

A. Limite de détection avec le piège ionique linéaire pour une solution aqueuse d'epoetin beta

Une gamme de cinq concentrations du mélange de peptides tryptiques de l'epoetin beta en solution aqueuse est préparée par dilution en cascade d'une solution mère d'epoetin beta préalablement protéolysée par la trypsine.

Les différentes concentrations testées sont :

- (5) 70 fmoles/ μ L
- (4) 23 fmoles/ μ L
- (3) 8 fmoles/ μ L
- (2) 2,5 fmoles/ μ L
- (1) 0,8 fmoles/ μ L

Trois peptides de l'époetin beta à lysine terminale, marqués par le réactif D0, sont retrouvés aux valeurs de m/z 655,38, 804,46 et 995,50. Ces peptides marqués correspondent respectivement aux séquences ¹¹¹ALGAQK¹¹⁶, ¹⁵YLLEAK²⁰ et ⁴⁶VNFYAWK⁵² de l'époetin beta. La figure IV.31 montre leur position sur la séquence peptidique de l'époetin beta.

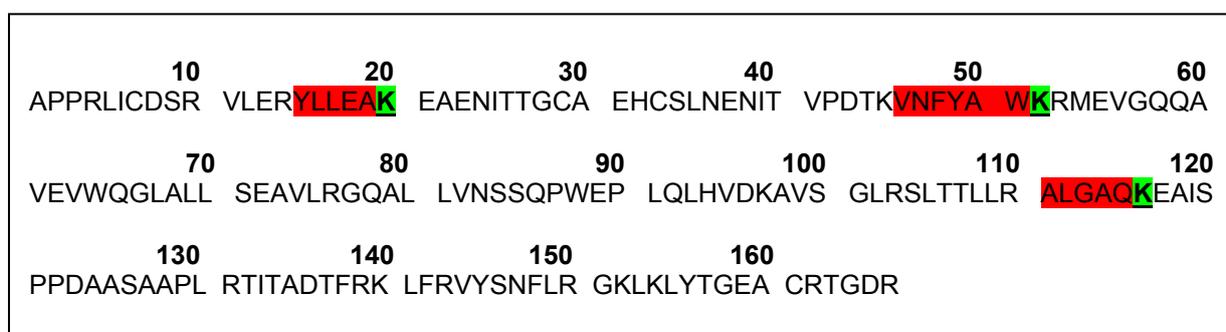


Figure IV.31. Position sur la séquence peptidique de l'époetin beta des trois peptides à lysine terminale marqués par notre réactif et vus en nano LC-ESI-LTQ

De manière quelque peu surprenante, nous avons constaté qu'il s'agit de trois ions monochargés. Les figures IV.32, IV.33 et IV.34 présentent les chromatogrammes et spectres de masse obtenus pour ces peptides marqués.

Le peptide de m/z 655,38 de l'époetin beta marquée est retrouvé du point de gamme le plus concentré jusqu'au moins concentré (0,8 fmoles/ μ L), pour lequel le rapport signal/bruit est d'environ 2. Cependant, les rapports signal sur bruit obtenus n'évoluent pas exactement proportionnellement au facteur 3 de dilution entre chacun des 5 points de la gamme.

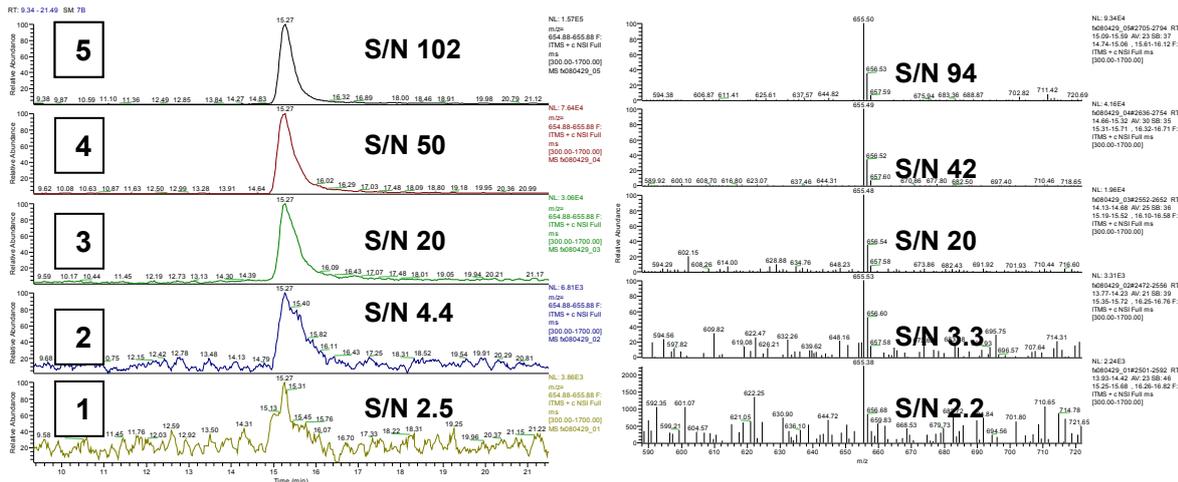


Figure IV.32. Chromatogrammes et spectres de masse pour l'ion m/z 655,38 de l'époétin beta marquée par le réactif D0, obtenus pour les échantillons (5) à (1) présentés de haut en bas (spectromètre LTQ)

Le peptide de m/z 804,46 est aussi retrouvé du point de gamme le plus concentré jusqu'au moins concentré (0,8 fmole/ μ L). Par contre, pour ce peptide, les rapports signal/bruit obtenus évoluent bien proportionnellement au facteur 3 de dilution entre chacun des 5 points de la gamme.

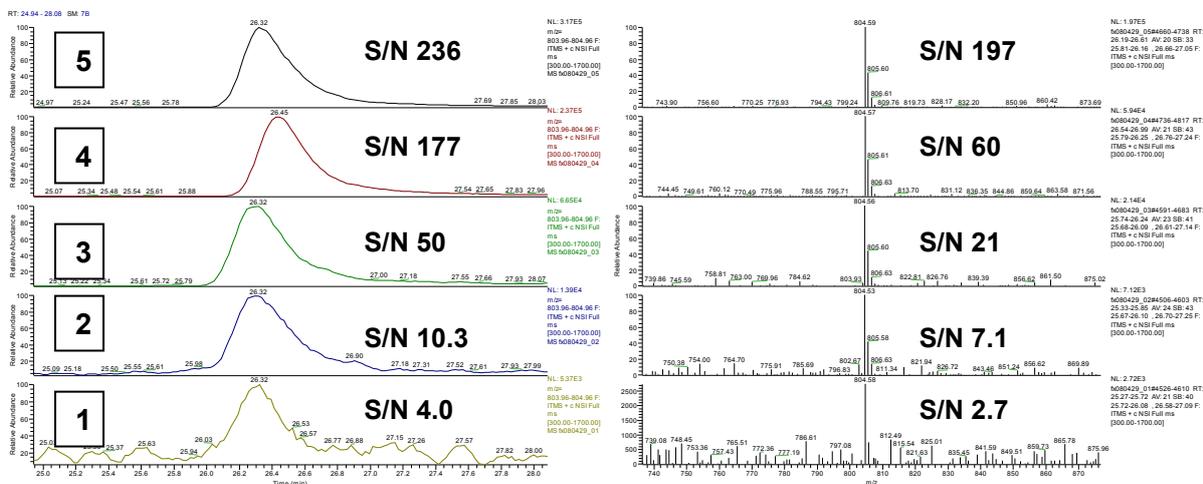


Figure IV.33. Chromatogrammes et spectres de masse pour l'ion m/z 804,46 de l'époétin beta marquée par le réactif D0, obtenus pour les échantillons (5) à (1) présentés de haut en bas (spectromètre LTQ)

Le peptide de m/z 995,50 n'est retrouvé que dans les deux points de gamme à 70 et 23 fmole/ μ L. Ce résultat est surprenant, puisque le rapport signal sur bruit observé sur le point de gamme le plus concentré est beaucoup plus important (S/N 419) que pour les espèces de m/z 655,38 (S/N 102) et 804,46 (S/N 236). Les spectres des points de gamme 1 à 3 sont ici inexploitable.

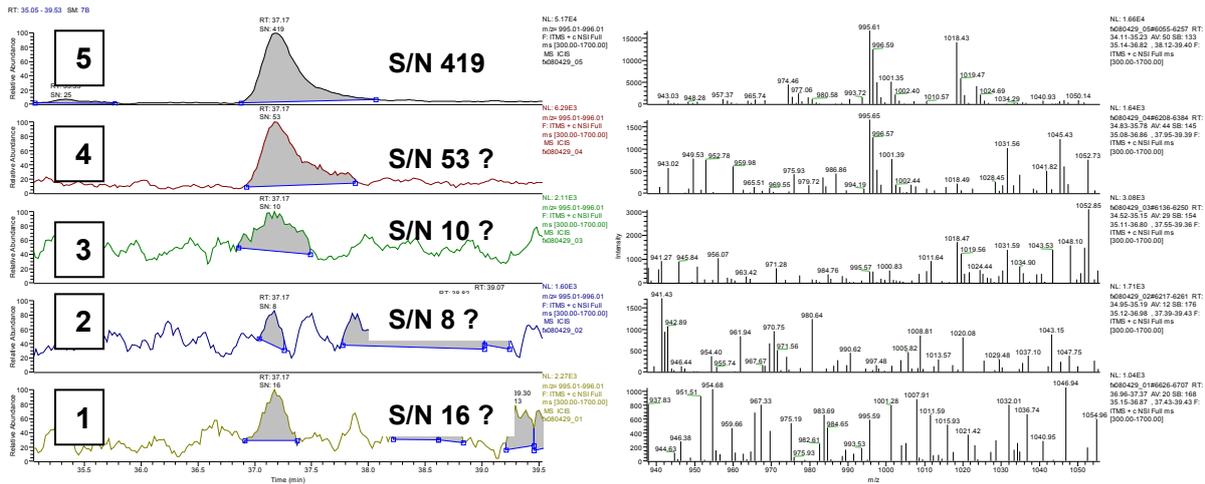


Figure IV.34. Chromatogrammes et spectres de masse pour l'ion m/z 995,50 de l'époetin beta marquée par le réactif D0, obtenus pour les échantillons (5) à (1) présentés de haut en bas (spectromètre LTQ)

Cette approche mettant en œuvre la nanochromatographie sur colonne de 75 μm de diamètre, couplée à un spectromètre fonctionnant en mode ESI, nous donne une limite de détection intéressante pour de l'époetin beta pure, en solution aqueuse. L'ion m/z 804.46 est détecté avec un rapport signal/bruit de 4 pour le dernier point de gamme, indiquant une limite de détection ultime inférieure à 0,8 fmole d'EPO/ μL . De plus, trois peptides peuvent servir de base à la quantification.

En plus des vérifications de spécificité des peptides ainsi détectés, le point majeur à examiner concernait l'apport de la nanochromatographie à la limite de détection de l'époetin beta dans le plasma. En effet, nous avons jusqu'à présent observé avec le mode d'ionisation MALDI un écart très important (100 x au moins) de limite de détection entre EPO pure et EPO dans le plasma.

B. Confirmation de l'identité des espèces d'intérêt pour la quantification

Pour confirmer l'identité des séquences des fragments obtenus pour les trois peptides de l'époetin beta comportant des lysines terminales, ces peptides marqués par le réactif D0 et D4 ont été fragmentés en mode MS/MS dans le piège linéaire du LTQ. Le tableau IV.10 présente les ions de séquence obtenus.

Tableau IV.10. Fragments obtenus par l'analyse en mode MS/MS des peptides de l'epoetin beta marqués observés avec la technique LTQ en mode MS.

Peptide ¹¹¹ ALGAQK ¹¹⁶		Peptide ¹⁵ YLLEAK ²⁰		Peptide ⁴⁶ VNFYAWK ⁵²	
Précurseur (D0)	Précurseur (D4)	Précurseur (D0)	Précurseur (D4)	Précurseur (D0)	Précurseur (D4)
655.38 Da	659.41	804.46	808.48	995.50	999.53
215.15 (y1)	219.18	225.12 (LE-H ₂ O)	229.15	401.22 (y2)	405.25
326.18 (y2-NH ₃)	330.21	286.18 (y2)	290.21	472.26 (y3)	476.29
343.20 (y2)	347.23	415.23 (y3)	419.26	635.33 (y4)	639.35
471.26 (y4)	475.29	528.31 (y4)	532.34	782.39 (y5)	786.42
		786.45 (MH-H ₂ O)	790.48	896.44 (y6)	900.46

Les séquences de ces peptides sont donc confirmées. Notons que dans les conditions de source ESI utilisées, les ions précurseurs monochargés donnent presque uniquement des ions de séquence de type y. Le faible nombre de fragments peut laisser espérer des conditions favorables d'analyse en mode MRM.

C. Résultats obtenus avec le piège ionique linéaire pour des échantillons chargés à 300 fmoles/μL d'epoetin beta

Cette analyse de l'échantillon d'epoetin beta plasmatique à 300 fmoles/μL a un double objectif :

- d'une part confirmer les résultats obtenus avec le MALDI-Q-TOF concernant les pertes de matériel lors des différentes étapes de l'extraction
- d'autre part vérifier si les trois peptides marqués d'epoetin beta sont utilisables pour la quantification à un niveau proche de celui de l'epoetin beta pure en solution aqueuse

1. Analyse d'un échantillon aqueux d'epoetin beta soumis à la chromatographie C4 uniquement

L'analyse réalisée avec le spectromètre MALDI-Q-TOF avait montré une perte d'EPO d'environ 44 % après l'étape d'évaporation consécutive à la chromatographie Vydac® C4 d'un échantillon aqueux d'EPO.

Ce résultat est confirmé par l'analyse en mode LC-ESI-MS avec le spectromètre LTQ. En effet, les rapports d'intensité des pics D0/D4 observés pour les peptides de *m/z* 655,38, 804,46 et 995,50 sont d'environ 1/2. Le spectre correspondant au peptide ¹⁵YLLEAK²⁰ (*m/z* 804 et 808) est présenté à titre d'exemple (figure IV.35)

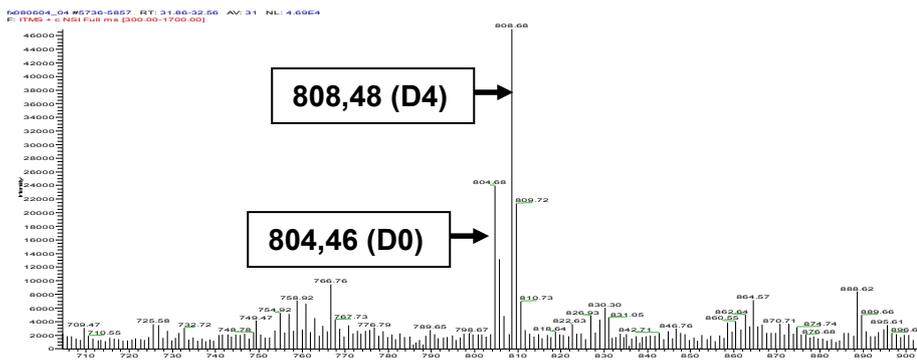


Figure IV.35 Spectre de masse en mode LC-ESI-MS *full scan* du peptide marqué $^{15}\text{YLLEAK}^{20}$ obtenu à partir d'un échantillon aqueux d'epoetin beta soumis à la seule chromatographie C4. Le rapport des pics marqués D0/D4 (804/808) indique une perte d'EPO de l'ordre de 50 %.

2. Analyse d'un échantillon plasmatique d'epoetin beta

La perte d'epoetin beta est moindre pour un échantillon plasmatique surchargé en epoetin beta que pour un échantillon d'epoetin beta pure en solution aqueuse. Cette différence peut être mise au compte d'une passivation des matériaux réalisée par l'intermédiaire des protéines plasmatiques. Les résultats obtenus en mode LC-ESI-MS avec le LTQ confirment ce que nous avons mis en évidence au préalable avec le spectromètre MALDI-Q-TOF.

Nous avons aussi montré que l'epoetin beta n'était pas retenue par la cartouche de déplétion Hu7. Ce résultat a aussi été confirmé par l'analyse en mode LC-ESI-MS avec le LTQ, en prenant comme base les rapports d'intensité des pics D0/D4 des peptides $^{111}\text{ALGAQK}^{116}$, $^{15}\text{YLLEAK}^{20}$, $^{46}\text{VNFYAWK}^{52}$.

3. Analyse d'un échantillon plasmatique sans addition d'epoetin beta

Un échantillon plasmatique contrôle sans epoetin beta préparé dans les mêmes conditions (protéolyse trypsique puis marquage D0) sans ajout d'étalon interne est analysé avec le LTQ. Les 6 espèces d'intérêt marquées D0 (m/z 655,38, 804,46 et 995,50) et marquées D4 (m/z 659,41, 808,48, 999,43) sont recherchées. La figure IV.36 montre les spectres correspondant aux 3 zones des masses dans lesquelles ces peptides marqués de l'epoetin beta sont attendus.

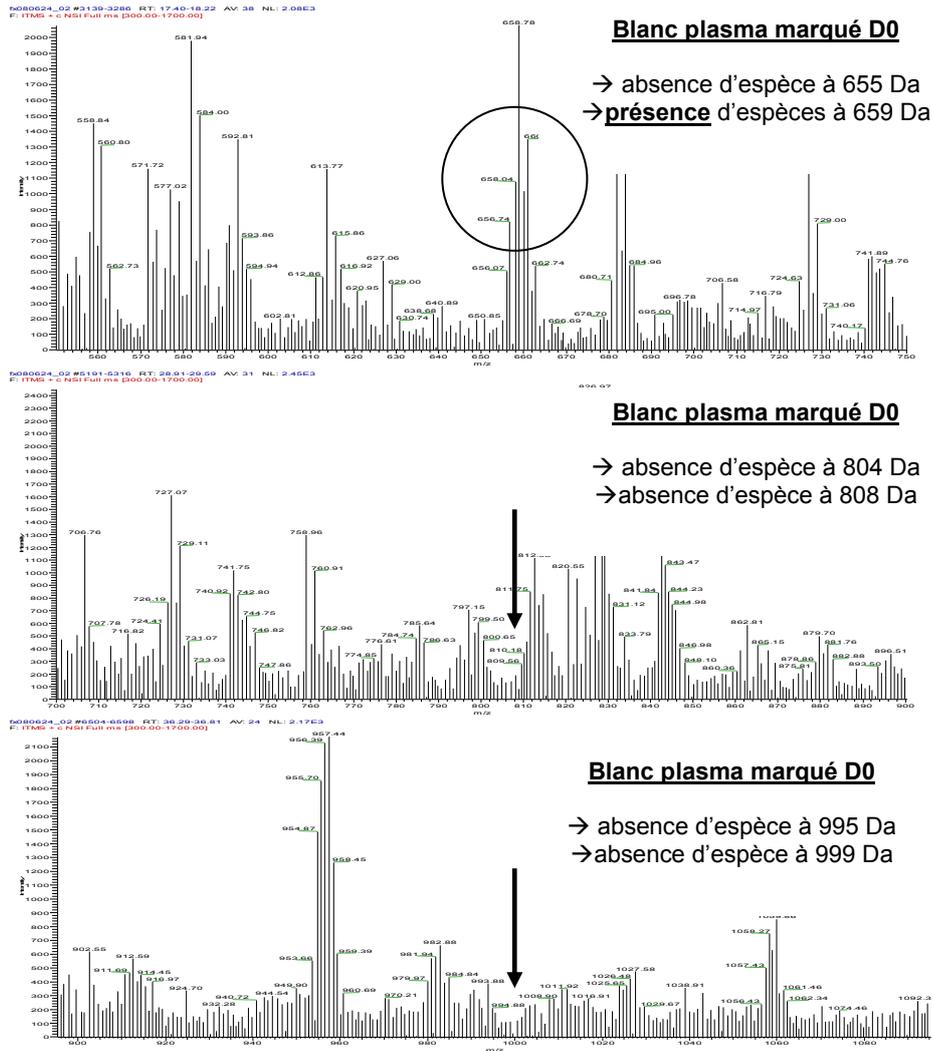


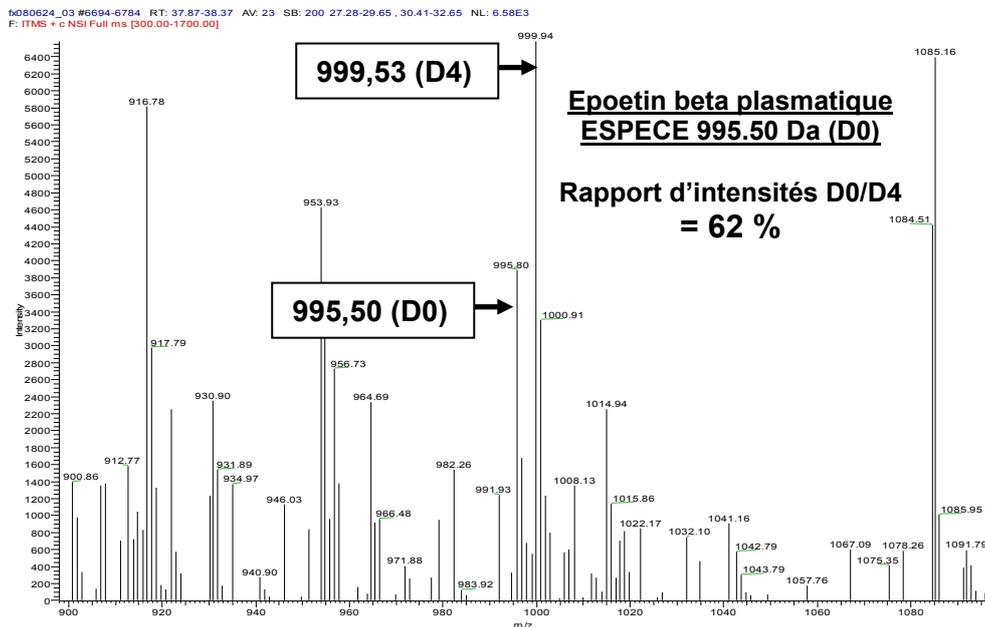
Figure IV.36. Spectres de masse en mode MS full scan observés pour un échantillon de plasma sans epoetin beta. Ces 3 spectres présentent les trois zones de masse où les peptides de l'epoetin beta marqués par D0 et D4 sont normalement attendus.

Seule une espèce de masse proche de 659 Da est rencontrée dans un blanc sans EPO. Cette masse correspond à l'étalon interne du peptide d'epoetin beta marqué D0 de m/z 655.38. Le peptide d'epoetin beta marqué de m/z 655.38 n'est donc pas un candidat fiable pour une quantification en mode *full scan*. Les candidats les plus fiables sont donc les peptides marqués D0 de m/z 804,46 et 995,50.

Ce résultat est conforme à l'estimation de la concentration endogène d'EPO à environ 2,4 attomoles/ μ L.

D. Résultats obtenus sur des échantillons plasmatiques d'epoetin beta à 150 fmol/ μ L, limite de détection du MALDI-Q-TOF

L'analyse réalisée avec le spectromètre MALDI-Q-TOF de l'échantillon de plasma humain surchargé par de l'epoetin beta à raison de 150 fmoles/ μ L de plasma avait donné un rapport d'intensités des pics D0/D4 de 65 % environ pour les ions 995.50/999,53. Le même échantillon analysé avec le piège ionique linéaire confirme le résultat obtenu en mode MALDI puisque le ratio observé sur le spectre de la figure IV.37 avec les espèces de m/z 995,50/999,53 est de 62 %. Le résultat est du même ordre pour les espèces de m/z 804,46/808,48.



Nous avons donc confirmé que l'application de la méthodologie de purification de l'epoetin beta à partir d'un échantillon de plasma humain se traduit par une perte de l'ordre de (35 ± 3) % environ.

L'approche qui associe une séparation des peptides par nanochromatographie à un piège ionique linéaire permet d'atteindre une limite de détection plus basse que celle du MALDI-Q-TOF en mode *full scan*, car l'analyse de l'échantillon de plasma surchargé par de l'EPO à raison de 150 fmoles/ μ L a montré que la limite de détection du LTQ n'était pas encore atteinte à cette concentration. Néanmoins, les expérimentations réalisées avec le piège ionique linéaire (LTQ) n'ont pas été poursuivies. En effet, le rapport signal sur bruit obtenu pour cet échantillon indiquait que notre objectif de dosage de 1 fmoles d'epoetin

beta/ μ L de plasma était encore hors de portée. Nous avons cherché à combler le fossé restant au moyen d'une instrumentation qui permette de travailler en mode MRM à haute sensibilité, en nous appuyant sur les informations délivrées par l'étude réalisée avec le piège ionique.

VIII. Analyse quantitative de l'époetin beta par nano LC-ESI-Q-TRAP

Les limites de détection de l'époetin beta dans le plasma obtenues avec les deux techniques de spectrométrie de masse utilisées précédemment étaient encore loin de l'objectif à atteindre. C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers un troisième instrument de spectrométrie de masse fonctionnant sur le principe d'un triple quadripôle, permettant de réaliser des analyses en mode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), pour effectuer l'analyse à haute sensibilité de multiples transitions entre ions précurseurs et ions fragments en mode MS/MS. En effet, le principe de la sélection, opérée par le premier quadripôle, d'un ensemble retreint d'ions précurseurs doit permettre d'atteindre en mode MRM une meilleure sensibilité qu'un analyseur hybride de type Q-TOF ou un analyseur de type piège ionique, et plus particulièrement lorsqu'il s'agit de dosage dans un milieu protéique complexe tel que le plasma humain.

Ne disposant pas d'un tel instrument associé à une chaîne de nanochromatographie sur le site de Bordeaux, nous avons sollicité une évaluation pour le dosage de l'époetin beta de l'instrumentation 4000 Q-TRAP™ auprès de la société Applied Biosystems-MDS Sciex. Les expériences ont été réalisées par Matthias Glückmann et Christof Lenz sur le site de la société situé à Darmstadt.

L'annexe chapitre 7/paragraphe I.E.4 fournit des renseignements complémentaires sur les conditions d'analyse en nano LC-ESI-Piège ionique linéaire (Q-TRAP)

Une étude préliminaire de sensibilité du nano LC-ESI-Q-TRAP a été conduite sur une solution aqueuse d'époetin beta soumise à protéolyse totale et marquée par le réactif D0, puis diluée en cascade dans l'eau jusqu'à atteindre la limite de détection de l'appareil. Par ailleurs, des échantillons plasmatiques contenant des quantités décroissantes d'époetin beta ont été préparés et marqués selon notre stratégie. L'étalon interne marqué D4 est ajouté avant l'analyse en quantité égale à la quantité théorique d'époetin beta marquée D0 présente dans l'échantillon plasmatique.

A. Limite de détection du spectromètre Q-TRAP pour une solution aqueuse d'époetin beta

Une gamme de six concentrations est préparée par dilution en cascade d'une solution mère d'époetin beta aqueuse trypsique marquée par le réactif D0.

Les différentes quantités injectées dans le système chromatographique sont :

- (E1) 0,1 fmole (soit 100 amoles)
- (E2) 0,2 fmole (soit 200 amoles)
- (E3) 0,5 fmole (soit 500 amoles)
- (E4) 1 fmole
- (E5) 2 fmoles
- (E6) 20 fmoles

Les géométries des sources nanospray des deux instruments, LTQ et Q-TRAP, sont sensiblement différentes. Il n'est donc pas trop surprenant de retrouver dans ces échantillons avec le Q-TRAP deux peptides de l'époetin beta marqués par le réactif D0 sous forme d'ions doublement chargés (au lieu d'ions monochargés pour le LTQ). Il s'agit des peptides :

- $^{15}\text{YLLEAK}^{20}$ de m/z 402,8068 (forme monochargée m/z 804,4618)
- $^{46}\text{VNFYAWK}^{52}$ de m/z 498,3060 (forme monochargée m/z 995,5097)

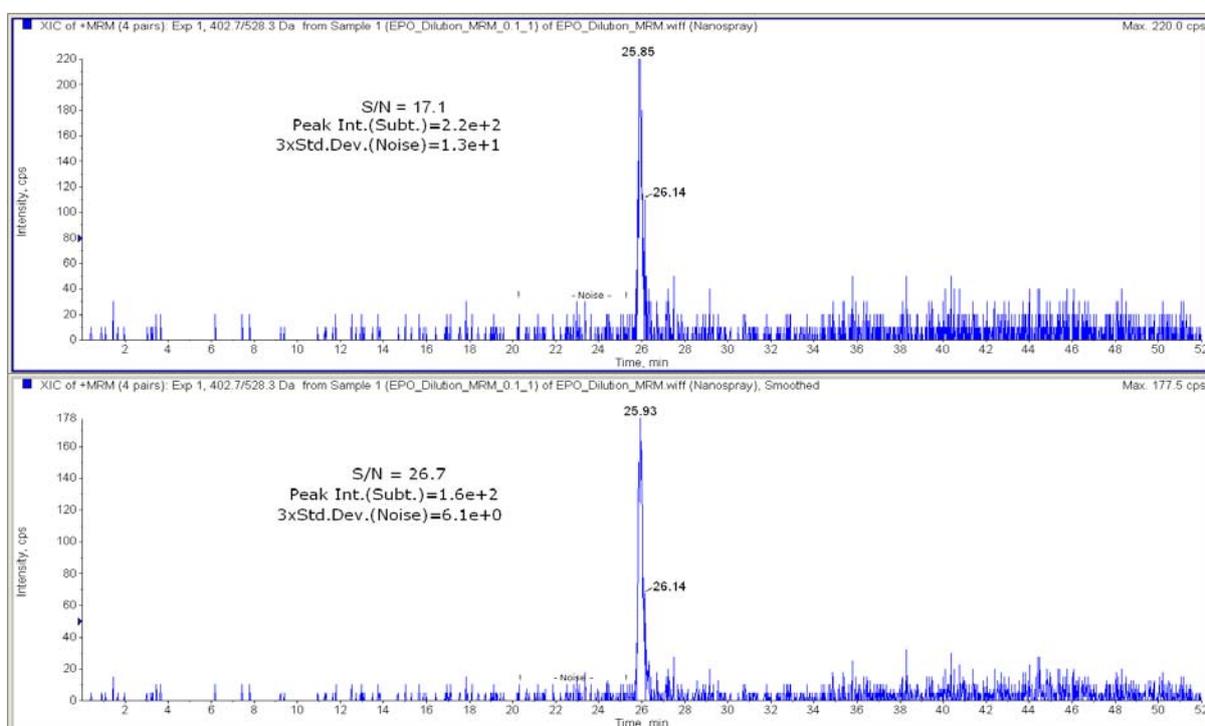


Figure IV.38. Chromatogramme de masse de l'ion m/z 402,8 (ion doublement chargé du peptide $^{15}\text{YLLEAK}^{20}$) obtenu pour une quantité de 100 attomoles d'époetin beta injectées sur la colonne. Spectre brut en haut, spectre lissé en bas.

Ces deux peptides de l'epoetin beta marqués par le réactif D0 sont détectés sans difficulté pour une quantité injectée sur la colonne de 100 attomoles comme le montre la figure IV.38.

L'analyse MS/MS confirme l'appartenance à l'epoetin beta des 2 espèces doublement chargées observées. Le spectre des ions fragments de l'ion doublement chargé du peptide $^{15}\text{YLLEAK}^{20}$ montre que plusieurs transitions observées à partir de ce précurseur restent utilisables pour une analyse MRM dans le cas de la plus faible concentration injectée sur colonne, soit ici 100 attomoles (figure IV.39). Notons au passage que le spectre d'ions fragments est constitué des seuls ions y, à l'exception de l'ion b2 (m/z 277) L'effet d'orientation des fragmentations en faveur des ions y introduit par la dérivation chimique reste donc très net même dans le cas d'un précurseur doublement chargé.

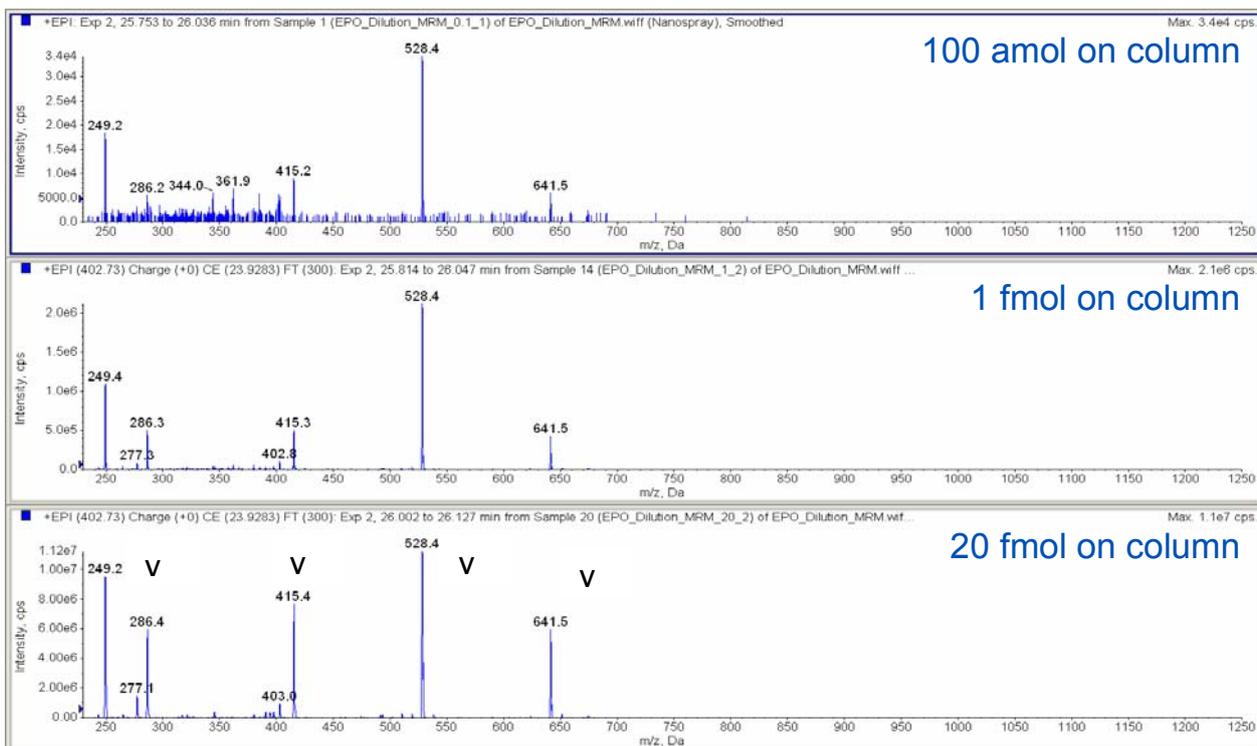


Figure IV.39. Spectres des ions fragments issus du précurseur m/z 402,8 (peptide $^{15}\text{YLLEAK}^{20}$) pour trois quantités différentes du mélange de peptides tryptiques de l'EPO injectées sur nanocolonne C18 (spectromètre 4000 Q-TRAP™)

D'autre part, pour cette même quantité de 100 attomoles d'epoetin beta, l'analyse en mode MRM réalisée à partir du précurseur m/z 402,8 montre un rapport signal/bruit de 27 environ (après lissage, figure IV.38). La limite de détection pour l'epoetin beta via ses peptides marqués, extrapolée au rapport S/N = 3, serait donc d'environ 9 attomoles injectées

sur la colonne. L'objectif fixé pour la limite de détection était donc atteint dans le cas de l'époetin beta pure.

La détermination de la limite de détection était notre objectif majeur lors de cette première série d'expériences. Malgré un faible nombre de points de mesure et un espacement peu adéquat de ces derniers, la réponse est linéaire en mode MRM (figure IV.40 ; coefficient de corrélation de 0,98) pour des quantités de peptides marqués injectés sur la colonne allant de 0,1 à 20 fmoles. Nous pouvions donc passer à la deuxième étape, celle de l'analyse quantitative d'un plasma surchargé en epoetin beta.

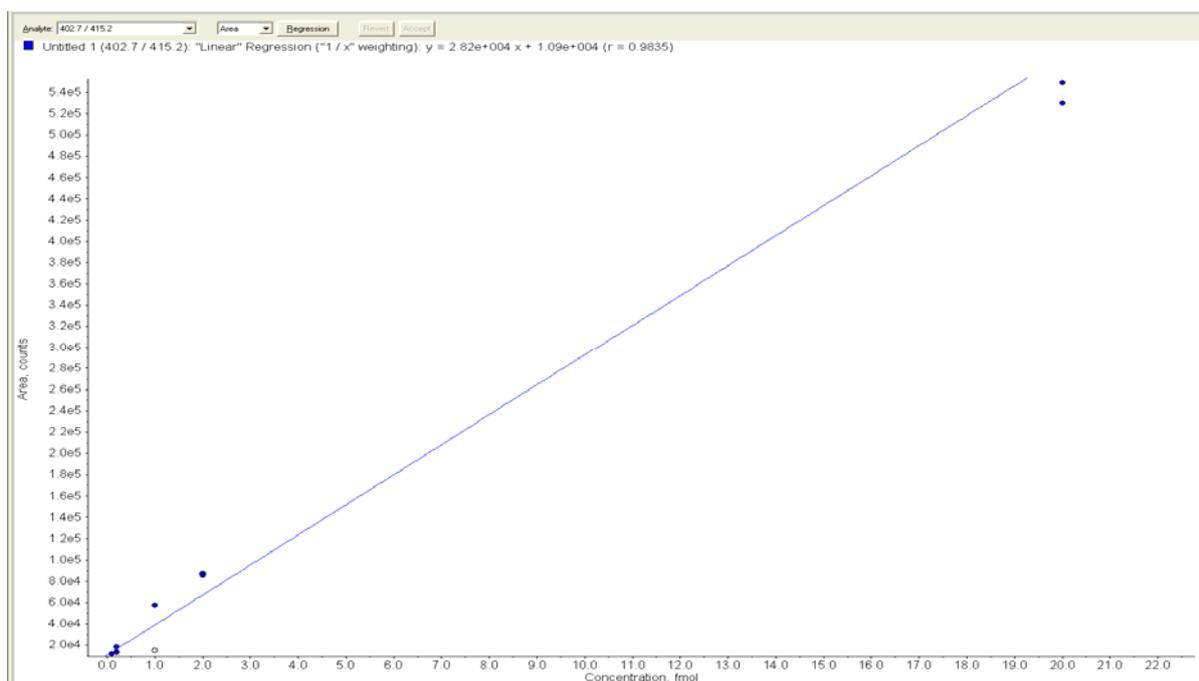


Figure IV.40. Corrélation entre les quantités d'époetin beta injectées sur la colonne (allant de 0,1 à 20 fmoles) et l'aire du pic de l'espèce de m/z 402,8068 (coefficient de corrélation 0,98).

B. Résultats obtenus en mode MRM avec le spectromètre Q-TRAP pour des échantillons plasmatiques d'époetin beta

Sept échantillons de plasma surchargés par des quantités croissantes d'époetin beta ont été traités par déplétion des protéines majoritaires sur cartouche Hu7, clivage protéolytique total, puis marquage des peptides en vue de l'analyse par spectrométrie de masse :

- (P1) Plasma contrôle sans epoetin beta (12 μ L)
- (P2) Plasma contenant 0,6 fmoles d'époetin beta/12 μ L
- (P3) Plasma contenant 3,0 fmoles d'époetin beta/12 μ L

- (P4) Plasma contenant 6,1 fmoles d'epoetin beta/12 μ L
- (P5) Plasma contenant 61 fmoles d'epoetin beta/12 μ L
- (P6) Plasma contenant 305 fmoles d'epoetin beta/12 μ L
- (P7) Plasma contenant 610 fmoles d'epoetin beta/12 μ L

A la fin du processus de préparation, l'étalon interne est ajouté. Il s'agit d'epoetin beta sous forme de peptides tryptiques marqués par le réactif D4, ajoutée en quantité équivalente à la quantité d'epoetin beta marquée par le réactif D0 contenue dans l'échantillon plasmatique à analyser.

Compte tenu du mode de préparation de l'échantillon les quantités de peptides de l'epoetin beta injectées sur la nano-colonne de chromatographie sont les suivantes:

- (P1) Plasma contrôle : 0 fmole EPO
- (P2) Plasma contenant 0,1 fmole EPO
- (P3) Plasma contenant 0,5 fmol EPO
- (P4) Plasma contenant 1 fmole EPO
- (P5) Plasma contenant 10,2 fmoles EPO
- (P6) Plasma contenant 51 fmoles EPO
- (P7) Plasma contenant 102 fmoles EPO

Les deux peptides de l'epoetin beta marqués par le réactif D0 détectés lors de l'étude de sensibilité ($^{15}\text{YLLEAK}^{20}$ et $^{46}\text{VNFYAWK}^{52}$) sont retrouvés dans tous les échantillons plasmatiques contenant de l'epoetin beta. Les ions doublement chargés qui correspondent à ces peptides ne sont pas trouvés dans le plasma contrôle. Ceci est normal, puisque la quantité d'EPO théoriquement attendue est de 2,4 attomoles/ μ L, valeur qui est très inférieure à la limite de détection déterminée lors des tests de sensibilité effectués avec de l'epoetin pure.

Deux chromatogrammes de masse obtenus lors de l'analyse de l'échantillon le moins concentré (P2, correspondant à 100 attomoles d'epoetin beta injectées sur la colonne) sont présentés sur la figure IV.41. Le peptide $^{15}\text{YLLEAK}^{20}$ marqué par le réactif léger D0 est détecté dans un échantillon plasmatique après une seule MRM avec un rapport signal/bruit (S/N) de 21. Le rapport S/N est encore meilleur lorsque trois transitions sont cumulées à partir de l'ion précurseur de m/z 402,80, atteignant un rapport S/N de 89.

L'apport de la méthodologie MRM est ici évident, puisque nous n'observons plus un écart considérable de limite de détection en passant de l'analyse de l'epoetin beta pure à celle d'un échantillon de plasma, au contraire de ce qui avait été constaté jusqu'ici avec les

autres spectromètres, et notamment le LTQ qui était lui aussi couplé à une chaîne de nano-chromatographie,

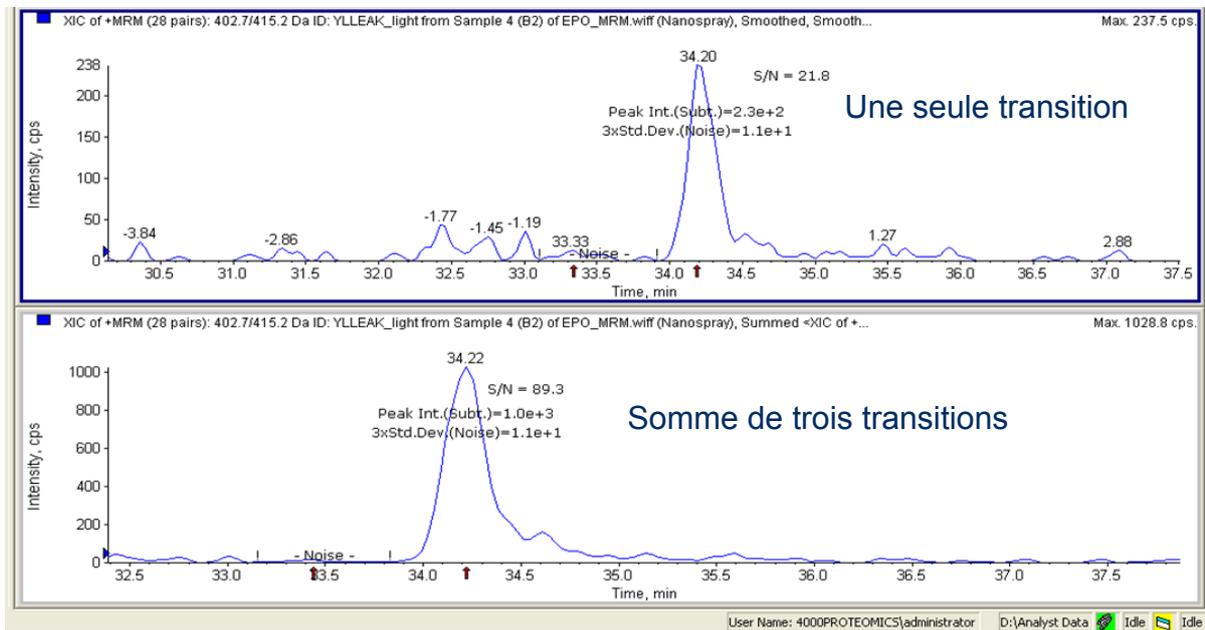


Figure IV.41. Chromatogrammes de masse obtenus en mode MRM pour le peptide $^{15}\text{YLLEAK}^{20}$ marqué D0 (m/z 402,807) de l'échantillon P2 qui correspond à 100 attomoles d'EPO injectées) pour une seule MRM effectuée (en haut, $S/N = 21,8$) et un cumul de 3 MRM pour ce même précurseur (en bas, $S/N = 89,3$).

Le peptide $^{46}\text{VNFYAWK}^{52}$ marqué par le réactif léger D0 est lui aussi détecté dans un échantillon plasmatique correspondant à 100 attomoles d'EPO injectées. Dans ce cas, le cumul de trois MRM permet d'atteindre un rapport signal/bruit (S/N) de 47 (figure IV.42).

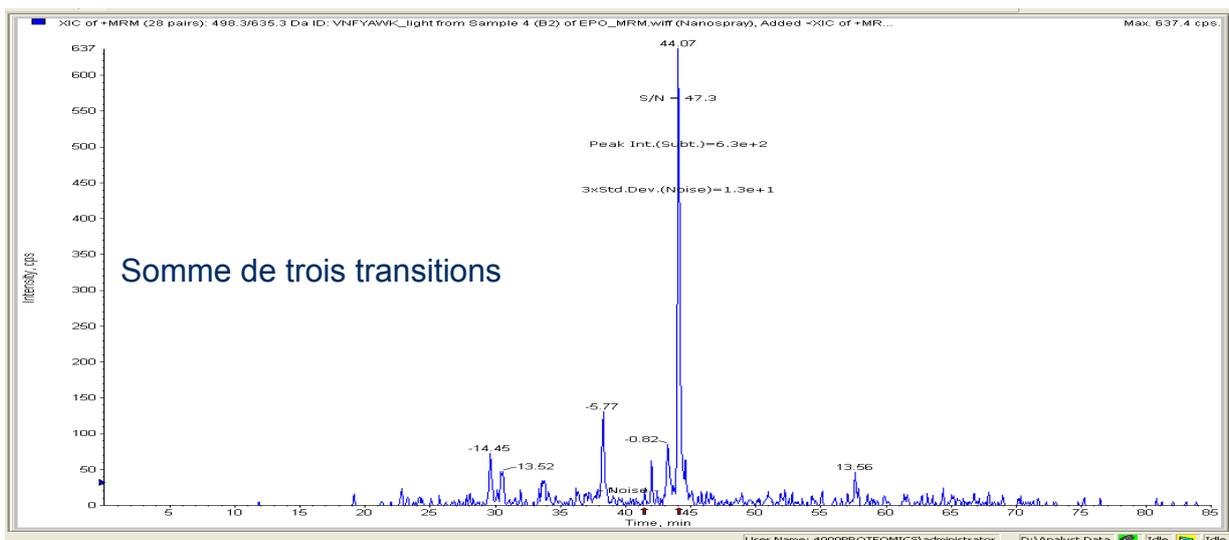


Figure IV.42. Chromatogramme obtenu en mode MRM pour le peptide $^{46}\text{VNFYAWK}^{52}$ marqué D0 (m/z 498,3060) de l'échantillon P2 qui correspond à 100 attomoles d'EPO injectées)

La corrélation entre les quantités d'époetin beta en milieu plasmatique injectées sur la colonne (3 mesures par point de concentration) et l'aire des pics obtenus en spectrométrie de masse en mode MRM pour les espèces marquées D0 et D4 est présentée sur la figure IV.43 pour le peptide $^{15}\text{YLLEAK}_{20}$. La linéarité de réponse est bonne (facteur de corrélation 0,99) pour le peptide marqué D4, mais moins bonne pour l'espèce marquée D0 qui montre au moins un point aberrant (facteur de corrélation 0,85).

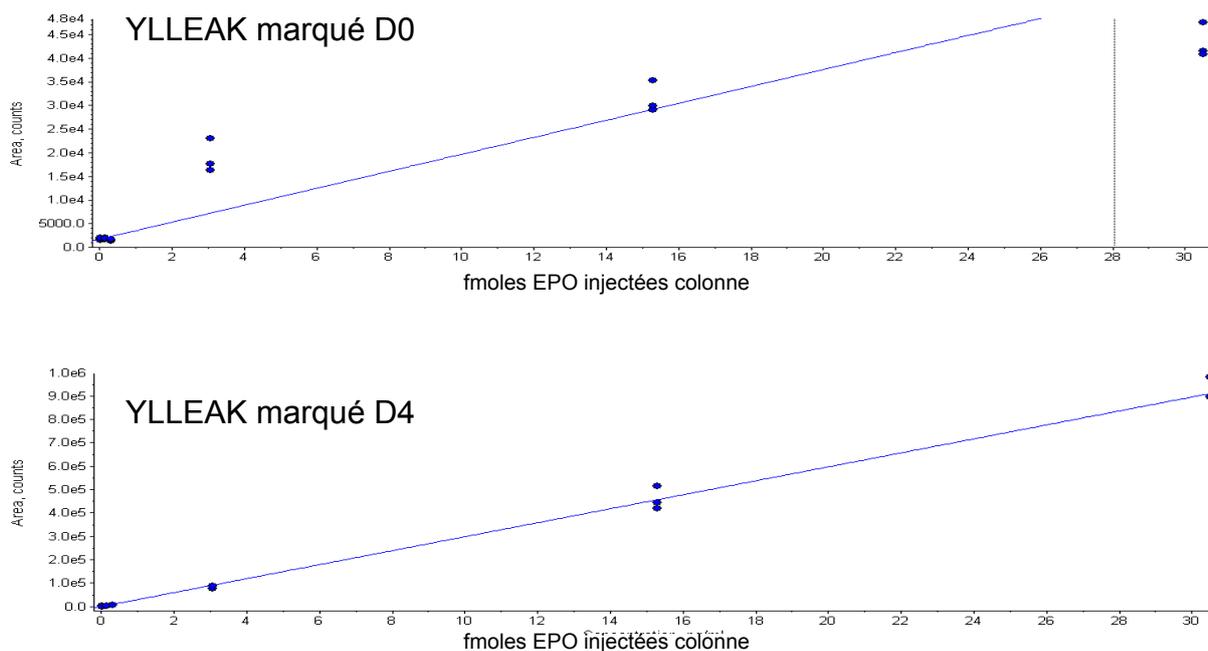


Figure IV.43. Peptide $^{15}\text{YLLEAK}_{20}$ de l'époetin beta. Corrélation entre les quantités injectées et l'aire des pics correspondant, pour le peptide marqué D0 à quantifier (en haut) et pour son étalon interne marqué D4 (en bas)

Le même type de résultat est obtenu pour le peptide et $^{46}\text{VNFYAWK}_{52}$ (Figure IV.44).

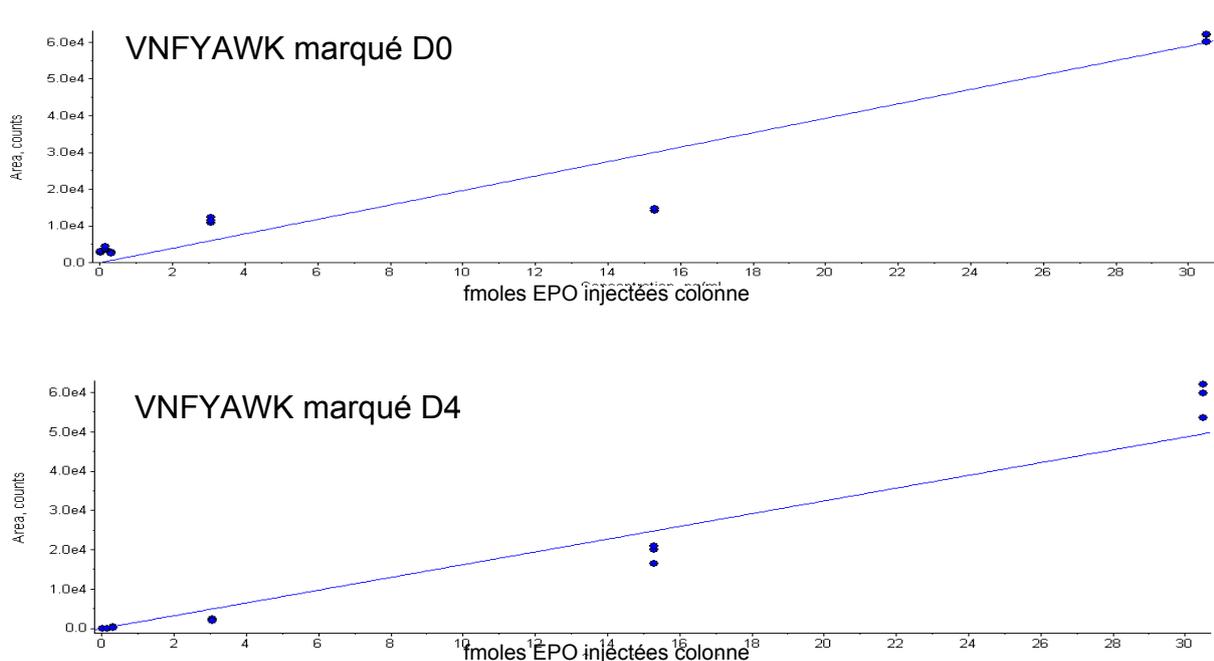


Figure IV.44. Peptide VNFYAWK de l'epoetin beta. Corrélation entre les quantités injectées et l'aire des pics pour le peptide marqué D0 (en haut) et pour son étalon interne marqué D4 (en bas)

Compte tenu du rapport S/N obtenu pour la plus faible concentration d'epoetin beta dans un échantillon plasmatique, qui était avant extraction de 600 attomoles d'epoetin beta/12 μ L de plasma, on peut estimer que la limite de quantification avec la technique de nano LC-ESI-Q-TRAP en mode MRM est de l'ordre de 50 attomoles d'epoetin beta/ μ L de plasma humain.

IX. Conclusion

Le dosage de l'epoetin beta dans un échantillon de plasma humain est donc possible en mode MRM avec deux peptides marqués $^{15}\text{YLLEAK}^{20}$ et $^{46}\text{VNFYAWK}^{52}$, en cumulant plusieurs transitions. L'objectif principal de ce travail, c'est-à-dire l'obtention d'une limite de détection et de quantification qui permette d'envisager le dosage de l'epoetin beta dans le plasma humain était donc atteint. Plusieurs points devront être examinés de manière approfondie pour que la méthodologie puisse acquérir une robustesse et une rapidité d'analyse satisfaisante. Nous y reviendrons dans la discussion générale.

Arrivés à ce point du travail, nous n'avions pas encore pu tester le caractère universel de cette méthodologie de dosage de protéines médicaments. Nous avons abordé ce point par une étude de protéine médicament modifiée par l'ajout de PolyEthylèneGlycol (PEG). En effet, les formes dites « pégylées » de protéines médicament sont administrées de manière de plus en plus fréquentes à des patients. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au cas de l'interféron pégylé.

CHAPITRE 5

MISE AU POINT DE L'EXTRACTION SPECIFIQUE DU PEG INTERFERON ALFA-2b

CHAPITRE 5 :

MISE AU POINT DE L'EXTRACTION SPECIFIQUE DU PEG INTERFERON ALFA-2b

I. Introduction

Selon l'organisation mondiale de la santé, 3 % de la population mondiale est infectée par le virus de l'hépatite C. L'hépatite C s'exprime par une maladie chronique du foie évoluant progressivement de la nécrose inflammatoire à la cirrhose puis au carcinome hépatocellulaire en l'absence de traitement antiviral. L'interféron, sous ses différentes formes, fait partie des traitements de référence de l'hépatite C. Les principales avancées thérapeutiques depuis la mise à disposition de l'interféron sont l'utilisation de la ribavirine en combinaison à l'interféron, puis le développement de formes pégylées ou « retard » de l'interféron permettant une meilleure activité antivirale avec un nombre réduit d'administrations.

Les principaux challenges actuels concernant le traitement de l'hépatite C sont, d'une part, le dosage des interférons pégylés et de la ribavirine en vue de l'optimisation thérapeutique individuelle, et d'autre part l'évaluation de l'efficacité de ces combinaisons d'antiviraux chez les patients difficiles à traiter, tels que les non répondeurs, les cirrhotiques, les transplantés, les insuffisants rénaux et les patients co-infectés avec le VIH (Carrat *et al.*, 2004).

Les interférons sont une famille de petites molécules protéiques d'une masse moléculaire d'environ 15 000 à 20 000 Da. Ils sont produits et sécrétés par les cellules en réponse à des infections virales ou à différents inducteurs biologiques. Trois classes majeures d'interférons ont été identifiées : alfa, bêta et gamma. Ces trois classes principales ne sont pas elles-mêmes homogènes et peuvent regrouper plusieurs espèces moléculaires différentes d'interférons (plus de 14 interférons alfa humains génétiquement différents).

Le peginterféron alfa-2b ou interféron alfa-2b pégylé est un conjugué covalent d'interféron alfa-2b recombinant avec le mono méthoxy-polyéthylène glycol. Les études *in*

vivo et *in vitro* suggèrent que l'activité biologique du peginterféron alfa-2b provient bien de sa moitié interféron.

A. Structure de l'interféron alfa-2b humain

Le précurseur de l'interféron alfa-2 humain comporte 188 acides aminés (référence *SwissProt* P01563, IFNA2_HUMAN figure V.1).

10	20	30	40	50	60
<i>MALTFALLVA</i>	LLVLSCKSSC	SVGCDLPQTH	SLGSRRTLML	LAQMRKISLF	SCLKDRHDFG
70	80	90	100	110	120
FPQEEFGNQF	QKAETIPVLH	EMIQQIFNLF	STKDSSAAWD	ETLLDKFYTE	LYQQLNDLEA
130	140	150	160	170	180
CVIQGVGVTE	TPLMKEDSIL	AVRKYFQRIT	LYLKEKKYSP	CAWEVVRAEI	MRSFSLSTNL
QESLRSKE					

Figure V.1. Séquence peptidique du précurseur de l'interféron alfa-2 humain (*Swiss-Prot/TrEMBL* entrée P01563) ; la séquence signal est en italique.

La banque *Swiss-Prot* donne également les informations suivantes :

- la séquence signal est constituée des acides aminés 1 à 23 ; la chaîne polypeptidique de l'interféron alfa-2 va donc des acides aminés 24 à 188, soit 165 acides aminés et une masse moyenne de 19 241 Da
- un pont disulfure relie les cystéines 24 et 121, ainsi que 52 et 161
- la structure tertiaire comporte 5 boucles et 7 hélices
- deux variants sont connus.

La carte peptidique théorique résultant d'une protéolyse par la trypsine est présentée dans le Tableau V.2.

B. Structure du peginterféron alfa-2b

Le peginterféron alfa-2b est une formulation à durée d'action prolongée de l'interféron alfa-2b, destinée à améliorer ses propriétés pharmacocinétiques dans le but de réduire le nombre d'administrations et d'améliorer sa tolérance. La demi-vie passe de 2 à 7 heures pour l'interféron alfa-2b à 40 heures pour le peginterféron alfa-2b. L'activité spécifique du

peginterféron alfa-2b est de $7,3 \times 10^7$ UI/mg alors que l'activité spécifique de l'interféron alfa-2b est de $2,6 \times 10^6$ UI/mg.

Le peginterféron alfa-2b est un conjugué covalent d'interféron avec le monométhoxy poly(éthylène glycol) ou PEG (figure V.2), composé hydrosoluble dénué de toxicité et d'immunogénicité, et de masse moléculaire moyenne 12 000 Daltons. Il existe une corrélation directe entre la masse moléculaire du PEG fixé à l'interféron et la demi-vie *in vivo* de la protéine pégylée (Grace *et al.*, 2005).

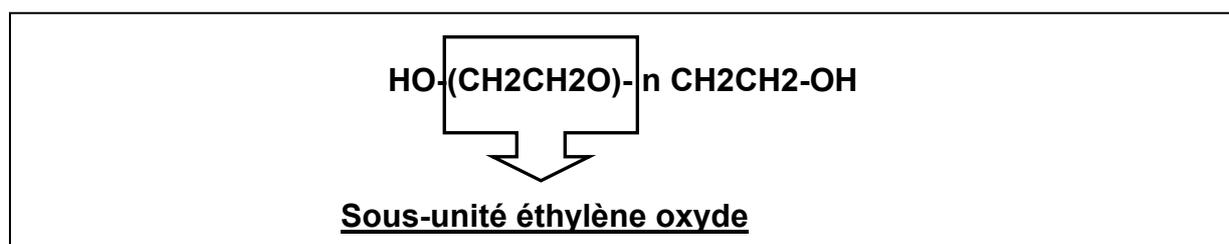


Figure V.2. Structure du polymère polyéthylène glycol (PEG)

Le peginterféron alfa-2b est issu d'une réaction entre l'interféron et un dérivé électrophile du PEG, le succinimidyl carbonate PEG (ou SC-PEG). Le schéma de cette réaction est présenté en figure V.3.

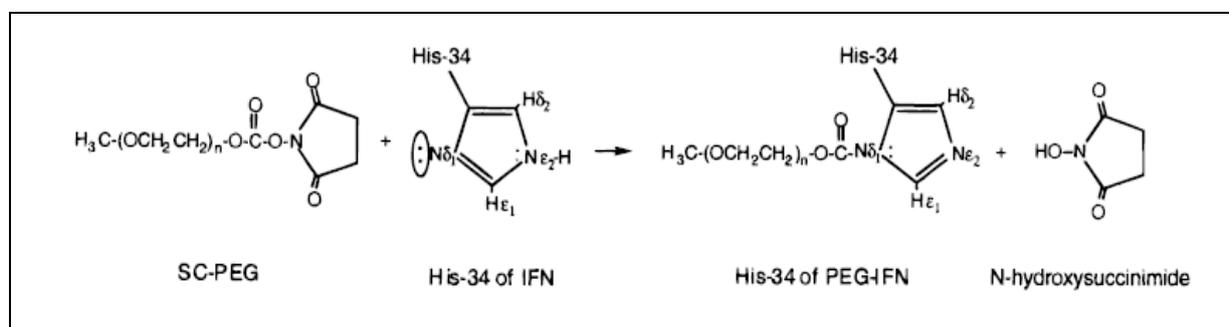


Figure V.3. Réaction de synthèse du PEG IFN α -2b par condensation de SC-PEG sur l'histidine 34 de la protéine, en présence de phosphate de sodium 100 mM à pH 6.5 (figure modifiée d'après Wang *et al.*, 2000).

Durant la réaction, la fixation du PEG pourrait intervenir sur les nombreux sites électrophiles des 165 acides aminés de l'interféron alfa-2b, mais en réalité l'encombrement stérique des différents sites réactifs potentiels lié à la conformation de la protéine (figure V.4), et le pK local de ces résidus déterminent des sites potentiels de pégylation (Wang *et al.*, 2000) :

- L'histidine 57 est localisée sur l'hélice B peu accessible aux solvants.

- L’histidine 7 localisée en N-terminal avant l’hélice A est également peu accessible aux solvants
- L’histidine 34 par contre se trouve sur une longue boucle de 30 acides aminés reliée aux hélices A et B et exposée aux solvants, ce qui fait d’elle un excellent site de fixation du PEG.

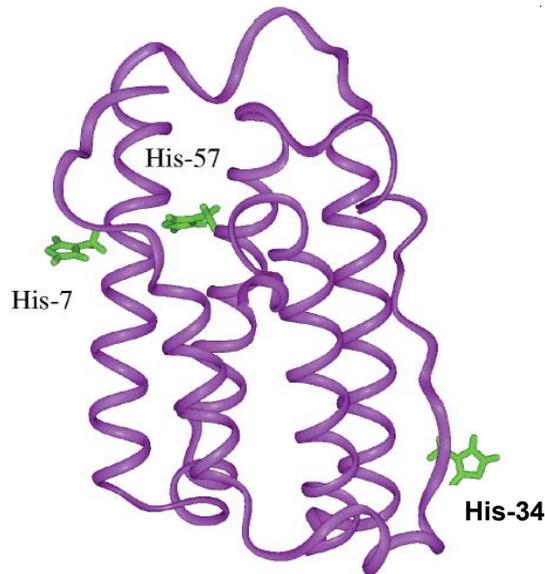


Figure V.4. Structure tridimensionnelle de l’interféron alfa-2b présentant quelques sites de fixation du PEG (figure modifiée d’après Wang *et al.*, 2000)

Le produit final de la réaction est une population hétérogène de molécules constituée principalement d’interféron monopégylé et d’un très faible pourcentage d’interféron multipégylé (principalement dipégylé) et non pégylé. D’autre part, la population d’interféron monopégylé est composée de différentes espèces à cause des différents sites de fixation du PEG (Wang *et al.*, 2000).

Le site de fixation majoritaire du PEG sur l’interféron, l’histidine 34, a été caractérisé par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). La proportion d’espèces pégylées sur l’histidine 34 serait de 47 % du total des espèces pégylées pour certains auteurs (Wang *et al.*, 2000) et de plus de 50 % pour d’autres (Grace *et al.*, 2005). L’interféron alfa-2b pégylé sur l’histidine 34 présente une activité biologique élevée mais une stabilité modérée. D’autres sites de fixation majeurs et mineurs du PEG sur l’interféron alfa-2b ont été identifiés (tableau V.1).

Tableau V.1. Sites de fixation du PEG sur le peginterferon alfa-2b (d'après Grace et al., 2005)

SITES DE FIXATION MAJEURS DU PEG	SITES DE FIXATION MINEURS DU PEG
Histidine 34 (porteur majeur > 50 %)	Lysine 83
Cystéine 1	Lysine 112
Lysine 31	Lysine 161
Lysine 121	Lysine 133
Lysine 49	Histidine 7
	Tyrosine 129
	Serine 163

Les peptides qui peuvent théoriquement résulter d'un clivage protéolytique par la trypsine peuvent être classés en plusieurs catégories (tableau V.2) :

- Peptides porteurs mineurs du PEG
- Peptides porteurs majeurs du PEG
- Peptides porteurs majeurs > 50 % du PEG : peptides représentant plus de 50 % de l'ensemble des peptides pégylés

Tableau V.2. Carte peptidique de l'interféron alfa-2 humain après digestion trypsique

PEPTIDE (m/z)	Fixation du PEG	PEPTIDE (m/z)	Fixation du PEG	PEPTIDE (m/z)	Fixation du PEG	PEPTIDE ((m/z)	Fixation du PEG
613.3093		1337.6670		2082.0648	Mineure	4243.1300	Mineure
619.3232		1344.7674	Mineure	2096.1792	Majeure	4314.2035	Majeure
635.3181		1360.7915		2098.0597	Mineure	4330.1985	Majeure
741.4042	Majeure	1366.7511	Majeure	2128.1691	Majeure	4371.2250	Majeure
750.4760		1370.6481	Majeure	2153.2007	Majeure	4395.1542	Maj>50%*
902.4941		1392.7814		2225.9999	Maj>50%*	4411.1491	Maj>50%*
910.5066	Majeure	1394.6885		2297.1918	Mineure	4666.2823	Maj>50%*
967.5281	Majeure	1450.6696	Mineure	2313.1867	Mineure	4682.2772	Maj>50%*
1007.6135	Mineure	1469.7277	Majeure	2459.3002		4734.2840	
1030.5891	Majeure	1472.8624	Majeure	2475.2952		4750.2789	
1038.6016	Majeure	1481.7594	Mineure	2527.3054	Majeure	4791.3055	
1076.5955		1526.7492	Majeure	2559.2952	Majeure	5617.7603	
1095.6230	Majeure	1594.8046	Mineure	2584.3268	Majeure	5633.7553	
1108.5853		1601.9050	Mineure	3117.4887	Maj>50%*	5674.7818	
1135.7085	Mineure	1624.8805	Majeure	3174.5101	Maj>50%*	5826.8060	Maj>50%*
1181.6347	Majeure	1651.8260	Mineure	3272.6190	Mineure	5842.8009	Maj>50%*
1204.6904		1696.8864	Mineure	3288.6139	Mineure	7174.5665	
1209.5721		1809.8774		3302.6323	Mineure	7206.5563	
1232.6966		1825.8723	Mineure	3318.6272	Mineure	7231.5879	
1236.6803		1825.9290		3329.6405	Mineure		
1238.6561	Majeure	1866.8989		3359.6537	Mineure		
1264.6864		1937.9724		3890.9520	Mineure		
1266.5935		1953.9673		3906.9469	Mineure		
1309.7296	Majeure	1954.8718	Maj>50%*	4186.1086	Mineure		
1313.6266	Majeure	1994.9939		4202.1035	Mineure		

* **Maj > 50%** = peptides représentant plus de 50 % de l'ensemble des peptides pégylés)

L'annexe chapitre 8/paragraphe III fournit des informations complémentaires concernant les différentes spécialités pharmaceutiques d'interféron recombinant actuellement sur le marché.

II. Stratégie d'analyse

A. Intérêt potentiel de la spectrométrie de masse pour le dosage d'une forme « retard » d'interféron alfa-2 dans le plasma

Les techniques de type immunoassay utilisées classiquement pour doser l'interféron présentent plusieurs inconvénients (Vrolijk *et al.*, 2003) :

- elles perdent de leur sensibilité sur des échantillons de plasma humain (présence d'inhibiteurs)
- elles ne permettent pas de distinguer l'interféron endogène de l'interféron pégylé et ne permettent pas systématiquement de différencier les divers types d'interféron
- elles peuvent donner des faux positifs sur des échantillons plasmatiques

Ce sont les raisons pour lesquelles la spectrométrie de masse présente un intérêt potentiel pour le dosage plasmatique de l'interféron. Les concentrations plasmatiques observées après une injection sous-cutanée d'interféron alfa-2 ou de sa forme « retard » pégylée sont de l'ordre d'une dizaine à 2 000 pg/mL (Glue *et al.*, 2000), soit 0,3 à 60 fmoles/mL (0,3 à 60 attomoles/ μ L) de plasma (en considérant la masse moléculaire du peginterféron alfa-2b à 32 000 Da). La quantification d'une concentration aussi basse ne pourra être atteinte qu'après déplétion initiale de l'échantillon plasmatique avec une colonne de déplétion permettant de traiter de grands volumes.

D'autre part, les formes « retard » de l'interféron sont actuellement le traitement de référence de l'hépatite C en association à la ribavirine. La présence d'une chaîne de polyéthylène glycol sur la protéine est une particularité qui peut être exploitée en vue d'une extraction sélective de l'interféron médicament du plasma humain, en offrant la possibilité de s'affranchir de l'interféron endogène.

En faisant à nouveau appel à une référence interne sous forme de peptides marqués issus d'un interféron pégylé, nous pourrions ainsi doser avec plus d'exactitude la seule protéine médicament.

B. Présentation de l'approche proposée

La stratégie proposée pour le dosage du peginterféron α -2b est présentée de manière schématique sur la figure V.5. Elle comprend tout d'abord une étape de protéolyse par la trypsine (1). Ensuite, les peptides pégylés (plus lourds de 12 000 Daltons environ, soit la masse du PEG) sont isolés des peptides non pégylés par chromatographie de fractionnement en fonction de la taille (colonnes HiTrapTM) (2). Les fractions qui contiennent les peptides pégylés (correspondant aux hautes masses moléculaires) sont éluées en premier, regroupées et concentrées par ultracentrifugation sur membrane de porosité maximale 10 000 Daltons (3). La dernière étape consiste à rompre la liaison peptide-PEG impliquant des histidines par un traitement à l'hydroxylamine (4) afin de pouvoir identifier et quantifier par spectrométrie de masse ces peptides porteurs du PEG.

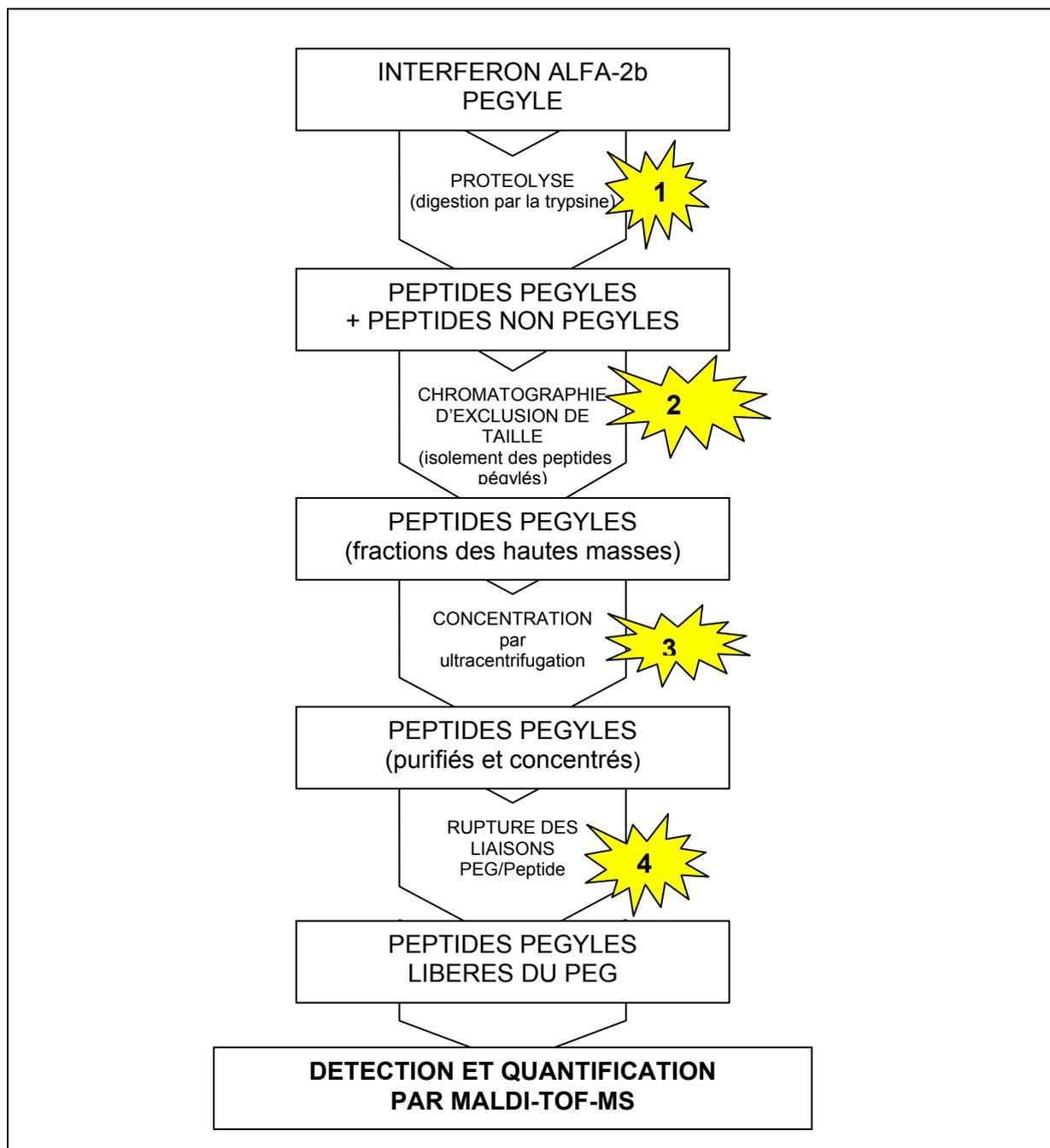


Figure V.5. Déroulement de la stratégie d'analyse

L'annexe chapitre 7/paragraphe II fournit des renseignements sur le protocole expérimental d'isolement spécifique des peptides pégylés en vue de leur analyse par MALDI-Q-TOF en mode MS.

C. Chromatographie d'exclusion de taille

La chromatographie d'exclusion de taille (ou *High-Performance Size Exclusion Chromatography* HPSEC) est réalisée sur une paire de colonnes HiTrap™ montées en série

sur une chaîne de chromatographie liquide Smart System (Amersham Biosciences ; figure V.6) Le support HiTrap™ est du Sephadex G-25 Superfine (dextran).

La limite d'exclusion théorique des colonnes HiTrap™ est de 5 000 Daltons. Nous l'avons vérifié par un étalonnage avec des composés de masse connue : le bleu dextran (2 000 000 Da), le cytochrome C (12 300 Da), l'insuline (5 734 Da) et la bradykinine (1 060 Da). Tous ces composés ont été observés dans le pic d'exclusion (4 - 5 minutes), à l'exception de la bradykinine éluée après 10 minutes.



Figure V.6. Smart System™ (gauche) et HiTrap™ Desalting (droite) Amersham Biosciences

D. Concentration par ultracentrifugation

Cette étape s'applique aux fractions de tête (pic d'exclusion en sortie de colonne HiTrap™) devant contenir en théorie les peptides trypsiniques pégylés et quelques peptides de grande taille. Ces fractions sont traitées dans un concentrateur Vivaspin® 500 dont la membrane en polyéthersulfone permet un seuil de coupure (*cut-off*) de 10 000 Da (Vivascience Sartorius ; figure V.7).



Figure V.7. Vivaspin® 500 (Vivascience/Sartorius)

E. Rupture des liaisons PEG/Peptide

La liaison polymère-peptide impliquant les résidus histidine peut être clivée par action de l'hydroxylamine. Les conditions retenues ont été décrites par Lemaire *et al.* (500 mM hydroxylamine (Sigma Aldrich), 1 heure à 20°C en milieu aqueux tamponné à pH 7 par de l'acétate d'ammonium 50 mM) (Lemaire *et al.*, 1994).

F. Préparation des échantillons pour analyse par spectrométrie de masse

Les échantillons doivent être dessalés avant analyse par spectrométrie de masse. Le mélange de peptides obtenu en sortie du concentrateur est donc traité à l'aide d'un ZipTip™ C18 (Millipore). L'échantillon issu du ZipTip™ C18 est mélangé à un volume équivalent d'une solution d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique et déposé selon la technique de la goutte séchée sur une cible métallique en vue de l'analyse MALDI-Q-TOF en mode MS.

III. Résultats

L'étude a été menée en parallèle sur l'interféron α -2b non pégylé (servant de contrôle), sur l'interféron α -2b pégylé, et sur l'interféron α -2b pégylé traité par l'hydroxylamine.

A. Etude de l'interféron non pégylé

L'interféron alfa-2b non pégylé provient de la spécialité INTRONA® de structure identique à l'interféron alfa-2b du VIRAFERONPEG®. Ces deux médicaments, commercialisés par la même firme pharmaceutique, ne se différencient que par le groupement PEG de masse moyenne 12 000 Da.

Lors de la chromatographie d'exclusion de taille de l'interféron alfa-2b non pégylé digéré (Figure V.8), aucune espèce n'est attendue dans les fractions d'élution des hautes masses, les fractions 3 à 5. Par contre, les fractions tardives de la chromatographie, soit les fractions postérieures à la fraction 12 doivent contenir les composés de bas poids moléculaire.

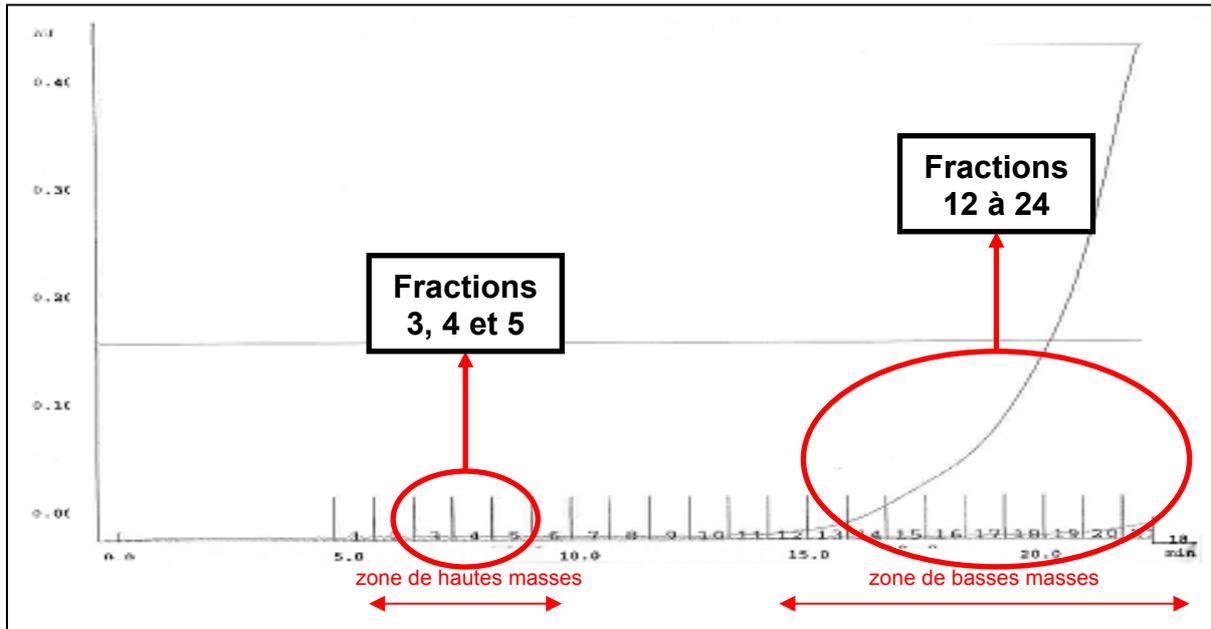


Figure V.8. Chromatographie d'exclusion par la taille de l'interféron non pégylé, protéolysé par la trypsine (2 colonnes HiTrap™ en série, débit de 400 µL/min). Les peptides élués sont détectés en UV à 280 nm puis collectés par fractions de 400 µL.

L'échantillon d'interféron non pégylé protéolysé par la trypsine ne doit renfermer que des espèces de masses molaires inférieures à 7 500 Daltons (Tableau V.2). Etant donné la présence d'espèces dans la zone d'éluion des basses masses uniquement (absence de signal au niveau des fractions 3 à 5), le chromatogramme avec détection UV est conforme à l'attente.

Néanmoins, l'analyse de la fraction 4 par spectrométrie de masse MALDI-Q-TOF en mode MS (figure V.9) montre la présence inattendue de peptides de l'interféron alfa-2b (exemple m/z 2226,00). Ce phénomène a également été observé après chromatographie dans les mêmes conditions, d'albumine de sérum bovin protéolysé par la trypsine.

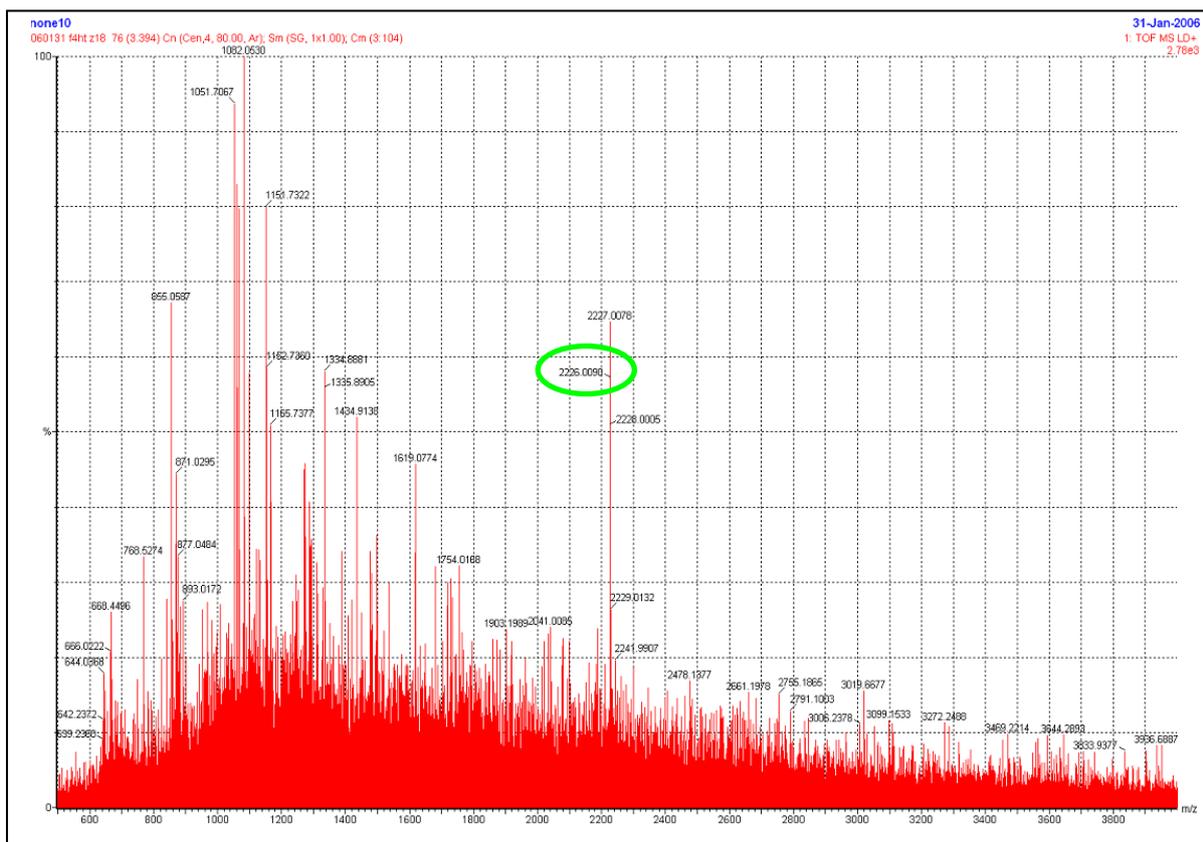


Figure V.9. Spectre de masse MALDI-Q-TOF en mode MS de la fraction 4 de la chromatographie d'exclusion stérique sur colonne HiTrap™.

Ces peptides parasites indiquent une résolution imparfaite de la chromatographie d'exclusion stérique, bien que les précautions d'usage aient été respectées (volume d'application limité, absence de surcharge). Ceci démontre la nécessité de poursuivre l'extraction du médicament par l'étape supplémentaire de purification et de concentration par ultracentrifugation sur membrane.

Le spectre de masse présenté sur la figure V.10 est le résultat de l'étape de purification par ultracentrifugation sur membrane. Aucun peptide de l'interféron alfa-2b n'est retenu sur la membrane de filtration. Cette étape permet *a priori* d'éliminer efficacement les peptides de basses masses inférieures à 10 000 Daltons, seuil de coupure de la membrane.

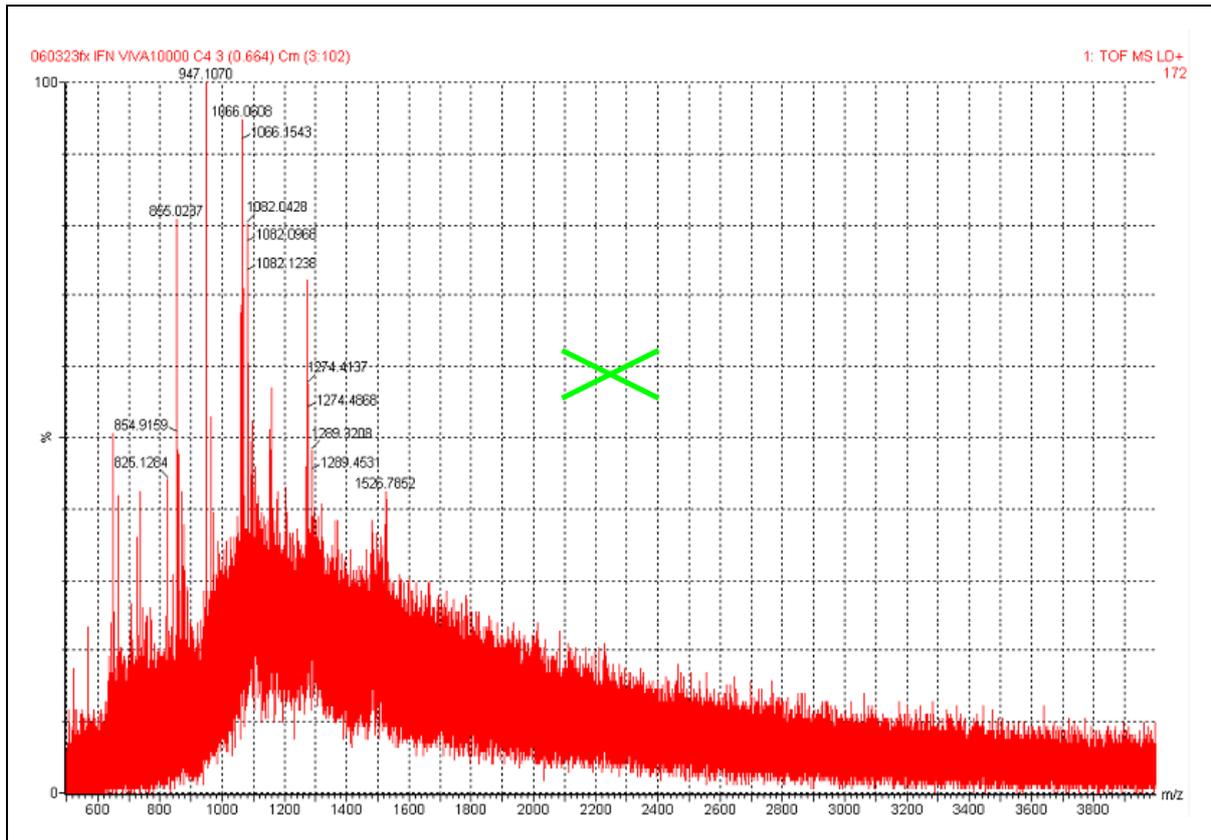


Figure V.10. Spectre de masse MALDI-Q-TOF (mode MS) de la fraction 4 de la chromatographie d'exclusion stérique après quatre étapes d'ultracentrifugation sur membrane 10 000 Da.

B. Etude de l'interféron pégylé protéolysé

L'interféron pégylé alfa-2b après protéolyse trypsique est soumis à la chromatographie d'exclusion de taille (figure V.11). Les peptides pégylés, dont la masse théorique se situe vers 12 000 - 14 000 Da, sont attendus dans les fractions d'élution des hautes masses (fractions 3 à 5).

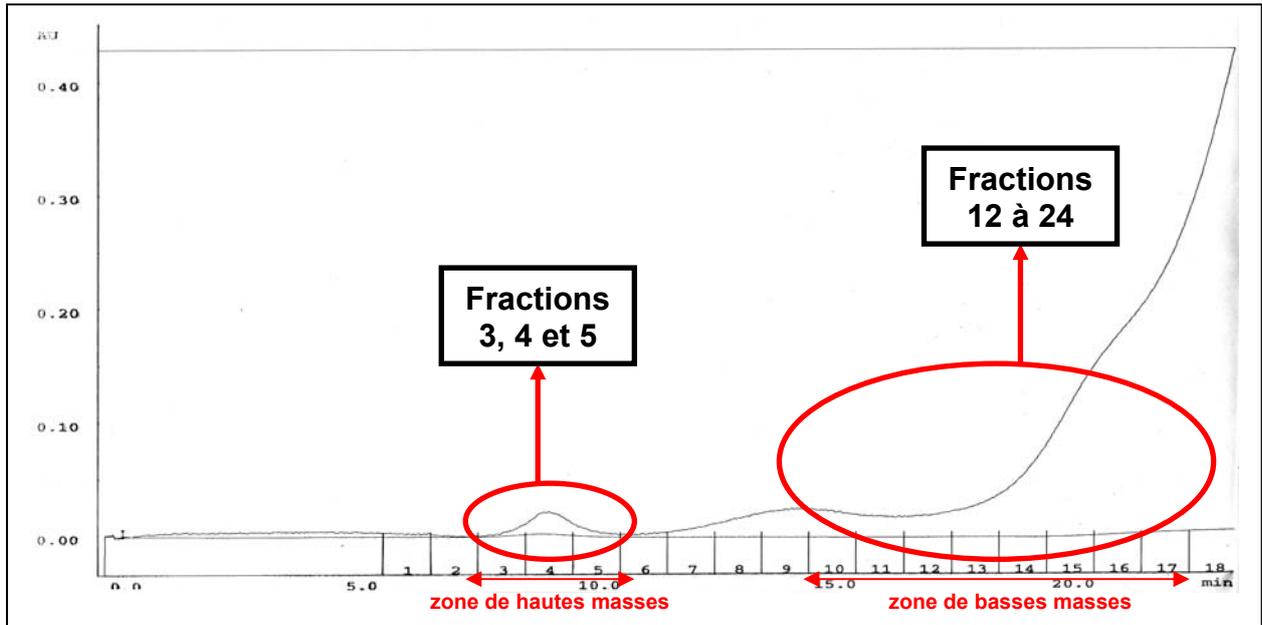


Figure V.11. Chromatographie d'exclusion par la taille de l'interféron péglylé, protéolysé par la trypsine (2 colonnes HiTrap™ en série, débit de 400 μ L/min). Les peptides élués sont détectés en UV à 280 nm puis collectés par fractions de 400 μ L.

L'allure du chromatogramme est en accord avec la théorie, car des espèces sont effectivement détectées dans les fractions d'éluion 3, 4 et 5 (figure V.11). La fraction 4, dont le signal UV est le plus important, est analysée par MALDI-Q-TOF en mode MS (figure V.12).

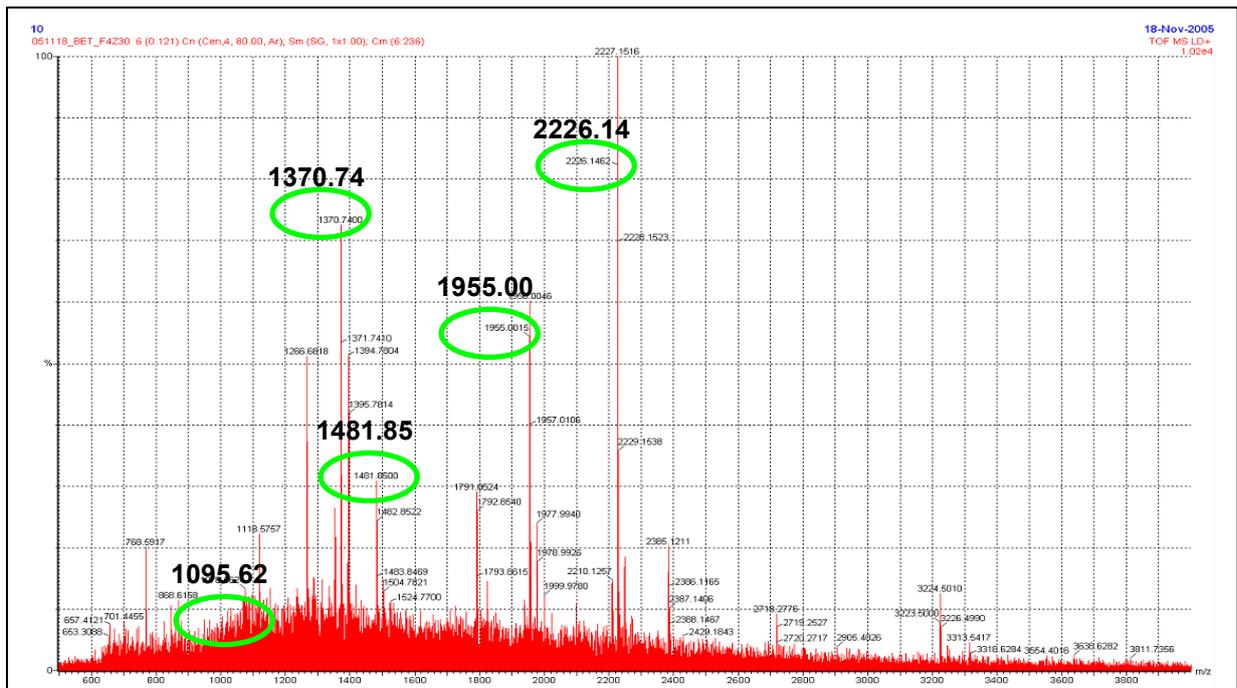


Figure V.12. Spectre de masse MALDI-Q-TOF en mode MS de la fraction 4 de la chromatographie d'exclusion stérique.

L'analyse par MALDI-Q-TOF en mode MS de la fraction 4 (figure V.12) met en évidence 6 peptides de l'interféron alfa-2b : cinq sont des porteurs potentiels du PEG (m/z 1095,62, 1370,73, 1481,83, 1954,98 et 2226,09) et le sixième est non porteur de PEG (m/z 1394.77). Ce résultat est surprenant, pour une fraction ne devant en théorie contenir que des peptides de masses > 5000 Da.

Ces peptides proviennent *a priori* de l'effet de dépegylation par le laser du MALDI-Q-TOF, mais une résolution imparfaite de la colonne d'exclusion stérique n'était pas forcément exclue. Comme dans l'étude contrôle de l'interféron non pegylé, la fraction 4 a été soumise à purification et concentration par ultracentrifugation sur membrane de *cut-off* 10 000 Da, puis analysée à nouveau par MALDI-Q-TOF (figure V.13). Cinq peptides de l'interféron alfa-2b, tous porteurs du PEG, sont observés suite à cette étape de purification (m/z 1095.59 ; 1450.64 ; 1481.80 ; 1954.89 ; 2225.89).

La présence de ces peptides sur le spectre de masse MALDI après passage sur une membrane ayant un seuil de coupure à 10000 Da indique qu'ils sont bien porteurs du PEG. C'est le processus d'ionisation en mode MALDI qui rompt la liaison peptide-PEG et les fait donc apparaître aux valeurs de masses des peptides non modifiés.

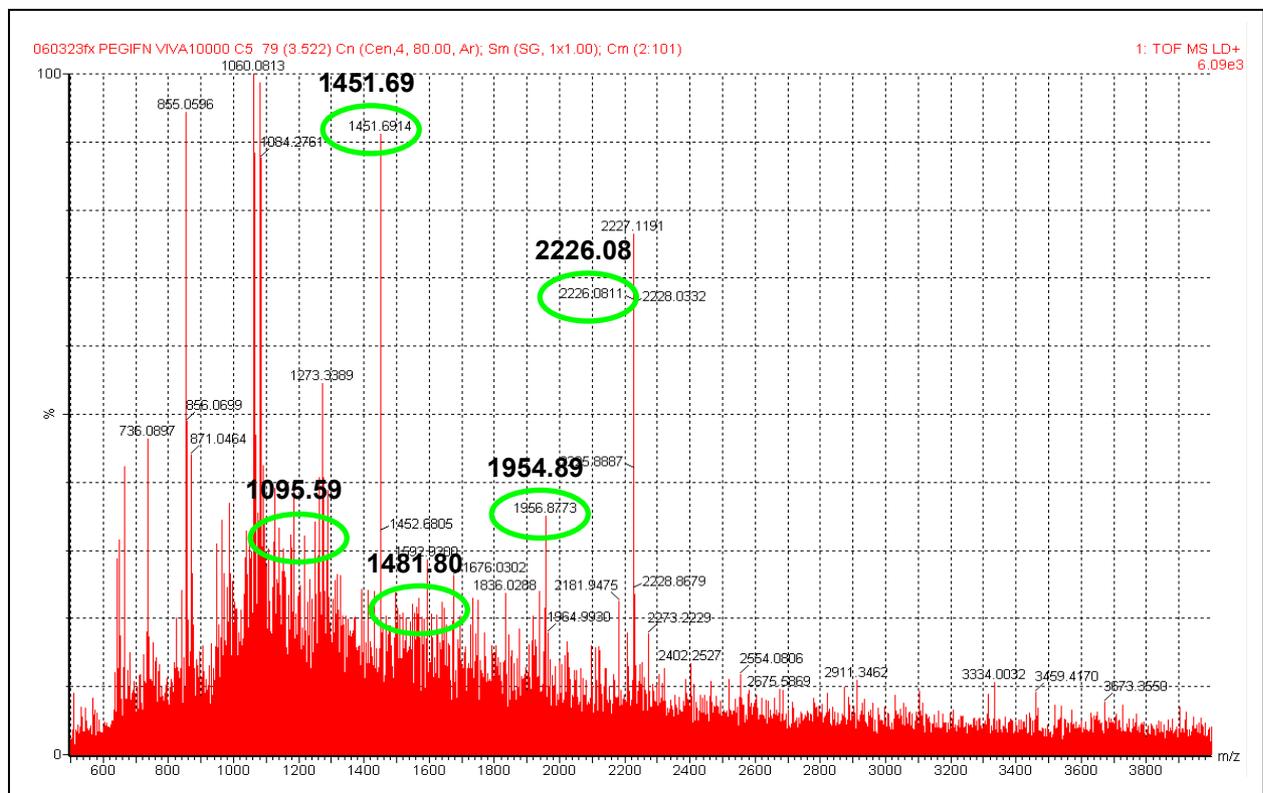


Figure V.13. Spectre de masse MALDI-Q-TOF (mode MS) de la fraction 4 de la chromatographie d'exclusion stérique après quatre étapes d'ultracentrifugation sur membrane 10 000 Da.

C. Etude de l'interféron dépegylé protéolysé

L'échantillon préparé dans cette expérience est le même que pour l'étude de l'interféron pégylé protéolysé, mais avec une étape supplémentaire de dépegylation chimique par l'hydroxylamine avant la séparation sur colonne d'exclusion.

Des études de dépegylation par l'hydroxylamine de l'interféron alfa-2b non digéré suivie d'une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode linéaire, ont mis en évidence que cette réaction de dépegylation chimique n'était pas totale (mélange d'interféron, d'interféron pégylé et de PEG 12 000 libre). Cette observation confirme que le PEG n'est pas uniquement lié aux résidus histidine.

La chromatographie d'exclusion par la taille de l'interféron alfa-2b dépegylé (figure V.14) devrait en théorie sélectionner dans les fractions de hautes masses (fractions 3 à 5, masses supérieures à 5 000 Da) du PEG libre et de rares peptides non dépegylés (12 000 - 14 000 Da). Le chromatogramme obtenu est en accord avec cette hypothèse.

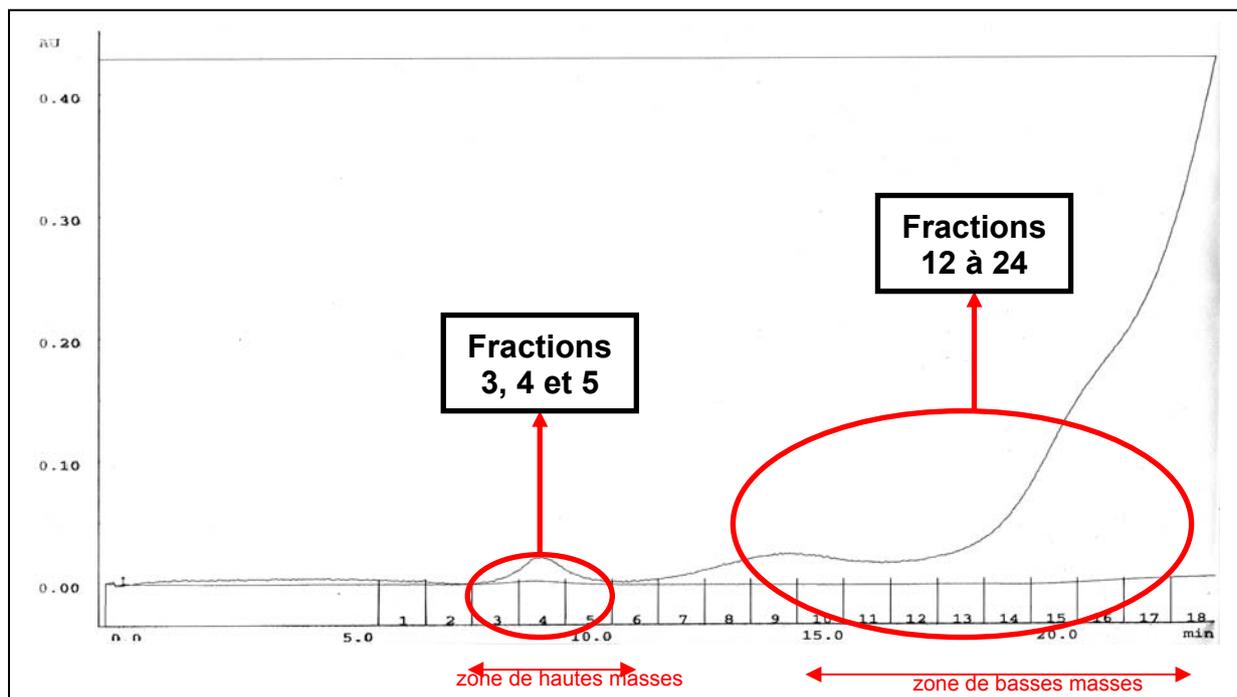


Figure V.14. Spectre UV de la chromatographie d'exclusion de taille de l'interféron dépegylé protéolysé

La fraction 4 issue de cette chromatographie d'exclusion a donc été examinée par spectrométrie de masse MALDI-Q-TOF en mode MS (figure V.15).

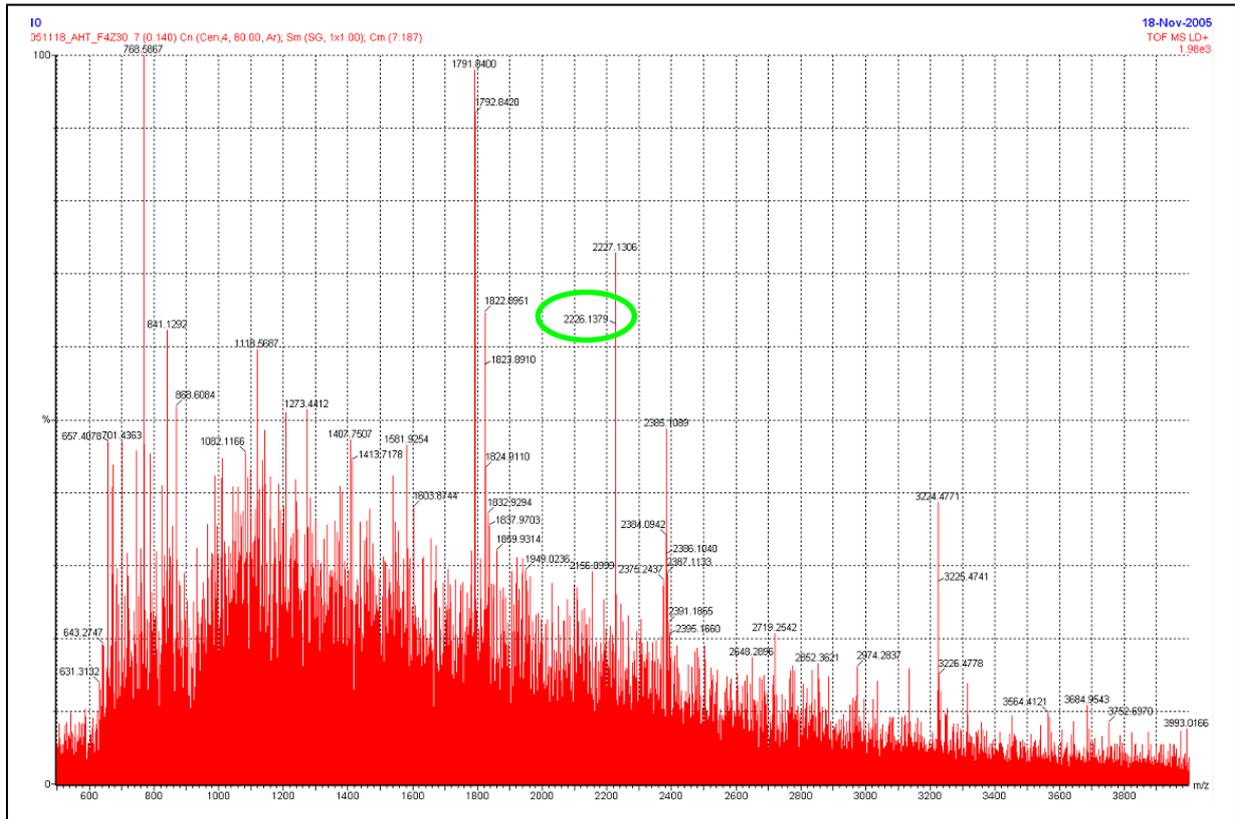


Figure V.15. Spectre de masse MALDI-TOF de la fraction 4 de la chromatographie d'exclusion stérique.

Des peptides de l'interféron α -2b (le plus abondant est le peptide de masse 2226.11 Da) sont observés dans la fraction 4, donc dans les fractions d'élution théorique des composés de hautes masses.

Le peptide observé sur la figure V.15 doit provenir d'une dépégylation du peptide $^{32}\text{KDRHDFGFPQEEFGNFQK}^{49}$ (figure V.16) initialement pégylé sur l'histidine 34. La dépégylation par l'hydroxylamine n'est pas totale, mais ces peptides ont ensuite été dépégylés lors du processus d'ionisation MALDI, associée certainement à une résolution imparfaite de la chromatographie d'exclusion. Celle-ci entraînerait en même temps que les composés de hautes masses, des peptides de basses masses.

Notons que l'espèce $^{32}\text{KDRHDFGFPQEEFGNFQK}^{49}$ de m/z théorique 2225,99 est le résultat d'un clivage manqué de l'espèce $^{34}\text{HDFGFPQEEFGNFQK}^{49}$ de m/z théorique 1954,87. Il s'agit des deux principales espèces pégylées que nous avons observées en MALDI-Q-TOF (mode MS).

10	20	30	40	50	60
CDLPQTHSLG	SRRTLMLLAQ	MRKISLFSCL	KDRHDFGFQ	EEFGNQFQKA	ETIPVLHEMI
70	80	90	100	110	120
QQIFNLFSTK	DSSAAWDETL	LDKFYTELYQ	QLNDLEACVI	QGVGVTTETPL	MKEDSILAVR
130	140	150	160		
KYFQRITLYL	KEKKYSPCAW	EVVRAEIMRS	FSLSTNLQES	LRSKE	

Figure V.16. Principal peptide pégylé de m/z 2225,9999 observé en MALDI-Q-TOF en mode MS. Ce peptide est pégylé sur l'histidine 34 (peptide présentant un *missed-cleavage*)

IV. Discussion

L'effet d'entraînement des peptides dans les fractions de la chromatographie correspondant aux hauts poids moléculaires, mis en évidence avec l'interféron alfa-2b non pégylé protéolysé par la trypsine et confirmé avec l'albumine de sérum bovin clivée par la trypsine, rend nécessaire la combinaison de la chromatographie d'exclusion de taille et de la concentration par ultrafiltration.

L'effet de dépégylation lors de l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-Q-TOF en mode MS, démontré avec l'étude de l'interféron pégylé alfa-2b protéolysé, a compliqué l'analyse, mais l'utilisation de la chromatographie d'exclusion après protéolyse permet bien de sélectionner une classe de peptides porteurs du PEG.

V. Conclusion

Dans un objectif plus général de mise au point d'une méthode de dosage en milieu plasmatique de protéines médicaments modifiées par du PEG, l'étude de l'interféron pégylé alfa-2b constitue un premier pas. L'étape de chromatographie d'exclusion par la taille doit permettre de doser les espèces réellement actives de ce médicament « retard », ce qui confère potentiellement à notre stratégie un niveau de spécificité supérieur à une méthode d'immunoassay ou de bioassay.

La stratégie complète serait ainsi constituée par les étapes successives de a) déplétion sur colonne de type Hu7 permettant de traiter des quantités de plasma supérieures, b) clivage enzymatique, c) dérivation chimique avec le réactif D0 d) ajout de standard interne (peptides marqués D4), e) chromatographie d'exclusion et f) analyse par

spectrométrie de masse. Concernant ce dernier point, les premières analyses réalisées en mode d'ionisation ESI ont montré que dans les conditions de source utilisées (spectromètre LCQ) le PEG était perdu tout comme dans le cas de l'ionisation MALDI. En sélectionnant des conditions de source qui apportent assez d'énergie aux ions formés pour créer une rupture prompte qui élimine le PEG, il serait donc possible d'utiliser le mode d'analyse MRM.

CHAPITRE 6

DISCUSSION, CONCLUSION et PERSPECTIVES

CHAPITRE 6 :

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

I-DISCUSSION

Le contexte - Les enjeux

L'augmentation rapide du nombre de protéines médicaments utilisées en thérapeutique crée des besoins croissants dans le domaine de leur quantification. En effet pouvoir accéder avec une grande précision et une bonne reproductibilité aux concentrations de protéines médicaments circulantes dans les fluides biologiques (dont le sang) revêt un caractère essentiel. Il s'agit non seulement d'une base de travail indispensable pour le développement d'études de pharmacocinétique et de pharmacodynamique, mais également d'une aide précieuse pour le thérapeute qui pourra ajuster plus finement les posologies.

Cependant, doser des protéines médicaments est en soi une tâche délicate dans la mesure où ces protéines sont le plus souvent présentes à de très faibles concentrations (de l'ordre de quelques attomoles/ μL à quelques centaines d'attomoles/ μL de fluide biologique). La quantification est aussi compliquée par le fait que ces médicaments sont noyés dans des milieux de complexité élevée (tel que le plasma) composés d'une grande diversité de protéines abondantes.

L'état de l'art

Au stade où nous avons décidé d'entreprendre ce travail, le dosage des protéines médicaments dans le plasma était appréhendé par différentes approches. Ces dernières sont de fait différentes de celles communément utilisées pour l'analyse des petites molécules dans le plasma (par exemple les techniques chromatographiques GC ou HPLC couplées à des détecteurs UV/visible). Les techniques les plus couramment utilisées pour doser en routine des médicaments protéiques ou peptidiques dans le plasma et déterminer leurs

paramètres pharmacocinétiques sont de type immunoassay qui, comme nous l'avons discuté dans l'introduction, présentent un certain nombre d'inconvénients.

De nombreuses techniques de quantification des protéines reposant sur la spectrométrie de masse sont par ailleurs couramment employées en protéomique. Ces techniques font appel au marquage isotopique différentiel des échantillons à comparer. Des variantes commerciales de ces techniques commencent à être appliquées à la quantification absolue des protéines par spectrométrie de masse. C'est le cas de la méthode AQUA™ (Sigma-Aldrich), une méthode de quantification absolue des protéines utilisant comme étalon interne un peptide marqué synthétisé à façon.

De ce fait, cette méthode de quantification est spécifique d'une protéine donnée et n'est pas transposable (au même titre qu'une technique d'immunoassay) à la quantification d'autres protéines médicaments.

Les ambitions et l'originalité du projet

L'objectif de notre travail était la mise au point d'une technique de dosage qui soit transposable si possible à la quantification de la plupart des protéines médicaments dans le plasma. Cet objectif ambitieux d'élaboration d'une méthodologie universelle devait par conséquent conférer à notre approche une originalité la démarquant des méthodes de dosage usuelles. En particulier, nous avons souhaité que la méthode de dosage repose sur l'analyse de plusieurs peptides, et non pas un seul comme c'est le cas pour la méthode AQUA™.

Il fallait également s'assurer que cette nouvelle approche conserve certaines qualités essentielles des méthodes existantes et qu'elle prouve ses performances dans d'autres domaines décisifs, notamment en matière de : sensibilité, justesse, rapidité, robustesse, reproductibilité, facilité de mise en œuvre, limitation du nombre d'étapes afin de minimiser les pertes de protéines à doser, coût.

Le choix de la spectrométrie de masse

Nous avons fait le choix de tirer profit des qualités intrinsèques de la spectrométrie de masse appliquée à l'analyse des peptides (rapidité, sensibilité, robustesse, facilité de mise en œuvre, reproductibilité...) pour atteindre certains de ces objectifs. Or, la spectrométrie de

masse n'est pas en soi une technologie adaptée à la quantification absolue des protéines. En revanche, si on la couple à une stratégie de marquage isotopique, elle devient un outil précieux pour le dosage quantitatif des protéines. En particulier, dans le cas des protéines médicaments, il est possible de réaliser une quantification relative à une quantité connue de la protéine médicament pure, ce qui en fait une approche de quantification absolue.

De telles qualités étaient déjà offertes par certaines solutions commerciales dans des déclinaisons variées permettant d'obtenir des informations de quantification relative et/ou absolue (ICAT, ITRAQ™, AQUA™). Actuellement, la méthodologie ITRAQ™ a nettement supplanté l'ICAT dans un contexte d'analyse protéomique. En effet, l'ICAT présente l'inconvénient d'une sélectivité trop étroite, la réaction de marquage chimique ayant pour cible les seules cystéines ; de ce fait, il n'est pas rare de devoir faire reposer la quantification d'une protéine sur un seul peptide. La méthodologie AQUA™ impose le passage obligé par la synthèse d'un peptide, et aboutit donc à une méthode de dosage qui repose sur un seul étalon. La méthode ITRAQ™ est utilisable pour une quantification absolue, qui n'intervient néanmoins qu'au stade de l'analyse par MS/MS, en raison de l'introduction d'une étiquette de masse isobare. Plusieurs peptides peuvent servir à la quantification, mais en observant toujours le même ion fragment de basse masse.

Développement de notre stratégie

Il nous fallait disposer d'une protéine modèle. Le choix de l'EPO s'est imposé du fait des besoins d'optimisation de ses thérapeutiques dans leurs indications de cancérologie. Un objectif précis de notre travail devenait dès lors l'élaboration d'une stratégie de quantification de l'epoetin beta dans le plasma humain adaptée aux concentrations attendues en thérapeutique, c'est-à-dire de l'ordre de 0,5 à 1 femtomole/ μ L de plasma.

Dans un premier temps notre démarche a consisté à concevoir et optimiser chacune des étapes devant transformer l'échantillon initial (la protéine médicament à doser dans le plasma) en un échantillon permettant la quantification par spectrométrie de masse.

Dans un second temps, afin de vérifier que notre approche pouvait répondre dans un avenir proche aux nouvelles générations de protéines médicaments pégyliées (la pégylation ayant pour rôle d'allonger le temps de demi-vie d'élimination plasmatique), nous avons cherché à adapter la méthodologie de quantification à ce cas particulier en nous servant d'une deuxième protéine modèle : le PEG-interféron alfa.

Les protéines médicament à doser se trouvant dans le plasma, c'est-à-dire un milieu de complexité très élevée, il nous a fallu d'abord réduire cette complexité.

Première étape : réduction de la complexité de l'échantillon

Toutes les méthodes faisant appel à la précipitation des protéines plasmatiques risquaient de co-précipiter la protéine médicament et étaient donc à proscrire d'emblée. La séparation des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide suivie par leur protéolyse dans le gel conduit quant à elle à de trop mauvais rendements de récupération. Ce problème de rendement est moins marqué dans le cas de l'électrophorèse capillaire (rapide, automatisable, meilleure résolution...) mais l'efficacité de celle-ci pour séparer un échantillon protéique complexe est discutable. La protéolyse suivie d'une séparation des peptides par chromatographie liquide n'est performante que pour des échantillons protéiques peu complexes. L'immunocapture de la protéine d'intérêt thérapeutique présente l'inconvénient des techniques de type immunologique (problèmes de spécificité), et n'est applicable qu'à une protéine donnée (non universelle).

L'approche que nous avons choisie pour l'enrichissement de l'échantillon plasmatique est un kit de déplétion des protéines majoritaires du plasma (système MARS®). Elle permet l'élimination de 90 % de 7 protéines plasmatiques majeures. Le système MARS® possède un caractère universel dans la mesure où cette méthode de déplétion est en théorie applicable à toute protéine médicament en solution dans le plasma. La condition est que la protéine d'intérêt ne soit pas elle-même perdue (même partiellement) par cette étape, au risque de fausser la quantification. Nous avons démontré que ce risque était écarté dans le cas de l'époétin beta, la protéine n'étant pas retenue par la cartouche de déplétion. Cette étape est par ailleurs rapide (moins de 5 min par échantillon) et automatisable, bien que le système de cartouche que nous avons utilisé ne le soit pas. La version automatisée basée sur un système de colonne offre aussi l'avantage d'éliminer des protéines plasmatiques majoritaires supplémentaires, de traiter de plus grands volumes de plasma humain (300 µL contre 12 µL dans notre cas), et d'obtenir ainsi un gain en sensibilité finale d'un facteur 25. Pour la mise au point de notre stratégie nous avons retenu le système de cartouche en raison de son coût plus abordable.

Cette étape de déplétion provoque une forte dilution de l'échantillon de 12 µL à 1000 µL. Une étape de reconcentration a donc du être intégrée à ce stade de notre stratégie.

Deuxième étape : reconcentration de l'échantillon

Nous avons montré que les techniques de concentration simples et rapides par concentrateurs (dispositifs de concentration par centrifugation impliquant une membrane semi-perméable) conduisaient à une perte importante du composé d'intérêt (Epoetin beta) par passage à travers ou adsorption sur la membrane.

Les techniques rapides de microchromatographie en phase inversée sur support C4 (ZipTip™ C4) ne permettent pas de traiter de façon satisfaisante le volume d'échantillon important récupéré en sortie de cartouche de déplétion.

A une autre échelle, la chromatographie sur colonne à polarité de phase inversée C4 de plus grande taille a permis dans le même temps de dessaler en une étape la totalité de l'échantillon et d'apporter une étape supplémentaire d'enrichissement en epoetin beta. Nous avons retenu cette option pour la bonne résolution qu'elle offrait : elle a permis dans le cas de l'epoetin beta d'isoler la protéine d'intérêt des protéines plasmatiques minoritaires. L'epoetin beta étant éluée au bout de 12 min, cette étape de chromatographie ne consomme pas trop de temps au regard de nos exigences. De plus, dans le cas de l'epoetin beta, cette étape de chromatographie présente l'avantage majeur de ne pas provoquer de perte de la protéine médicament à doser. Elle n'introduit donc pas de biais dans la quantification.

Cependant, le choix final d'une colonne de diamètre intérieur de 4,6 mm fonctionnant au débit de 1 mL/min ne nous a pas permis d'atteindre l'autre objectif recherché *via* cette étape de chromatographie : la reconcentration de l'échantillon dilué au terme de l'étape de déplétion des protéines plasmatiques majoritaires, puisque l'epoetin beta est collectée dans une fraction de 1 mL.

Le solvant d'élution de la chromatographie (eau/acétonitrile/acide formique) a été éliminé par évaporation totale sous vide. Les concentrateurs sur membrane et la microchromatographie ont été écartés en raison de la forte concentration en acétonitrile. Cette étape d'évaporation sous vide présente deux défauts : la longue durée de l'évaporation (1 h 45) et surtout la perte d'une partie de l'epoetin beta qui n'a pu être remise en solution. Malgré de nombreux essais d'optimisation des conditions d'évaporation et de reprise, nous avons dû nous contenter d'un taux de récupération maximum de 65 ± 3 % pour l'epoetin beta plasmatique. Il est certes bien connu qu'une évaporation à sec de protéines est un des traitements les moins favorables à une bonne récupération de l'échantillon. Nous avons malgré tout persévéré dans ce sens afin d'assurer une meilleure reproductibilité de la méthodologie utilisée. D'autres solutions doivent néanmoins être recherchées pour résoudre ce problème.

Troisième étape : protéolyse enzymatique

L'étape de protéolyse a été réalisée au moyen de la trypsine. Cette enzyme produit des peptides à lysines ou arginines C-terminales. Les lysines étant les cibles du réactif de marquage, nous pouvions ainsi produire des peptides marqués ayant comme caractéristique commune une étiquette isotopique portée par le résidu présent au C-terminal.

Nous avons montré qu'il était indispensable de travailler en conditions de protéolyse totale, afin d'éliminer les peptides issus de sites de protéolyse manqués (*missed cleavage*). Cette condition est nécessaire pour ne pas sous-estimer la quantité de protéine dosée. De ce fait, la protéolyse telle que nous l'avons pratiquée est une étape longue (4 heures). Il est cependant possible de réduire le temps de protéolyse à quelques minutes en ayant recours à une protéase immobilisée.

La fiabilité de la stratégie de quantification repose en partie sur le fait que la protéolyse de l'échantillon à doser et celle de l'étalon interne ont été menées dans des conditions rigoureuses de protéolyse totale. Or, étant donné que l'échantillon à doser est un mélange protéique complexe et que l'étalon interne est une protéine pure, les conditions de protéolyse des deux échantillons ne sont pas rigoureusement identiques. Cela impose de pouvoir vérifier que la protéolyse est totale dans les deux cas.

Quatrième étape : marquage isotopique

Il s'agit de l'étape clé de notre stratégie qui lui confère en grande partie son originalité. Les peptides produits ont été marqués au moyen d'un réactif spécifique des lysines, utilisé pour introduire le marquage isotopique. L'échantillon à doser a été marqué par la version légère du réactif. En parallèle, les peptides de la protéine médicament pure ont été marqués par la version lourde afin de servir d'étalons internes.

Cette étape de dérivation chimique a plusieurs atouts :

- un caractère universel en pouvant marquer les peptides à lysine terminale de n'importe quelle protéine
- plusieurs peptides marqués peuvent être utilisés pour la quantification (contre un seul pour la méthode AQUA™), ce qui doit rendre la méthode plus juste et plus fiable
- le réactif utilisé oriente les fragmentations en mode MS/MS ; les spectres obtenus comportent peu de fragments, ce qui est un cas plutôt favorable pour l'analyse quantitative par MRM

Etalonnage interne

L'ajout de l'étalon interne marqué est nécessaire à la quantification absolue, précise et reproductible de la protéine à doser. Un caractère original de la méthode élaborée au cours de ce travail consiste à utiliser la protéine médicament comme standard interne *via* ses peptides terminés par une lysine. Il n'est par conséquent pas nécessaire d'optimiser toute la méthode de quantification pour un peptide, qui serait ensuite synthétisé sous forme marquée comme dans le cas de la méthode AQUA™.

Cependant, comme dans toutes les approches commerciales de quantification absolue, l'étalon interne est ajouté dans l'échantillon à doser après la protéolyse. Il ne subit donc pas les premières étapes de la stratégie (déplétion, concentration et dessalage par chromatographie, séchage et reprise, puis protéolyse) subies par la protéine à doser.

Dans notre cas, ce problème est particulièrement critique dans la mesure où nous avons montré que l'étape de séchage/reprise conduisait à la perte de 35 ± 3 % de l'époetin beta plasmatique. A première vue, ce problème ne semble pas pouvoir être contourné. En effet, il n'est pas envisageable d'ajouter le mélange peptidique servant d'étalon interne avant la chromatographie puisque bien évidemment ces peptides n'auront pas du tout le même temps de rétention sur le support de chromatographie que la protéine à doser.

De même il ne semble pas opportun de rajouter le mélange peptidique servant d'étalon interne en sortie de chromatographie juste avant l'étape de séchage/reprise. En effet rien n'assure que la perte éventuelle que subiront ces peptides à ce stade sera d'ampleur égale à celle que subit l'époetin beta.

Alternative de marquage de la protéine entière

Idéalement, il faudrait pouvoir marquer directement les protéines (protéine étalon et protéine à doser) avant l'étape de chromatographie, et de préférence au tout début du protocole d'analyse, avant la déplétion.

Le réactif utilisé permettrait de marquer les lysines directement sur la protéine entière, mais il s'ensuivrait une difficulté liée à la protéolyse. Il faudrait faire le choix d'une autre protéase, qui ne posséderait pas forcément toutes les qualités de la trypsine, et notamment son efficacité de clivage, son faible taux d'autolyse et qui ne conduirait pas nécessairement à des spectres MS/MS aisément exploitables.

Compromis

Le fait que notre stratégie de quantification comporte au moins une étape causant la perte d'une partie de la protéine à doser n'empêche pas d'atteindre l'objectif final de la quantification. La condition essentielle est que ces imperfections de la stratégie soient reproductibles et causent systématiquement le même taux de perte de la protéine d'intérêt (ce que nous avons pu démontrer pour différentes concentrations plasmatiques d'EPO au moyen de différents spectromètres de masse).

Le rendement devant être systématiquement pris en compte pour pondérer la quantité de protéine plasmatique dosée dans le cas de l'époétin beta est de 65 +/- 3 %, déterminé avec deux techniques analytiques différentes (MALDI-TOF et LC-ESI-Piège ionique linéaire).

Apport des différentes techniques de spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse des échantillons à quantifier a été menée en trois temps sur trois types de spectromètres différents.

Toutes les étapes de mise au point de la stratégie d'analyse ont été suivies par MALDI-Q-TOF. Bien qu'il ne s'agisse pas de la technologie de choix pour une approche de quantification, elle offre un panel de qualités intéressantes à ce stade : disponibilité au laboratoire, clarté des cartes peptidiques, rapidité, robustesse, sensibilité et exactitude des mesures. La perte d'époétin beta évaluée par ce moyen est d'environ 35 %.

L'étude de sensibilité par MALDI-Q-TOF a mis en évidence les peptides exploitables pour la quantification de l'époétin beta. Ils devaient satisfaire les prérequis suivants : être marqués par le réactif D0, ne pas être produits par un événement de *missed-cleavage* lors de la protéolyse trypsique, faire partie des ions majoritaires de la carte peptidique de la protéine et être observés pour de faibles concentrations d'époétin beta plasmatiques. Ces qualités sont réunies par un seul peptide : le peptide de m/z 995.50, de séquence $^{46}\text{VNFYAWK}^{52}$, observé jusqu'à la limite de 150 fmoles d'époétin beta/ μL de plasma. Cette limite de détection était encore très éloignée des objectifs fixés : il nous fallait gagner un facteur de sensibilité 500 à 1 000.

Il nous a alors semblé qu'une telle performance ne pouvait être atteinte qu'en faisant appel à une méthodologie de dosage par MRM, en utilisant un mode d'ionisation électrospray couplé à une nanochromatographie. Cette technologie n'était pas disponible au laboratoire. Dans notre environnement proche, l'instrument qui se rapprochait le plus de cette configuration était un spectromètre de type piège ionique linéaire couplé à la nanochromatographie (spectromètre LTQ XLTM ThermoFisher du pôle protéomique de la

Plateforme de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux). Une phase de mise au point sur cet instrument nous a permis de rechercher des ions précurseurs intéressants pour le dosage, en nous attendant à trouver en mode ESI d'autres ions que celui utilisé jusque là en mode MALDI.

Deux espèces monochargées satisfont les critères de sélection : m/z 804,46 $^{15}\text{YLLEAK}^{20}$ et 995,50 $^{46}\text{VNFYAWK}^{52}$ (qui a servi de base aux études de quantification en mode MALDI). L'analyse de l'échantillon de plasma surchargé par de l'EPO à raison de 150 fmole/ μL de plasma a montré que la limite de détection de l'EPO n'était pas encore atteinte à cette concentration. Cependant le rapport signal sur bruit obtenu pour cet échantillon indiquait que l'objectif de dosage d'environ 1 fmole d'EPO/ μL de plasma était encore hors de portée. Nous avons alors cherché à combler ce fossé au moyen d'une méthodologie de MRM à haute sensibilité, en tirant profit des résultats obtenus avec le spectromètre LTQ couplé à la nanochromatographie.

La mise à l'épreuve de notre approche a été réalisée en utilisant un spectromètre 4000 Q-TRAPTM qui regroupe les deux qualités primordiales de sensibilité et d'utilisation du mode MRM. Là encore deux peptides seulement ont pu être utilisés comme base de quantification : ce sont les deux mis en évidence avec le LTQ ($^{15}\text{YLLEAK}^{20}$ et $^{46}\text{VNFYAWK}^{52}$), mais sous forme d'ions doublement chargés. Néanmoins, les spectres d'ions fragments de ces peptides présentent plusieurs ions exploitables en mode MRM. Le dosage de l'epoetin beta dans un échantillon de plasma humain en mode MRM avec ces deux peptides marqués, en cumulant plusieurs transitions, a permis d'atteindre une limite de quantification de l'ordre de 50 attomoles d'epoetin beta/ μL de plasma humain.

Vers une approche universelle....

Notre travail avait pour objectif le développement d'une stratégie de quantification de protéines médicaments dans le plasma humain. Appliquée à l'epoetin beta aux concentrations attendues en thérapeutique, c'est-à-dire d'environ 1 fmole/ μL de plasma, la stratégie proposée permet de situer la limite de quantification à environ 50 attomoles d'epoetin beta par μL de plasma. L'objectif quantitatif est donc atteint dans le cas de l'EPO. Cependant, plusieurs points de la stratégie analytique doivent faire l'objet d'améliorations afin de donner à notre approche plus de robustesse ou de rapidité. Des propositions d'amélioration seront faites plus loin.

L'une des originalités de notre approche devait être son caractère universel. Pour aller dans ce sens, une deuxième protéine modèle a été étudiée. Pour le choix de celle-ci, nous avons pris en compte le fait que de nombreuses protéines médicaments sont

aujourd'hui pégylées. S'attaquer à la quantification d'une protéine pégylée représente un défi intéressant à relever pour prouver l'adaptation possible de notre stratégie aux nouvelles générations de médicaments dits « retards ». Idéalement nous aurions souhaité pouvoir disposer de l'époetin beta pégylée qui n'était malheureusement pas disponible à l'époque, ce qui aurait évidemment facilité la mise au point de certaines étapes déjà explorées.

Nous nous sommes par conséquent intéressés à une autre protéine médicament : l'interféron alfa-2b pégylé. Nous avons pu tirer profit de la présence du greffage PEG afin d'isoler et de caractériser les peptides porteurs du PEG qui sont caractéristiques de l'interféron pégylé, c'est-à-dire de la part active du médicament. Il s'agit donc d'une étape décisive pour le dosage des espèces réellement actives de ce médicament retard, qui confère potentiellement à notre stratégie un niveau de spécificité supérieur à une méthode d'immunoassay ou de bioassay. Il faut cependant rester prudent puisque cette étude préliminaire conduite sur un échantillon d'interféron pégylé purifié n'a pas été mise à l'épreuve sur un échantillon plasmatique complexe.

Par ailleurs, le volet quantification du travail sur l'interféron n'a pas pu être exploré à ce jour. Rien ne semble cependant s'opposer à la mise en œuvre de notre stratégie de quantification sur les peptides pégylés isolés. L'étape d'isolement spécifique des peptides pégylés pourrait s'insérer dans notre stratégie de quantification directement après l'étape de protéolyse.

Bilan : points forts et point faibles de la méthode

Il nous faut recenser et évaluer les performances de notre approche mais également en révéler les limites et les lacunes au regard des autres points clés évoqués au début de ce travail.

Pour ce qui concerne les points forts de la méthode, les attentes en matière de performances analytiques ont été satisfaites :

-sensibilité : la limite de quantification a été évaluée à 50 attomoles/ μ L dans le cas de l'époetin beta dans le plasma humain. Cette limite pourrait être encore repoussée un peu plus loin dans le cas de protéines dont certains peptides marqués pourraient présenter une meilleure efficacité d'ionisation.

-justesse : le fait de pouvoir baser la quantification sur plus d'un peptide confère à notre méthode une fiabilité de quantification intéressante, même si dans le cas de l'époetin beta seulement deux peptides ont pu être exploités.

-spécificité : celle-ci est assurée par plusieurs transitions en MRM pour chacun des deux peptides.

-reproductibilité : les résultats obtenus sont cohérents avec deux technologies d'analyse différentes ainsi que pour plusieurs concentrations de protéine médicament.

Dans l'état actuel de son développement, notre stratégie présente encore plusieurs points faibles :

-rapidité : près de 6 heures sont nécessaires au dosage d'un échantillon, avec néanmoins la possibilité de traiter simultanément plusieurs échantillons, à l'exception des étapes courtes de déplétion et de chromatographie (20 min en tout). Notamment, l'étape de protéolyse devrait être considérablement écourtée.

-facilité de mise en œuvre : au maximum de ses performances, notre stratégie n'est accessible qu'aux laboratoires équipés de technologies permettant des analyses MRM après chromatographie sur nanocolonnes. Les autres étapes ne requièrent que des équipements usuels avec une difficulté de mise en œuvre très réduite.

-nombre d'étapes : 5 étapes sont nécessaires, que la protéine soit ou non pégylée.

-pertes de la protéine à doser : il s'agit du principal point faible de notre stratégie même si nous avons montré qu'il ne s'agissait pas d'un handicap majeur pour la quantification puisqu'il est possible d'évaluer cette perte avec une précision raisonnable. L'étape responsable de ces pertes importantes a été identifiée. Comme nous le verrons dans les perspectives, des améliorations sont envisagées.

-coût : ce point est difficile à évaluer mais peut être estimé à 40 euros par échantillon en comptant les mesures de spectrométrie de masse comme une prestation payante d'une plateforme technologique

-robustesse : le fait que notre approche intègre une étape de protéolyse enzymatique entame sa robustesse. Cependant le passage par le stade peptide est essentiel à la sensibilité de notre approche.

-automatisation : dans sa forme actuelle, la méthodologie n'est pas automatisée. Cependant certaines étapes peuvent l'être. C'est le cas de la déplétion (si elle est menée sur colonne et non plus sur cartouche), de la chromatographie sur support de phase inversée C4 et de l'analyse MRM par LC-ESI-MS/MS. En revanche, les étapes de protéolyse et d'évaporation sous vide, menées simultanément pour plusieurs échantillons, sont moins facilement automatisables mais ne monopolisent pas l'opérateur.

II-PERSPECTIVES

Nous envisageons d'améliorer la stratégie en plusieurs points :

- La perte de la protéine à doser : il s'agit de l'inconvénient majeur de la stratégie. L'étape de reprise de l'échantillon protéique amené à sec en sortie de chromatographie de polarité de phase inversée n'est pas satisfaisante. Nous avons l'intention d'optimiser cette étape en utilisant d'autres solvants soit organiques (à base d'isopropanol par exemple), soit contenant des agents chaotropiques (comme l'urée ou le chlorure de guanidinium). Nous ne disposerons malgré tout que d'une latitude faible à ce niveau, puisque les conditions de reprise envisagées doivent rester compatibles avec l'étape de protéolyse qui suit.
- La perte de la protéine à doser (bis) : les résultats obtenus en mode MRM tendent à montrer que le couplage LC-ESI-MS/MS aurait peut être pu s'accommoder d'une complexité plus importante de l'échantillon analysé. Cela remet en question l'intérêt de la chromatographie de polarité de phase inversée C4. Si cette étape ne s'avère plus indispensable, on évite donc l'étape critique qui suit, de reprise de l'échantillon séché et donc les pertes dramatiques de protéine à doser associées.
Pour compenser l'absence de cette étape de chromatographie nous proposons d'utiliser en couplage avec le spectromètre ESI-Q-TRAP une colonne de chromatographie de polarité de phase inversée C18 de plus grand diamètre : remplacement de la colonne de nanochromatographie de 75 μm par une colonne de 300 μm voire 1 mm.
- Les problèmes liés à l'étalon interne : afin de minimiser les risques liés à une mauvaise utilisation de l'étalon interne, nous envisageons de tester l'efficacité du marquage chimique directement sur la protéine entière. Ainsi le marquage différentiel du lot de protéine à doser (par le réactif D0) et du lot servant d'étalon (par le réactif D4) aurait lieu très tôt dans la stratégie et amènerait les deux échantillons à subir rigoureusement les mêmes étapes. Le choix de la protéolyse par la trypsine devra alors être remis en cause, à la lumière des transitions utilisables en MRM pour quantifier la protéine.
- La quantification des protéines médicaments pégylées : une fois optimisée sur une protéine non pégylée la stratégie pourra être testée sur une protéine pégylée. Il s'agira de renoncer à l'étape de purification par chromatographie C4 et d'effectuer la protéolyse en sortie de colonne de

déplétion (en vérifiant que cette étape de déplétion n'affecte pas une protéine pégylée). L'étape de chromatographie d'exclusion par la taille destinée à tirer profit de la présence du PEG pour isoler les peptides pégylés pourra alors être introduite à ce niveau.

Nous envisageons par ailleurs de vérifier la fiabilité du dosage de l'époétin beta par notre approche en réalisant une comparaison avec les résultats délivrés par des méthodes de dosage plus usuelles. Les mêmes échantillons plasmatiques d'époétin beta seront dosés simultanément par notre approche et par la méthode ELISA utilisée en routine. Pour ce test nous disposons d'ores et déjà d'échantillons plasmatiques intéressants, provenant d'une étude que nous avons menée sur l'adsorption de l'époétin beta injectée sur différents sites de la ligne veineuse d'hémodialyse (Etude SITEPO™ : collaboration pharmacie centrale Haut Lévêque CHU de Bordeaux et Service d'hémodialyse Pellegrin CHU de Bordeaux).

L'approche de quantification universelle des protéines médicaments présentée dans ce document repose sur une idée simple. Sa mise en œuvre pouvait constituer un pari risqué. Cependant, la pertinence d'une idée est parfois confortée indirectement par le fait que d'autres personnes ont eu sensiblement la même idée presque en même temps. Ainsi, la société Applied Biosystems a présenté lors du congrès de l'*American Society of Mass Spectrometry* en juin 2008 une solution commerciale de dosage des protéines basée sur le marquage différentiel des peptides couplé à une étude MRM : le concept mTRAQ™. Cette méthodologie ressemble en de nombreux points à notre approche. Au contraire des réactifs ITRAQ™, les deux réactifs mTRAQ™ ne sont pas isobares, présentent une spécificité pour les amines primaires et peuvent donc marquer potentiellement tous les peptides sur leur groupement amino terminal et sur les résidus lysine. La société Applied Biosystems s'est montrée intéressée par une étude comparée de leur solution mTRAQ™ et de notre approche impliquant les réactifs D0 et D4, qui est en cours de réalisation.

CHAPITRE 7

**ANNEXE
PARTIE EXPERIMENTALE**

CHAPITRE 7 :

ANNEXE PARTIE EXPERIMENTALE

Nous avons regroupé dans ce chapitre quelques méthodes utilisées dans les différentes parties de ce travail et dont le détail aurait alourdi les résultats exposés dans les parties précédentes.

I. L'époetin beta : versant expérimental de la stratégie de quantification

L'époetin beta utilisée dans toutes les expériences provient de la spécialité Néorecormon® 6 000 UI/0,3 mL conditionnée en seringues pré-remplies ce qui correspond à 49,8 µg d'époetin beta/0,3 mL (1 UI d'époetin beta = 0,0083 µg d'époetin beta) (Vidal, 2008) soit 4 880 fmoles d'époetin beta/µL (considérant une masse moléculaire de l'époetin beta de 34000 Da (Roche, 1998)).

A. ETAPE 1 : déplétion des protéines majoritaires du plasma

1. Protocole de déplétion sur Spin cartridge Hu7® Agilent

Les échantillons de plasma contenant l'époetin beta à doser (12 µL) ont été dilués dans 188 µL de tampon A d'Agilent qui favorise la retenue de 90 % de 7 protéines plasmatiques majoritaires. Il s'agit d'une solution de sel de phosphate à pH 7,4 contenant 0,02 % de NaN₃.

L'échantillon introduit dans la cartouche est lavé avec 1 mL de tampon A par centrifugation (en 3 étapes de 2,5 minutes à 100 g), éluant les protéines non retenues dont l'époetin beta. Les protéines majoritaires du plasma retenues par la cartouche sont éluées par 3 mL du tampon B d'Agilent (solution aqueuse d'urée concentrée à pH 2,25) puis éliminées. La cartouche est enfin rééquilibrée avec 1 mL du tampon A et peut être réutilisée. La composition précise des solutions tampon A et B n'est pas communiquée par le fabricant.

2. Etude préliminaire du comportement de l'époetin beta sur la Spin Cartridge Hu7®

L'étude du comportement de l'époetin beta sur la cartouche de déplétion ainsi que l'effet de l'étape de concentration a été menée sur une quantité importante d'époetin beta (9760 fmoles) soumise :

- (1) à la procédure de déplétion sur Spin cartridge Hu7® suivie de concentration
- (2) à l'étape de concentration seule
- (3) à aucune de ces deux étapes

Pour ce premier essai de concentration de l'échantillon recueilli en sortie de cartouche Hu7, nous avons utilisé le dispositif de concentration préconisé par le fournisseur des cartouches de déplétion Hu7 (Spin concentrator® Agilent 5 000 Da).

Le protocole suivi par l'échantillon qui subit les deux étapes de déplétion et de concentration est le suivant : en sortie de cartouche, l'échantillon recueilli dans 1 000 µL de tampon A (soit en théorie 9 760 fmoles/1 000 µL de tampon A) est concentré à l'aide des concentrateurs Agilent fournis dont la membrane présente une porosité de 5 000 Da. Le protocole de centrifugation recommandé par le fabricant est appliqué (centrifugation de 4 000 g à 20°C pendant 30 minutes). Le concentrat (partie supérieure) est récupéré, protéolysé (rapport trypsine/EPO 1/50 mole/mole, tampon NH₄HCO₃ 100 mM finale, réaction de 4 heures à 37°C), dessalé (ZipTip™ C18) puis analysé par MALDI-Q-TOF en mode MS.

B. ETAPE 2 : concentration de l'échantillon déplété

1. Concentration par les différents types de concentrateurs

Les dispositifs de concentration ont été utilisés en respectant les indications données par les fournisseurs.

a) Spin concentrator® Agilent 5 000 Da (1 000 µL)

Les essais ont été menés sur des solutions d'époetin beta de 9 760 fmoles/1 000 µL de tampon A d'Agilent. Les 1 000 µL d'échantillon d'époetin beta sont concentrés en une étape de centrifugation à 4 000 g en 30 minutes. Les concentrats recueillis ont été protéolysés et analysés par MALDI-Q-TOF en mode MS.

b) Vivaspin® Vivascience 3 000 Da et 5 000 Da (500 µL)

Les essais ont été menés sur des solutions d'époetin beta de 9 760 fmoles/1 000 µL de tampon A Agilent. Les 1 000 µL d'échantillon d'époetin beta sont concentrés en deux étapes successives de centrifugations de 500 µL à 10 000 rpm en 10 minutes. Les concentrats recueillis ont été protéolysés et analysés par MALDI-Q-TOF en mode MS.

c) Microcon® 3 000 et 10 000 Da (500 µL)

Les essais ont été menés sur des solutions d'époetin beta de 9 760 fmoles/120 µL de tampon A Agilent. Le faible volume permet l'analyse des filtrats. Les 120 µL d'échantillon d'époetin beta sont concentrés en une étape de centrifugation à 12 000 g pendant 6 minutes pour le Microcon® 10 000 et 36 minutes pour le Microcon® 3 000.

Le retournement du dispositif permet une meilleure efficacité de récupération de l'échantillon au moyen du rinçage de la partie inférieure de la membrane par 50 µL d'eau et d'une centrifugation 5 minutes à 5 000 g. Les concentrats et les filtrats ont été protéolysés et analysés par MALDI-Q-TOF en mode MS.

2. Concentration par microchromatographie ZipTip™ C4

a) Principe du ZipTip™ C4

Le ZipTip™ C4 (Millipore) est un système de microchromatographie à polarité de phase inversée sur support C4. Le ZipTip™ C4 est un cône de 10 µL pour pipette contenant à son extrémité 0.6 µL de phase stationnaire de chromatographie à polarité de phase inversée C4. Pour l'adapter au dessalage et à la concentration d'un échantillon de 1 000 µL, le ZipTip™ C4 a été monté à l'extrémité d'un embout de micropipette de 1 000 µL (Gilson).

La microchromatographie permet de concentrer l'échantillon dans un volume de quelques microlitres. L'échantillon protéique peut alors être soit directement analysé par MALDI-TOF en mode linéaire soit soumis à protéolyse. Les peptides produits ont été analysés par MALDI-Q-TOF en mode MS.

b) Détermination du volume maximal d'échantillon qu'il est possible de concentrer par ZipTip™ C4

Cette étude a été conduite sur quatre échantillons contenant 4 880 fmoles d'époetin beta dans 20 µL, 100 µL, 200 µL ou 1 000 µL de tampon A d'Agilent soumis au ZipTip™ C4. Le chargement des 20, 100, 200 ou 1 000 µL d'échantillon a été effectué par trois cycles d'aspiration puis de refoulement de l'échantillon.

Plusieurs cycles de lavage ont été effectués avec une solution d'eau avec 0,1 % de TFA (12 cycles de rinçage avec 20 µL d'une solution de 0,1 % de TFA dans l'eau).

L'élution finale de l'échantillon a été effectuée par 2 µL d'une solution ACN/eau 70/30 v/v avec 0,1 % de TFA.

L'échantillon élué a été soit soumis à protéolyse trypsique en vue de l'analyse des peptides par MALDI-Q-TOF en mode MS, soit directement déposé sur une cible en vue de l'analyse des protéines entières par MALDI-TOF en mode linéaire.

3. Concentration par minichromatographie Aquapore® Brownlee C4 BU-300

a) Chromatographie de l'échantillon plasmatique déplété

Ce protocole de concentration a fait appel à une mini-colonne de chromatographie Aquapore® Brownlee C4 BU-300 à particules de 7 µm et de taille 30 x 2,1 mm (Perkin Elmer) montée sur un système de Chromatographie Liquide Haute Performance (Surveyor, ThermoFinnigan).

Les conditions optimales de chromatographie permettant l'élution rapide de l'époetin beta à un temps de rétention distinct des sels et d'une partie des protéines plasmatiques ont été recherchées.

La chromatographie a donc été réalisée sur une durée de 12 min en mode gradient de deux phases mobiles A (eau 100 % avec 0,05 % de TFA) et B (ACN/isopropanol 80/20 v/v avec 0,05 % de TFA) et au débit de 0,2 mL/min. Le pourcentage de phase B augmente de 0 à 90 % entre 0 et 4 min, reste à 90 % de 4 à 10 min puis redescend à 0 % entre 10 et 12 min. L'injecteur automatique a été programmé pour injecter l'échantillon de 1 000 µL d'époetin beta dans le tampon A Agilent obtenu en sortie de cartouche Hu7, en 4 étapes de 250 µL chacune.

L'epoetin beta est détectée par son absorbance à 280 nm dans la fraction [11-12] minutes. Cette fraction est collectée au moyen d'un collecteur de fractions (Fraction collector FC 205, Gilson) programmé pour collecter une fraction par minute d'analyse.

b) Concentration de la fraction de chromatographie collectée par évaporation sous vide en vue de sa protéolyse

La fraction [11-12] min (soit un volume d'échantillon de 200 µL) est concentrée à 50 µL par évaporation sous vide de 30 min (SpeedVac, Savant) en vue de sa protéolyse.

4. Protocole de concentration par chromatographie Vydac® C4 214TP

a) Chromatographie de l'échantillon plasmatique déplété

Ce protocole de concentration a fait appel à une colonne de chromatographie plus résolutive que la minichromatographie Aquapore® Brownlee C4. Il s'agit d'une colonne de chromatographie Vydac® C4 214TP Reversed Phase à particules de 5 µm et de taille 4,6 x 150 mm (Grace) montée sur un système de Chromatographie Liquide Haute Performance Waters composé d'un module de séparation (2695 separation module) et d'un détecteur UV (996 photodiode array detector).

Les conditions optimales de chromatographie permettant l'élution rapide de l'epoetin beta à un temps de rétention distinct des sels et d'une partie des protéines plasmatiques ont été recherchées.

La chromatographie a donc été réalisée sur une durée plus longue de 26 min en mode gradient de B (ACN/isopropanol 80/20 v/v avec 0,05 % de TFA) dans A (eau 100 % avec 0,05 % de TFA) au débit de 1 mL/min. Le pourcentage de phase B augmente de 0 à 40 % entre 2 et 3 min, puis de 40 à 70 % entre 3 et 15 min, puis de 70 à 95 % entre 15 et 18 min, reste à 95 % de 18 à 22 min puis redescend à 0 % entre 22 et 24 min. L'injecteur automatique a été programmé pour injecter l'échantillon de 1 000 µL d'epoetin beta dans le tampon A d'Agilent obtenu en sortie de cartouche Hu7, en 5 étapes de 200 µL chacune.

L'epoetin beta est détectée par son absorbance à 280 nm dans la fraction [10,5-11,5] minutes. Cette fraction est collectée au moyen d'un collecteur de fraction (Fraction collector FC 205, Gilson) programmé pour collecter une fraction par min d'analyse.

Entre chaque injection d'un échantillon plasmatique sur la colonne Vydac® C4, trois cycles de rinçage de 12 min sont effectués pour éliminer les protéines plasmatiques restantes dans la colonne et susceptibles d'interférer avec l'injection suivante. La chromatographie de rinçage est réalisée en mode gradient des deux mêmes phases mobiles A et B et au débit de 1 mL/min. Le pourcentage de phase B augmente de 0 à 90 % entre 0 et 2 min, reste à 90 % de 2 à 6 min puis redescend à 0 % entre 6 et 8 min. L'injecteur automatique effectue lors de chaque cycle une injection de 200 µL d'eau ce qui assure un rinçage supplémentaire à son rinçage automatique.

b) Concentration de la fraction de chromatographie collectée par évaporation sous vide en vue de sa protéolyse

La fraction [10,5-11,5] min (soit un volume d'échantillon de 1 000 µL) est évaporée à sec sous vide durant 1 h 30 min (SpeedVac, Savant) en vue de sa protéolyse.

L'étape d'évaporation à sec et de reprise de l'échantillon collecté a dû faire l'objet d'une mise au point précise. En ayant tout d'abord voulu éviter d'évaporer à sec par crainte de pertes lors de la remise en solution, nous avons constaté que si le volume non évaporé était supérieur à 10 µL, la protéolyse trypsique était perturbée et de nombreux peptides de l'époetin beta n'étaient pas retrouvés. Devant la difficulté technique à garder de manière reproductible un faible volume non évaporé, les échantillons ont été amenés à sec. Il a donc fallu optimiser les conditions de remise en solution.

La meilleure solution trouvée a consisté en une reprise dans 5 µL d'une solution d'ACN/eau 50/50 (v/v) suivi d'un cycle de vortex 30 sec/centrifugation 30 sec puis addition de 45 µL d'eau suivi d'un second cycle vortex 30 sec/centrifugation 30 sec/ultrasons 30 sec. L'échantillon de 50 µL obtenu après mise en œuvre de notre protocole de concentration/reprise après chromatographie C4 était ainsi adapté à l'étape de protéolyse qui suit, ainsi qu'à celle de dérivation chimique des peptides.

C. ETAPE 3 : protéolyse trypsique

La protéolyse trypsique a été effectuée au moyen d'une solution aqueuse de trypsine de pancréas de porc (Sigma Aldrich).

1. Etude préliminaire d'efficacité de la protéolyse trypsique dans le tampon A d'Agilent

Cette étude indispensable dans la mesure où l'échantillon plasmatique est soumis à la Spin Cartridge® Agilent, a été effectuée sur deux échantillons d'époetin beta préparés dans les mêmes conditions. Dans le premier l'époetin beta est diluée dans l'eau, dans le second l'époetin beta est diluée dans le tampon A d'Agilent pur tel qu'il est utilisé pour la déplétion.

Les deux échantillons contenant 144 fmoles d'époetin beta/ μ L ont été soumis aux conditions standard de protéolyse trypsique (rapport trypsine/EPO 1/50 mole/mole, tampon NH_4HCO_3 100 mM finale, réaction de 4 heures à 37°C). L'échantillon protéolysé est ensuite dessalé par microchromatographie sur ZipTip™ C18, les peptides élués dans 1 μ L d'ACN/eau 7/3 avec 0,1 % de TFA puis analysés par MALDI-Q-TOF en mode MS.

2. Etude préliminaire de l'influence de la concentration en trypsine et du temps de protéolyse

L'étude de l'influence de la concentration en trypsine a été conduite sur cinq échantillons d'époetin beta dans l'eau préparés dans les mêmes conditions, contenant 144 fmoles d'époetin beta/ μ L. Ces échantillons ont été soumis à cinq concentrations différentes de trypsine (rapports trypsine/époetin beta de 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 mole/mole) en présence de tampon NH_4HCO_3 100 mM finale. La réaction a lieu durant 4 heures à 37°C. Les échantillons protéolysés ont été dessalés par microchromatographie sur ZipTip™ C18. Les peptides élués dans 1 μ L d'ACN/eau 70/30 v/v avec 0,1 % de TFA ont été analysés par MALDI-Q-TOF en mode MS.

L'étude de l'influence du temps de protéolyse a été effectuée ensuite sur quatre échantillons d'époetin beta dans l'eau préparés dans les mêmes conditions, contenant 144 fmoles d'époetin beta/ μ L. Ces échantillons ont été soumis à protéolyse trypsique selon le rapport trypsine/époetin beta le plus favorable de 1/50 mole/mole, en présence de tampon NH_4HCO_3 100 mM finale. La réaction a lieu selon l'échantillon durant 2, 3, 4 ou 12 heures à 37°C. Les échantillons protéolysés ont été dessalés par microchromatographie sur ZipTip™ C18. Les peptides élués dans 1 μ L d'ACN/eau 70/30 avec 0,1 % de TFA ont été analysés par MALDI-Q-TOF en mode MS.

3. Conditions de protéolyse après concentration par minichromatographie Aquapore® Brownlee C4

L'échantillon de 50 μL obtenu après concentration par minichromatographie Aquapore® Brownlee C4 et évaporation sous vide est protéolysé pendant 4 heures à 37°C avec 27 pmoles de trypsine porcine (Sigma) en milieu tamponné (NH_4HCO_3 100 mM finale pH 8).

La quantité de trypsine mise en jeu a été définie à partir de la quantité estimée de protéines plasmatiques restantes après déplétion de l'échantillon par la Spin Cartridge® Hu7. Cette quantité est approximativement de 133 400 fmoles de protéines/ μL de plasma mis en jeu lors de la déplétion, soit pour 12 μL de plasma 1 600 pmoles. Etant donné que l'étape de chromatographie Aquapore® Brownlee C4 élimine à son tour une quantité difficile à déterminer de protéines plasmatiques dans l'échantillon, la quantité de trypsine mise en jeu a dû être déterminée arbitrairement. Des essais ont été effectués avec 54 puis 27 pmoles de trypsine. La meilleure limite de détection a été atteinte en utilisant 27 pmoles de trypsine.

4. Conditions de protéolyse trypsique totale après concentration par chromatographie Vydac® C4.

La protéolyse trypsique menée dans les conditions standard (concentration trypsine/epoetin beta 1/50 mole/mole, tampon bicarbonate d'ammonium 100 mM pH 8, 37°C, 4 heures) n'était pas totale.

Pour que la protéolyse soit totale il faut que l'échantillon de 50 μL obtenu après concentration par chromatographie Vydac® C4, évaporation à sec sous vide et reprise soit protéolysé pendant 4 heures à 37°C avec 9,76 pmoles de trypsine porcine (Sigma) en milieu tamponné (NH_4HCO_3 100 mM finale pH 8).

Cette quantité de trypsine a été choisie pour permettre une protéolyse totale de l'epoetin beta se trouvant dans un échantillon plasmatique. La quantité de trypsine mise en jeu a été déterminée par des tests de différentes quantités inférieures à la quantité de 27 pmoles qui était utilisée après concentration par chromatographie Aquapore® C4 Brownlee, étant donné que la chromatographie Vydac® C4 est beaucoup plus sélective (chromatographie de concentration/purification).

Ainsi, suite à l'étude préliminaire de marquage peptidique, tous les échantillons aqueux d'époetin beta de référence ainsi que tous les échantillons plasmatiques déplétés des protéines plasmatiques majoritaires puis concentrés par chromatographie Vydac® C4, ont été protéolysés avec 9,76 pmoles de trypsine permettant une protéolyse totale.

D. ETAPE 4 : marquage chimique isotopique

Les échantillons d'époetin beta (pure ou plasmatique) à doser sont marqués par le réactif D0 après protéolyse réalisée à pH 8.

La réaction de marquage est provoquée par mise en présence de l'échantillon peptidique à doser avec un volume équivalent de réactif D0 en solution aqueuse de 0,8 M (soit une concentration finale de 0,4 M).

La réaction a lieu pendant 3 heures à 55°C à pH 8, puis elle est arrêtée par ajout d'acide trifluoroacétique pur (TFA) à la quantité de 1 µL de TFA pour 10 µL de réactif D0 à 0,8 M mis en réaction).

La solution étalon interne est préparée dans les mêmes conditions expérimentales à partir d'une solution aqueuse d'époetin beta protéolysée par la trypsine et traitée par un volume équivalent d'une solution à 0,8 M du réactif lourd D4. Une quantité constante d'étalon interne doit être ajoutée à l'échantillon de peptides tryptiques d'époetin beta avant l'analyse par spectrométrie de masse.

E. ETAPE 5 : analyse par spectrométrie de masse

1. Conditions d'analyse en protéine entière par MALDI-TOF en mode linéaire

La calibration du MALDI-TOF en mode linéaire est réalisée avec une solution de BSA à 25 pmoles/µL. La matrice est l'acide 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique), matrice convenant le mieux à l'analyse de composés de haute masse, à la concentration de 5,6 mg/500 µL dans eau/ACN/TFA 50/50/0,1 v/v/v. La calibration porte sur trois points : formes mono-, di- et tri- chargées de la BSA (masses moyennes de 66 431 Da, 33 216 Da et 22 144 Da respectivement).

Les échantillons protéiques sont préalablement dessalés par microchromatographie ZipTip™ C4 et les protéines éluées (après plusieurs cycles de lavage avec une solution

eau/TFA 0,1 %) dans un volume final de 1 μ L d'une solution acétonitrile eau 70/30 avec 0,1 % de TFA.

0,5 μ L de la solution de protéines (purifiées et concentrées sur ZipTip™) sont déposés sur une cible MALDI-TOF avec une quantité égale de matrice acide 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique), matrice à la concentration de 5,6 mg/500 μ L dans eau/ACN/TFA 50/50/0,1 v/v/v. Après séchage à température ambiante, l'analyse est réalisée avec un spectromètre MALDI-TOF Reflex (Bruker).

2. Conditions d'analyse par MALDI-Q-TOF en mode MS ou MS/MS

La calibration du MALDI-Q-TOF est effectuée une fois par semaine avec un mélange de polyéthylène glycol de masses moléculaires couvrant une gamme de masse allant jusqu'à m/z 4000. Une correction est ensuite effectuée pour chaque spectre avec un point de référence (*Lockmass*, Waters) correspondant à la mesure de masse d'un étalon (Glu-fibrinopeptide à $M+H^+ = 1570,6774$ Da).

Les échantillons peptidiques à analyser (peptides marqués ou non marqués) sont préalablement dessalés par microchromatographie ZipTip™ C18 (Millipore) et les peptides sont élués (après plusieurs cycles de lavage avec une solution eau/TFA 0,1 %) dans un volume final de 1 μ L d'une solution acétonitrile eau 70/30 avec 0,1 % de TFA.

0,9 μ L de la solution de peptides tryptiques (purifiés et concentrés sur ZipTip™) sont mélangés à un volume équivalent d'une solution de matrice acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (Sigma) à 3,6 mg/mL dans acétonitrile/eau 1/1 avec 0,1 % de TFA. Le mélange est déposé sur une cible MALDI à 96 puits (Waters). Après séchage à température ambiante, l'analyse est réalisée avec un spectromètre MALDI-Q-TOF Premier (Waters).

3. Conditions d'analyse par nano LC-ESI-Piège ionique linéaire (LTQ)

En nano LC-ESI-Piège ionique linéaire (LTQ), le mélange peptidique marqué (ou non) et surchargé (ou non) en étalon interne marqué D4 ne nécessite pas de dessalage C18 préalable puisqu'il subit une nanochromatographie C18.

Les échantillons peptidiques préparés sont donc analysés par HPLC capillaire (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) couplée à un spectromètre de masse nanospray LTQ XL™ Ion trap (ThermoFinnigan, San Jose, CA). Dix microlitres de l'échantillon peptidique sont injectés sur une colonne (« *trap column* ») C18 PepMap™ de 300 µm x 5 mm (LC Packings) avec un débit de 30 µL/min. Les peptides sont ensuite élués vers une seconde colonne C18 PepMap™ (LC Packings), analytique cette fois de taille 75 µm x 15 cm avec un gradient linéaire de 5 à 40 % de solvant B sur 35 min. Le solvant A est composé de 0,1 % d'acide formique dans 5 % d'ACN dans H₂O et le solvant B de 0,1 % d'acide formique dans 80 % d'ACN dans H₂O. Le débit de séparation est de 200 nL/min.

Le spectromètre de masse opère en mode positif avec une tension de 1,8 kV au niveau de l'aiguille et de 33 kV au niveau du capillaire.

Les données sont acquises selon un mode alternant une MS (dans la zone de masses 300-1 700 *m/z*) donnant la carte peptidique des ions multichargés et trois analyses MS/MS sur les trois ions majoritaires selon un mode d'exclusion dynamique. L'acquisition des spectres MS/MS est effectuée avec une fenêtre de sélection de l'ion parent de 2 *m/z* (*units ion isolation window*) une énergie relative de collision de 35 %, et une exclusion dynamique de 20 sec.

4. Conditions d'analyse par nano LC-ESI-Piège ionique linéaire (Q-TRAP)

En nano LC-ESI-Piège ionique linéaire (Q-TRAP), le mélange peptidique marqué (ou non) et surchargé (ou non) en étalon interne marqué D4 ne nécessite pas de dessalage C18 préalable puisqu'il subit une chromatographie C18.

Les échantillons peptidiques préparés sont dilués dans un volume final de 60 µL de tampon eau/ACN/acide formique 98/2/0,5 v/v/v et analysés sur un système HPLC capillaire en ligne (TEMPO 1D™ Nano LC-System, Applied Biosystems) couplé à un spectromètre de masse 4000 Q-TRAP™ LC/MS/MS System (Applied Biosystems). Un aliquot de 10 µL de chaque échantillon peptidique est injecté en 5 min sur une précolonne C18 PepMap™ 3 µm, 100 Å, 300 µm de diamètre interne x 5 mm de long (Dionex). Les peptides sont ensuite élués vers une seconde colonne C18 PepMap™ 3 µm, 100 Å, 75 µm de diamètre interne x 15 cm de long (Dionex). La chromatographie est effectuée selon un gradient linéaire de 5 à 95 % de solvant B sur 61 min, un plateau à 95 % de B pendant 5 min, puis un retour à 5 % de B.

Le solvant A est composé de 0,1 % d'acide formique dans 2 % d'ACN et le solvant B de 0,1 % d'acide formique dans 98 % d'ACN. Le débit de séparation est de 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

II. L'interféron pégylé alfa 2b : versant expérimental du protocole d'isolement spécifique des peptides pégylés en vue de leur analyse par MALDI-Q-TOF en mode MS

L'interféron α -2b pégylé utilisé dans toutes les expériences provient de la spécialité VIRAFERONPEG® (Schering-Plough) 150 $\mu\text{g}/0,5 \text{ mL}$ conditionnée en stylos pré-remplis (cartouche bi-compartmentée). L'interféron α -2b non pégylé provient de la spécialité INTRONA® (Schering-Plough) 18 M UI/1,2 mL conditionnée en stylos pré-remplis (Vidal 2008). Deux solutions de concentrations équivalentes (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) d'interféron pégylé et de son homologue non pégylé sont préparées pour nos expérimentations.

A. ETAPE 1 : protéolyse du PEGinterféron et de l'interféron

1. Réduction

La réduction consiste à rompre les ponts disulfures au moyen d'une solution aqueuse de 1,4-dithiothreitol à 5 mM (DTT, Boehringer Mannheim) ; 15 minutes ; 55°C.

2. Alkylation

L'alkylation a pour but de bloquer les fonctions SH libres pour éviter la reformation des ponts disulfures. Elle est réalisée au moyen d'une solution aqueuse d'iodoacétamide (IAA, Sigma Ultra) à la concentration finale de 10 mM, 10 minutes à 20°C.

3. Protéolyse

La protéolyse a été effectuée au moyen d'une solution aqueuse de trypsine de pancréas de porc (Sigma Aldrich) : rapport trypsine/interféron 1/50 mole/mole ; tampon TRIS 50 mM pH 8 ; réaction de 4 heures à 37°C.

B. ETAPE 2 : chromatographie d'exclusion de taille

La chromatographie d'exclusion de taille (*High-Performance Size Exclusion Chromatography* HPSEC) a été réalisée sur une paire de colonnes HiTrap™ (Amersham

Biosciences) montées en série sur une chaîne de chromatographie liquide Smart System™ (Amersham).

Ces colonnes contiennent une phase stationnaire Sephadex G-25 Superfine, un assemblage de billes de dextran permettant une séparation des espèces en fonction de leur taille. La limite d'exclusion théorique de ces colonnes est de 5 000 Da. Par conséquent, seuls les composés de masse moléculaire inférieure à cette limite sont retenus.

La phase mobile utilisée pour la séparation des peptides non pégylés et pégylés était un tampon TRIS 50 mM/NaCl 150 mM pH 8 circulant au débit de 400 µL/min. Les peptides élués ont été détectés en UV à 214 et 280 nm puis collectés chaque minute par fractions de 400 µL.

C. ETAPE 3 : concentration par concentrateurs

La concentration par concentrateurs a été appliquée aux fractions de tête (soit de hautes masses) de la chromatographie d'exclusion, contenant en théorie les peptides pégylés et quelques peptides libres résiduels de grande taille.

Les fractions à concentrer et à débarrasser des composés de masse inférieure à 10 000 Da ont été introduites dans un concentrateur Vivaspin® 500 µL (soit une capacité réelle de 100 à 600 µL) dont la membrane en polyéthersulfone permet un seuil de coupure (*cut-off*) de 10 000 Da (Vivascience Sartorius).

La fraction de chromatographie collectée est soumise à 5 étapes successives de centrifugations de 5 minutes à 10 000 g. Entre chaque étape de centrifugation, le concentrat est dilué dans un volume d'eau maximal. Le dernier concentrat est soumis à la réaction de clivage PEG/peptide.

D. ETAPE 4 : rupture des liaisons PEG/Peptide

Cette réaction de cassure de la liaison polymère-peptide a été effectuée par 500 mM hydroxylamine (Sigma Aldrich), 1 heure à 20°C en milieu aqueux tamponné à pH 7 par de l'acétate d'ammonium 50 mM) (Lemaire, 1994).

E. ETAPE 5 : analyse par spectrométrie de masse

1. Conditions d'analyse en protéine entière par MALDI-TOF en mode linéaire

Cf paragraphe I.E.1 de ce chapitre

2. Conditions d'analyse par MALDI-Q-TOF en mode MS ou MS/MS

Cf paragraphe I.E.2 de ce chapitre

CHAPITRE 8

ANNEXE INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

CHAPITRE 8 :

ANNEXE INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

I. La composition du sang et du plasma humains

Le sang humain est le liquide biologique le plus exploré. C'est un milieu très hétérogène composé de deux phases : une phase cellulaire ou globulaire comportant trois types d'éléments figurés (globules rouges ou hématies ou érythrocytes, globules blancs ou leucocytes et plaquettes ou thrombocytes) et une phase liquide, le plasma, où circulent les éléments figurés. Le volume relatif d'éléments cellulaires/sang total donne l'hématocrite qui est normalement de 45 %. Le sang est un milieu très riche en protéines (22 %) réparties dans les éléments cellulaires (2/3) et dans le plasma (1/3).

Lorsque le sang total est prélevé sans anticoagulant (héparine, citrate, EDTA...), il se produit une coagulation sanguine rapide physiologique par une cascade enzymatique qui aboutit à la transformation du fibrinogène en fibrine. Les éléments cellulaires se trouvent alors emprisonnés dans la fibrine et constituent le caillot sanguin. Par centrifugation le caillot sédimente et permet de récupérer le sérum. Par contre, lorsque le sang est prélevé avec anticoagulant, après centrifugation la phase liquidienne ressemble au sérum, mais elle comporte encore le fibrinogène soluble : il s'agit du plasma.

Le plasma (ou le sérum) comporte plus de 300 protéines de structures différentes qui représentent chez l'adulte sain entre 60 et 80 g/L. L'hétérogénéité des protéines plasmatiques est également fonctionnelle (homéostasie, transport, anti-protéasiques, hémostatiques, immunitaires...) et quantitative. En effet, il existe de très grandes différences entre les protéines plasmatiques qui peuvent être classées en fonction de leur concentration plasmatique :

- Protéines prédominantes (albumine, IgG) : 10 à 40 g/L
- Protéines majeures (fibrinogène, transferrine, IgA, IgM) : 1 à 10 g/L
- Protéines mineures (plasminogène, céruléoplasmine) : 0,1 à 1 g/L
- Protéines traces (Protéine C Reactive, IgE, Rétinol Binding Protein) : < 0,1 g/L

Sur la base de leur charge électrique et de leur solubilité dans l'eau pure, on distingue essentiellement deux groupes de protéines plasmatiques : le groupe des albumines et le groupe des globulines. Seules les protéines les plus abondantes sont citées (nom, poids moléculaire, concentration dans le plasma en g/L et en mole/L) :

- ALBUMINES
 - Préalbumine : 55 000 Da ; 0,1 à 0,4 g/L soit 18 pmoles/ μ L
 - Rétinol Binding Protein : 21 000 Da ; 0,035 à 0,090 g/L soit 2,9 pmoles/ μ L
 - Albumine : 66 000 Da ; 42 g/L soit 636 pmoles/ μ L
- GLOBULINES
 - alpha1 globulines
 - α 1 antitrypsine : 55 000 Da ; 1,9 à 3,5 g/L soit 49 pmoles/ μ L
 - Orosomucoïde : 41 000 Da ; 0,55 à 1,4 g/L soit 23,6 pmoles/ μ L
 - alpha 2 globulines
 - Haptoglobine : 86 000 à 160 000 Da ; 0,5 à 1,5 g/L soit 8,3 pmoles/ μ L
 - α 2 macroglobuline : 850 000 Da ; 1,5 à 3,5 g/L soit 2,9 pmoles/ μ L
 - gamma globulines
 - Ig G : 150 000 Da ; 6 à 8 g/L soit 46,6 pmoles/ μ L
 - Ig A : 160 000 Da ; 2 à 4 g/L soit 18,7 pmoles/ μ L
 - Ig M : 950 000 Da ; 0,5 à 2 g/L soit 1,3 pmoles/ μ L
 - Ig D : 185 000 Da ; 0,05 à 0,4 g/L soit 1,21 pmoles/ μ L
 - Ig E : 0,1 à 1 mg/L
- AUTRES
 - Transferrine : 76 000 Da ; 1 à 3 g/L soit 26,3 pmoles/ μ L
 - Fibrinogène : 3 g/L soit 50 pmoles/ μ L

Après addition des concentrations respectives de chacune des protéines plasmatiques présentées ci-dessus, la concentration totale approximative (les protéines traces n'ayant pas été prises en compte) s'élève à 884 pmoles de protéines/ μ L de plasma humain soit 884 000 fmole/ μ L (Le Treut, 2001). Rappelons que la concentration attendue pour l'époétin beta que l'on veut quantifier dans le plasma est de l'ordre de 0,5 à 1 fmole/ μ L de plasma. La concentration plasmatique de l'érythropoïétine endogène est comprise entre 0,00244 et 0,029 fmole/ μ L.

II. Informations complémentaires concernant les différentes spécialités pharmaceutiques d'érythropoïétine

Toutes les spécialités pharmaceutiques d'érythropoïétine commercialisées en 2008 sont utilisées dans le traitement de l'anémie.

A. Les spécialités d'epoetin alfa, beta, delta ou omega : érythropoïétine de première génération

Les spécialités d'epoetin alfa, beta, delta ou oméga, qui sont des érythropoïétines humaines recombinantes (rHuEPO), sont connues sous les noms commerciaux Epogen® (Amgen), Epogin® (Chugai), Epomax® (Elanex), Eprex® (Janssen-Cilag), Neorecormon® ou Recormon® (Roche), Dynepo® (Shire Pharmaceuticals) et Procrit® (Ortho-Biotech). Pour toutes ces spécialités, la séquence de l'epoetin est identique à celle de l'érythropoïétine endogène. Ce sont des variations de leurs motifs de glycosylation qui distinguent ces produits (expasy). La différence de motifs de glycosylation est liée aux conditions de synthèse de la protéine ainsi qu'au type de cellules utilisées : cellules d'ovaires de hamsters chinois (epoetin alfa, beta et darbepoetin alfa), cellules humaines HT-1080 (epoetin delta).

B. Formes pharmaceutiques biosimilaires à l'epoetin alfa : érythropoïétine de première génération

Des formes pharmaceutiques biosimilaires à l'epoetin alfa sont apparues récemment sur le marché. Ces médicaments biosimilaires appelés également « epoetin zêta » ont une structure théoriquement identique au médicament « copié » mais n'étant pas produits par le même procédé de fabrication, ils ne sont pas strictement bioéquivalents et ne peuvent pas porter le nom de « génériques ». En effet, chaque procédé de biotechnologie utilisé pour la fabrication de ces médicaments est, à cause de sa complexité, difficilement reproductible à l'identique, et de plus appartient au laboratoire qui a initialement développé le principe actif.

C. La darbépoétin alfa : érythropoïétine de deuxième génération

La darbépoétin alfa ou Aranesp® (Amgen) contrairement aux spécialités présentées précédemment présente une structure en acides aminés différente de l'érythropoïétine naturelle par substitution de 5 acides aminés (Asn-57, Thr-59, Val-114, Asn-115 et Thr-117). Ces substitutions engendrent la présence sur la darbépoétine alfa de 2 sites de N-

glycosylation supplémentaires. En raison de sa teneur importante en glucides, sa demi-vie terminale *in vivo* est plus longue que celle des epoetin alfa, beta, delta et oméga (rHuEPO).

D. La méthoxy polyéthylène glycol-époétine bêta : érythropoïétine de troisième génération

La méthoxy polyéthylène glycol-époétine bêta ou Mircera® (Roche) est la conjugaison d'une protéine produite par la technique de l'ADN recombinant dans les cellules d'ovaires de hamsters chinois et d'un méthoxy polyéthylène glycol (PEG) linéaire. Cette molécule est un activateur continu du récepteur de l'EPO qui montre une activité au niveau du récepteur différente de celle de l'EPO, caractérisée par une association plus lente et une dissociation plus rapide du récepteur et une activité spécifique plus élevée *in vivo* ainsi qu'une demi-vie plus longue (Vidal, 2008).

Le tableau VIII.1 présente la liste des agents stimulant l'érythropoïèse commercialisés dans le monde ainsi qu'un comparatif des principales caractéristiques de chacun des agents lorsque les données sont disponibles.

Tableau VIII.1 : Tableau comparatif des structures et des demi-vies des différents agents stimulant l'érythropoïèse commercialisés dans le monde (certaines informations ne sont pas disponibles)(Vidal, 2008)

Dénominations Communes Internationales	Noms de spécialités (**commercialisées en France)	Fraction protéique	Fraction glucidique	Poids moléculaire global	Demi-vie plasmatique
Epoetin alfa	**EPREX® EPOGEN® EPOGIN® PROCRI®	58 % 165 acides aminés = EPO endogène	42 % 3 N-glycosylations 1 O-glycosylation ≈ EPO endogène	32 000 à 40 000 Da	IV : 4-5 h SC : 24 h
Epoetin beta	**NEORECORMON® RECORMON®	60 % 165 acides aminés = EPO endogène	40 % 3 N-glycosylations 1 O-glycosylation ≈ EPO endogène	34000 Da	IV : 4-12 h SC : 13-28 h
Epoetin delta	**DYNEPO®	= EPO endogène	≈ EPO endogène	-	IV : 4,7-13 h SC : 27-33 h
Epoetin omega	EPOMAX®	-	-	-	-
Epoetin zeta	SILAPO® RETACRI®	-	-	-	-
Darbepoetin alfa	**ARANESP®	165 acides aminés ≠ EPO endogène	5N-glycosylations 1 O-glycosylation ≠ EPO Endogène	-	IV : 21 h SC : 73 h
Méthoxy polyéthylène glycol-époétine beta	**MIRCERA®	= EPO endogène	≈ EPO endogène	30 000 Da	IV : 134 h
		+ méthoxy polyéthylène glycol linéaire (PEG)		30 000 Da	SC : 139-142 h

III. Informations complémentaires concernant les différentes spécialités pharmaceutiques d'interféron

A. Pharmacologie de l'interféron

Les interférons exercent leurs activités en se fixant à des récepteurs spécifiques de la membrane cellulaire et déclenchent une séquence complexe de réactions intracellulaires. La liaison de l'interféron alfa-2 aux récepteurs hétérodimériques IFNAR1/IFNAR2 situés sur la membrane des hépatocytes (figure VIII.1) entraîne l'activation de Jak1 (Janus kinase) et de Tyk2 (Tyrosine kinase). Jak1 et Tyk2 activent à leur tour leurs substrats Stat1 et Stat2 qui forment un complexe multimérique. Ce complexe Stat1/Stat2 après translocation dans le noyau de la cellule se lie aux « *interferon alfa-2-stimulated response elements (ISRE)* » des promoteurs des « *interferon alfa-2-stimulated genes (ISG)* » (Grace et al., 2005).

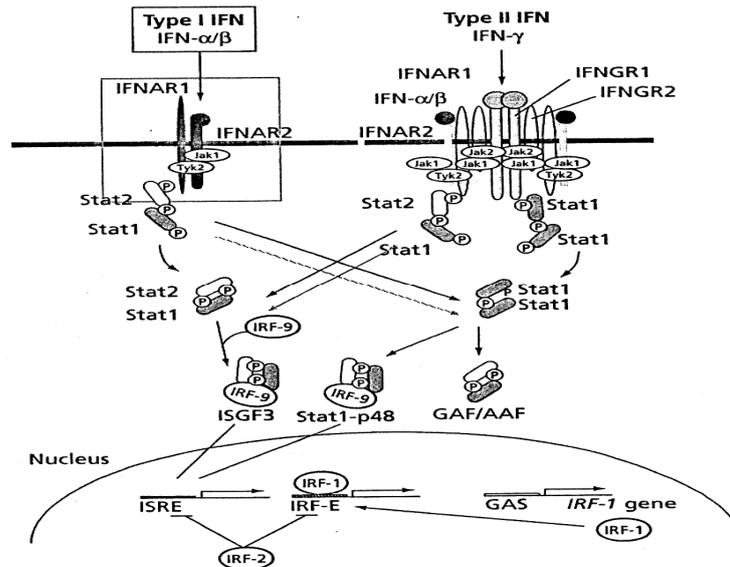


Figure VIII.1. Signaux intracellulaires déclenchés par la liaison de l'interféron alfa à son récepteur (d'après Grace et al, 2004)

L'induction de certaines enzymes qui résulte de cette cascade de réactions intracellulaires serait en partie responsable des diverses réponses cellulaires à l'interféron : l'inhibition de la réplication virale dans les cellules infectées par le virus, la suppression de la prolifération cellulaire ainsi que des activités immunomodulatrices (amélioration de l'activité phagocytaire des macrophages, augmentation de la cytotoxicité spécifique des lymphocytes pour les cellules cibles) (Vidal, 2008).

Bien que le mode d'action antiviral exact de l'interféron alfa-2b recombinant ne soit pas connu, il semble modifier le métabolisme de la cellule hôte.

B. Production

Le médicament est une forme stérile, stable, hautement purifié de l'interféron alfa-2b, obtenu par les techniques d'ADN recombinant. Il s'agit donc d'une protéine recombinante, hydrosoluble et ayant un poids moléculaire d'environ 19 300 daltons. La protéine recombinante est obtenue à partir d'un clone d'*Escherichia coli* qui abrite un plasmide hybridé par génie génétique renfermant un gène d'interféron alfa-2b humain leucocytaire.

Le peginterféron alfa-2b, conjugué covalent d'interféron alfa-2b recombinant avec le monométhoxy-polyéthylèneglycol possède un poids moléculaire moyen approximatif de 31 300 Daltons.

C. Indications thérapeutiques

Le peginterféron alfa-2b est indiqué dans le traitement des patients adultes atteints d'hépatite C chronique possédant des transaminases élevées en l'absence de décompensation hépatique et ayant un ARN-VHC sérique positif ou des anticorps anti-VHC positifs.

Le traitement de référence de l'hépatite C est l'association interféron pégylé (PEG IFN)/ribavirine (RBV). En effet, cette association permet d'obtenir une disparition durable de l'ARN-VHC chez 60 % des sujets, soit 88 % pour les sujets génotype 2 et 3 et 48 % pour les sujets génotype 1 (Girard *et al.*, 2007).

L'interféron en monothérapie est indiqué principalement en cas d'intolérance ou de contre indication à la ribavirine.

La prise en charge des patients co-infectés VIH-VHC doit prendre en compte en plus des critères classiques de l'infection VHC le statut immunitaire du patient et les médicaments antirétroviraux éventuellement associés (effets secondaires imputables aux traitements et interactions possibles entre les différentes molécules). La démarche thérapeutique est différente selon que le patient co-infecté est sous traitement antirétroviral ou non. Une priorité doit être établie pour le traitement anti-VIH ou pour le traitement anti-VHC (Girard *et al.*, 2007).

D. Profil pharmacocinétique des interférons alfa-2b

1. L'interféron alfa-2b

Les concentrations sériques moyennes d'interféron après une injection sous-cutanée et intramusculaire sont comparables. Les demi-vies d'élimination de l'interféron administré par voie SC ou IM sont respectivement de 2-3 heures et 6-7 heures. Les taux sériques maximaux sont observés entre 3 et 12 heures après l'injection puis se situent en dessous de la limite de détection respectivement 16 et 24 heures après l'injection SC ou IM.

Après administration intraveineuse, la demi-vie d'élimination de l'interféron est de 2 heures, et son taux sérique n'est plus détectable 4 heures après la perfusion. .

2. L'interféron alfa-2b pégylé

Le peginterféron alfa-2b est un dérivé « pégylé » de l'interféron alfa-2b et principalement composé d'éléments monopégylés.

Les propriétés susceptibles d'être améliorées par la pégylation sont :

- une solubilité augmentée autorisant des modalités d'administration plus favorables
- une résorption facilitée
- une clairance rénale de la substance active diminuée associée à un allongement du temps de demi-vie d'élimination plasmatique
- un maintien et une stabilisation des concentrations plasmatiques dans le temps permettant de reproduire le schéma pharmacocinétique d'une administration continue
- une moindre immunogénicité et une faible antigénicité
- une toxicité réduite
- une résistance renforcée à la protéolyse

Ainsi, le temps de demi-vie d'élimination plasmatique du peginterféron alfa-2b est prolongé comparativement avec l'interféron alfa-2b non pégylé. Le peginterféron alfa-2b est susceptible de se dépeglyler en interféron alfa-2b libre. Après administration sous-cutanée, les concentrations sériques maximales apparaissent entre 14-44 heures et sont maintenues jusqu'à 48-72 heures après l'injection. La demi-vie d'élimination moyenne est de 40 heures.

L'ensemble de ces facteurs est en faveur d'une efficacité clinique au minimum équivalente voire supérieure à celle de la substance active non pégylée ainsi que d'un meilleur confort et d'une qualité de vie améliorée pour le patient.

E. Effets indésirables de l'interféron

Les effets indésirables dus à l'interféron, les plus couramment rapportés, sont la fièvre, la fatigue, les céphalées et les myalgies.

F. Echappement thérapeutique aux interférons alfa-2b

Le taux de réponse aux traitements actuels de l'hépatite C est de l'ordre de 100 % chez les patients porteurs des génotypes 2 et 3 du VHC après 24 semaines de traitement alors qu'il n'est que de 63 % chez les patients porteurs du génotype 1 après 48 semaines de traitement (Baker, 2003). Certaines études de cinétique virale suggèrent que cette mauvaise réponse au traitement serait liée à une sensibilité diminuée du virus au médicament et/ou à des concentrations plasmatiques en interféron alfa-2 non adaptées.

Par conséquent, des études pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et des études dose d'interféron-cinétique virale s'avèrent nécessaires pour les patients porteurs du VHC génotype 1. Il faut pour cela être capable de doser spécifiquement et précisément dans le plasma humain l'interféron alfa-2 et ses nouvelles formes pégylées. Cependant, cette cytokine est très difficile à doser dans un échantillon humain à cause de la présence d'interféron endogène et des très faibles concentrations de l'interféron médicament (Vrolijk *et al.*, 2003).

G. Les différentes spécialités d'interféron actuellement sur le marché

Il existe deux types d'interférons : les interférons alfa-2a ou 2b « classiques » devant être injectés trois fois par semaine et les interférons pégylés alfa-2a ou 2b « retards » permettant une seule injection par semaine. Ces derniers sont indiqués chez les patients naïfs et en rechute associés à la ribavirine, ou en monothérapie en cas d'intolérance ou de contre-indication à la ribavirine. Le tableau VIII.2 présente les 5 spécialités d'interféron avec leurs posologies et leurs caractéristiques propres.

Les posologies des interférons (et de ribavirine) varient en fonction du poids et la durée du traitement en fonction du génotype. La durée du traitement est de 24 semaines (6 mois) pour les génotypes 2 et 3 (réputés bons répondeurs) et de 48 semaines (12 mois) pour le génotype 1 si le patient est répondeur après 12 semaines (M3) de traitement. Le traitement sera de 48 semaines (12 mois) pour les génotypes 4, 5 et 6.

Les interférons retard pégylés ont autant d'effets secondaires que les interférons non pégylés mais sont plus efficaces sur l'infection à VHC tous génotypes confondus (Girard *et al.*, 2007).

Tableau VIII.2. Médicaments de l'hépatite C : les interférons et leurs posologies dans le traitement de l'hépatite C (Vidal, 2008)

DCI	SPECIALITES	VOIES / POSOLOGIES	Poids moléculaire	T1/2 d'élimination
Interféron alfa-2b	INTRON A® (Schering-Plough)	Voie SC / IV <u>Adultes</u> : 3 MUI x 3/semaine <u>Enfants >= 3 ans</u> : 3 MUI/m ² x 3/semaine	19 300 Da	SC : 2-3 h IV : 6-7 h
Interféron alfa-2b	VIRAFERON® (Schering-Plough)	Voie SC <u>Adultes</u> : 3 MUI x 3/semaine <u>Enfants >= 3 ans</u> : 3 MUI/m ² x 3/semaine	19 300 Da	SC : 2-3 h IV : 6-7 h
Interféron alfa-2a	ROFERON®-A (Roche)	Voie SC et IM <u>Combiné à la ribavirine</u> : 3 à 4.5 MUI x 3/semaine <u>En monothérapie</u> : 3 à 6 MUI x 3/semaine	Non communiqué	IV : 3,7-8,5 h Non communiqué pour voies SC et IM
Interféron alfa-2b pégylé	VIRAFERON PEG® (Schering-Plough)	Voie SC <u>Combiné à la ribavirine</u> : 1.5 µg/kg/semaine <u>En monothérapie</u> : 0,5 ou 1,0 µg/kg/semaine	31 300 Da (dont PEG linéaire de 12 000 Da)	SC : 40 h
Interféron alfa-2a pégylé	PEGASYS® (Roche)	Voie SC 180 µg/semaine	Non communiqué (dont PEG branché de 40 000 Da)	IV : 60-80 h SC : 50-130 h

Le peginterféron alfa-2a (PEGASYS®) diffère du peginterféron alfa-2b (VIRAFERON PEG®) surtout par son groupement PEG branché de 40 000 Daltons environ, lié de façon covalente à l'interféron (figure VIII.2). Il existe sur cet interféron quatre sites majeurs de pégylation (les lysines 31, 121, 131 et 134) et sept sites mineurs (les lysines 70, 83, 49, 112, 164, 23 et 133). L'activité spécifique du peginterféron α -2a est de $1,1 \times 10^6$ UI/mg alors que l'activité spécifique du peginterféron alfa-2b est de $2,4 \times 10^8$ UI/mg.

La taille importante du PEG fixé à l'interféron alfa-2a réduit sa filtration glomérulaire : sa demi-vie passe grâce au PEG de 6-9 heures à 50-130 heures.

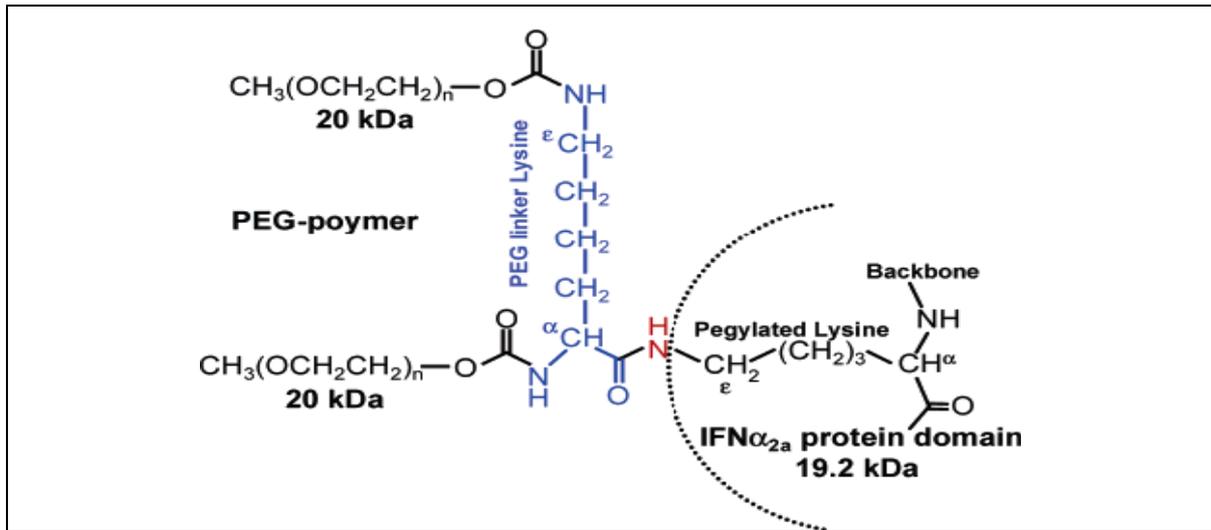


Figure VIII.2. Représentation schématique du peginterféron alfa-2a (figure modifiée d'après Dhalluin, 2005)

La seule différence entre les peginterféron alfa-2a et 2b réside dans la structure du PEG et dans les sites de greffage du PEG sur la protéine.

IV. Publication

CHAPITRE 9

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 9 :

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abellan R, Ventura R, Pichini S, Remacha AF, Pascual JA, Pacifici R, et al. Evaluation of immunoassays for the measurement of erythropoietin (EPO) as an indirect biomarker of recombinant human EPO misuse in sport. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, 35, (5), 1169-77.

Afssaps. Traitement de l'anémie au cours de l'insuffisance rénale chronique de l'adulte : Recommandations. *Néphrologie et thérapeutique* **2005**, 1, (1), 1-48.

Anderson N, Anderson N, Haines L, Hardie D, Olafson R, Pearson T. Mass spectrometric quantitation of peptides and proteins using Stable Isotope Standards and Capture by Anti-Peptide Antibodies (SISCAPA). *Journal of proteome research* **2004**, 3, (2), 235-44.

Anderson L, Hunter CL. Quantitative Mass Spectrometric Multiple Reaction Monitoring Assays for Major Plasma Proteins. *Molecular & cellular proteomics* **2006**, 5, (4), 573-88.

Antonov VK, Ginodman LM, Rumsh LD, Kapitannikov YV, Barshevskaya TN, Yavashev LP, et al. Studies on the Mechanisms of Action of Proteolytic Enzymes Using Heavy Oxygen Exchange. *European Journal of Biochemistry* **1981**, 117, (1), 195-200.

Arlington S, Barnett S, Hughes S, Palo J. Pharma 2010: The Threshold of Innovation. *IBM Business Consulting Services* **2002**, 1-8.

Aussedat B, Sagan S, Chassaing G, Bolbach G, Burlina F. Quantification of the efficiency of cargo delivery by peptidic and pseudo-peptidic Trojan carriers using MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2006**, 1758, (3), 375-83.

Ayala A, Parrado J, Machado A. Use of rotofor preparative isoelectrofocusing cell in protein purification procedure. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1998**, 69, (1), 11-6.

B

Baker DE. Pegylated Interferon Plus Ribavirin for the treatment of Chronic Hepatitis C, Review. *Reviews in gastroenterological disorders* **2003**, 3, (2), 93-109.

Barnidge D, Goodmanson M, Klee G, Muddiman D. Absolute quantification of the model biomarker prostate-specific antigen in serum by LC-MS/MS using protein cleavage and isotope dilution mass spectrometry. *Journal of proteome research* **2004**, 3, (3), 644-52.

Beavis R, Chait B. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid communications in mass spectrometry* **1989**, 3, (12), 432-5.

Becher F, Pruvost A, Clement G, Tabet JC, Ezan E. Quantification of Small Therapeutic Proteins in Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Application to an Elastase Inhibitor EPI-hNE4. *Analytical chemistry* **2006**, 78, (7), 2306-13.

Becher F, Duriez E, Volland H, Tabet JC, Ezan E. Detection of Functional Ricin by Immunoaffinity and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical chemistry* **2007**, 79, (2), 659-65.

Belghazi M, Bathany K, Hountondji C, Grandier-Vazeille X, Manon S, Schmitter JM. Analysis of protein sequences and protein complexes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* **2001**, 1, (8), 946-54.

Benson EW, Hardy R, Chaffin C, Robinson CA, Konrad RJ. New automated chemiluminescent assay for erythropoietin. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **2000**, 14, (6), 271-3.

Beullens M, Delanghe JR, Bollen M. False-positive detection of recombinant human erythropoietin in urine following strenuous physical exercise. *Blood* **2006**, 107, (12), 4711-3.

Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomedical & environmental mass spectrometry* **1988**, 16, (1-12), 99-111.

Blasco H, Lalmanach G, Godat E, Maurel MC, Canepa S, Belghazi M, *et al.* Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum. *Journal of Immunological Methods* **2007**, 325, (1-2), 127-39.

Bokemeyer C, Aapro MS, Courdi A, Foubert J, Link H, Österborg A, *et al.* EORTC guidelines for the use of erythropoietic proteins in anaemic patients with cancer. *European Journal of Cancer* **2004**, 40, (15), 2201-16.

Bokemeyer C, Aapro MS, Courdi A, Foubert J, Link H, Österborg A, *et al.* EORTC guidelines for the use of erythropoietic proteins in anaemic patients with cancer: 2006 update. *European Journal of Cancer* **2007**, 43, (2), 258-70.

Brown R, Lennon J. Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. *Analytical chemistry* **1995**, 67, (13), 1998-2003.

C

Carrat F, Bani-Sadr F, Pol S, Rosenthal E, Lunel-Fabiani F, Benzekri A, *et al.* Pegylated interferon alfa-2b vs standard interferon alfa-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infected patients: a randomized controlled trial. *The journal of the American Medical Association* **2004**, 292, (23), 2839-48.

CDER/FDA. Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation: U.S Department of Health and Human services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, **2001**.

Chen X, Sun L, Yu Y, Xue Y, Yang P. Amino acid-coded tagging approaches in quantitative proteomics. *Expert Review of Proteomics* **2007**, 4, (1), 25-37.

Cheung W, Minton N, Gunawardena K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa once weekly and three times weekly. *European journal of clinical pharmacology* **2001**, 57, (5), 411-8.

Clark SC, Kamen R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* **1987**, 236, (4806), 1229-37.

Cole RB. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35, (7), 763-72.

Colgrave ML, Jones A, Craik DJ. Peptide quantification by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry: Investigations of the cyclotide kalata B1 in biological fluids. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1091, (1-2), 187-93.

Comuzzi B, Sadar MD. Proteomic analyses to identify novel therapeutic targets for the treatment of advanced prostate cancer. *Cellscience* **2006**, 3, (1), 61-81.

Cooper MA. Optical biosensors in drug discovery. *Nature reviews Drug discovery* **2002**, 1, (7), 515-28.

D

de Hoffmann E. Tandem Mass Spectrometry : a Primer. *Journal of Mass Spectrometry* **1996**, 31, 129-37.

de Hoffmann E, Stroobant V. Spectrométrie de masse. 3^{ème} Ed. Dunod : Paris, **2005**, 425 p. ISBN 210049449X

Dhalluin C, Ross A, Leuthold LA. Structural and Biophysical Characterization of 40 kDa PEG-Interferon- α 2a and its Individual Positional Isomers. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, 16, 504-17.

Domon B, Aebersold R. Challenges and Opportunities in Proteomics Data Analysis. *Molecular & cellular proteomics* **2006**, 5, (10), 1921-6.

Dongré AR, Jones JL, Somogyi A, Wysocki VH. Influence of Peptide Composition, Gas-Phase Basicity, and Chemical Modification on Fragmentation Efficiency: Evidence for the Mobile Proton Model. *Journal of American Chemical Society* **1996**, 118, 8365-74.

Dorosz P. Guide Pratique de Médicaments. 27^{ème} Ed. Maloine : Paris, **2007**, 1893 p. ISBN 2224029675

Dubois M, Becher F, Herbet A, Ezan E. Immuno-mass spectrometry assay of EPI-HNE4, a recombinant protein inhibitor of human elastase. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, 21, (3), 352-8.

Dubois M, Fenaille F, Clement G, Lechmann M, Tabet JC, Ezan E, *et al.* Immunopurification and Mass Spectrometric Quantification of the Active Form of a Chimeric Therapeutic Antibody in Human Serum. *Analytical chemistry* **2008**, 80, (5), 1737-45.

Douglas DJ, Frank AJ, Mao D. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, 24, (1), 1-29.

Duriez E, Fenaille F, Tabet J-C, Lamourette P, Hilaire D, Becher F, *et al.* Detection of Ricin in Complex Samples by Immunocapture and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of proteome research* **2008**, 7, (9), 4154-63.

F

Feng WY, Chan KK, Covey JM. Electrospray LC-MS/MS quantitation, stability, and preliminary pharmacokinetics of bradykinin antagonist polypeptide B201 (NSC 710295) in the mouse. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2002**, 28, (3-4), 601-12.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, 246, (4926), 64-71.

Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, *et al.* Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2000**, 21, (6), 1249-73.

Fujisaka Y, Tamura T, Ohe Y, Kunitoh H, Sekine I, Yamamoto N, *et al.* Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Weekly Epoetin Beta in Lung Cancer Patients. *Japanese journal of clinical oncology* **2006**, 36, (8), 477-82.

G

Gerber SA, Rush J, Stemman O, Kirschner MW, Gygi SP. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, (12), 6940-5.

Girard PM, Katlama C, Pialoux G. VIH. Ed. 2007 Doin : Paris, **2007**, 788 p. ISBN 9782704012312.

Glaspy J, Beguin Y. Anaemia management strategies: optimising treatment using epoetin beta (NeoRecormon). *Oncology* **2005**, 69, (2), 8-16.

Glue P, Fang JWS, Rouzier-Panis R. Pegylated interferon- α : Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **2000**, 68, (5), 556-67.

Grace MJ, Bordens RW, Cutler D. Peginterferons for the Treatment of Chronic Hepatitis C, Review. *Hepatology Review* **2005**, 2, 3-9.

Guan F, Uboh CE, Soma LR, Birks E, Chen J, Mitchell J, *et al.* LC-MS/MS Method for Confirmation of Recombinant Human Erythropoietin and Darbepoetin alfa in Equine Plasma. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (12), 4627-35.

Guan F, Uboh CE, Soma LR, Birks E, Chen J, You Y, *et al.* Differentiation and Identification of Recombinant Human Erythropoietin and Darbepoetin Alfa in Equine Plasma by LC-MS/MS for Doping Control. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, (10), 3811-7.

Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature biotechnology* **1999**, 17, (10), 994-9.

Gygi SP, Rist B, Aebersold R. Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Current Opinion in Biotechnology* **2000**, 11, (4), 396-401.

H

Hager JW. A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, 16, 512-26.

Hardouin J. Etude de Glutathiones S-Transférases par Spectrométrie de Masse : Séquences et Interactions Non Covalentes. Thèse Sciences Physiques. Université de Rouen, **2003**, 233 p.

Hashimoto Y, Shibakawa K, Nakade S, Miyata Y. Validation and application of a 96-well format solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of digoxin in human plasma. *Journal of Chromatography B* **2008**, 869, (1-2), 126-32.

Havlis J, Shevchenko A. Absolute Quantification of Proteins in Solutions and in Polyacrylamide Gels by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, (11), 3029-36.

Heudi O, Barteau S, Zimmer D, Schmidt J, Bill K, Lehmann N, *et al.* Towards Absolute Quantification of Therapeutic Monoclonal Antibody in Serum by LC-MS/MS Using Isotope-Labeled Antibody Standard and Protein Cleavage Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, (11), 4200-7.

Hillenkamp F, Karas M, Beavis R, Chait B. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry* **1991**, 63, (24), 1193A-203A.

Hoos JS, Sudergat H, Hoelck J-P, Stahl M, de Vlioger JSB, Niessen WMA, *et al.* Selective quantitative bioanalysis of proteins in biological fluids by on-line immunoaffinity chromatography-protein digestion-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2006**, 830, (2), 262-9.

I

Iribarne JV, Thomson BA. On the evaporation of small ions from charged droplets. *Journal of Chemical Physics* **1976**, 64, (6), 2287-94.

J

Janecki DJ, Bemis KG, Tegeler TJ, Sanghani PC, Zhai L, Hurley TD, *et al.* A multiple reaction monitoring method for absolute quantification of the human liver alcohol dehydrogenase ADH1C1 isoenzyme. *Analytical Biochemistry* **2007**, 369, (1), 18-26.

Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Internal medicine* **2004**, 43, (8), 649-59.

Jones JL, Dongré AR, Somogyi A, Wysocki VH. Sequence Dependence of Peptides Fragmentation Efficiency Curves Determined by Electrospray Ionization/Surface-Induced Dissociation Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, 116, 8368-9.

K

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. *Analytical Chemistry* **1988**, 60, 2299-301.

Kay RG, Gregory B, Grace PB, Pleasance S. The application of ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry to the detection and quantitation of apolipoproteins in human serum. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, 21, (16), 2585-93.

Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35, (7), 804-17.

Koomen JM, Shih LN, Coombes KR, Li D, Xiao L-c, Fidler IJ, *et al.* Plasma Protein Profiling for Diagnosis of Pancreatic Cancer Reveals the Presence of Host Response Proteins. *Clinical cancer research* **2005**, 11, (3), 1110-8.

Koomen JM, Zhao H, Li D, Nasser W, Hawke DH, Abbruzzese JL, *et al.* Diagnostic protein discovery using liquid chromatography/mass spectrometry for proteolytic peptide targeting. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, 19, (12), 1624-36.

Kuhn E, Wu J, Karl J, Liao H, Zolg W, Guild B. Quantification of C-reactive protein in the serum of patients with rheumatoid arthritis using multiple reaction monitoring mass spectrometry and ¹³C-labeled peptide standards. *Proteomics* **2004**, 4, (4), 1175-86.

L

Lappin G, Garner RC, Meyers T, Powell J, Varley P. Novel use of accelerator mass spectrometry for the quantification of low levels of systemic therapeutic recombinant protein. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, 41, (4), 1299-302.

Leclercq M, Guimont-Ducamp C. Tools for proteomic studies. *Biofutur* **1999**, 1999, (192), 1-13.

Lee KH. Proteomics: a technology-driven and technology-limited discovery science. *Trends in Biotechnology* **2001**, 19, (6), 217-22.

Lehn JM. La Chimie Supramoléculaire. Concepts et perspectives. 1^{ère} Ed. De Boeck Université, **1997**, 273 p.
ISBN 2804125041

Lehninger AL. Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. Ed. Flammarion Médecine/Science; **1973**, 1088 p.
ISBN 2257500911

Lemaire M, Schmitter JM, Issakidis E, Miginiac-Maslow M, Gadal P, P. D. Essential histidine at the active site of sorghum leaf NADP dependent malate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 27291-6.

Le Treut. Les proteines plasmatiques [Resource électronique]. Sémiologie biochimique, CHU de Rennes. **2001**. 26 pages. Disponible sur : <http://www.med.univ-rennes1.fr/resped/s/semio/protplasma.htm>. [consulté le 16/03/2006].

Lin S, Shaler TA, Becker CH. Quantification of Intermediate-Abundance Proteins in Serum by Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry in a Single-Quadrupole Ion Trap. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (16), 5762-7.

M

Ma S. Analysis of protein therapeutics by capillary electrophoresis: applications and challenges. *Developments in biologicals* **2005**, 122, 49-68.

Mayr BM, Kohlbacher O, Reinert K, Sturm M, Gropl C, Lange E, *et al.* Absolute Myoglobin Quantitation in Serum by Combining Two-Dimensional Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Novel Data Analysis Algorithms. *Journal of proteome research* **2006**, 5, (2), 414-21.

McMartin C. Pharmacokinetics of peptides and proteins: Opportunities and challenges. *Advances in drug research* **1992**, 22, 39-106.

Meager A. Biological assays for interferons. *Journal of Immunological Methods* **2002**, 261, (1-2), 21-36.

Miller KJ, Bowsher RR, Celniker A, Gibbons J, Gupta S, Lee JW, *et al.* Workshop on Bioanalytical Methods Validation for Macromolecules: Summary Report. *Pharmaceutical research* **2001**, 18, (9), 1373-83.

Mire-Sluis AR. Progress in the Use of Biological Assays During the Development of Biotechnology Products. *Pharmaceutical research* **2001**, 18, (9), 1239-46.

Müller S, Hutson A, Arya V, Hochhaus G. Assessment of complex peptide degradation pathways via structured multicompartmental modeling approaches: The metabolism of dynorphin A1-13 and related fragments in human plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1999**, 88, (9), 938-44.

N

Nadeau RW, Satoh H, Scheide S, Crowl R, Conroy R, Garland WA, *et al.* A comparison of mass balance, pharmacokinetics and disposition of [¹⁴C(U)]- and [¹²⁵I]recombinant human interleukin-2 in cynomolgus monkeys. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **1995**, 23, (9), 904-9.

O

Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, *et al.* Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & cellular proteomics* **2002**, 1, (5), 376-86.

Ong SE, Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture for quantitative proteomics. *Methods in molecular biology* **2007**, 359, 37-52.

P

Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, 36, (10), 1083-91.

Peters EC, Horn DM, Tully DC, Brock A. A novel multifunctional labeling reagent for enhanced protein characterization with mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, 15, (24), 2387-92.

Piscitelli SC, Reiss WG, Figg WD, Petros WP. Pharmacokinetic studies with recombinant cytokines. Scientific issues and practical considerations. *Clinical pharmacokinetics* **1997**, 32, (5), 368-81.

Poutanen M, Salusjärvi L, Ruohonen L, Penttilä M, Kalkkinen N. Use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass mapping and nanospray liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry sequence tag analysis for high sensitivity identification of yeast proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, 15, (18), 1685-92.

Pronzato P, Jassem J, Mayordomo J. Epoetin beta therapy in patients with solid tumours. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2006**, 58, (1), 46-52.

Q

Qiu H, Wang Y. Quantitative Analysis of Surface Plasma Membrane Proteins of Primary and Metastatic Melanoma Cells. *Journal of proteome research* **2008**, 7, (5), 1904-15.

R

Rabilloud T, Charmont S. Proteome Research: Two-dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. 1^{ère} Ed. Springer : Verlag, **2000**, 107-126.
ISBN 3540657924

Riter LS, Peng Y, Noll RJ, Patterson GE, Aggerholm T, Cooks RG. Analytical performance of a miniature cylindrical ion trap mass spectrometer. *Analytical chemistry* **2002**, 74, (24), 6154-62.

Roche Pharma. NeoRecormon (Epoetin beta) : Dossier Scientifique; **1998**, 164 p.

Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry* **1984**, 11, (11), 601.

Rose MP, Gaines Das RE, Balen AH. Definition and Measurement of Follicle Stimulating Hormone. *Endocrine reviews* **2000**, 21, (1), 5-22.

S

Sadick MD. Kinase Receptor Activation (KIRA): a rapid and accurate alternative to endpoint bioassays. *Developments in biological standardization* **1999**, 97, 121-33.

Sakata S, Enoki Y, Shimizu S, Hattori M, Ueda M. Correlation between a sandwich ELISA and an in-vitro bioassay for erythropoietin in human plasma. *British journal of haematology* **1995**, 91, (3), 562-5.

Sakiz E. Les Molécules de la Vie: Ed. Pour la Science : Paris, **1986**, 39-49.
ISBN 290291850X

Schmidt A, Kellermann J, Lottspeich F. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* **2005**, 5, (1), 4-15.

Schwartz JC, Senko MW, Syka JE. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, 13, (6), 659-69.

Scott T, Mercer E. Concise Encyclopedia: Biochemistry and Molecular Biology. 3^{ème} Ed. Walter de Gruyter : Berlin-New-York, **1997**, 548-564.
ISBN 3110145359

Shah V, Midha K, Findlay J, Hill H, Hulse J, McGilveray I, et al. Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical research* **2000**, 17, (12), 1551-7.

Stanley SMR, Poljak A. Matrix-assisted laser-desorption time-of flight ionisation and high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectral analyses of two glycosylated recombinant epoetins. *Journal of Chromatography B* **2003**, 785, (2), 205-18.

Suzuki Y, Tokuda Y, Fujiwara Y, Minami H, Ohashi Y, Saijo N. Weekly epoetin beta maintains haemoglobin levels and improves quality of life in patients with non-myeloid malignancies receiving chemotherapy. *Japanese Journal of Clinical Oncology* **2008**, 38, (3), 214-21.

T

Tabet JC, Rebuffat S. [Nobel Prize 2002 for chemistry: mass spectrometry and nuclear magnetic resonance]. *Médecine sciences* **2003**, 19, (8-9), 865-72.

Tang XJ, Thibault P, Boyd RK. Fragmentation reactions of multiply-protonated peptides and implications for sequencing by tandem mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation. *Analytical chemistry* **1993**, 65, (20), 2824-34.

Tang L, Persky AM, Hochhaus G, Meibohm B. Pharmacokinetic aspects of biotechnology products. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, 93, (9), 2184-204.

Tanswell P, Modi N, Combs D, Danays T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tenecteplase in fibrinolytic therapy of acute myocardial infarction. *Clinical pharmacokinetics* **2002**, 41, (15), 1229-45.

Thorpe R, Wadhwa M, Page C, Mire-Sluis A. Bioassays for the characterisation and control of therapeutic cytokines; determination of potency. *Developments in biological standardization* **1999**, 97, 61-71.

Toon S. The relevance of pharmacokinetics in the development of biotechnology products. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* **1996**, 21, (2), 93-103.

V

Vidal (Collectif), Le Dictionnaire Vidal 2008. 84^{ème} Ed. Vidal, **2008**.

Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharmaceutical research* **2007**, 24, (10), 1962-73.

Vrolijk JM, Kaul A, Hansen BE, Lohmann V, Haagmans BL, Schalm SW, *et al.* A replicon-based bioassay for the measurement of interferons in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Virological Methods* **2003**, 110, (2), 201-9.

W

Wallis M, Gwilliam DJ, Wallis OC. Preparation and characterization of a recombinant DNA-derived ovine growth hormone variant internally labelled with sulphur-35. *Journal of molecular endocrinology* **1993**, 11, (3), 351-9.

Wang YS, Youngster S, Bausch J. Identification of the Major Positional Isomer of Pegylated Interferon Alpha-2b. *Biochemistry* **2000**, 39, 10634-40.

Washburn MP, Wolters DA, Yates JRr. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature biotechnology* **2001**, 19, (3), 242-7.

Wei X, Grill DS, Heatherington AC, Swanson SJ, Gupta S. Development and validation of a quantitative cell-based bioassay for comparing the pharmacokinetic profiles of two recombinant erythropoietic proteins in serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, 43, (2), 666-76.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & genetic engineering reviews* **1996**, 13, 19-50.

Wills RJ, Ferraiolo BL. The role of pharmacokinetics in the development of biotechnologically derived agents. *Clinical pharmacokinetics* **1992**, 23, (6), 406-14.

Wilm M, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Analytical chemistry* **1996**, 68, (1), 1-8.

Wolters DA, Washburn MP, Yates JRr. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Analytical chemistry* **2001**, 73, (23), 5683-90.

Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF. Comparative Study of Three Proteomic Quantitative Methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, Using 2D Gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *Journal of proteome research* **2006**, 5, (3), 651-8.

Wysocki VH, Tsapralis G, Smith LL, Brechi LA. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35, (12), 1399-406.

Y

Yanagihara S, Kori Y, Ishikawa R, Kutsukake K. Production of Novel Anti-Recombinant Human Erythropoietin Monoclonal Antibodies and Development of a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Bioactive Human Erythropoietin. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* **2008**, 29, (2), 181 - 96.

Yang Z, Fang X, Hayes M, Daley MP, Ettenberg S, Tse FLS. LC-MS/MS Approach for Quantification of Therapeutic Proteins in Plasma Using a Protein Internal Standard and 2D-Solid-Phase Extraction Cleanup. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (24), 9294-301.

Yu K, Little D, Plumb R, Smith B. High-throughput quantification for a drug mixture in rat plasma - a comparison of Ultra Performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, 20, (4), 544-52.

La spectrométrie de masse appliquée à la quantification des protéines médicaments dans le plasma

Le nombre croissant de médicaments protéiques utilisés en thérapeutique a créé des besoins dans le domaine de leur quantification, principalement dans le plasma, un milieu de composition protéique complexe.

Le dosage, essentiel aux études pharmacocinétique/pharmacodynamique, ainsi qu'à l'optimisation de ces traitements, est compliqué par la nature protéique de ces médicaments et par les faibles concentrations auxquelles ils sont attendus dans ces milieux complexes.

La méthodologie proposée se démarque des méthodes de dosage usuelles par son caractère universel. Elle fait appel à la spectrométrie de masse adaptée à la quantification des protéines grâce à l'utilisation d'un marquage isotopique différentiel des peptides : après enrichissement et protéolyse, l'échantillon à doser est marqué sur les lysines par la version légère d'un réactif de dérivation. En parallèle, les peptides de la protéine médicament pure marqués par la version lourde du réactif, servent d'étalon interne. La possibilité de quantifier la protéine à partir de plusieurs de ses peptides améliore la fiabilité du dosage.

Appliquée à l'époétin beta aux concentrations attendues en thérapeutique (autour de 0,5 femtomole/ μL de plasma), la stratégie proposée permet de situer la limite de quantification à environ 50 attomoles d'époétin beta/ μL de plasma avec une méthodologie de spectrométrie de masse nano-LC-ESI-Q-TRAP fonctionnant en mode MRM.

Pour étendre l'universalité de cette approche au champ des protéines médicaments pégylées, une seconde molécule a été étudiée. Il s'agit de l'interféron alfa-2b pégylé qui a permis de mettre en place une stratégie d'extraction spécifique du médicament utilisant sa pégylation.

Mots-clés : Protéines médicaments, spectrométrie de masse, MRM, marquage chimique isotopique, quantification, protéines pégylées.

Quantitative analysis of therapeutic proteins in plasma by mass spectrometry

The growing number of therapeutic proteins has created needs in the field of their quantification, mainly in plasma, which is a complex protein environment.

Quantitative analysis of these proteins is essential for pharmacokinetics /pharmacodynamics studies, and for the optimization of treatments. However, the nature itself of the analyte and the low concentrations that are expected in plasma complicate the quantitative analysis.

The proposed methodology differs from usual methods on its universal applicability. It relies on mass spectrometry adapted to the quantification of proteins by using peptides differential isotope labelling : after enrichment and proteolysis, the therapeutic protein and the plasmatic proteins are labelled on lysine residues by the light reagent. In parallel, peptides of the pure therapeutic protein, labelled by heavy version of reagent, are used as internal standard. The ability to quantify the protein with several of its peptides improves the reliability of the analysis.

When applied to epoetin beta at expected therapeutic concentrations (about 0.5 femtomole/ μL of plasma), the proposed strategy leads to a quantification limit close to 50 attomoles of epoetin beta/ μL plasma, with a nano-LC-ESI-Q-TRAP mass spectrometry methodology operating in MRM.

To extend the universal character of this approach to the field of pegylated protein drugs, a second therapeutic protein model has been studied. This model is a pegylated interferon alfa-2b which allowed developing a strategy for specific extraction of the drug relying on its pegylation.

Key words : protein drugs, mass spectrometry, MRM, chemical isotope labelling, quantification, pegylated proteins.