UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

THÈSE

présentée par

Michael BIACCHI

Soutenue le : 23 Septembre2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : chimie analytique et spectrométrie de masse

Développement du couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse à source MALDI : applications à la caractérisation de protéines

THÈSE dirigée par :

Dr. Emmanuelle LEIZE-WAGNER	Directrice de recherche, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr. Anne VARENNE	Rapporteur externe, Chimie Paris Tech
Pr. Richard B. COLE	Rapporteur externe, Université Pierre et Marie Curie

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr. Maurice MILLET	Président du jury, Université de Strasbourg
Dr. Bernard CAPOLAGHI	Examinateur, Hôpital Bel-Air
Dr. Yannis FRANCOIS	Examinateur, Université de Strasbourg

« La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre. »

Albert Einstein

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du Jury Professeur Maurice MILLET, Professeur Anne VARENNE, Professeur Richard B. COLE, Dr Michel ANSELME, Dr FRANCOIS Yannis-Nicolas et Dr CAPOLAGHI Bernard pour avoir bien voulu juger ce travail de Thèse

Attention toutes les personnes remerciées prochainement, sont les catalyseurs de ma réaction chimique personnelle

A la première place, Je tiens à remercier le Dr Emmanuelle LEIZE-WAGNER, Directeur du Laboratoire de spectrométrie de masse des interactions et des systèmes pour m'avoir accueilli au sien de son laboratoire, et surtout de m'avoir fait confiance, d'avoir partagé ses connaissances scientifiques, répondu a mes attentes, su trouver les mots pour me rebooster à chaque coup de blues. Pour tout ca, merci ! Tu ne te rends pas compte de ce que tu as fait pour moi et ce que représente ce travail de thèse. Bien sur la logique voudrait que je remercie Dr Yannis FRANCOIS maintenant …. Mais je le garde pour la fin. Entre la poire et le fromage…..ou plutôt la frite et le Sunday !

Ensuite je tiens a remercier le Dr Hélène NIERENGARTEN, Directrice du service de spectrométrie de masse pour son implication scientifique, pour m'avoir fait confiance en me laissant utiliser toutes les formidables machines. Tu m'as laissé m'épanouir dans ce monde étrange qu'est le sous sol de la tour de Chimie. Encore merci pour les petites discussions, pour les petites attentions et les grands conseils !

Merci à Dr Noëlle POTIER pour la qualité de tes conseils scientifiques, pour ton implication, pour ta gentillesse.

Merci à Dr Armelle CHARRIE, merci pour tes conseils scientifiques, merci pour ton flegme face à l'explosion engendrée par une expérience hautement scientifique et complètement irresponsable !

Merci Nathalie ZORN, pour ton pragmatisme et ta patience lors de mes rentrées intempestives dans ton bureau, pour les conseils scientifiques. Merci

Merci MONSIEUR Philippe HAMMANN, apiculteur protéique ! Merci pour tes conseils, pour ton soutien ! Merci de m'avoir laissé casser ton MALDI 2X ! Merci de m'avoir fait confiance pendant les longues soirées passées dans ce labo si bien organisé ! Merci pour tout …. Au fait je n'ai pas fait tomber la plaque MALDI ….

Merci Laurianne Kuhn ! Que dire de plus ! Un puits de science. Alliance de Rigueur et de Légèreté (C'est la classe cette phrase). Un exemple pour pas mal de monde, un soutien pour pas mal de monde ! R E S P E C T ! . Sinon je pense que tu as bien compris c'est de 2 C comme Gnocchi ! Merci à Dr Jérôme Pansanel pour son codage efficace !. Merci a toute l'équipe de l'IBMC qui s'est dit …. Et je l'ai vu dans vos yeux ! … Woaw celui la il est Kératine Free !

Maintenant je vais remercier (parce que j'aime bien remercier …) les personnes qui ont partagé mon quotidien, qui pour certain m'ont accompagné pendant un bon bout de chemin et qui pour d'autre ont fait parti des rencontres éphémères mais qui ont aussi leurs importances.Tout d'abord, Rabah, génétiquement modifié pour être bon. Grand dépouilleur de spectre. Je n'ai pas besoin de faire un grand paragraphe. Tu sais ce que je pense, je te l'ai déjà dit ! Merci du respect que tu m'as accordé et d'avoir supporté mes états d'âmes… Merci pour les discussions scientifiques, pour les réflexions scientifiques, pour les rires et les cafés ! Pour les moments de détentes, pour les réflexions « borderline ». Merci de m'avoir fait confiance pour la CESI-MS. Pour être rester avec moi jusqu' 3h du mat comme des zombies !. Merci de ta confiance. Tu crois vraiment qu'il y a des gens qui écoutent de la musique a fond dans les labos à 2 h du mat ? Merci à Cécile, sous ton air hautain ben ….t'es hautaine ! … Merci pour ta gentillesse et ta vision des choses, merci de m'avoir fait comprendre que j'étais ringard et « relou ». Que je n'étais plus dans le coup ! Pour tout ca, je te mets un bon coup de savate dans le dos ! Merci Marianne … Le Liban est fière de Toi, merci pour le chocolat, pas merci pour mon cholestérol, toujours un petit cadeau pour nous, je n'oublierai pas les pauses Chocolat - remonte moral à 00h00 à la tour de chimie ! Merci à Mélanie, du MASTER au DOCTORAT, tu m'auras supporté. Rigueur de travail, toujours le sourire, toujours le petit mot gentil, toujours le conseil….Merci Amelle, pour ton soutien ! Merci Nassur, Ricky et Eddy, bien joué les mecs ! Faut avoir du cran pour approcher la nouvelle interface CE/MALDI-MS ! Merci Nha THi ! Je compte sur toi pour le Vietnam ! Et

franchement le T shirt Panda avec les nouilles c'est trop ! Merci Reynald de ne pas avoir porté plainte pour tentative de meurtre par carboglace. Merci Nina, ma première stagiaire, On sait bien amusé sur la CE-ESI MS Minoucham !. Merci Carolina, ta rigueur scientifique m'a beaucoup aidé. **Enfin je remercie Mr Dominique Schlaefli , directeur adjoint de la formation continue et les membres de MCB2A, Dr Paul FONTENEAU, Dr Paul NKENG, Dr Philippe DEMUYTER : Merci d'être revenu sur votre décision, cette prise de risque m'a permis de m'épanouir !**

Voila j'ai fais le tour des les labos Strasbourgeois 67 ! Je passe au Thionvillois 57…

Ahhhh Bernard …. Je peux t'appeler Bernard ? … On se connait maintenant ! Merci Dr Capolaghi Bernard, pour avoir cru en moi … dès mon premier stage en 1998 et oui ca remonte à loin. Merci de m'avoir imposé en méthode physique. Vous faites parti des personnes qui m'ont aidé à évoluer. Merci d'avoir toujours dit les choses que je voulais entendre pour avancer. Votre intelligence et votre clairvoyance alliées à une ténacité hors du commun, vous ont toujours fait rebondir même si parfois le sol était vraiment bas. La plongée en eau trouble et la navigation à vue mettent plus d'un homme à genou. Merci d'avoir écouté mes états d'âmes parfois virulentes (mais justifiées). J'espère qu'après notre période Technicien / Biologiste, on pourra aller se boire un café en terrasse et se raconter la vraie histoire. Remerciez pour moi Dr Bernadette HYM et Dr Georges COVI pour leurs petites phrases non officielles qui reboostent ! Merci à Docteur Mohamdi AHMED KHALIFA. Sagesse incarnée. J'ai un grand respect pour vous et pour ce que vous m'avez dit : « Quand les anciens transmettent le flambeau, il faut prendre la flamme et laisser les cendres »… Merci à tous les biologistes …. Et aux petites nouvelles ! Merci a tous mes collègues des « méthodes physiques d'analyses », « de la toxico », « les professeurs ». VOUS m'avez accompagné depuis le début, malgré mes périodes d'absence, mes délires analytiques, mon organisation…Merci Evelyne (La taupe, grand'mère, dudule), Chantal (PASQCHHH), Stéphanie (La Steph, la môman, stephanette), Brigitte (La Briguitta), Carole (Chat-role), Bernard (le nanard à moustache), Jean Noel (le Nono, le petit gris), Roland (Le schmurrrr, Docteur). Merci à tous, on fait une bonne équipe de « Cake ». Merci à ma môman adoptive du laboratoire : Marie Christine (La petite Marie, Mary Poppins) si j'en suis la c'est grâce à toi ! Merci à tous MES collègues du Laboratoire de l'hôpital Bel Air !

Enfin je finirais avec mes proches, ceux qui ont été le moteur de cette formidable aventure. je vais commencer par mes parents…. Mon père Raymond …Tu m'as dit « va le plus haut que tu peux » et maintenant tu n'es plus la, mais tu sais pourquoi j'ai fais tout ca. J'ai rempli mon contrat. Si je suis

comme je suis …. C'est grâce à toi merci pour ton Y ;-) Ma mère Murielle… Tu m'as appris à ne jamais renoncer, et qu'il ne faut jamais abandonner. On la fait ! Merci Môman. Pierrot prend soin de ma mère !, Ma Sœur Nathalie et ses 2 enfants Thomas et Janelle merci de ne m'avoir pas laissé tomber dans les moments difficiles … Hey les Enfants ! Faut travailler à l'école ;-). Cousin Jeff et toute sa famille… et oui je suis un fou ! Mais c'est de famille. Cousin Georges et toute sa famille du bout du monde, Tu es surement **L'ELEMENT CLEF** de mon envie de faire des études ! Merci de ta confiance et pardonne mon absence. Oncle Roland, nos discussions même courtes m'ont toujours aidé. Car tu es un exemple pour moi. Merci, Soraya et Leila mes belles « belle-sœur » qui prennent beaucoup de place dans mon cœur. Mes Amis Kais, Adel et Mustapha, les soupapes de sécurité… mes « frangins » même si y en a qui sont bizarres mais je ne dirais pas qui c'est !

Enfin le Dr Yannis François que j'ai mis dans la catégorie « proche » car tu es passé du statut de tuteur à ami. Quelle formidable aventure ! Pleine de rebondissement ! De suspens ! De cliffhanger de fou ! A la question « Au fait Michael ca te dirais de faire une thèse en CE ? » je répondrai toujours « Oui ». Comme à dit Rabah, nous on a pas fini ! Tu m'as fait découvrir la CE et moi le KFC … et on est allé sur la lune ! Et toi à BECKERHOLZ. Merci Mon POTE !... Merci pour tout ce que tu as fais pour moi, pour nous ! C'est pas mal pour un petit jeune ! Au fait sur ton album Panini de Maitre de Conférence, tu peux cocher (Thésard de 37 ans Chauve, Technicien de laboratoire médicale, Stressé) … tu as le combo, celui la personne ne l'aura ! Merci pour tout !

La dernière qui est pour moi la première (désolé Maman !) c'est ma femme Radhia. Courageuse, Rayonnante, Intrépide, Intelligente, Espiègle. Tu m'as fait confiance, tu as supporté (ou apprécié) mes absences ! Tu as été patiente (ce n'est pas vrai mais je le mets quand même). Merci de m'avoir accompagné, dans ce projet et merci pour l'aventure qui nous attend… Je t'aime. A l'heure ou j'écris ces remerciements, on se connait toujours pas, tu as dois bien entendre ma grosse voix et moi je sais ou tu es … tu vas prendre beaucoup de place dans notre vie, mais pour l'instant tu en prends chez ta mère… A bientôt.

ERRATUM ! Bienvenue à ma princesse ASSIAH, 52 cm 3 Kg 770 ! J'écrirais une autre thèse pour toi ! née le 14 Aout 2014, tu as chamboulé mon timing et ma vie !

Abréviations

1D / 2D	Une dimension / deux dimensions
AcNH4	Acété d'ammonium
ADDC	Antibody dependent cell mediated cytotoxicity
BGE	Electrolyte support
BGE	Tampon électrophorétique
CDC	Complement dependent cytotoxicity
CDR	Complementarity determining region
CE	Electrophorèse capillaire
CE/MS	Couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse
CEC	Electrochromatographie
CID	Dissociation induite par collision
CIEF	Focalisation isoélectrique capillaire
CMC	Concentration micellaire critique
CZE	Electrophorèse capillaire de zone
EACA	Acide Amino Epsilon Caproïque
ECD	Capture d'électrons
EI	Impact électronique
EMA	Agence Européenne du Médicament
EOF	Flux Electro Osmotique
ESI	Ionisation par électronébulisation
ETD	Transfert d'électrons
FAB	FastAtom Bombardement
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fraction crystallizable
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FI	Force ionique
FTICR	spectromètre de masse à transformation de Fourier par résonance cyclotronique d'ion
HC	chaînes lourdes
HPC	Hydroxypropylcellulose
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
HPMC	Hydroxypropylméthylcellulose
HPT	Hauteur de Plateau Théorique
ICD	ion conversion detector
ICR	résonance cyclotronique d'ion
IEF	focalisation isoélectrique
Ig	immunoglobuline
ISD	Ion Source Decay
ITP	isotachophorèse

ITPP	Inositol tri pyrophosphate
LC	chaînes légères
LID	dissociation induite par laser
LIF	fluorescence induite par laser
mAbs	anticorps monoclonaux
MALDI	ionisation par désorption/ionisation laser assistée par matrice
ma_{pp}	mobilité apparente
MCP	microchannel plate
MEKC	chromatographie électrocinétique micellaire
m_{eo}	mobilité électro-osmotique
MS	spectrométrie de masse
nanoESI	nano electrospray
nanoLC	nano chromatographie liquide
PA	Polyacrylamide
PB	Polybrène
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
PEG	polyéthylène glycol
pH	potentiel hydrogène
pI	point isoélectrique
PTM	Modification post traductionnel
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RMN	Résonance magnétique nucléaire
S/N	Rapport signal sur bruit
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS PAGE	Electrophorèse sur gel de Polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
t_{app}	temps de migration apparent
T-ITP	transient-isotachophorèse
TOF	analyseur à temps de vol
v_{eo}	vitesse électro-osmotique

Sommaire

Introduction Générale. 15

CHAPITRE I : Revue Bibliographique 24

1. L'Electrophorèse Capillaire. 24

1.1. L'électrophorèse capillaire de zone (CZE). 28

1.2. Autres méthodes de CE. 32

1.2.1. La focalisation isoélelectrique capillaire (CIEF). 33

1.2.2. La chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC). 35

1.2.3. L'électrochromatographie (CEC). 36

1.2.4. L'isotachophorèse (ITP) et la transient-isotachophorèse (tITP). 37

2. La Spectrométrie de Masse. 40

2.1. Les sources d'ionisations. 42

2.1.1. L'ionisation par électronébulisation (ESI). 42

2.1.1.1. La fission des gouttelettes chargées. 42

2.1.1.2. Le transfert des ions en phase gazeuse. 43

2.1.2. La source nano électrospray (nanoESI). 44

2.1.3. L'ionisation par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI). 46

2.1.3.1. Les mécanismes d'ionisation MALDI. 47

2.1.3.1.1. L'ionisation primaire. 47

2.1.3.1.2. L'ionisation secondaire. 48

2.1.3.1.3. Les règles d'ionisation en MALDI-MS. 49

2.1.3.2. La préparation de l'analyte. 49

2.1.3.2.1. La nature de la matrice. 49

2.1.3.2.2. Les différents types de dépôts. 50

2.1.3.2.2.1. Dépôt goutte séchée (dried droplet). 50

2.1.3.2.2.2. Dépôt couche mince (thin layer). 51

2.2. L'analyseur à temps de vol (TOF). 51

2.2.1. Principe du TOF. 51

2.2.2. Le mode linéaire. 53

2.2.3. Le mode reflectron. 54

2.2.4. L'extraction retardée. 55

2.3. Les détecteurs. 56

2.3.1. Le détecteur MCP (Microchannel Plate). 56

2.3.2. Le détecteur CovalX 57
3. Le couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse (CE/MS) 58
3.1. Les interfaces CE/ESI-MS. 58
3.1.1. Interface coaxiale à liquide additionnel. 59
3.1.2. L'interface à jonction liquide. 61
3.1.3. L'interface sans liquide additionnel « sheathless » 62
3.2. Les interfaces CE/MALDI-MS. 66
3.2.1. Collecte de fractions. 68
3.2.2. Les couplages CE/MALDI-MS. 73
3.2.2.1. Les interfaces CE/MALDI-MS directes. 74
3.2.2.2. Les interfaces CE/MALDI-MS indirectes. 77
3.2.2.2.1. Couplage CE/MALDI-MS indirect avec interface à débit de liquide additionnel. 79
3.2.2.2.2. Couplage CE/MALDI-MS indirect avec interface sans liquide additionnel. 83
3.3. Applications CE/MALDI-MS. 87
4. Analyse protéomique par spectrométrie de masse. 94
4.1. Introduction. 94
4.2. Stratégie Top Down par fragmentation « Ion Source Decay (ISD)». 96
4.2.1. La fragmentation. 96
4.2.2. La fluence ou puissance laser. 96
4.2.3. La matrice. 97
4.2.4. La structure de la protéine. 98
4.3. La caractérisation par Top Down. 98
5. Anticorps monoclonaux 101
5.1. Structure et caractéristiques des anticorps monoclonaux. 102
5.1.1. Utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux. 105
5.2. Utilisation de la spectrométrie de masse pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux. 106
5.2.1. Introduction. 106
5.2.2. Stratégies d'analyses des anticorps monoclonaux. 108
CHAPITRE II : Analyse d'Anticorps Monoclonaux à l'aide d'un Nouveau Couplage CE-UV/MALDI-MS. 126
1. Introduction. 126
2. Article 129
3. Conclusion 148
CHAPITRE III : Caractérisation de protéines entières par enrichissement d'échantillon et stratégie Top Down à l'aide du Couplage CE-UV/MALDI-MS 150

Introduction 150
1. Matériels et méthodes 153
1.1. Réactifs et matériels 153
1.2. Composition d'échantillons 153
1.3. Protocole de digestion à l'IdeS 153
1.4. L'électrophorèse capillaire. 154
1.5. L'interface CE/MALDI-MS. 154
1.6. Collecte de fractions 155
1.7. MALDI-TOF-MS. 156
2. Résultats et discussion. 156
2.1. Etude d'un mélange de 3 protéines. 156
2.1.1. La séparation des 3 protéines 157
2.1.2. Répétabilité de la séparation 158
2.1.3. Collecte de fractions pour l'enrichissement des dépôts. 161
2.1.4. L'enrichissement des dépôts. 162
2.1.5. L'analyse Top Down. 164
2.2. Etude d'un mélange de 5 protéines. 167
2.2.1. Séparation, répétabilité et collection de fractions 167
2.2.2. L'enrichissement 169
2.2.3. L'analyse Top Down. 171
2.3. Etude du digestat IdeS de Cetuximab. 175
2.3.1. Optimisation du dépôt de la matrice 176
2.3.2. L'analyse MALDI-MS. 177
2.3.3. L'analyse Top Down. 180
3. Conclusion 182
CHAPITRE IV : Stratégie à deux dimensions par collection de fraction à l'aide de l'interface du couplage CE-UV/MALDI-MS et infusion nanoESI par CESI-MS pour la séparation et la caractérisation d'isoformes d'anticorps monoclonaux. 186
Introduction 186
1. Matériels et Méthodes 189
1.1. Réactifs et matériels 189
1.2. Composition d'échantillons 189
1.3. Protocole de digestion à l'IdeS 189
1.4. L'électrophorèse capillaire 190

1.5. La collecte de fractions. 191
1.6. L'ESI-MS 191
2. Résultats et discussions. 191
2.1. Optimisation des conditions de séparation des Mabs. 191
2.1.1. Mise en place des conditions « asymétriques » 194
2.1.2. Choix des conditions « $AcNH_4$ ». 197
2.1.3. Choix des Conditions « mixtes». 198
2.2. Collecte de fractions et infusion CESI-MS 200
2.2.1. Collecte de fractions 200
2.2.2. L'infusion CESI-MS 201
2.3. Etude du digestat IDES de Trastuzumab. 201
2.3.1. Infusion par CESI-MS 201
2.3.2. Comparaison méthode de référence HPLC-MS 211
2.4. CETUXIMAB entier. 213
2.4.1. Infusion par CESI-MS 213
2.4.2. Comparaison méthode de référence HPLC-MS 219
3. Conclusion 220
CHAPITRE V : Bioavailability of *myo*-inositol trispyrophosphate (ITPP), a novel allosteric effector of hemoglobin, after oral and parenteral administration in mice assessed by MALDI-TOF mass spectrometry 22424
1. Introduction 224
2. Article 226
3. Conclusion 242
CHAPITRE VI : CEToolbox: Calculateur Spécialisé Pour les Utilisateurs d'Electrophorèse Capillaire sous la Forme d'une Application Androïd 243
1. Introduction 243
2. Article 245
3. Conclusion 253
Conclusion générale 254
ANNEXE.1 255

Introduction Générale.

Parmi les nombreuses molécules physiologiques, les protéines font partie des composants primordiaux du domaine biologique. Elles sont l'aboutissement ultime du processus de transcription de l'ADN en ARN puis de la traduction de l'ARN en polypeptides. Les protéines jouent un rôle primordial dans la vie de l'organisme grâce à leurs fonctions de structure, de mobilité, de catalyse, de protection ou de défense[1].

Nombre d'entre elles sont identifiées comme des actrices majeures des voies de régulation biologique et apparaissent souvent comme des marqueurs d'activités biologiques. De nombreuses maladies et dysfonctionnements physiologiques sont directement liés à une mutation ou une modification des édifices peptidiques. Que ce soit d'un point de vue de leur structure primaire, secondaire ou tertiaire, la moindre incohérence peut engendrer de graves conséquences métaboliques ou constitutionnelles. Dans certaines conditions, l'apparition ou la disparition d'isoformes annoncent les prémices ou l'évolution d'un dysfonctionnement biologique. Parallèlement, les biotechnologies ont su profiter de certaines catégories de protéines, comme les immunoglobulines ou anticorps, en les utilisant comme de formidables outils thérapeutiques[2] pouvant servir d'alternatives à l'arsenal médicamenteux classique.

Que ce soit pour comprendre leurs structures, leurs rôles, leurs utilités ou pour les synthétiser, les contrôler ou les améliorer, les protéines exigent un besoin d'identification, de caractérisation et de quantification de plus en plus poussé. La possibilité d'identifier ou de déterminer avec précision leurs infimes caractéristiques est devenue un objectif majeur pour les sciences analytiques.

De nos jours, la quasi-totalité des méthodes analytiques sont mises en œuvre dans l'étude des protéines. De la simple spectrophotométrie UV, à des techniques beaucoup plus poussées comme la microscopie à transmission ou la RMN, l'arsenal analytique permet d'obtenir une importante quantité d'informations. Cependant, la complexité croissante des systèmes protéiques, en termes de poids moléculaire, de concentration, d'interaction ou même de mélange, repousse sans cesse les besoins et les performances des méthodes développées.

Aujourd'hui, l'une des méthodes référence pour l'identification, la caractérisation et la quantification de protéines est la spectrométrie de masse (MS) [3]. Ce système de détection est le plus généralement couplé à une méthode séparative en veine liquide telle que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Le développement du couplage HPLC/MS, aussi noté LC/MS, a permis d'améliorer l'analyse des protéines notamment en permettant d'obtenir des informations de séquences et de structures[4] de plus en plus précises. Techniquement, le couplage LC/MS est le plus communément utilisé car il permet d'obtenir des analyses très reproductibles avec une bonne résolution. De plus la facilité de mise en place du couplage avec un collecteur de fraction pour un couplage MS à source désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) ou directement dans la source pour un couplage MS à source électrospray (ESI) est un facteur majeur du bon développement de ce système. En effet, les techniques chromatographiques liquides sont particulièrement adaptées au couplage avec la MS, car l'interface LC et MS est basée sur l'application d'un débit constant permettant d'obtenir relativement facilement et par simple électronébulisation un spray stable. La LC/MS est aujourd'hui la méthode de référence pour la caractérisation de mélange protéique. Cependant, une méthode ne permet pas de répondre au besoin infini d'une telle caractérisation. Une alternative majeure au couplage LC/MS est l'utilisation de l'électrophorèse capillaire (CE) en tant que méthode séparative en remplacement de l'HPLC. La CE est une méthode électrophorétique en veine liquide permettant de réaliser des séparations rapides, de très haute efficacité et de haute résolution. C'est une technique de choix pour la caractérisation de protéines, notamment pour la recherche de glycoprotéines. Principalement couplé avec des détections UV, fluorimétrique (LIF) ou électrochimique (ampérométrie), la CE est basée sur la migration d'espèces chargées sous l'effet d'un champ électrique. Cependant, les propriétés intrinsèques de la CE comme des électrolytes supports (BGE) de fortes forces ioniques ainsi que la nécessité de maintenir le courant tout au long de la séparation, font du couplage CE/MS, un système compliqué à mettre en place. En effet, le détecteur MS est très sensible à la présence de sels qui peut provoquer des phénomènes de suppressions d'ions. De plus, contrairement à la LC/MS, la séparation en CE/MS doit impérativement conserver le courant électrique ce qui complique la géométrie de l'interface entre les deux technologies. Cependant, malgré ces problèmes techniques, le couplage de la CE avec la MS apparait aujourd'hui comme un système très attractif permettant de grandes avancés dans de nombreux domaines de recherche tels que la protéomique ou l'analyse de protéines entières[5,6].

Depuis la fin des années 1980, un grand nombre d'interfaces CE/MS ont été développées. Du à son caractère direct, c'est-à-dire intégré à la source MS, le couplage CE/ESI-MS a été fortement implanté. En effet, la source ESI permet d'ioniser en phase gazeuse les composés chargés ou polaires présents dans un milieu liquide, comme le BGE. De ce fait, l'ESI est parfaitement adaptée pour le couplage avec la CE et s'impose tout naturellement comme la source d'ionisation la plus employée pour ce type d'association. Afin de permettre le maintien du courant tout au long de la séparation, trois types d'interfaces basées sur des principes différents ont été décrits : l'interface coaxiale à liquide additionnel dite « Sheath liquid », l'interface à jonction liquide dite « Junction liquid » et l'interface sans liquide additionnel dite « Sheathless ». Récemment, trois équipes de recherche ont mis en évidence la grande complémentarité des approches LC/ESI-MS et CE/ESI-MS pour l'étude protéomique de mélanges complexes. En effet, les différences de principe de séparation basé pour la LC sur des équilibres d'hydrophobicité et pour la CE sur un ratio charge sur masse, permet d'obtenir dans les deux cas des peptides différents. L'avantage principal de la CE est que cette méthode permet d'obtenir dans une même séparation des peptides hydrophiles et/ou de haut poids moléculaire. Ces mêmes peptides sont souvent « perdus » en LC soit dans le volume mort, soit pour cause de trop forte rétention sur la phase stationnaire.

Cependant, l'une des limites majeures du couplage CE/ESI-MS est que la nature du BGE (présence de sel, volatilité) peut affecter fortement la stabilité du spray et donc limiter le nombre de milieux de séparations compatibles avec l'ESI-MS. La source MALDI est une technologie MS qui présente une meilleure tolérance en présence de sels ou de détergents. Le couplage CE/MALDI-MS représente donc une alternative intéressante au couplage CE/ESI-MS. Depuis la fin des années 1980, une grande variété d'interfaces ont été développées. Concernant les procédés permettant de maintenir le courant tout au long de la séparation, la quasi-totalité des interfaces reprennent les principes physiques du couplage de la CE avec une source ESI, à savoir l'utilisation d'un liquide additionnel coaxial, la jonction liquide ou l'utilisation d'un capillaire conducteur. En ce qui concerne la réalisation de dépôt solide, principe fondamental du MALDI, cet impératif a conduit au développement de deux types de couplages distincts : le couplage direct, avec un dépôt à l'intérieur de la source, suivi d'une étape de cristallisation intégrée et le couplage indirect, avec une étape de dépôt sur cible hors de la source et une étape de passage manuel ou automatisé de la cible dans la source. Quelques équipes de recherche ont réalisé le couplage direct en faisant un lourd développement instrumental, notamment en modifiant la source MALDI. La très forte demande d'ingénieurie n'a pas aidé au développement de ce

type de couplage. Parallèlement au couplage direct, le couplage indirect a été réalisé. Cette stratégie, plus facile à mettre en œuvre, ne fait pas intervenir de modifications instrumentales sur le MALDI-MS. De plus, le caractère indirect ouvre de nouvelles voies dans le domaine du traitement de l'échantillon. En effet, le fait de fractionner l'échantillon permet de le retraiter (enrichissement, digestion enzymatique, dérivation chimique…) indépendamment avant analyse en MALDI ou même de le déposer sur différents supports : plaque PCR, capillaire creux, membrane greffée ou cible MALDI.

Cependant, malgré le fait que la quasi-totalité des interfaces CE/MALDI-MS soit efficace et robuste, aucune d'entre elles n'est automatisable et commercialisée ce qui rend ce couplage confidentiel par rapport au couplage LC/MS. Malgré cela, un grand nombre de publications ont été recensées montrant l'intérêt grandissant pour ce couplage, particulièrement pour l'étude de protéines entières ou digérées.

Lors de ce travail de thèse présenté dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés à la mise en place au laboratoire d'un couplage indirect CE/MALDI-MS totalement automatisable dans le but de développer de nouvelles méthodologies analytiques permettant la caractérisation fine de protéines entières et particulièrement l'application aux anticorps monoclonaux (mAbs).

Dans ce contexte, une étude bibliographique, décrite dans le chapitre 1, a été réalisée afin de disposer des informations nécessaires à la compréhension des problématiques qui pourraient se présenter lors de la mise en place de ce couplage CE/MS. Après un rappel des principes fondamentaux de la CE et de la MS, les différentes interfaces utilisées pour ce couplage ainsi que les diverses applications réalisées seront décrites. Une attention particulière sera donnée à l'étude bibliographique des mAbs.

La première partie de mon travail de thèse, décrite dans le chapitre 2, a été consacrée au développement et à l'installation au laboratoire du couplage CE/MALDI-MS. Aujourd'hui, il n'existe aucun système commercial permettant de coupler la CE avec une détection MALDI-MS. Ce constat confère un caractère « homemade » des interfaces décrites dans la littérature et implique un manque d'automatisation du système. Dans le chapitre 2, nous avons développé le premier couplage CE-UV/MALDI-MS/MS avec système de dépôt de matrice totalement automatisé. En effet, plusieurs évolutions ont été réalisées pour rendre ce couplage robuste, autonome et polyvalent. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur la modification de deux systèmes commerciaux. Afin de contrôler la séparation électrophorétique, la cellule UV originelle de l'appareil de CE a été déportée pour permettre simultanément la détection UV et la collection de fractions. Ceci permet d'éviter l'ajout

d'un spectrophotomètre UV externe. De plus, nous avons détourné les possibilités de l'appareil de CE d'appliquer simultanément une différence de potentiel et de pression, pour développer un système permettant de déposer la matrice directement après le dépôt de l'échantillon. Pour cela, une modification de la cartouche CE a été optimisée afin de rendre le couplage universel en termes de mode de dépôt MALDI. Ainsi, la séparation, le suivi UV, la collecte de fractions et l'adjonction de matrice sont automatisés et pilotés par seulement deux logiciels. Le caractère polyvalent du système est conféré par la possibilité de déposer sur tout type de support et d'élaborer tout type de dépôt quel que soit la stratégie analytique. Les performances du système ont été évaluées avec la séparation d'un mélange de 5 protéines entières ainsi qu'un digestat trypsique de 9 protéines. Une comparaison avec le couplage référence LC/MS a été réalisée sur l'approche de peptide mapping. Enfin, dans le but de confirmer les performances du système pour la séparation de protéines entières de haut poids moléculaire, l'application à la séparation de mAbs intacts et digéré a été réalisée à l'aide du couplage CE-UV/MALDI-MS.

Dans le troisième chapitre de ce manuscrit, nous avons décrit le premier couplage CE/ collecte de fractions pour l'enrichissement et l'analyse de protéines entières par Top Down. En effet, l'approche analytique Top Down fait partie des nombreuses stratégies qui permettent la caractérisation des protéines. Elle donne la possibilité d'étudier les protéines entières. Cette technique, couramment utilisée en couple LC-MS, nécessite pureté et quantité d'analytes pour caractériser précisément les résidus d'acides aminés et ainsi obtenir une séquence caractéristique de la protéine. Cependant, lors d'analyse d'échantillons de haut poids moléculaire ou de mélange complexes, les techniques de références peinent à fournir des séparations suffisamment résolutives. En effet, nous avons vu dans le chapitre 2 que la nouvelle interface CE MALDI permettait non seulement d'effectuer des séparations résolutives, robustes et répétables, mais aussi d'élaborer des fractions pures et des dépôts MALDI précis. Partis de ces constats, nous avons décidé de bénéficier de ces avantages dans le but d'aboutir aux degrés de pureté et de quantités d'analytes nécessaires à l'analyse Top Down. Pour cela, nous avons mis au point une stratégie d'enrichissement de fraction par séparation et collecte successives. Ainsi, nous avons évalué la très bonne répétabilité du processus sur deux échantillons de concentrations et de compositions en protéines modèles différentes, dans deux conditions électrophorétiques différentes et sur deux supports de collectes différents (plaque PCR et MALDI). Nous avons démontré la robustesse du système en multipliant les séparations sans dégradation électrophorétique afin d'enrichir les fractions contenant les protéines séparées. Ce processus a été

confirmé par la visualisation de l'augmentation successive des quantités de protéines dans les fractions par analyse MALDI MS, jusqu'à atteindre les quantités d'analytes nous permettant d'obtenir un spectre Top Down et l'identification d'une partie non négligeable de la séquence des protéines. Grâce aux résultats très encourageants sur des protéines modèles, nous avons appliqué ce protocole d'enrichissement et d'analyse à la caractérisation d'anticorps monoclonaux partiellement digérés.

Le quatrième chapitre de ce manuscrit décrit l'application d'une stratégie inédite et originale à deux dimensions pour la séparation et la collecte par la nouvelle interface CE/MALDI-MS et l'infusion et la détection par le nouveau nanosprayeur CESI-MS couplé à micro-QTOF. Cette nouvelle stratégie a été appliquée pour la caractérisation des anticorps monoclonaux, avec la recherche et l'identification des isoformes ou des modifications post traductionnelles. Ce travail a été effectué avec la collaboration du Centre immunologique PIERRE FABRE et du Dr Alain BECK, pour la mise à disposition des échantillons, et le conseil scientifique. En effet, actuellement l'industrie pharmaceutique confectionne et produit des anticorps à visée thérapeutique. Que ce soit pour l'élaboration, le suivi de production, le contrôle qualité ou les essais cliniques, les industriels font face à la problématique de la caractérisation toujours plus poussée des anticorps monoclonaux. La connaissance du produit final permet d'évaluer le bon déroulement de la production mais aussi de recenser les isoformes pouvant fortement influencer la réponse thérapeutique. C'est pourquoi, l'analyse d'édifice protéique d'environ 150 000 daltons exige des solutions analytiques sensibles. Parmi les solutions utilisées dans les laboratoires de contrôle qualité, la CE propose des solutions commerciales pour la détection d'isoformes. En s'inspirant de l'une d'elle nous avons établi un protocole original de séparation/collecte des variants de charges de mAbs, dans des conditions de BGE dite « asymétriques » ou « mixtes ». Ces nouvelles conditions électrophorétiques ont été imaginées en partant du constat de la modification du BGE par le liquide additionnel et de l'influence consécutive sur la séparation électrophorétique dans les couplages CE-ESI MS. Ainsi nous avons décidé d'utiliser les conditions « asymétriques » et « mixtes » consistant à l'emploi de BGE très différentes en entrée et en sortie de capillaire. Nous avons alors pu bénéficier des atouts du BGE d'entrée riche et complexe nécessaire à la séparation résolutive des mAbs tout en collectant les analytes dans un BGE différent et compatible avec l'ESI-MS. Et ce sont ces conditions originales qui nous ont permis de détecter, d'identifier et de caractériser des variants de charges de mAbs entiers et partiellement digérés grâce à la très grande sensibilité du nouveau nanosprayeur sheathless CESI-MS de la société ABSIEX.

Le cinquième chapitre décrit un projet initié lors de mon stage de Master 2 Chimie Biologie : Aspects analytiques appliqués aux biotechnologies et à l'environnement à l'Université de Strasbourg. Cette étude en collaboration avec Dr Aurélie Même et la Société Normoxys a pour objet la mise au point d'un protocole de dosage sanguin à l'inositol-tri-pyrophosphate (ITPP) par MALDI-TOF MS. En effet, l'ITPP a été identifié comme un ligand allostérique de l'hémoglobine permettant de stabiliser la forme non oxygénée de l'hémoglobine : la désoxyhémoglobine. Cette propriété confère à la molécule un pouvoir thérapeutique majeur en oncologie, en favorisant l'hypoxie et le blocage de l'angiogénèse. La première partie de notre étude a consisté à s'assurer de la détection de l'ITPP par MALDI-MS et ce, malgré sa faible masse molaire (604.8 Da). Ensuite, nous avons mis au point un protocole d'extraction par échange d'ions afin de simplifier le spectre de masse en éliminant les adduits. Enfin, une calibration et une évaluation de la LOD ont permis de mesurer les concentrations plasmatiques en fonction du mode de la voie d'administration chez la souris. Ces données ont permis d'envisager le suivi pharmacocinétique lors d'étude clinique.

Enfin la sixième partie de mon manuscrit sera consacré au dernier projet que j'ai eu l'occasion de réaliser pendant ma thèse. Ce travail a consisté à développer en collaboration avec le Dr. Jérôme Pansanel, Ingénieur de Recherche CNRS en informatique à l'IPHC (Strasbourg), une application Androïd permettant de calculer de nombreuses grandeurs physiques relatives à une séparation électrophorétique (volume d'injection, champ électrique, concentration, viscosité, conductivité…). Cette application nommée CEToolbox a pour but d'aider l'utilisateur de CE au jour le jour en lui permettant d'obtenir toutes les informations utiles en quelques clics sur une tablette ou sur un Smartphone. Aujourd'hui, la version 1.0 de CEToolbox est disponible sur Google Play et une mise à jour de la version 2.0 est prévue.

---

[1] Engelbert BUXBAUM, *Fundamentals of Protein Structure and Function*, Springer, 2007.

[2] Janice M. REICHERT, « Antibodies to watch in 2014 », *mAbs*, 1 janvier 2014, vol. 6, n° 1, pp. 5‑14.

[3] John R. YATES, Cristian I. RUSE et Aleksey NAKORCHEVSKY, « Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications », *Annual Review of Biomedical Engineering*, août 2009, vol. 11, n° 1, pp. 49‑79.

[4] Irina NEVEROVA et Jennifer E. VAN EYK, « Role of chromatographic techniques in proteomic analysis », *Proteomic Databases Part III*, 5 février 2005, vol. 815, n° 1–2, pp. 51‑63.

[5] Claudia DESIDERIO, Diana Valeria ROSSETTI, Federica IAVARONE, Irene MESSANA et Massimo CASTAGNOLA, « Capillary electrophoresis–mass spectrometry: Recent trends in clinical proteomics », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, décembre 2010, vol. 53, n° 5, pp. 1161‑1169.

[6] Bryan R. FONSLOW et John R. YATES III, « Capillary electrophoresis applied to proteomic analysis », *Journal of Separation Science*, avril 2009, vol. 32, n° 8, pp. 1175‑1188.

CHAPITRE I : Revue Bibliographique

1. L'Electrophorèse Capillaire.

Les sciences séparatives sont aujourd'hui dominées par deux grands principes : la chromatographie et l'électrophorèse. La chromatographie a pris une place prédominante dans de nombreux domaines tels que l'analyse de biomolécules[1]. Cependant l'électrophorèse, technique dont les principes furent énoncés bien avant la chromatographie[2] , apparaît comme une technique de choix à l'analyse de composés biologiques[3] et particulièrement à la protéomique[4].

Le principe de l'électrophorèse repose sur un phénomène simple. Fondamentalement, toutes séparations électrophorétiques résultent de la possibilité de faire migrer, dans un milieu conducteur et sous l'action d'un champ électrique, les espèces à séparer à différentes vitesses. C'est la vitesse électrophorétique exprimée suivant l'équation suivante :

$$v_i = m_i E$$

Où v_i est la vitesse linéaire constante, m_i la mobilité électrique, E le champ électrique uniforme.

Ce phénomène électrophorétique a permis de mettre au point diverses techniques basées sur ce principe de migration. Deux grands groupes se démarquent en fonction du type du milieu conducteur et du support de migration. D'un côté, l'électrophorèse en gel (amidon, polyacrilamide ou agarose...) et de l'autre côté, l'électrophorèse en veine liquide (électrolyte support (BGE)).

Concernant l'électrophorèse en gel, diverses évolutions ont été mises au point en modifiant le type de gel utilisé en fonction de la facilité de réalisation et surtout du pouvoir résolutif. Dans le but d'obtenir une résolution maximale, deux méthodes ont été développées : le gel de polyacrilamide (SDS PAGE)[5]et la focalisation isoélectrique (IEF)[6].

La séparation en gel de polyacrilamide permet de séparer les composés en fonction de leur masse moléculaire. Le polyacrilamide, agissant comme un tamis moléculaire, la concentration en gel permet d'augmenter le pouvoir résolutif[7]. L'IEF de son coté, permet d'effectuer une séparation très fine des

molécules en fonction de leur point isoélectrique (pI).Cette séparation est possible grâce à la présence d'ampholytes supports ajoutés dans le tampon de séparation. Sous l'effet du courant électrique, les ampholytes s'organisent en fonction de leur propre pI créant un gradient de pH. Les composés à analyser sont ainsi focalisés et séparés suivant leur pI. Le pouvoir résolutif peut être augmenté en fonction du type d'ampholyte et de leur concentration[8].

Réalisées indépendamment, ces méthodes sont appelées électrophorèse en gel 1D. Cependant, le caractère complémentaire de ces deux méthodes et la possibilité de les mettre en place de manière successive sur le même gel a permis le développement de l'électrophorèse en gel 2D. Une première étape d'IEF est réalisée ce qui correspond à la première dimension de la séparation puis une étape de SDS-PAGE pour la seconde dimension. Cette méthode assez contraignante à effectuer est particulièrement utilisée pour séparer des échantillons protéiques complexes et potentiellement similaires. Cet enchainement permet de réaliser des séparations très résolutives. Cependant, elle nécessite une rigueur d'exécution dans toutes les étapes de réalisation et surtout un lourd traitement des résultats.

Alternative aux techniques en plaques, l'électrophorèse en veine liquide a été mise au point en 1937 par Tiselius[9]. Au début des années 1980, Hjerten *et al*. ont mis au point la première séparation électrophorétique dans un tube de 300 µm de diamètre interne[10]. Par ces découvertes est née l'électrophorèse capillaire (CE). La CE connaitra ensuite un réel développement avec la commercialisation d'instruments performants et automatisables.

Basée sur les principes fondamentaux de l'électrophorèse, la CE est une technique séparative mettant en jeu la migration différentielle de composés à l'intérieur d'un capillaire rempli d'électrolyte et soumis à un champ électrique.

En 1981, Jorgenson *et al*. ont montré que l'utilisation de capillaire de faible diamètre interne (<100 µm) permet de réaliser des séparations sous très haute tension[11] (>10 kV). En effet, plus le diamètre est réduit, moins l'intensité du courant est importante ce qui implique une limitation des phénomènes d'échauffement (effet Joule) et donc évite toutes dégradations chimiques à l'intérieur du capillaire.

De ce fait, en ayant la possibilité d'augmenter l'intensité du champ électrique, l'accès à des séparations plus rapides devient envisageable. Les autres avantages à la miniaturisation de la CE sont la faible consommation d'échantillons et de BGE requis pour les séparations électrophorétiques, la haute

résolution et la très grande efficacité de pic. Par ailleurs, l'automatisation des différentes étapes de l'analyse telles que le conditionnement, l'injection ou la séparation, ont été des atouts majeurs pour le développement de systèmes commerciaux. Ceci a permis dès 1988, la commercialisation du premier système (the late Bob Brownlee's company, Microphoretics)[12]. Depuis, de nombreux systèmes automatisés ont vu le jour permettant d'être toujours plus performants dans le maintien du courant, du volume d'injection et du couplage avec des systèmes de détections.

Depuis la fin des années 1980, la CE et ses applications ont connu un développement considérable. Les améliorations réalisées en termes de méthodes d'injection, de modification de la paroi interne des capillaires afin d'éviter d'éventuelles phénomènes d'adsorptions, ainsi que l'introduction de nouveaux milieux de séparation, ont permis le développement de la CE pour de nombreuses applications[13] chimiques[14], biologiques[15,16] et environnementales[17]. Ces améliorations constantes ont permis d'adapter des techniques de séparations électrophorétiques telle que l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), l'isotachophorèse (ITP), la focalisation isoélelectrique capillaire (CIEF), l'électro chromatographie (CEC) et l'électrophorèse capillaire sur gel (CGE).

Le développement de la CE, en tant qu'outil analytique fiable et robuste, est le résultat des avancées faites en matière de détection et d'identification. Avec des diamètres internes de capillaires conventionnels (<100µm) et des volumes d'injection généralement de l'ordre de 1 à 10 nL, des limites de détections inférieure à 10^{-6} M sont obtenues. De plus, les limites de détections peuvent être substantiellement améliorées en utilisant des méthodes électrophorétiques de préconcentrations des échantillons durant l'étape d'injection. En outre, dans un besoin croissant de sensibilité dans l'analyse d'échantillons dilués ou de complexité en constante augmentation, différents modes de détections ont été adaptés à la CE comme alternative ou complément à la détection UV-Visible. Le tableau 1 donne les principaux systèmes de détection en couplage avec la CE et leur limite de détection respective[18].

Detection technique	LOD (M)
Direct absorbance	10^{-5}–10^{-6} (standard pathlength) 10^{-6} (extended pathlength)
Indirect absorbance	10^{-5}–10^{-6}
Photothermal refraction	10^{-7}–10^{-8}
Direct on-column LIF	$< 10^{13}$ (chemical derivatization) 10^{-10}–10^{-11} (native)
Post-column LIF	10^{-16} (single molecule)
Indirect LIF	10^{-5}–10^{-7}
Potentiometric	10^{-7}–10^{-8}
Conductivity	10^{-7}–10^{-8}
Amperometric	10^{-7}–10^{-8}
Refractive index	10^{-5}–10^{-6} (capillary) 10^{-5} (chip-scale)
Raman	10^{-3}–10^{-6} (preconcentration needed)
Radiofrequency (NMR)	10^{-3}
Radioisotope	10^{-10}
Laser-induced capillary vibration	10^{-8} (chemical derivation) 10^{-5} (native)
Mass spectrometry	10^{-7} – 10^{-8}

Tableau 1**. Liste des détecteurs et leurs limites de détections respectives, compatible avec l'électrophorèse capillaire (tableau repris de la publication de Swinney et Bornhop 2000)*[18]Erreur ! Signet non défini.***

Les systèmes de détections peuvent être intégrer suivant différentes configurations : directement sur le capillaire (On column) ou en dérivation (Off column). Par défaut, tout système commercial possède un détecteur UV/Vis ou un détecteur à barrette de diodes. Alternativement à ces deux détecteurs, les systèmes de détections le plus décrit dans la littérature sont la détection par conductimètrie/ampèrometrie[19,20], par fluorescence induite par laser (LIF)[21,22] et par spectrométrie de masse (MS)[23,24,25,26,27,28,29,30].

La détection MS est non seulement une technologie très sensible mais elle donne accès à la masse précise des analytes ainsi qu'à des informations de structure. Aujourd'hui, la MS est devenue l'une des technologies de choix pour l'analyse des échantillons complexes et notamment pour l'analyse protéomique[31,32,33]. C'est donc naturellement que le couplage CE/MS s'est énormément développé depuis la fin des années 1980 passant d'un caractère « home made » à une première interface commerciale en 1988 par la société Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). On trouve

actuellement une grande diversité dans les couplages CE/MS avec un grand nombre de sources et d'analyseurs MS couplés à la CE dans le but d'être adaptable aux analyses requises.

Dans le cadre de mon travail de thèse sur le développement du couplage CE/MS à source d'ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI), nous avons principalement travaillé sur des techniques en CZE. Dans cette étude bibliographique, je détaillerai donc plus particulièrement son principe. Par ailleurs, j'énoncerai plus succinctement les autres techniques de séparations mettant en jeu la CE (CIEF, CEC, MEKC et tITP).

1.1. L'électrophorèse capillaire de zone (CZE).

La CZE est considérée par certains comme le principe de séparation sous champs le plus simple[34]. En effet, la CZE reprend le principe fondamental de l'électrophorèse. La CZE permet de séparer les espèces chargées grâce à deux mécanismes : l'électromigration et l'électro-osmose (EOF).

L'électromigration correspond au déplacement de toute espèce chargée dans un champ électrique. La vitesse acquise par un ion est fonction du champ électrique appliqué et de la mobilité électrophorétique ainsi définie :

$$v_{ep} = m_{ep}E = m_{ep}\frac{V}{L}$$

Où v_{ep} est la vitesse électrophorétique, m_{ep} la mobilité électrophorétique, E le champ électrique, L la longueur du capillaire et V la différence de potentiel appliquée à ses extrémités.

La mobilité électrophorétique d'une espèce chargée est fonction de sa charge et de sa taille. Ainsi, un ion sera d'autant plus mobile que sa charge est élevée et que sa taille est faible, c'est-à-dire que sa densité de charge est élevée. C'est ce principe qui assure la séparation des espèces chargées (fig1).

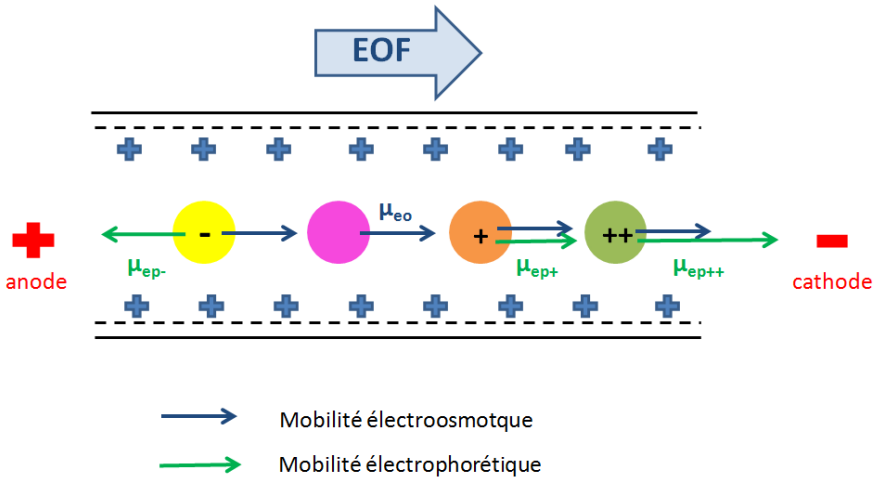


Figure 1. *Représentation schématique du principe de séparation en électrophorèse capillaire de zone.*

A ce premier phénomène, s'ajoute celui de l'électro-osmose. Le capillaire étant constitué de silice vierge non désactivé, cela donne lieu à un écoulement électro-osmotique cathodique (figure 1). En effet, l'EOF est un phénomène résultant de l'existence d'une double couche de charges électriques à l'interface entre la silice vierge et le tampon de séparation.

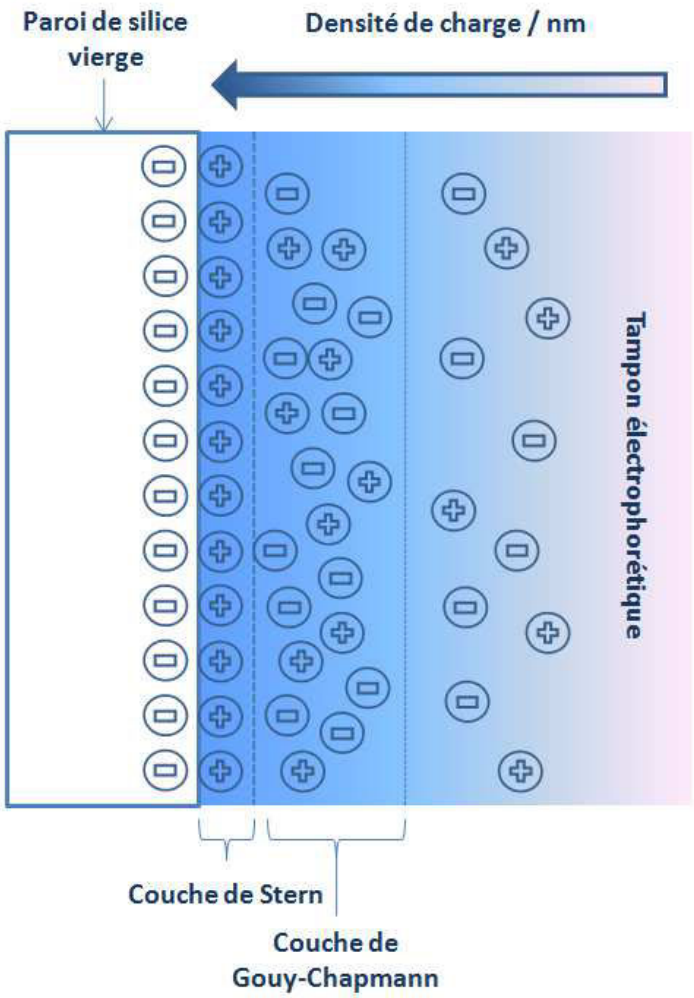


***Figure 2**. Organisation des charges à l'intérieur d'un capillaire de silice vierge*

Une première couche fixe, appelée couche de Stern, est constituée de charges de signes opposés fournies par les ions excédentaires du BGE. Le reste des charges excédentaires constitue une seconde couche, appelée couche de Gouy-Chapmann, plus diffuse. A l'application d'un champ électrique, la première couche constituée d'interactions fortes reste fixe. Par contre, la seconde couche se met en mouvement dans la direction déterminée par la charge (figure 2).

Ce phénomène crée un véritable "tapis roulant" de charge provoquant l'entrainement par friction des molécules neutres du solvant. Elle est définie par la mobilité électro-osmotique m_{eo} en fonction des caractéristiques de l'interface entre le liquide et le solide. Lorsque la densité de charge de surface du solide est nulle alors la charge à la surface du capillaire est négative et la mobilité est positive. On a

donc un sens de migration cathodique (sens des cations.) Inversement, si la charge est positive on a un déplacement des anions donc un sens de migration anodique.

La vitesse d'écoulement électro-osmotique v_{eo} est régit par la loi de Helmotz Smoluchowski.

$$v_{eo} = m_{eo} E = -\frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} E$$

Où v_{eo} est la vitesse électro-osmotique, m_{eo} la mobilité électro-osmotique, E le champ électrique, ε_r la permittivité relative du solvant, ε_0 la permittivité du vide, η la viscosité du solvant et ξ le potentiel Zeta.

Sur la figure 1 est représenté un capillaire de silice vierge, l'EOF est négatif. Ceci est dû aux silanols résiduels. L'EOF est un paramètre de séparation primordial afin d'accélérer les séparations électrophorétiques et/ou d'améliorer la résolution. Plusieurs paramètres, tels que le pH ou la force ionique (FI) du BGE, influent sur la valeur de l'EOF. En effet, les propriétés acido-basiques des groupements silanols impliquent une variation de la densité de charge à la surface interne du capillaire suivant la valeur du pH du BGE. Si le pH du BGE augmente, les silanols se dissocient accentuant la valeur de l'EOF (Fig 3). Concernant la force ionique (FI), si la FI diminue, l'épaisseur de la double couche diminue et l'EOF ralentit. Ainsi, les conditions de pH et de FI des tampons affectent l'EOF afin d'influer sur la séparation électrophorétique (Fig 3).

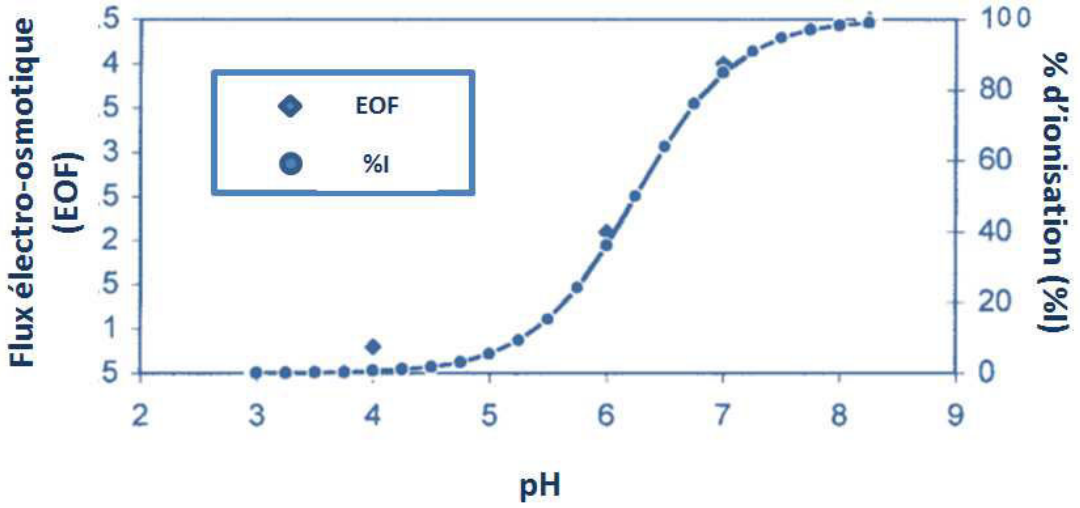


***Figure 3**. Variation de l'EOF et du pourcentage d'ionisation des silanols d'un capillaire vierge en fonction du pH du tampon électrophorétique*

Cependant, il est parfois nécessaire d'inverser voire d'annuler complètement l'EOF afin d'améliorer les séparations électrophorétiques. L'un des moyens le plus souvent mis en œuvre ces dernières années a été de modifier la surface des capillaires soit par des greffages physiques (Hydroxypropylcellulose HPC, Polyacrylamide PA, Polyéthylène glycol PEG[35]...) soit par des greffages dynamiques (Polybrène PB, Hydroxypropylméthylcellulose HPMC…)[36,37,38].

Au final, le principe de la CZE repose sur le fait qu'une espèce qui migre sous champ électrique, au sein du capillaire, a donc une mobilité apparente ma_{pp} reliée au temps de migration t_{app} mesurables. Ils sont la somme algébrique de la mobilité électrophorétique et de la mobilité électro-osmotique :

$$m_{app} = \frac{l\ L}{t_{app} V} = m_{ep} + m_{eo}$$

Où l est la longueur à la détection, L est la longueur total du capillaire

1.2. Autres méthodes de CE.

Aujourd'hui, la CZE est le mode de séparation le plus couramment utilisé notamment dans les applications en CE/MS. Cependant, la CE est une technique extrêmement modulable. En effet, l'absence de phase stationnaire dans le capillaire permet une grande liberté dans les conditions de séparations. Plusieurs modes d'électrophorèses ont donc été développés dans le but d'améliorer ou même de réaliser des séparations de composés non séparables en CZE ou par des méthodes chromatographiques classiques.

1.2.1. La focalisation isoélelectrique capillaire (CIEF).

En 1985, Hjerten *et al*. ont démontré, que pour améliorer la résolution d'une séparation de protéines, il est possible d'utiliser une technique permettant de les séparer grâce à leur charge et leur point isoélectrique dans un gradient de pH : c'est naissance de la CIEF[39,40].

Basé sur le même principe que l'IEF, l'établissement d'un gradient de pH en veine liquide nécessite l'utilisation de petits peptides synthétiques : les ampholytes. Sous l'effet d'un courant électrique appliqué à un anolyte acide et un catholyte basique, les ampholytes s'ordonnent selon leur pI permettant de créer des zones de pH à l'intérieur du capillaire. La mise en œuvre de la séparation par CIEF comporte le plus souvent deux étapes successives : la focalisation et la mobilisation (Fig 4).

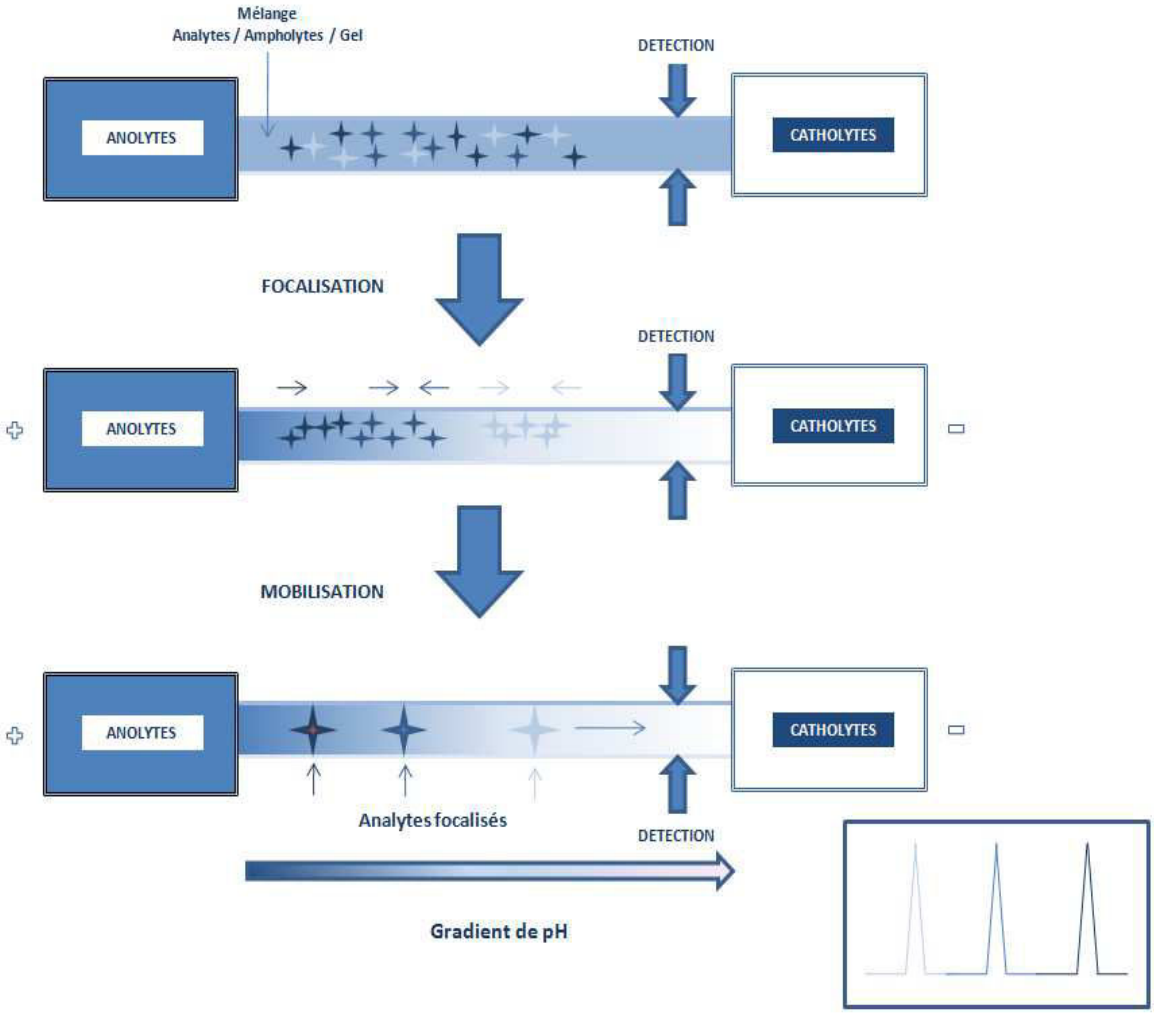


***Figure 4**. Principe et étapes de la CIEF*

La focalisation est le phénomène qui va permettre aux analytes de se séparer et de s'immobiliser dans la zone de pH correspondant à leur pI. Dans la majorité des cas les phénomènes de diffusions et d'adsorptions des biomolécules sont neutralisés en modifiant les parois internes du capillaire par greffage. Ceci à pour effet d'annuler l'EOF. Pour les biomolécules, la limitation de la focalisation vient du fait qu'à leur pI, les protéines ont tendances à précipiter et à entraîner le bouchage du capillaire. Il faut donc limiter la période de focalisation pour éviter ce phénomène.

Une fois la focalisation effectuée, il faut mobiliser les analytes afin qu'ils puissent passer devant le détecteur. La technique de mobilisation la plus courante est la mobilisation hydrodynamique. Elle consiste en un déplacement physique (par pression, contre pression ou dénivellation) afin de diriger l'ensemble gradient de pH/analytes vers la détection. Cette simple pression peut altérer la séparation à cause du phénomène de dispersion. Toutefois, il est possible d'améliorer la résolution en maintenant le champ électrique tout au long de la mobilisation[41,42].

Concernant le couplage de la CIEF avec une détection MS, la présence d'ampholytes pouvant provoquer des effets de suppression d'ion est la principale limitation. Aujourd'hui, dûe à une meilleure tolérance à la présence de sels de la source MALDI, la majorité des applications ont été développées à l'aide d'un couplage CE/MALDI-MS[43]. Cependant, il a été démontré en 2005 par Busnel *et al*. et plus récemment par Mokaddem *et al*., qu'il est possible malgré les limitations, de réaliser des applications à l'aide d'un couplage CIEF/ESI-MS[44].

Une de problématique majeure de la CE est la séparation des composés neutres. En effet, le principe fondamental de l'électrophorèse ne fonctionne qu'avec les espèces chargées. Cependant, pour séparer des composés neutres, non ionisables et non séparables entre eux par CZE ou CIEF, plusieurs méthodes mettant en jeu une phase stationnaire ou « pseudo » stationnaire ont été développées. Ce sont la MEKC et la CEC.

1.2.2. La chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC).

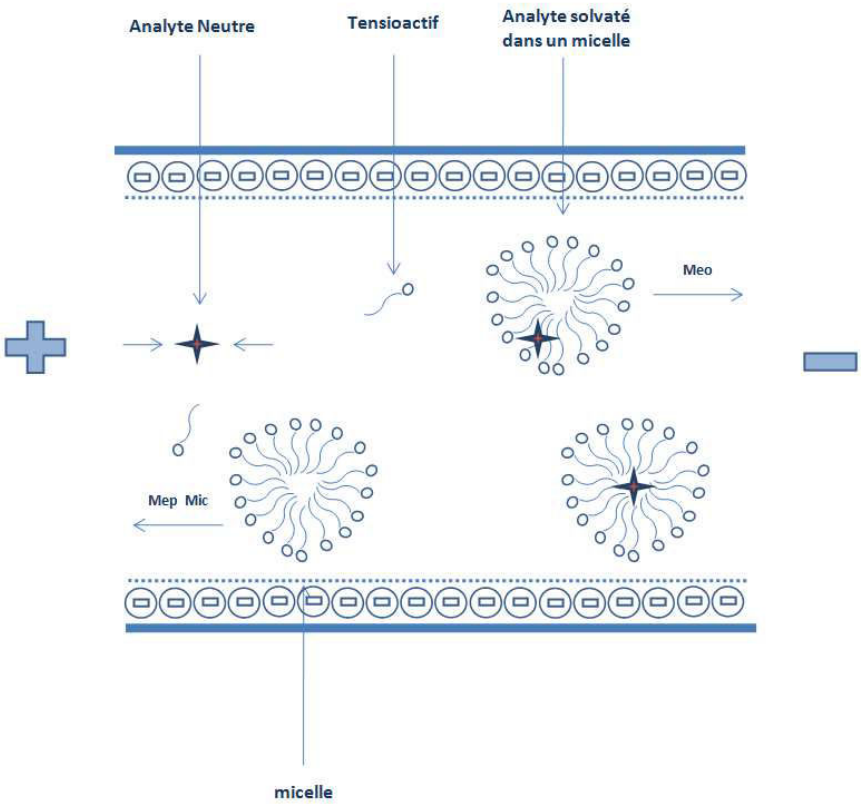


***Figure 5**. Principe de la MEKC*

La MEKC[45,46] est une technique qui nécessite l'utilisation de micelles ioniques dans l'électrolyte. La formation de micelles et leur mobilité dans le capillaire sont dépendantes de la concentration en tensioactif, du champ électrique et de l'EOF. En milieu aqueux et à une concentration supérieure à la concentration micellaire critique (CMC), un tensioactif forme des micelles prenant la forme d'agrégats sphéroïdales de molécules de tensioactifs possédant une tête polaire hydrophile dirigée vers le BGE aqueux et une chaîne hydrophobe dirigée vers l'intérieur[47] de la sphère micellaire. Les analytes neutres vont se partager entre la phase aqueuse et la « pseudo » phase stationnaire micellaire afin d'être séparés (figure 5.) Lors de la séparation, les analytes neutres sont "solvatés" suivant leur hydrophobicité au milieu des micelles. Ainsi, des différences dans la distribution des analytes se créent dans le solvant et les micelles. Dans le cas d'utilisation de tensioactifs chargés, les micelles possèdent

leur propre mobilité électrophorétique. Les solutés neutres sont alors séparés dans l'ordre de leurs hydrophobicités croissantes.

Concernant les analytes chargés, la sélectivité en MEKC est souvent modifiée par rapport à la CZE classique. En effet, dans le cas des micelles anioniques, les solutés positifs sont soumis aux interactions électrostatiques. Ils sont donc « retenus » par les micelles et sortent après l'EOF. Pour les solutés négatifs, les interactions électrostatiques avec les micelles sont répulsives, il n'y a donc pas de modification de sélectivité.

En MEKC, l'agent micellaire le plus utilisé est le dodécylsulfate de sodium (SDS .) Cependant, suivant les domaines d'applications, un grand nombre de tensioactifs ont été développés et utilisés ces dernières années.

1.2.3. L'électrochromatographie (CEC).

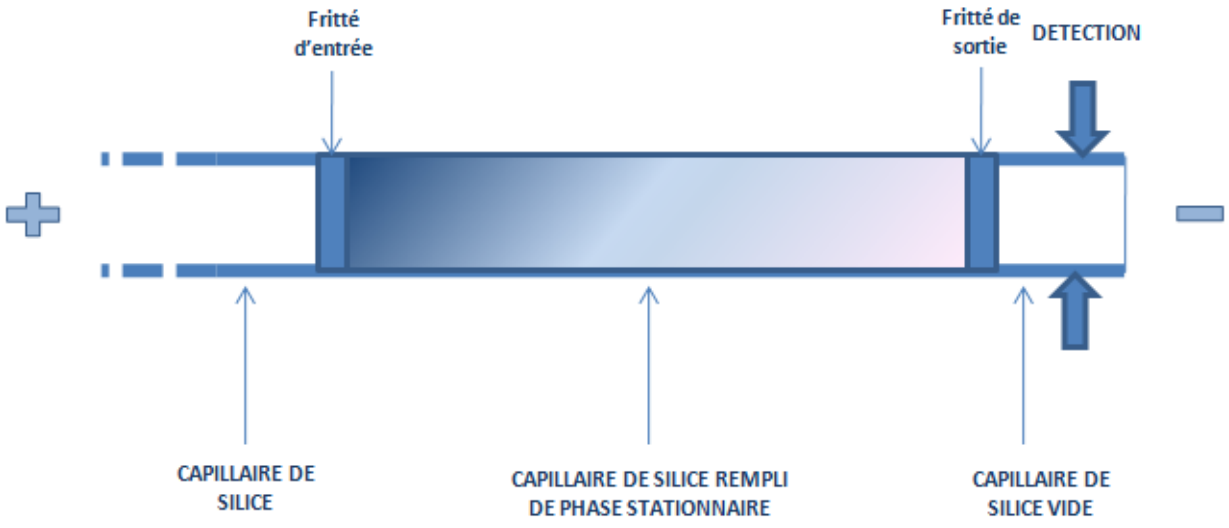


***Figure 6**. Représentation d'un capillaire de CEC*

La CEC est considérée comme une technique hybride de la CE et de l'HPLC[48,49]. En effet, c'est un mélange entre les hautes efficacités et sélectivités de la CE et l'hétérogénéité des types de phases stationnaires disponibles de la deuxième technique[50]. Le processus séparatif est basé sur le principe de

la distribution de l'analyte entre la phase mobile (BGE) et la phase stationnaire caractéristique de la chromatographie et sur la différence de mobilités électrophorétiques des espèces chargées (figure 6.) Les analytes sont ainsi séparés suivant leur mobilité électrophorétique et leur coefficient de distribution entre la phase mobile et la phase stationnaire[51,52].

1.2.4. L'isotachophorèse (ITP) et la transient-isotachophorèse (tITP).

L'un des avantages majeurs de la CE est le faible volume d'échantillons utiles pour la séparation (1 à 10 nL). Cependant, cet avantage peut aussi se transformer en inconvénient dans le cas d'échantillons peu concentrés. En effet, les propriétés de l'EOF font qu'en CZE, il n'est possible d'injecter qu' 1% du capillaire pour obtenir une efficacité optimale et éviter des phénomènes de plateaux. Afin de limiter cette contrainte, plusieurs méthodes de pré-concentration de l'échantillon ont été développées telles que la pré-concentration sur phase solide, la jonction de pH et l'ITP.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé la tITP. Je développerai uniquement cette méthode de pré-concentration mettant en jeu la combinaison de l'ITP et de la CZE.

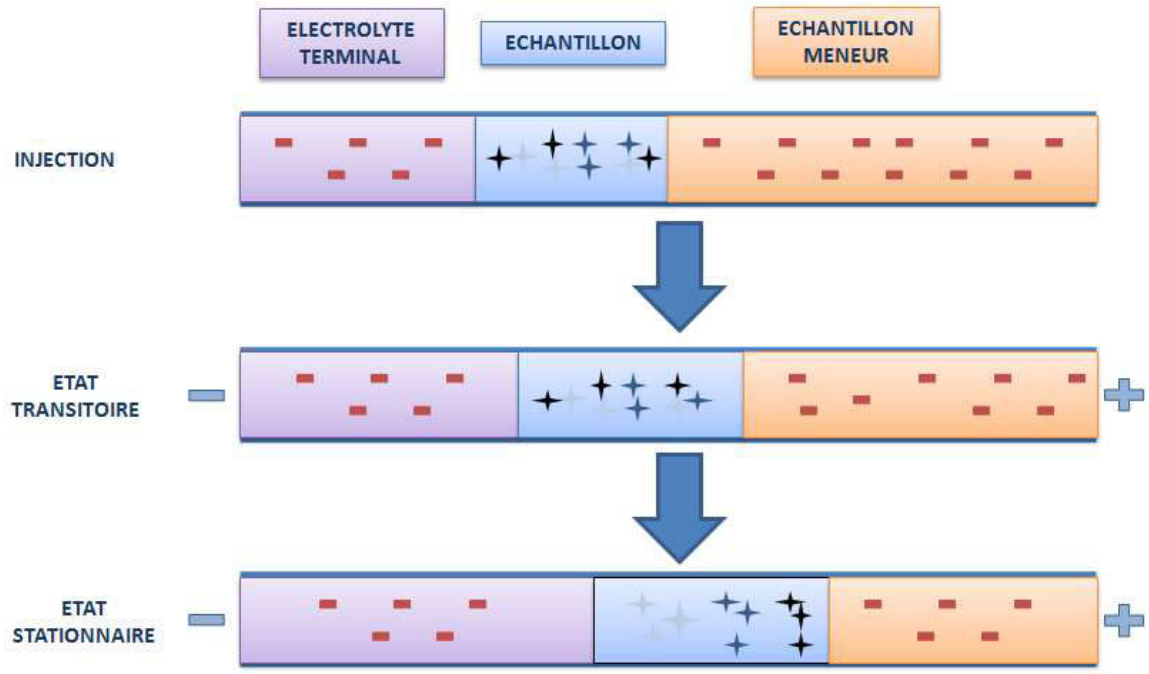


***Figure 7**. Principe de l'isotachophorèse*

Contrairement à la CZE, l'ITP se déroule dans un milieu de séparation discontinu. Il est constitué d'un électrolyte meneur et d'un électrolyte terminal qui contiennent respectivement un ion meneur et un ion terminal. Les ions meneur et terminal doivent avoir une mobilité électrophorétique respectivement supérieure et inférieure à celles des analytes à préconcentrer. Ils doivent posséder une charge de même signe que celle des analytes[53,54,55]. Sous l'effet du champ électrique, un gradient de conductivité se forme à l'intérieur de la zone échantillon. Les analytes chargés présents dans l'échantillon vont se "concentrer" à la jonction entre les deux milieux (figure 7). On parle alors d'effet "stacking". Les zones d'analytes obtenues en ITP ne sont pas séparées par des zones d'électrolytes. Les zones d'analytes sont donc adjacentes et détectées sous forme de créneaux dont la longueur est proportionnelle à la quantité d'analyte injectée. Les facteurs de concentration obtenus en ITP peuvent être très importants (jusqu'à 80 % du capillaire)[56] mais l'ITP permet de ne préconcentrer que des anions ou que des cations pendant une analyse.

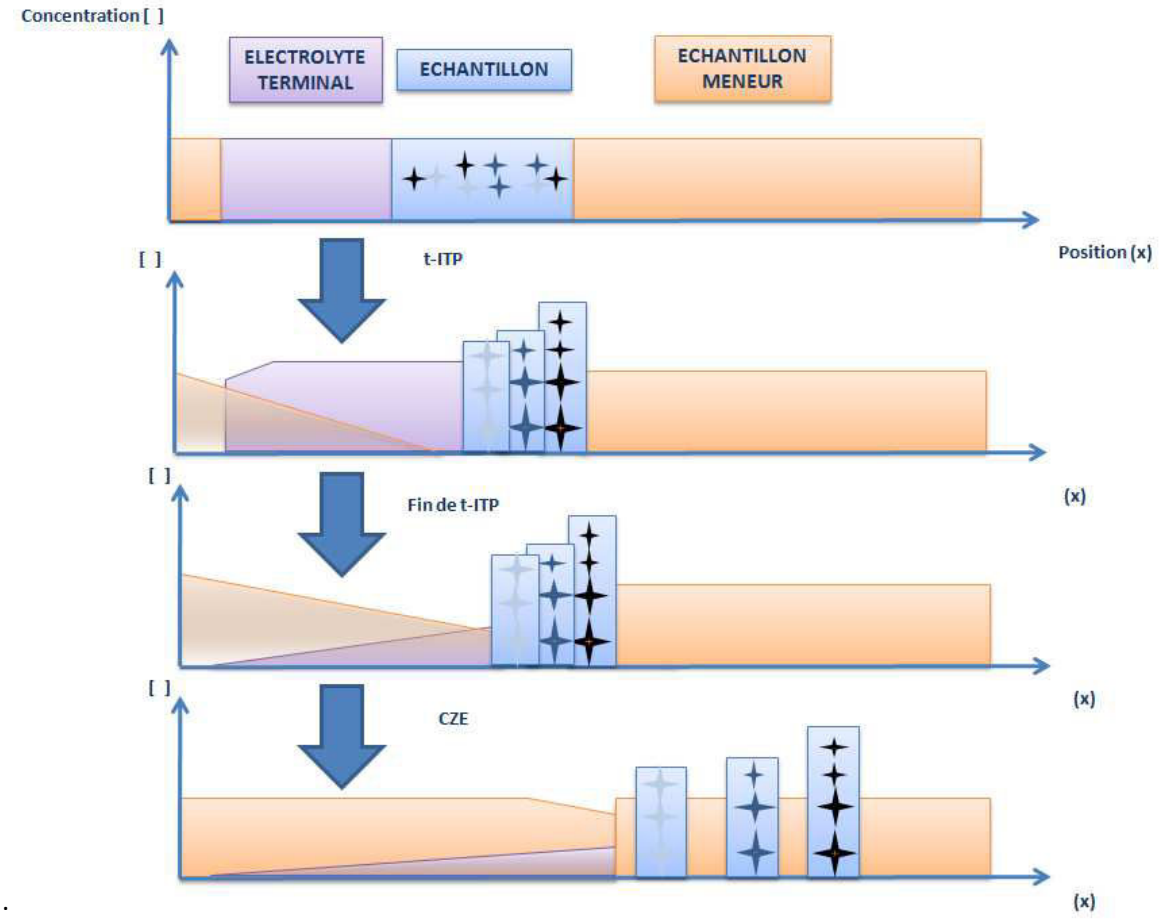


Figure 8 *: Représentation des différentes étapes de tITP-CZE réalisée dans un seul capillaire.*

Dans notre cas, nous mettons en œuvre la tITP. Il est une combinaison de l'ITP et de la CZE en utilisant un seul capillaire. Les différentes étapes d'une expérience tITP-CZE où l'échantillon est injecté dans un capillaire rempli avec l'électrolyte de séparation qui est aussi utilisé comme électrolyte meneur, sont présentés sur la figure 8. L'électrolyte terminal est ensuite injecté, puis l'entrée du capillaire est plongée dans l'électrolyte de séparation (électrolyte meneur). Sous application d'un champ électrique, les analytes sont pré-concentrés par tITP. L'interface entre l'électrolyte terminal et l'électrolyte meneur devient diffuse. L'électrolyte meneur pénètre progressivement dans la zone d'électrolyte terminal. Lorsque les ions meneurs rattrapent les analytes, le mode ITP, permettant la pré-concentration, cesse pour laisser place au mode CZE qui assure la séparation des composés.

2. La Spectrométrie de Masse[57].

C'est avec la découverte des "raies positives" par Eugen Goldstein en 1886 dans un tube à décharge électrique sous pression faible que débute l'histoire de la spectrométrie de masse. Ensuite, en 1898 et 1902, Wein Wilhelm montre que ces raies sont déviées par un champ magnétique et électrique. Plus tard en 1906, Sir Joseph John Thompson démontrera l'existence des électrons et s'intéressera à son "opposé" positif. Ses travaux lui permettront d'obtenir le prix Noble de Physique en 1906.

En 1919, le premier spectromètre de masse sera mis au point par Francis W. Alstom. Pour "*sa découverte au moyen de son spectrographe de masse des isotopes d'un grand nombre d'éléments non radioactifs et de son énonciation de la règle des nombres entiers*", il décrochera le Prix Nobel de Chimie en 1922.

Dans la même période en 1917, Arthur J. Dempster, grâce au spectrographe, obtiendra le premier spectre de masse et découvrira entre autre les isotopes de Lithium, du Potassium et surtout de l'Uranium 235. La course à l'énergie nucléaire va faire connaitre à la spectrométrie de masse un essor considérable. La conséquence sera le développement de nombreux types d'analyseurs de masse.

Entre 1940 et 1945, Alfred O.C. Nier mis au point le premier spectromètre de masse à secteur magnétique. En 1946, la première description du Time Of Flight (TOF), ou analyseur à temps de vol, est publiée au Physical Review[58] puis le Metropolitan Vickers produira le premier spectromètre de masse MS-1. L'année suivante, General Electricen, commencera la production commerciale. En 1948, le spectromètre de masse par résonance cyclotronique d'ion (ICR) est développé puis, en 1953, Wolfgang Paul (Prix Nobel en 1989) réalisera les pièges à ions. En 1975, débutera le développement du spectromètre de masse à transformation de Fourier par résonance cyclotronique d'ion (FTICR).

Concernant les sources, les travaux d'Eugen Golstein font apparaitre les sources à impact électronique (EI). L'EI est encore à ce jour l'une des sources d'ionisation la plus utilisée. Ensuite les découvertes vont s'enchaîner et ce sera l'émergence de différentes sources d'ionisations. En 1966, l'ionisation chimique et sa capacité à transmettre une charge par collision avec un gaz réactif va être mise en place. Entre 1966 à 1969, la désorption de champ va être découverte[59]. Ce sera le début des sources d'ionisation à

pression atmosphérique et les premiers couplages avec la chromatographie liquide. C'est d'ailleurs à cette période que Klaus Biemann réalisera l'intérêt de la spectrométrie de masse pour l'analyse de biomolécules avec l'étude des peptides[60].

Durant les années 1980, d'autres procédés d'ionisations et leurs applications apparaissent (FastAtom Bombardement (FAB) pour l'analyse des sucres, des nucléotides et peptides...) avec notamment l'interface Thermospray (1983) puis l'électronébulisation en 1984 et enfin l'ionisation electrospray (ESI) en 1988 qui conduira John Fenn au prix Nobel en 2002.

Parallèlement à ces découvertes, en 1985, Michael Karas présente l'influence de la longueur d'onde d'un laser UV sur les molécules organiques. Au même moment en 1988, Koichi Tanaka présente les premiers spectres de masse de protéines et de polymères de haut poids moléculaire (m/z>100000) grâce à la désorption laser assistée par matrice (MALDI) couplée à un TOF qui lui vaudra de partager avec John Fenn le Prix Nobel 2002.

Dans les années 90, l'ESI devient la technique de choix pour la bio-analyse notamment pour l'analyse des protéines et surtout l'étude des complexes non covalents. Toutes ces avancées voient naitre une nouvelle discipline : la protéomique[61].

Parallèlement aux progrès technologiques, l'informatique et l'électronique ont connu une évolution comparable rendant l'instrumentation des spectromètres de masse de plus en plus sophistiquée repoussant toujours plus loin la résolution, la gamme de masse, les vitesses d'acquisition et les limites de détection.

Ce travail de thèse est principalement axé sur le couplage de la CE avec la source MALDI et un analyseur par TOF. Cependant mes travaux en fin de thèse m'ont permis d'utiliser la source ESI. Dans cette revue bibliographique, je vais donc me focaliser sur la description des sources ESI et MALDI, de l'analyseur temps de vols et des détecteurs microchannel plate (MCP) et Covalx.

2.1. Les sources d'ionisations.

2.1.1. L'ionisation par électronébulisation (ESI).

Comme nous l'avons dit précédemment, bien que l'ionisation par ESI soit connue depuis plusieurs années, ce n'est que dans les années 1980 que le potentiel de cette technique fut réellement mesuré. En 1984, John Fenn et Masamichi Yamashita couplent avec succès un spectromètre de masse à source ESI avec un analyseur quadripolaire et démontrent que des ions peuvent être ainsi obtenus sans fragmentation à partir de molécule non volatile[62]. Bien que le mécanisme de l'ESI ne soit pas encore physiquement élucidé[63,64], le processus est simplement détaillé (figure 9). L'échantillon liquide, introduit par l'intermédiaire d'un capillaire dont on soumet l'extrémité à un champ électrique intense (10^6 V/m), prend la forme d'un cône, appelé cône de Taylor, par déstabilisation de la surface du liquide. A la pointe de ce cône de Taylor est émis un "nébulisât" de gouttelettes quelques micromètres de diamètre[65,66,67] chargées. Ces gouttelettes traversent un gradient barométrique et électrique qui les dirigent vers l'analyseur de masse. Lors de ce transfert, entre la sortie du capillaire et l'entrée de l'analyseur de masse, ces gouttelettes sont confrontées à deux phénomènes : la fission des gouttelettes chargées en gouttelettes de taille plus réduite et le transfert des ions désolvatés en phase gazeuse.

2.1.1.1. La fission des gouttelettes chargées.

La désolvatation progressive des gouttelettes chargées est généralement due à l'application d'un gaz inerte chaud (azote). Elles voient par ce phénomène leurs densités de charges augmenter à leur surface[68,69]. Lorsque les forces de répulsion électrostatique sont suffisamment fortes et qu'elles l'emportent sur les forces de cohésion du liquide (rayon de goutte inférieur à la valeur du « rayon de Rayleigh »), l'intégrité des gouttelettes est déstabilisée et elles explosent en donnant des nanogouttelettes plus petites. C'est la fission de Rayleigh[70].Cette explosion coulombienne est hétérogène et génère des gouttelettes de densité de charge différente. Grâce aux processus de désolvatation et de fission coulombienne, les ions présents dans les nanogouttelettes se retrouvent en phase gazeuse.

2.1.1.2. *Le transfert des ions en phase gazeuse.*

Le processus d'émission des ions en phase gazeuse est encore soumis à la controverse. Deux modèles sont proposés :

- Le modèle de Dole [71]

Malcolm Dole décrit un mécanisme basé sur la succession d'explosions coulombiennes conduisant à la formation d'une gouttelette fille ne contenant qu'un seul ion. L'ion en phase gazeuse est généré par l'évaporation du solvant résiduel de cette gouttelette fille (figure 9.)

- Le modèle de Thomson[72,73]

Le modèle décrit par Iribame et Thomson, est basé sur l'hypothèse suivante : avant même que le rayon de la gouttelette n'atteigne la valeur du « rayon de Rayleigh », elle devient suffisamment petite pour que le champ électrique à sa surface soit suffisamment intense et extrait les ions directement en phase gazeuse (figure 9.)

Aujourd'hui, de nombreux travaux expérimentaux semblent indiquer que les ions de haute masse seraient produits majoritairement en suivant le modèle de Dole. Contrairement aux ions de petites masses, l'évaporation en phase gazeuse suivraient le modèle de Thomson. Cependant, aucune théorie n'a été démontrée à ce jour.

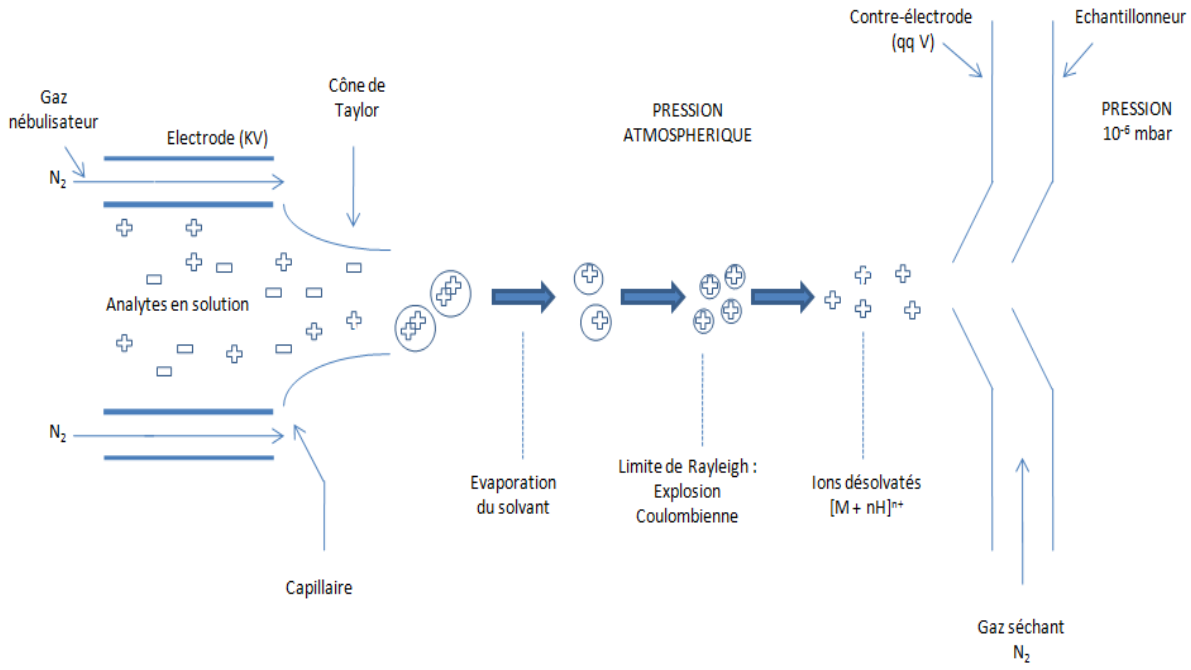


***Figure 9**. Principe de l'ESI*

L'un des avantages majeurs de l'ESI est que dans sa configuration classique et pour l'analyse d'espèces de masse moléculaire élevée et non volatiles, cette source d'ionisations permet d'atteindre des rendements d'ionisations élevées (20-50 %)[74]. Au cours des années 1980, Fenn et al. ont démontré[75] que la charge nette (z) des molécules augmentait avec la taille des analytes. Ils ont également montré que la masse moléculaire précise des protéines pouvait être déterminée à partir de la distribution des différents états de charge (m/z) sur les spectres MS[76] .

Grâce à ces nombreux avantages en termes d'ionisation, l'ESI est devenue au fil des années la technique de choix[77] pour l'analyse des biomolécules de haute masse comme les protéines[78] et les édifices protéiques non covalents[79].

2.1.2. La source nano électrospray (nanoESI).

Afin d'augmenter la sensibilité de l'ESI, la source a été peu à peu miniaturisée pour devenir le "micro electrospray" (micro ESI) ou le "nano electrospray" (nanoESI)[80,81,65].

En 1994, les travaux d'Emmet et Caprioli décrivent le développement d'une source dite micro-electrospray. Cette source permet de produire un ESI stable pour des débits de travail compris entre 300 et 800 nL/min. Ces travaux montrèrent que la mise en œuvre d'une source miniaturisée permet d'augmenter de manière significative la sensibilité du signal MS tout comme le rapport signal/bruit dans le cadre d'étude de protéines[82].

Peu après, Mann et Wilm ont décrit l'utilisation d'une source capable de produire un nano electrospray (nanoESI). La source nanoESI décrite réalise des injections d'échantillons dans la MS avec des débits inférieures à 25 nL/min[83]. Ils ont pu démontrer que l'utilisation de ce type de source permet en plus d'améliorer la qualité du signal MS, de diminuer les effets de suppression d'ions dus aux sels contenus dans l'échantillon et de réaliser des acquisitions prolongées même dans le cadre d'échantillons disponibles en faible quantité, 1 µL d'échantillons devenant alors suffisant pour maintenir l'acquisition pendant 30 min.

Les sources nanoESI utilisent, pour injecter l'échantillon, un capillaire dont le diamètre interne est compris entre 1 et 10 µm. Ce faible diamètre engendre la production de gouttelettes parents de faibles diamètres par rapport à une source ESI standard. Ces gouttelettes plus fines subissent plus facilement le phénomène d'explosion coulombienne. D'un point de vue mécanique, ceci augmente le rendement d'ionisation globale des analytes contenus à l'intérieur de celle-ci. Parallèlement au développement de cette source, Mann et Wilm se sont également efforcés à modéliser le cône de Taylor émettant les gouttelettes chargées dans la source afin d'interpréter les effets bénéfiques sur les performances d'ionisation grâce à la miniaturisation de la source ESI. Le débit d'injection de l'échantillon joue un rôle important sur le rendement d'ionisation de la source. A partir de l'équation de Bernoulli, ils ont pu montrer que le rayon d'émission des gouttelettes est proportionnel à d2/3 (d étant le débit d'injection de l'échantillon). La conséquence directe de cette équation est que la réduction du débit d'injection tend à réduire le rayon d'émission des gouttelettes dont le flux va être correctement focalisé vers l'entrée de la MS[83]**Erreur ! Signet non défini.** En raison du haut rendement d'ionisation obtenu et de son impact positif sur la sensibilité du signal, les sources nanoESI se sont largement développées aussi bien pour l'injection directe d'échantillons que dans le cadre de couplages avec une méthode séparative tel que la nano chromatographie liquide (nanoLC).

2.1.3. L'ionisation par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI).

Dès 1976, Posthumus and al. entreprirent d'analyser des peptides intacts grâce à une désorption laser sur des échantillons en phase solide[84]. Cependant, cette technique n'a pas permis d'analyser des analytes de masses supérieures à 1000 Da. Parallèlement au développement de l'ESI, à la fin des années 1980, la technique du MALDI fut simultanément introduite par deux équipes : Karas et Hilmkamp[85,86] et Tanaka *et al.*[87].L'évolution proposée par ces deux équipes met en jeu l'utilisation d'une matrice en large excès, absorbant la longueur d'onde du laser, afin de protéger l'analyte lors de l'étape de désorption/ionisation.

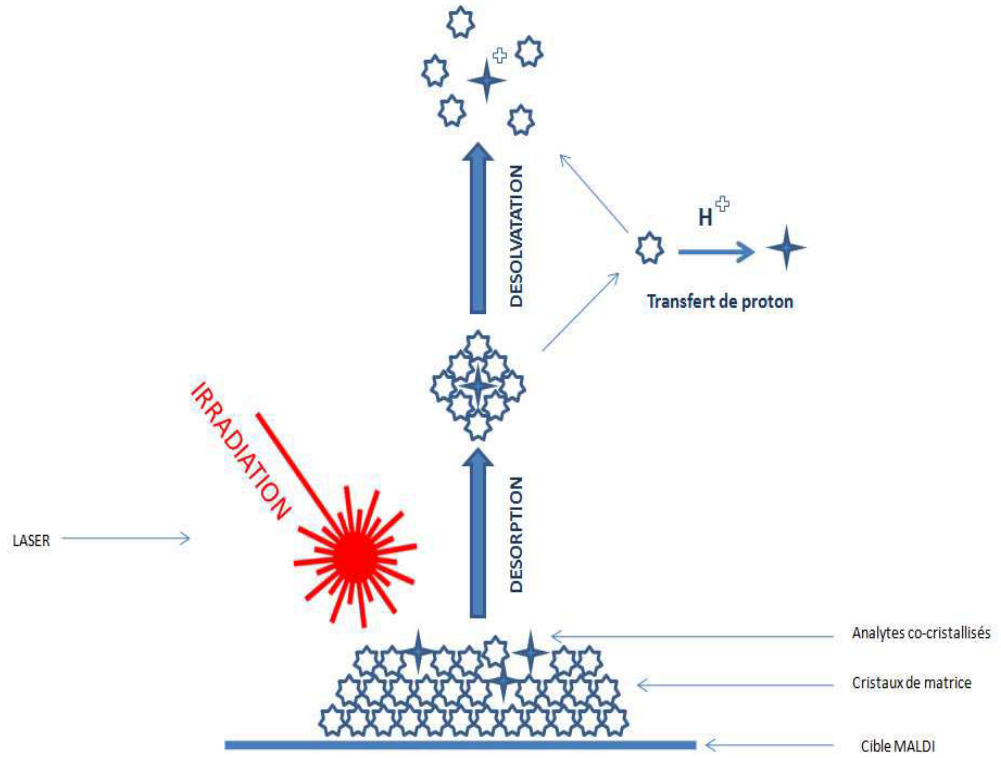


Figure 10. *Transfert de charge dans l'ionisation/désorption assisté par matrice*

Le processus du MALDI repose sur le principe qu'à pression réduite (10^{-6}-10^{-7} mbar), un mélange co-cristallisé d'échantillon et de matrice est sublimé et ionisé par des tirs lasers pulsés (figure 10). En effet, une fois le choix de la matrice organique acté en fonction du type de molécules à analyser, l'opérateur la mélange avec l'échantillon sur une cible rigoureusement plane. Le solvant de la matrice s'évapore et la co-cristallisation s'effectue. Ensuite, un laser est utilisé pour vaporiser et ioniser le

mélange. La matrice a pour propriété d'absorber la longueur d'onde du laser ce qui entraîne une sublimation de la matrice et par conséquent des analytes incorporés. Lors de cette vaporisation, l'énergie du laser est transférée aux molécules présentes se retrouvant sous forme d'ions en phase gazeuse. Cette phase du processus est très importante car l'homogénéité et/ou la vitesse de la cristallisation conditionnent la précision de mesure de masse des analytes. Les ions produits sont immédiatement accélérés et entrainés vers l'analyseur à l'aide d'un fort champ électrique. Afin de mieux comprendre le processus d'ionisation/désorption, nous allons en décrire les différentes étapes.

2.1.3.1. Les mécanismes d'ionisation MALDI.

Le développement historique de la source MALDI s'est fait de manière empirique. Les mécanismes d'ionisation sont encore mal connus mais les modèles actuels[88] convergent vers un processus en deux étapes[89,90] : l'ionisation primaire et l'ionisation secondaire.

2.1.3.1.1. L'ionisation primaire.

L'ionisation primaire est le mécanisme le plus discuté. Il est basé sur deux modèles principaux : "le cluster model" et le "photo excitation/pooling model"[91]. Ils correspondent respectivement à l'éjection en cluster des ions préformés en solution lors du tir laser et de la redistribution de l'énergie entre deux molécules voisines. De ce fait, l'ionisation primaire est immédiatement consécutive au tir laser et entraîne la formation des molécules de matrices excitées. Ainsi l'excès d'énergie interne emmagasinée par la matrice est redistribué aux analytes.

La redistribution de l'énergie abaisse les forces de cohésion des cristaux de matrice et provoque la co-éjection des analytes et de molécules de matrices dans la phase gazeuse. Dans les conditions de vide, le gaz très dense subit une expansion adiabatique (figure 11) et prend la forme d'un jet supersonique nommé plume[92,93].

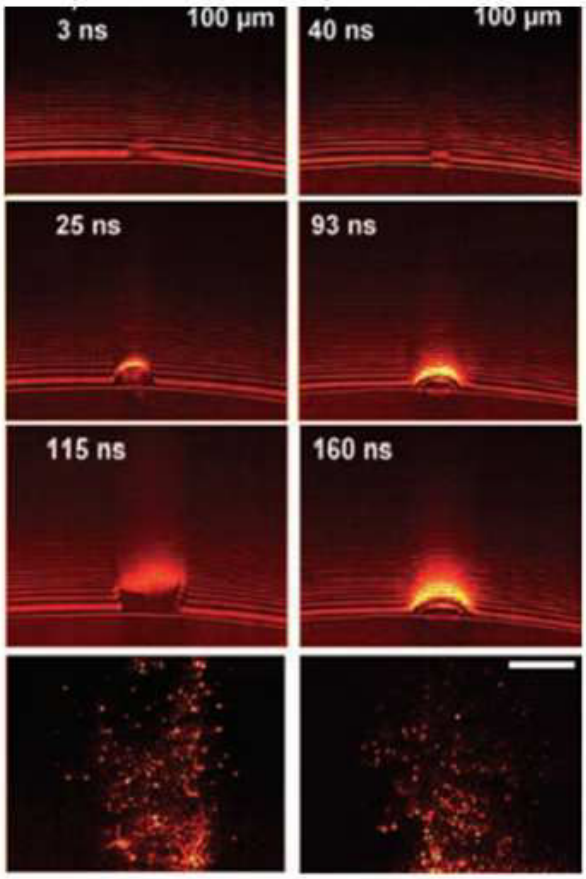


***Figure 11**. Expansion adiabatique de gaz, lors d'un tir laser IR sur un dépôt de matrice*[94]

2.1.3.1.2. L'ionisation secondaire.

Le principe d'ionisation des molécules de l'analyte en phase gazeuse est régit par des transferts d'électrons, de protons (cationisations). Suite au tir laser, ces transferts entre les molécules de matrice et des analytes s'effectuent dans le nuage gazeux en expansion. L'application d'un champ électrique intense situé entre la cible et la première lentille électrostatique du spectromètre de masse[91] (lentille d'extraction) permet le transfert des ions vers l'analyseur.

2.1.3.1.3. Les règles d'ionisation en MALDI-MS.

Contrairement au processus de l'ESI, lors du processus MALDI les ions ne sont pas préformés en solution. L'analyte s'ionise directement dans la plume. Ainsi, l'ionisation MALDI génère en grande majorité des ions monochargés. Les règles inhérentes à l'ionisation MALDI sont identiques à celles de l'ionisation par ESI-MS.

2.1.3.2. La préparation de l'analyte.

2.1.3.2.1. La nature de la matrice.

Le choix de la matrice est un paramètre primordial pour le bon déroulement d'une analyse MALDI. Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie du laser pour permettre une bonne ionisation/désorption tout en protégeant l'analyte des effets destructeurs du faisceau laser[94]. Pour une analyse MALDI optimale, l'analyte doit être co-cristallisé avec une quantité de matrice en fort excès (ratios analyte/matrice compris entre 1:1000 et 1:10000). La molécule de matrice doit avoir une masse moléculaire faible, une bonne solubilité pour faciliter la co-cristallisation et la capacité d'absorber à la longueur d'onde du laser (dans notre cas, laser à azote irradiant dans l'ultraviolet à 337 nm)[95]. Enfin la matrice doit favoriser la distribution homogène des analytes afin d'en réduire les interactions moléculaires.

Il est difficilement possible de trouver une substance chimique universelle répondant à tous ces critères. Dans le tableau 2 sont données les principales matrices utilisées le plus communément en MALDI-MS pour l'analyse de diverses catégories de protéines et/ou peptides.

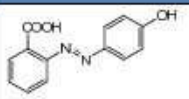
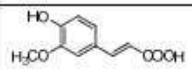
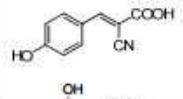
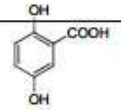
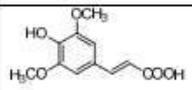
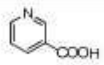
Abréviation	Nom(s)	Structure	Affinité protonique (Kcal.mol^{-1})	Longueur d'onde optimale	Applications
HABA	Acide 2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoïque		183±2	337/355	Peptides, protéines, glycoprotéines, polymères synthétiques, glycolipides perméthylés
FA	Acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique, ou acide férulique		183±2	337	Protéines, peptides
α-CHCA	α-cyano-4-hydroxycinnamique		183±2	337	Peptides, protéines, lipides, oligonucléotides, PSD
2,5-DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque, ou acide gentisique		202,9	337	Peptides, protéines, lipides, glycoprotéines, oligosaccharides
SA	Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique, ou acide sinapinique		204±4	337	Peptides, protéines, glycoprotéines
NA	Acide 3-pyridinecarboxylique, ou acide nicotinique		215±4	266	Oligonucléotides, glycopeptides

Tableau 2. *Principaux composés utilisés comme matrice pour analyse MALDI et leurs domaines d'applications*

2.1.3.2.2. Les différents types de dépôts.

Comme indiqué sur le tableau 2, le choix de la matrice se fait en fonction de l'échantillon à analyser. Cependant, la matrice n'est pas le seul paramètre influençant les résultats d'analyses. En effet, le type de dépôt, c'est à dire la façon de mélanger analytes et matrice, influence la cristallisation et par conséquent l'ionisation et la qualité du spectre MS[96,97]. Dans le cadre de ma thèse, nous avons utilisé deux types de dépôts : le dépôt goutte séchée et le dépôt couche mince.

2.1.3.2.2.1. Dépôt goutte séchée (dried droplet).

Ce type de dépôt est le plus fréquemment employé. La matrice et l'échantillon doivent être solubles dans les mêmes conditions de solvant afin d'éviter la migration des analytes dans le dépôt. Les deux sont mélangés dans des proportions définies. Le plus souvent, le mélange est équivalent et se fait soit dans un récipient soit directement sur la cible. Ce dépôt génère souvent des cristaux hétérogènes

pouvant avoir une incidence négative sur la résolution et la reproductibilité des spectres MS. Cependant, le caractère grossier des cristaux en font un type de dépôt de choix notamment dans le cadre d'analyses protéomiques d'échantillons en très faible concentration.

2.1.3.2.2.2. Dépôt couche mince (thin layer).

Ce type de dépôt se fait en deux étapes. La première étape consiste à déposer une goutte de solution de matrice sur la cible. Lorsque le solvant est évaporé, une goutte de la solution contenant l'analyte est déposée sur la matrice et évaporée à température ambiante. Ce type de dépôt permet d'obtenir des cristaux de matrice très fins et homogènes améliorant significativement la résolution et la reproductibilité des spectres MS. Cependant, la finesse du dépôt peut être un désavantage notamment pour l'étude de la fragmentation de peptides.

2.2. L'analyseur à temps de vol (TOF).

2.2.1. Principe du TOF.

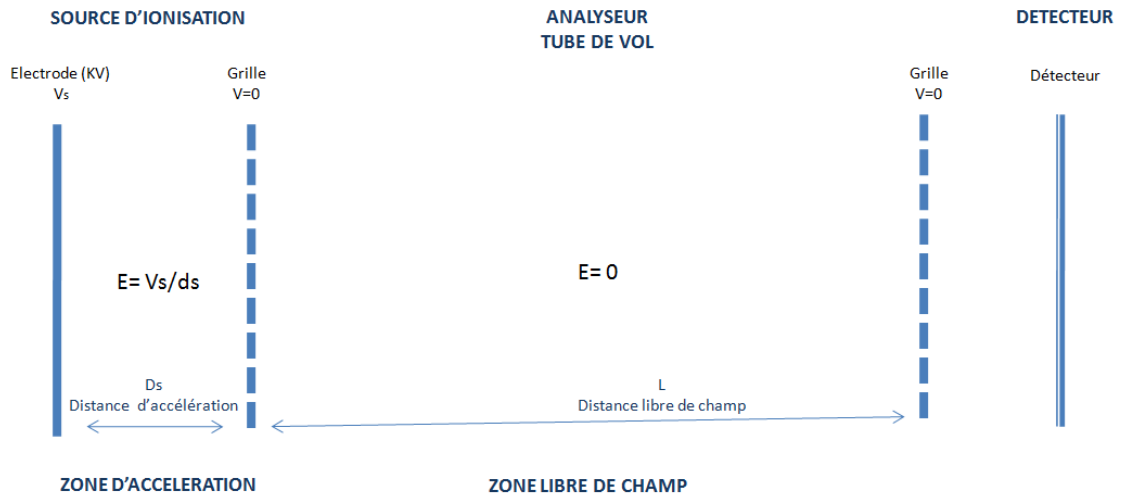


Figure 12. *Schéma simplifié d'un analyseur TOF*

Introduit en 1946, le principe du TOF repose sur la mesure du temps de vol d'un ion, préalablement accéléré dans un champ électrostatique, dans une zone libre de tout champ[98].

L'instrumentation d'un analyseur TOF est divisée en deux parties (fig 12) :

- Une zone d'accélération : accélération des ions sous l'effet d'un champ électrique intense,
- Un tube de vol : zone libre de tout champ dans laquelle règne un vide poussé (10^{-7} mbar). Les ions y pénètrent avec l'énergie cinétique (Ec) acquise dans la zone d'accélération.

Leurs vitesses dépendent intégralement de leurs masses et sont calculées suivant l'équation (1) :

$$v = (2zeV_s/m)^{1/2}$$

Où v est la vitesse, z la charge de l'ion, e la charge de l'électron (1.602 x 10^{-19} C), V_s le champ électrique et m la masse de l'ion.

De cette équation, on peut en déduire le temps t nécessaire aux ions pour traverser le tube de vol de longueur L :

$$t = \frac{L}{v} = L\sqrt{\frac{m}{2zeV}}$$

Suivant cette dernière équation et en considérant que tous les ions pénètrent dans le tube de vol avec la même énergie cinétique, les ions seront séparés suivant leur rapport masse sur charge (m/z). Pour deux ions de même état de charge, l'ion le plus léger traversera le tube de vol plus rapidement que l'ion le plus lourd[99]. Ainsi, le rapport m/z d'un ion peut être déterminé suivant la mesure précise de son temps de vol à travers le tube de vol.

2.2.2. Le mode linéaire.

Le spectromètre de masse MALDI-TOF-MS fonctionne principalement suivant deux modes : le mode linéaire et le mode réflectron. Le plus simple est le mode linéaire. En effet, une fois désorbés et ionisés par le tir laser, les ions expulsés de la source sont accélérés par les différents champs électriques décroissants. Ce trajet dans le gradient de potentiels (20 à 15 kV) permet de donner la même énergie cinétique à tous les analytes. Une fois les énergies égalisées, les ions continuent leur trajet dans le tube de vol jusqu'à frapper le détecteur (figure 13).

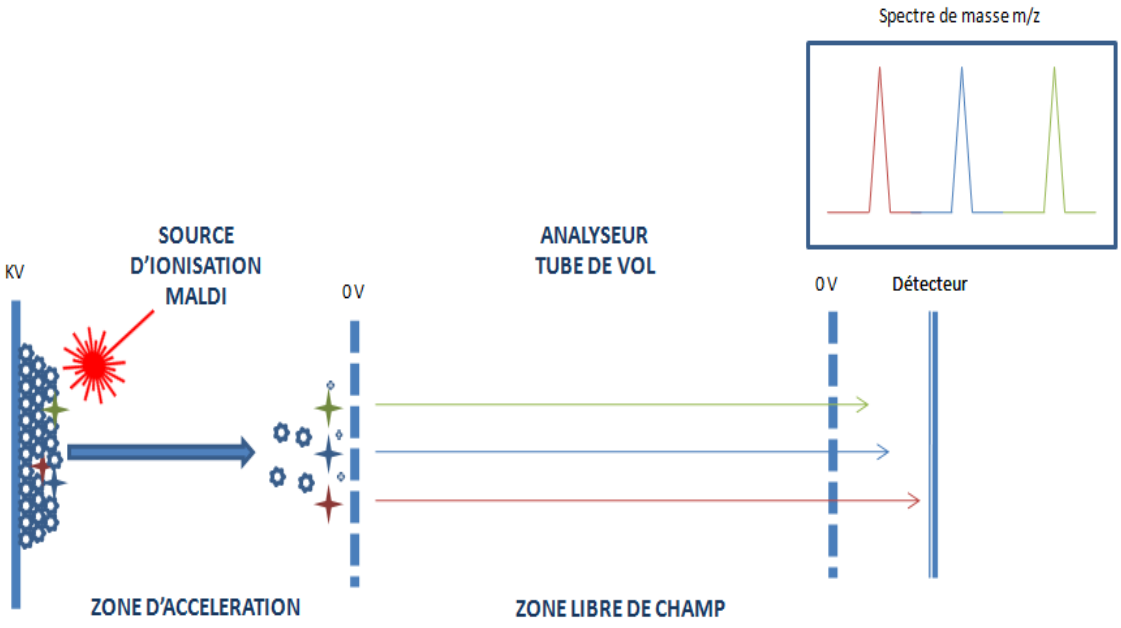


Figure 13. *Spectromètre masse MALDI-TOF-MS en mode linéaire*

Le mode linéaire permet d'acquérir les signaux avec une bonne sensibilité au détriment de la résolution (500 pour les ions de 1000 m/z). Cette perte de résolution* se traduit par un élargissement du pic sur le spectre de masse. En effet au moment du tir laser, tous les ions ne sont pas générés strictement au même moment et au même endroit dans la source. De ce fait, il se produit une dispersion spatiale et d'énergie cinétique avant le tube de vol. Ainsi deux ions ayant le même rapport m/z n'ont pas strictement la même énergie cinétique initiale et donc ne partent pas sur la même « ligne de départ ».

Afin de minimiser ces phénomènes de dispersion, les TOF actuels bénéficient d'améliorations telles que l'extraction retardée et le réflecteur électrostatique.

* La résolution se définit comme la capacité d'un analyseur à distinguer un ion de rapport (m/z) d'un ion de rapport (m/z + Δm/z). La résolution est définie par l'équation suivante :

$$R = \frac{m/z}{\Delta\, m/z}$$

2.2.3. Le mode reflectron.

Une des solutions pour corriger les effets des phénomènes de dispersion en énergie cinétique lors de l'étape de désorption/ionisation est l'ajout à l'extrémité du TOF d'un dispositif de réflecteur électrostatique (reflectron).

Le réflecteur électrostatique améliore significativement la résolution. En effet, il est composé d'une série de lentilles électrostatiques qui agissent comme des miroirs électrostatiques. L'application de potentiel croissant sur ces lentilles crée un champ électrique qui s'oppose à la progression des ions. En passant le gradient de potentiel croissant, les ions sont successivement ralentis jusqu'à posséder une énergie cinétique nulle. De ce fait, les ions se retrouvent ré-accélérés dans le sens contraire de leur progression initiale vers le détecteur (figure 14).

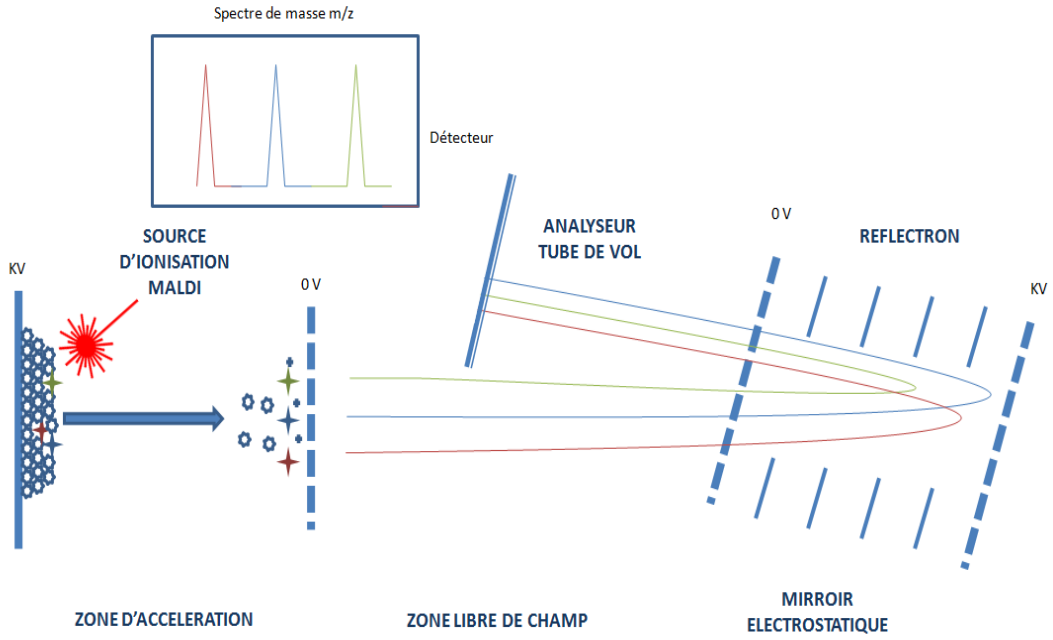


Figure 14. *Spectromètre masse MALDI-TOF-MS en mode Réflectron*

Ainsi, les ions de même m/z pénètrent plus ou moins profondément dans le reflectron en fonction de leur énergie initiale. Par exemple, les ions ayant une énergie cinétique plus élevée pénètrent plus profondément dans le réflecteur, leur temps de vol est augmenté. Les ions se refocalisent donc « en sortie de virage» et viennent tous frapper le détecteur en même temps.

Le mode reflectron augmente la résolution de manière significative (5000 de résolution pour les masses de 2000 m/z). De plus, l'allongement de la distance de trajet améliore de ce fait la précision de mesure de masse. Cependant, la limite de ce mode est la diminution de la gamme de masse. En mode réflectron, la gamme de masse est limitée à des molécules n'excédant pas 20000 m/z.

2.2.4. L'extraction retardée.

Lors de l'irradiation du laser sur le dépôt, les analytes co-cristallisés dans la matrice ne se trouvent pas tous à la même profondeur dans le dépôt. Cette disparité spatiale est accentuée par les phénomènes de dispersion cinétique engendrés par les transferts d'énergie lors du tir laser[100]. Ce phénomène engendre donc des pertes de résolution. Afin de compenser ces dispersions, une lentille est ajoutée

juste après la source pour séparer les phénomènes de désorption/ionisation et d'accélération. Juste après le tir laser, et pendant quelques centaines de nanosecondes, cette lentille est portée à un potentiel légèrement supérieur au champ électrique de la source. Le champ engendré par cette lentille s'oppose à la progression des ions en sortie de plume. Il s'opère alors un alignement des ions leur permettant d'entrer simultanément dans le tube de vol[101,102].

L'extraction dite "retardée" peut être utilisée en mode linéaire comme en mode réflectron. De plus, elle permet d'améliorer la résolution de manière significative, de 5000 pour les ions à 3000 m/z en mode linéaire et 10000 pour les ions de 6000 m/z[103,104] en mode réflectron.

2.3. Les détecteurs.

2.3.1. Le détecteur MCP (Microchannel Plate).

Le détecteur MCP est le détecteur le plus classiquement utilisé dans les analyseurs de spectrométrie de masse par temps de vol. Son principe de fonctionnement repose sur le photomultiplicateur d'électrons. Il est constitué d'une galette de micro canaux incurvés recouverts d'un dépôt métalliques (dynode). Le système entier est soumis à un fort champ électrique. De ce fait, quand un ion entre en collision avec la paroi du micro canal, il engendre une émission d'électrons en cascade qui se propagent dans le micro canal et amplifient le signal (figure 15).

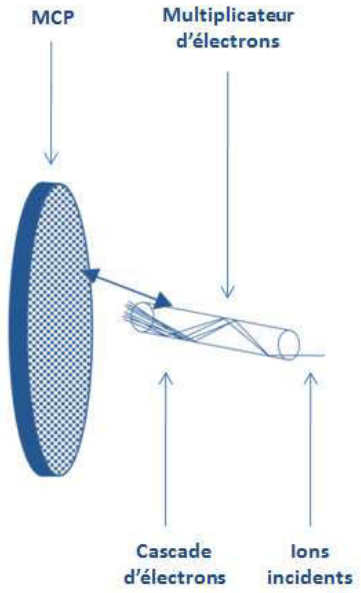


Figure 15. *Micro Channel Plate (MCP)*

2.3.2. Le détecteur CovalX.

Une vitesse élevée des ions est une condition primordiale pour obtenir un signal intense avec un détecteur MCP. Or dans un analyseur TOF, la vitesse des ions est inversement proportionnelle à leur masse (équation 1). Dans le cas des ions de haut poids moléculaire, ils sont donc difficilement observables avec un détecteur MCP. De plus, il est possible de saturer les microcanaux du détecteur par un excès d'ions de petite masse.

C'est dans l'optique d'augmenter la sensibilité dans les hautes masses et pour l'étude d'édifices non-covalents biologiques que la société CovalX[105] (Zürich, Suisse) a mis au point un nouveau détecteur. Son fonctionnement repose sur le principe suivant :

Les ions entrant dans le système Covalx percutent une première dynode et engendrent l'émission d'ions secondaires. Ces ions sont ré-accélérés par un champ électrique et percutent un deuxième photomultiplicateur qui produit le signal. Ce dispositif nommé "ion conversion detector" ICD amplifie le signal pour des masses allant jusqu'à 1,2 MDa pour des concentrations de quelques nanomoles tout en évitant la saturation du détecteur.

3. Le couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse (CE/MS).

Ce travail de thèse a consisté en grande partie à développer et à installer au laboratoire le couplage CE/MS à source MALDI. Cependant, dans le cadre de mes travaux de fin de thèse, j'ai eu l'opportunité d'utiliser la dernière génération d'interface CE/ESI-MS mise en application récemment au laboratoire. Dans cette étude bibliographique, je détaillerai donc la mise en œuvre des couplages CE/ESI-MS et CE/MALDI-MS.

3.1. Les interfaces CE/ESI-MS.

La source ESI permet d'ioniser en phase gazeuse les composés chargés ou polaires présents dans un milieu liquide, comme le BGE. De ce fait, l'ESI est parfaitement adaptée pour le couplage avec la CE et s'impose tout naturellement comme la source d'ionisation la plus employée pour ce type d'association. Afin d'assurer le transfert des analytes issus de la séparation jusqu'à la source d'ESI, le couplage CE/MS nécessite une interface permettant non seulement d'établir une jonction physique mais surtout de conserver un contact électrique nécessaire à toute séparation électrocinétique. L'interface joue un rôle primordial dans le bon fonctionnement du couplage CE/MS.

En 1987, Olivares *et al*. mettent au point la première interface utilisant le processus d'ionisation par ESI[106]. L'interface proposée consiste à déposer une couche d'argent à l'extrémité de la sortie du capillaire de séparation[107] afin de réaliser le contact électrique aux bornes du capillaire et de permettre le principe d'ESI. La formation du spray aidé par un flux d'azote (2,5 L/Min) est réalisée sous pression atmosphérique à 60°C. Malgré de bons résultats en termes de sensibilité de détection, l'instabilité du spray en sortie de capillaire a montré que le débit de l'électrophorèse capillaire était sensiblement inférieur au débit nécessaire à une électronébulisation optimale. De plus, la volatilité ainsi que la présence de sel en forte concentration dans le BGE provoquent des problèmes de formation du spray ainsi que des phénomènes de suppression d'ions[108]. Enfin, des réactions électrochimiques à l'extrémité du capillaire détériorent la couche de métal entraînant ainsi des instabilités voire des pertes de courant.

Depuis la fin des années 1980, de nombreuses équipes de recherche ont développé différentes interfaces au couplage CE/ESI-MS basées sur des principes différents qui peuvent être classées en trois grandes catégories : l'interface coaxiale à liquide additionnel dite « Sheath liquid », l'interface à jonction liquide dite « Junction liquid » et l'interface sans liquide additionnel dite « Sheathless ».

3.1.1. Interface coaxiale à liquide additionnel.

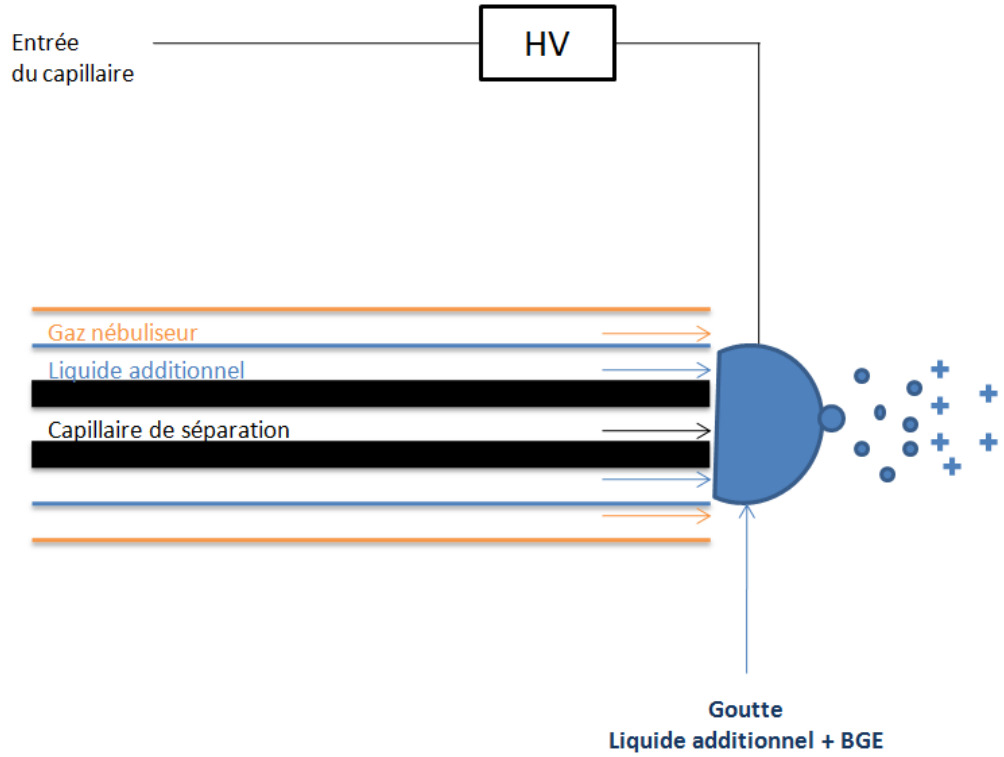


***Figure 16**. Schéma du principe de l'interface coaxial à liquide additionnel*

En 1988, Smith *et al*. ont proposé une alternative à la métallisation du capillaire. Cette interface consiste à remplacer la couche de métal par une jonction à liquide additionnel coaxial[109,110]. Cette interface se présente sous la forme d'un enfilement coaxial de trois capillaires (figure 16). Le capillaire de séparation électrophorétique prend la place centrale. Celui-ci est entouré par un capillaire métallique permettant de délivrer un liquide additionnel de manière concentrique au flux arrivant de

la CE, avec un débit compris entre 3 et 6 µL/min. Le troisième et dernier capillaire, également en acier inoxydable, assure l'écoulement d'un gaz nébulisant (air ou azote).

Ce flux de gaz permet de favoriser l'évaporation des solvants lors de l'électronébulisation[111,112]. Afin de procéder aux phénomènes d'ESI, la tension appliquée à l'extrémité de l'aiguille (ou à l'entrée de l'analyseur)[113] est de $^{+}/_{-}$ 3 à 8 kilovolts. De ce fait, à l'extrémité de l'interface entre les liquides, provenant des capillaires, et le gaz, apparait le spray de nébulisation. L'interface coaxiale améliore sensiblement la stabilité du processus d'ESI[106]**Erreur ! Signet non défini.**

Les propriétés physico-chimiques du liquide additionnel ont une grande influence sur l'ionisation des composés en phase gazeuse et, par conséquence, sur l'intensité du signal obtenu. Ainsi, la formation du cône de Taylor est facilitée par l'utilisation de solvants possédant une faible tension de surface. La diminution de la viscosité du solvant utilisé conduit à la diminution de la taille des premières gouttelettes formées ce qui est associé à une meilleure efficacité d'ionisation[114]. Le liquide additionnel est donc généralement constitué d'un solvant organique ou d'un mélange solvant organique/eau.

Ce système a été la première interface CE/ESI-MS commercialisée par la société Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). C'est aussi pour cette raison que cette interface est devenue l'interface la plus utilisée dans les couplages CE/ESI-MS[115]. Cependant, au cours des dernières décennies, plusieurs améliorations ont été réalisées permettant d'améliorer la stabilité du couplage CE/ESI-MS ainsi que la robustesse des analyses [111,115,116 ,117,118,119,120].

Plus récemment, l'équipe de David Chen a développé une nouvelle génération d'interface sheath liquid afin de réduire au maximum le débit du liquide additionnel. En effet, Maxwell *et al* ont proposé de placer le capillaire de séparation dans un fourreau métallique[121] terminé par une cavité s'ouvrant sur un orifice (figure 17). Cette cavité, dans laquelle vient buter l'extrémité du capillaire, fait office de réservoir. Ce fourreau est relié à l'électrode et le réservoir permet d'établir le contact avec la lumière du capillaire. Des débits inférieurs à 1 µL/min, pouvant aller jusqu'à 300 nL/min peuvent être obtenu par ce type d'interface. La société CMP Scientific (Hoboken, USA) s'est très récemment lancée dans la commercialisation de cette interface[122].

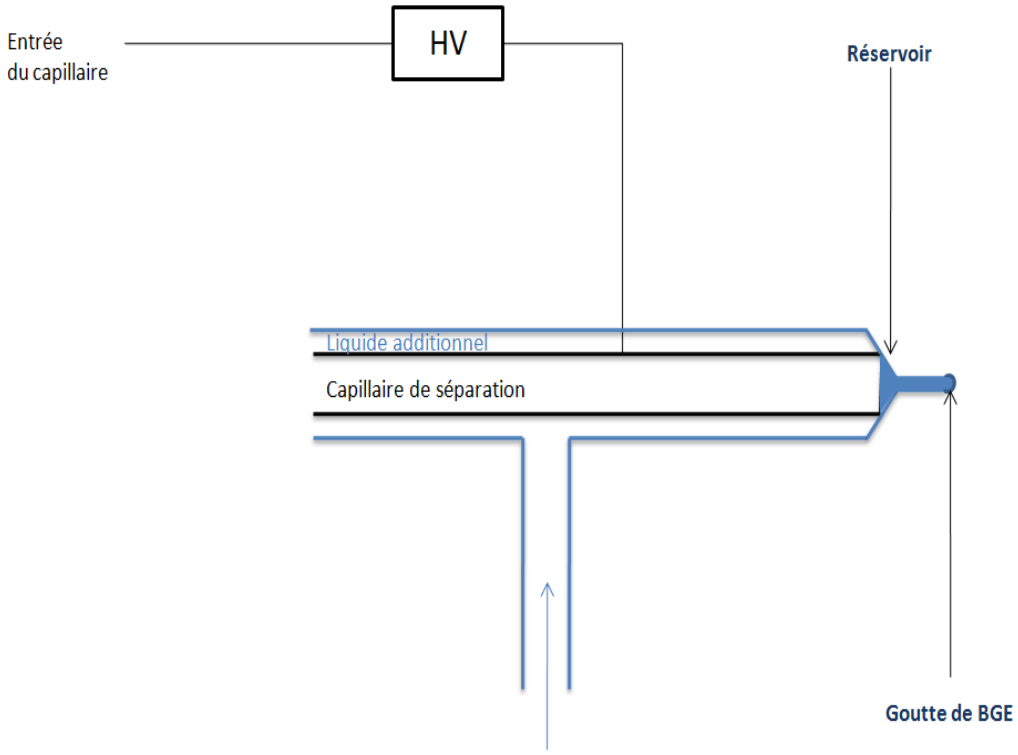


Figure 17. *Schéma du principe de l'interface coaxial à liquide additionnel à micro-débit*

3.1.2. L'interface à jonction liquide.

En 1988, Henion *et al.*[123,124] ont développé l'interface CE/ESI-MS à jonction liquide dans laquelle le capillaire et le nébuliseur sont connectés par un petit espace de 10 à 20 µm rempli par un liquide de contact (figure 18). Cet espace inter-capillaire doit être suffisamment grand pour permettre au liquide de s'introduire dans le capillaire de transfert, mais aussi suffisamment petit pour éviter toute "fuite" et donc éviter les pertes des analytes[125,126,127] .

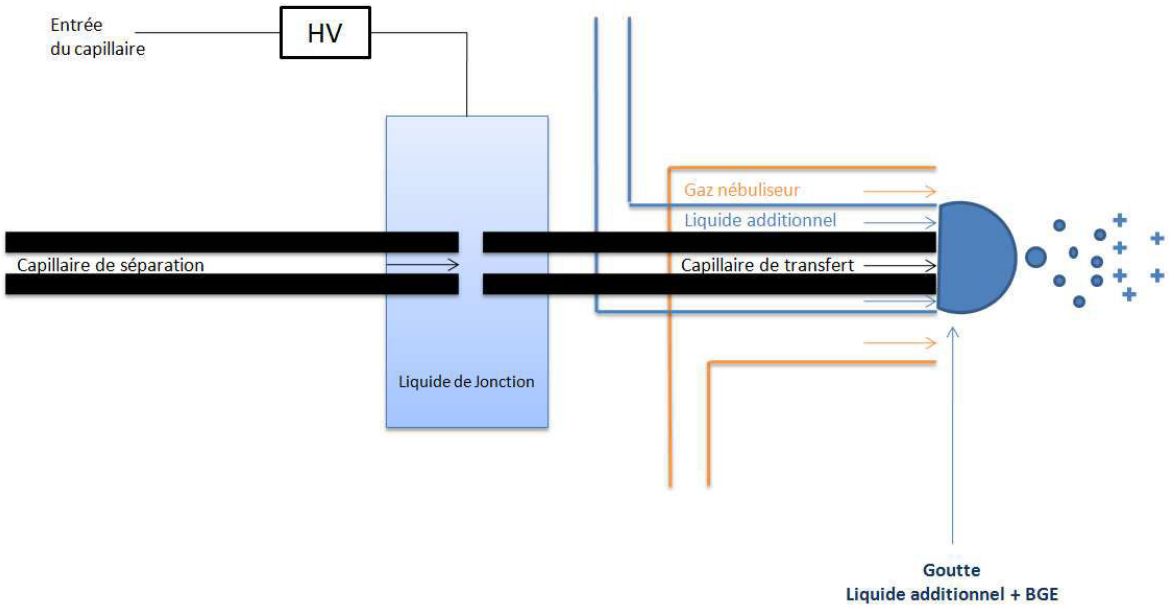


Figure 18. *Schéma du principe de l'interface à jonction liquide*

Les différentes études réalisées à l'aide de cette interface ont montré que la séparation physique des deux capillaires permet une plus grande souplesse dans le choix du liquide de jonction[128]. Cet avantage s'est révélé efficace dans l'optimisation et l'amélioration du processus d'ESI. Malheureusement l'interface à jonction liquide est délicate à construire. Cette configuration demande une grande rigueur de montage dans l'alignement des capillaires de séparations et de transfert[116,129].

En effet, de nombreuses études ont mis en évidence des augmentations de bruits de fond significatifs ainsi que des pertes d'efficacité. Ces deux phénomènes sont principalement dus à l'élargissement des pics lors du passage d'un capillaire à l'autre. Malgré le plus large choix de liquide additionnel, la faible ergonomie de mise en place et le manque de robustesse ont fait que cette interface n'a pas supplanté l'interface coaxiale à liquide additionnel.

3.1.3. L'interface sans liquide additionnel « sheathless ».

Comme nous l'avons vu précédemment, la première interface sans liquide additionnel a été développée en 1987 par Olivares *et al.*[106]. Malgré de nombreuses limitations basées notamment sur des problèmes d'instrumentation, ce type d'interface a toujours suscité un grand intérêt dans la communauté scientifique[130]. En effet, cette interface permet entre autre d'améliorer la sensibilité en

minimisant les effets de dilution des analytes en sortie de capillaire engendrés par le liquide additionnel. Cela représente le couplage idéal de la CE avec l'ESI-MS. Cette source fonctionne de manière optimale avec des débits pouvant être inférieur à 20 nL/min qui sont compatibles avec le faible débit de la CE[131]. La réduction du débit de solution arrivant dans la source d'ionisation conduit par ailleurs à la formation de gouttelettes de plus petites tailles associées à une meilleure efficacité d'ionisation et se traduit par une amélioration de la sensibilité[132].

En 1997, Kelly *et al*. ont démontré que l'interface sans liquide additionnel permet l'amélioration de la sensibilité par un facteur 10 par rapport à l'interface coaxiale à liquide additionnel pour une même quantité injectée[133].

Plus récemment, Gahoual *et al*. ont évalué les performances d'une nouvelle interface CE/ESI-MS développée par la société Beckman Coulter (Brea, USA) en tant que nanosprayeur. Ils ont montré dans l'étude de l'infusion de myoglobine en milieu acide acétique à 10%, une augmentation significative de la sensibilité d'un facteur 46 lorsqu'on réduit le débit d'infusion d'une valeur de 460 à 14 nL/min.

Depuis quelques décennies, quatre catégories de configurations d'interfaces nanosprays ont été développées. La première configuration, la plus répandue, consiste à utiliser un capillaire de silice vierge recouvert à son extrémité d'un matériau conducteur (figure 19). La couche de métal est en contact avec la lumière du capillaire et permet de réaliser le contact électrique[134,135,136].

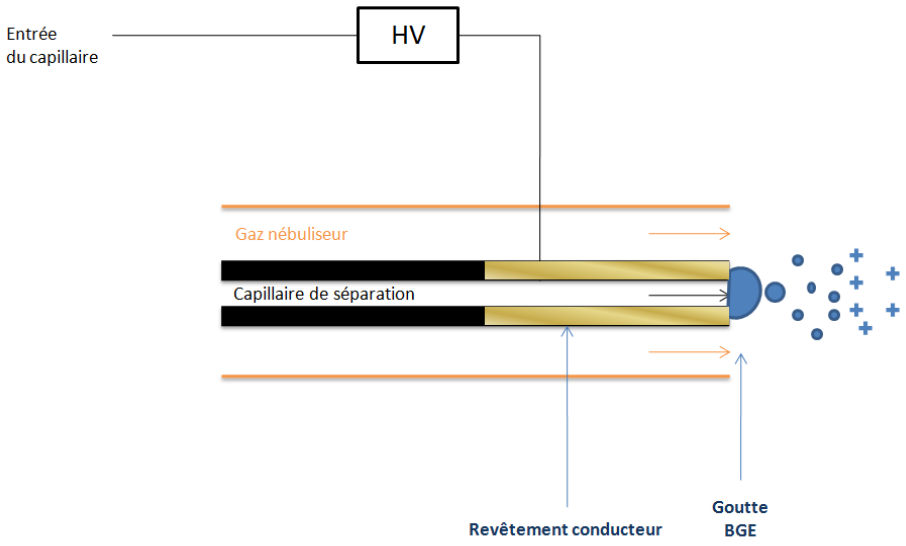


Figure 19. *Interface « Sheathless » à connexion par revêtement conducteur.*

La deuxième configuration reprend l'interface à jonction liquide sans liquide additionnel (figure 20). Le contact électrique se fait par l'intermédiaire de la jonction liquide[134,135,136]. Le nanospray prend la forme d'une aiguille apportant le liquide de séparation dans la source. Diverses déclinaisons ont été proposées en changeant le procédé de jonction (tube de téflon, capillaire de silice, connecteur, douilles de téflon avec fritté de laine de verre, jonction poreuse)[137,138]. Le principe de jonction a été repris en utilisant un raccord en T avec une électrode d'or[139].

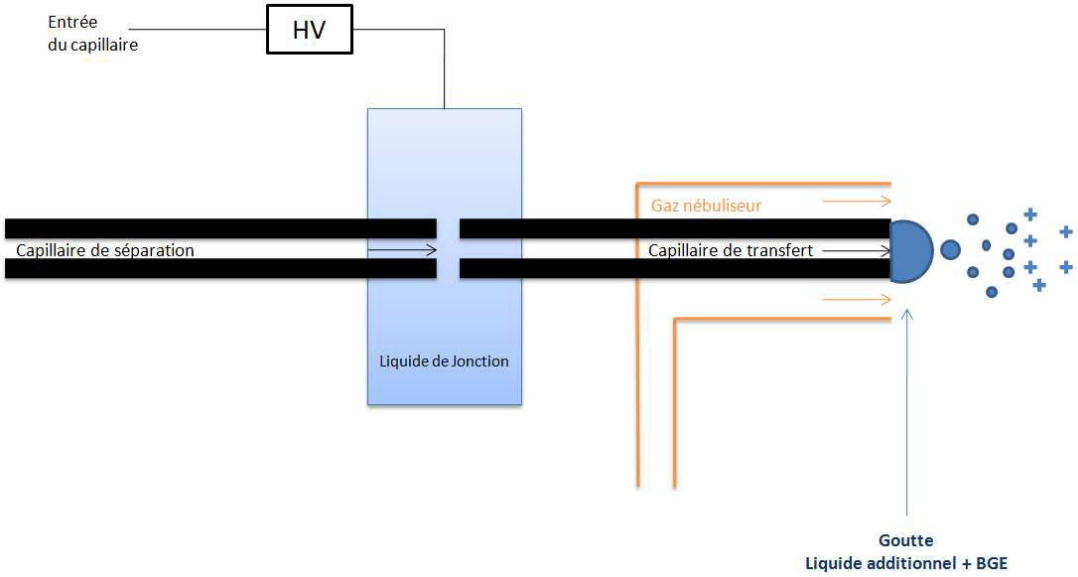


Figure 20. *Interface « Sheathless » à jonction liquide.*

Une troisième géométrie d'interface propose d'insérer une microélectrode (figure 21) à l'intérieur du capillaire de séparation[140].

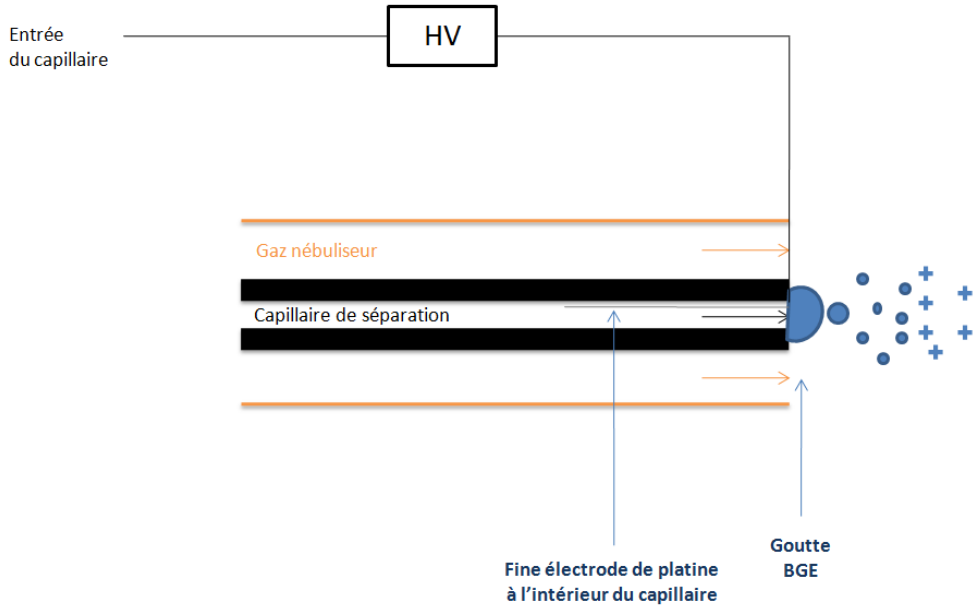


Figure 21. *Interface « Sheathless » à microélectrode.*

Enfin, plus récemment en 2007, Mehdi Moini a développé une interface basée sur l'attaque à l'acide fluoridrique de l'extrémité du capillaire pour qu'il soit poreux[141]. Cette porosité permet de rendre conducteur le capillaire lorsqu'il est en contact avec un électrolyte (figure 22). Le capillaire de séparation est ensuite placé dans une canule métallique rempli d'un liquide conducteur statique permettant le retour du courant.

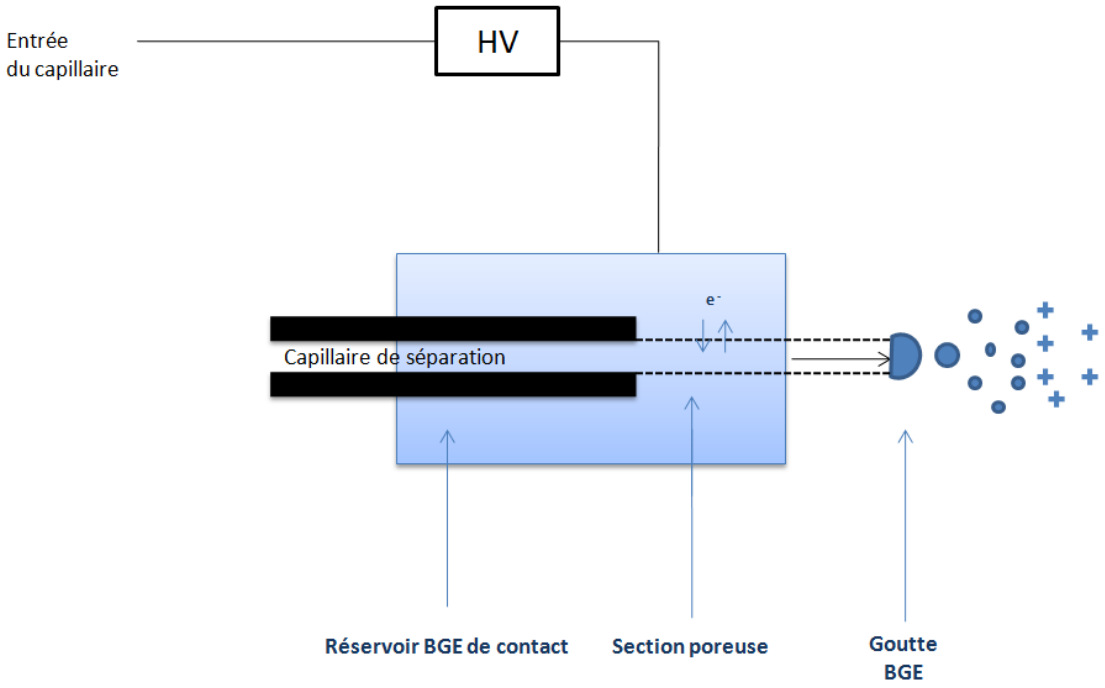


Figure 22. *Interface « Sheathless » à capillaire poreux.*

Aujourd'hui, cette interface est en cours de commercialisation par la société SciexSeparation (Brea, USA)[142]. Elle a été mise en application avec succès dans un grand nombre de domaines tel qu'en protéomique[143,144,145,146,147], en métabolomique[148], en protéine intacte[149],[150] ou en tant que simple système d'infusion[151].

3.2. Les interfaces CE/MALDI-MS.

Comme nous l'avons vu précédemment, le couplage de la CE avec la MS à source ESI représente aujourd'hui un outil alternatif de choix aux couplages chromatographiques classiques. Grâce à sa géométrie et à sa relative facilité de mise en application, ce couplage est majoritairement mis en œuvre pour les analyses de CE/MS. Cependant, les propriétés intrinsèques de l'ESI imposent l'utilisation de BGE volatile pour la formation d'un spray mais aussi une présence et une concentration maîtrisées en sels et en détergents pour minimiser les phénomènes de suppression d'ions[152,153,154].

En effet, la CE nécessite souvent l'utilisation d'un BGE dont la composition est majoritairement en phase aqueuse et en présence de sels avec une force ionique pouvant atteindre 1M. De plus, d'autres modes tels que la CIEF ou la MEKC imposent l'utilisation d'ampholytes ou de détergents rendant très complexe voire impossible l'utilisation de l'ESI.

La source MALDI, décrite dans le paragraphe 2.1.3 , apparait comme une alternative importante au couplage de la CE avec une source ESI-MS. Le couplage CE/MALDI-MS permet en effet d'allier la rapidité, la haute résolution et la grande efficacité de séparation de la CE avec la sélectivité et la sensibilité[155,156] du MALDI-MS. De plus, comparé à l'ESI, la source MALDI permet une meilleure compatibilité avec les conditions de la CE. En effet, la source MALDI est grâce à son principe d'ionisation plus tolérante envers la présence de sels et/ou de détergents[157,158]. De plus, l'étape de co-cristallisation de l'échantillon et de la matrice permet une plus grande malléabilité du traitement de l'échantillon post-séparation. Il est en effet possible d'effectuer des opérations de lavages sur cibles permettant d'éliminer au maximum les sels ou de procéder à des réactions sur cible[159,160]. Evidemment, ce couplage n'est pas exempt de limitations. Concernant la CE, la limitation majeure est la même que celle du couplage CE/ESI-MS, à savoir le maintien du courant. En effet, toute chute de courant implique des phénomènes de diffusion de l'échantillon à l'intérieur du capillaire provoquant une baisse de l'efficacité et de la résolution de la séparation. Les principes physiques des interfaces CE/MALDI-MS sont en grande majorité identiques aux interfaces CE/ESI-MS, c'est-à-dire basées sur l'utilisation de liquide additionnel, de jonction liquide ou de l'utilisation de capillaires rendus conducteurs.

Concernant la source MALDI, la limitation est propre au principe même du MALDI. En effet, lors de l'étape de désorption/ionisation, l'irradiation laser est réalisée sur un dépôt solide d'un mélange de matrice et d'échantillon ce qui empêche théoriquement tout couplage avec une méthode séparative en veine liquide. Cette limitation a imposé de lourds développements instrumentaux et a conduit au développement de deux types de couplage distincts : le couplage direct, avec un dépôt à l'intérieur de la source suivie d'une étape de cristallisation intégrée et le couplage indirect, avec une étape de dépôt sur cible hors de la source et une étape de passage manuel ou automatisé de la cible dans la source.

Pour décrire les différentes configurations de couplage CE/MALDI-MS nous avons décidé de décrire, tout d'abord, les premières interfaces CE pour la collection de fractions. En effet, ces interfaces ont les

mêmes problématiques pour le maintien de la séparation électrophorétique lors des processus de collectes. C'est la raison pour laquelle, elles sont considérées comme les prémices des couplages CE/MALDI-MS.

3.2.1. Collecte de fractions.

En 1992, Castoro *et al*. ont publié les premiers résultats issus d'un couplage CE/MALDI-MS[161] et réfèrent dans leur article, des premiers couplages direct et indirect[162,163] dans les présentations en 1991 à la 39ème ASMS par Williams *et al*. et Lacey *et al*.

Cependant, bien avant les couplages avec la source MALDI, des équipes de chercheurs ont tout d'abord étudié la possibilité de récupérer les analytes au fur et mesure de la séparation électrophorétique. En comparaison avec la chromatographie liquide, la collection de fraction en CE doit pouvoir se faire en conservant au maximum la haute résolution de la séparation électrophorétique.

En effet, l'action de collection de fraction doit se faire avec des procédés pouvant récolter les échantillons à des temps définis tout en conservant le champ électrique indispensable à l'électrophorèse. La méthode la plus "simple", impliquant un minimum de développements instrumentaux, est de procéder à la séparation électrophorétique à l'intérieur de vials remplis de BGE et reliés à l'électrode[164]. C'est l'étape préliminaire au développement du couplage CE/MALDI-MS.

En 1988, Rose *et al*. ont mis au point un système automatisé permettant de récupérer les analytes en sortie de capillaire en vue de la caractérisation de l'activité biologique de l'α-chymotrypsine. Ce système consiste en un montage proposant un réservoir principal et dix réservoirs supplémentaires (figure 23.)

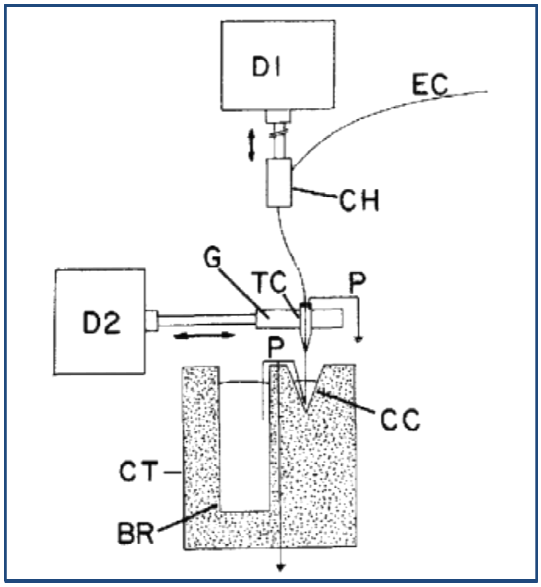


Figure 23. *Reproduction du schéma du système de collecte de fractions de la publication de Rose 1988[164].*

Tous les réservoirs sont équipés d'une électrode de platine reliée entre elles et permettant d'amener le courant. Pendant la majorité du temps de séparation, la sortie du capillaire reste au repos dans le réservoir principal. Pour la collecte de fraction, des moteurs pilotés par informatique déplacent la sortie du capillaire de réservoir en réservoir. L'équipe a effectué plusieurs séparations sans collecte de fraction pour "calibrer" les temps de séparation afin de programmer les temps de "sortie" des échantillons. L'analyse par HPLC des différentes collectes montreront la présence des analytes uniquement dans les récipients prévus. Ce type de procédé de collecte se décline dans différentes versions et sera utilisé notamment pour la réalisation de séparation préparative[165].

Un peu plus tard, en 1990, Xiaohua Huang *et al*. ont mis au point un procédé utilisant un capillaire percé afin de pouvoir relié l'intérieur du capillaire à l'électrode[166] tout en gardant la sortie du capillaire libre. Le système est constitué d'un capillaire préalablement percé à l'aide d'un laser CO_2 permettant de traverser la silice. L'orifice est ensuite rebouché par de la silice en poudre. Le bouchon de silice étant poreux, le contact électrique peut se faire entre le milieu intra-capillaire et une enceinte remplie de tampon entourant le capillaire (figure 24).

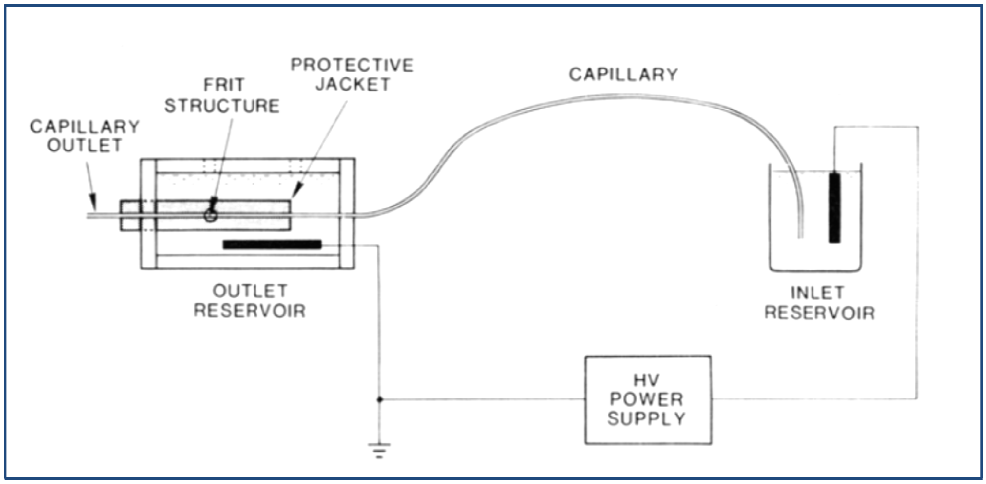


***Figure 24**. Reproduction du schéma du système de collecte de fractions de la publication de Huang 1990[166].*

Néanmoins, la gaine de polyamide, proche de l'orifice, est retirée rendant le système fragile et imposant au capillaire de rester fixe. Malgré cette limitation, l'analyse des collections de fraction montre la présence des analytes dans les fractions prévues et sans contamination. L'équipe a estimé que 90% des échantillons pouvait être collectés.

En 1991, Guzman *et al*. ont utilisé un système de collecte de fraction comparable pour la collection semi-préparative d'anticorps monoclonaux[167]. La particularité de leur système consiste à l'utilisation de 1 à 6 capillaires (figure 25) en parallèle pour augmenter la sensibilité ainsi que la concentration par collecte (pg/ml). La sortie des capillaires débouchent ensemble dans un collecteur permettant d'amener la totalité des analytes vers l'interface de collecte.

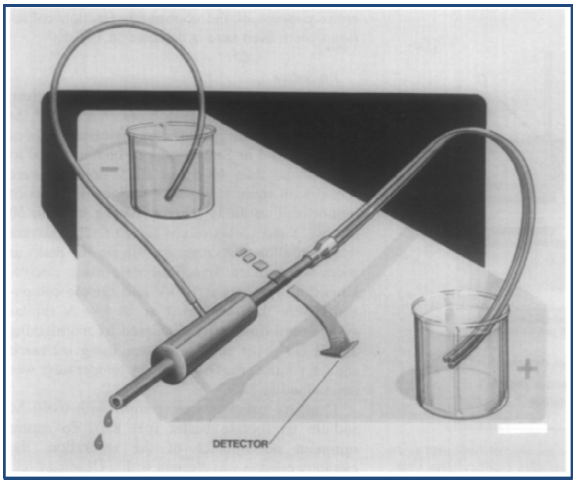


Figure 25. *Reproduction du schéma du système de collecte de fractions de la publication de Guzman 1990[167].*

L'année suivante va voir l'utilisation de la CE comme solution de séparation préparative avec le développement d'une succession de système de collecte de fraction (Fig 26.) En 1992, Albin *et al*. ont mis au point un système de collecte de fractions utilisant un injecteur automatique. En mode collection, des vials contenant des inserts remplis de BGE sont utilisés. Le système a été évalué sur différents mélanges de peptides et de protéines entières. L'étude a montré la robustesse du système ainsi que sa capacité à réaliser des étapes d'enrichissement de l'échantillon afin d'améliorer les taux de recouvrement[168].

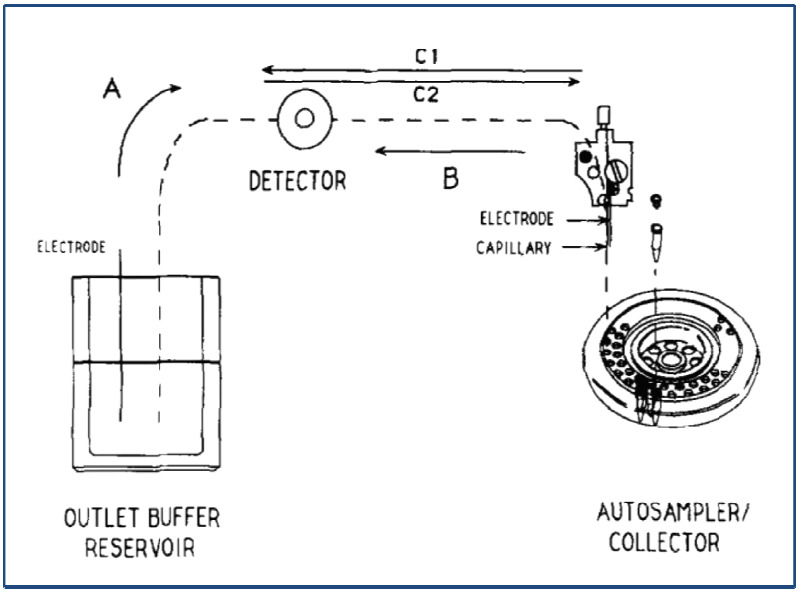


Figure 26. *Reproduction du schéma du système de collecte de fractions de la publication de Albin 1992[168]*

Un autre développement consiste à faire évoluer la nature du support de collecte. En effet, en 1992, Cheng utilise un système de disque tournant permettant de collecter l'effluant sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF)[8] (figure 27.) Le dépôt continu sur disque tournant sera repris par plusieurs équipes scientifiques en y adaptant des membranes différentes[169,170,171,172].

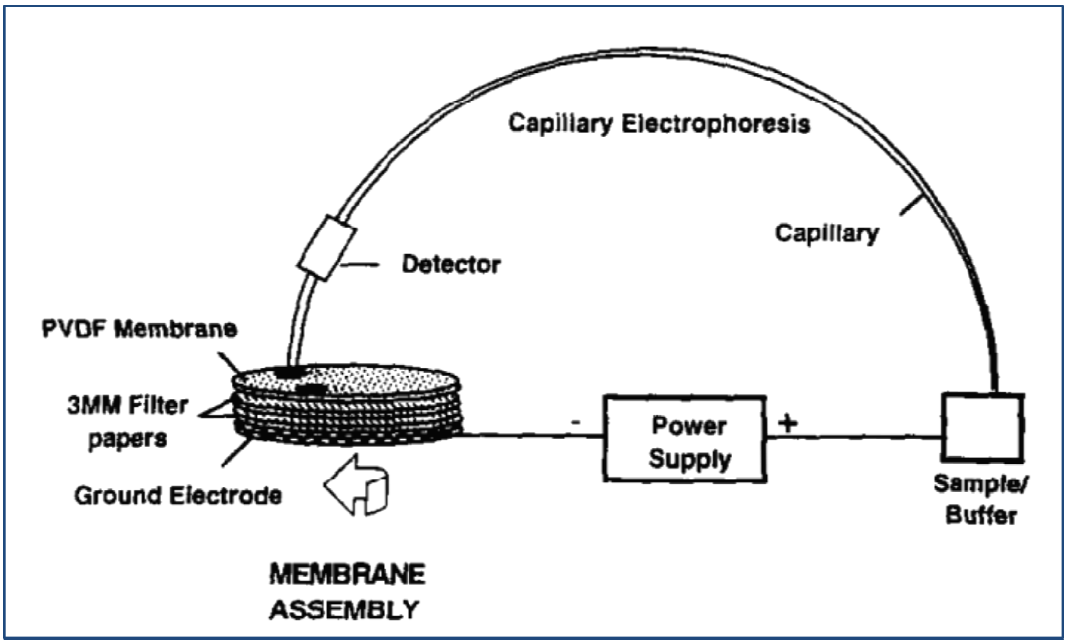


***Figure 27**. Reproduction du schéma du système de collecte de fractions de la publication de Cheng 1992[169].*

En 1995, Muller *et al*. ont mis au point un système de collecte de fraction permettant de récupérer les analytes séparés dans un système de capillaire "réservoir" tournant[173]. Le système embarque jusqu'à 60 capillaires en verre (figure 28.) Ce système a permis de fractionner et de collecter des fragments d'ADN qui ont été analysés ensuite en biologie moléculaire par réaction en chaîne par polymérase (PCR).

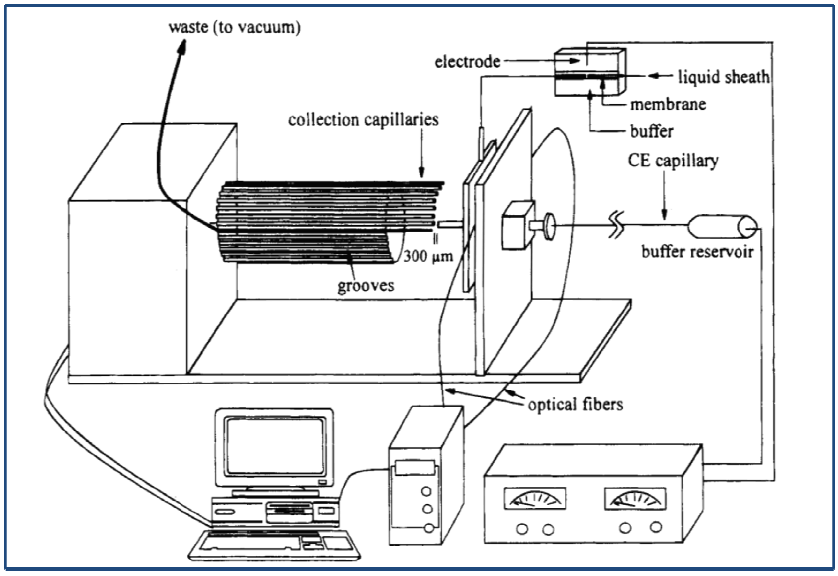


***Figure 28**. Reproduction du schéma du système de collecte de fractions de la publication de Muller 1995[173].*

L'apparition du couplage CE/MALDI-MS est une conséquence directe à l'évolution de ces systèmes de collections de fractions. En effet, le besoin croissant en science analytique de simplification de mélanges complexes et la recherche ininterrompue de détecteur toujours plus sensible a impliqué le développement du couplage de la CE avec la MS notamment à source MALDI.

3.2.2. Les couplages CE/MALDI-MS.

Comme nous l'avons vu en introduction, le cahier des charges de couplage CE/MALDI-MS impose deux grands principes : le maintien du courant lors de la séparation électrophorétique et le dépôt en phase solide de l'échantillon avant l'irradiation laser.

Concernant le maintien du courant, la quasi-totalité des interfaces reprend les principes physiques du couplage de la CE avec une source ESI, à savoir l'utilisation d'un liquide additionnel coaxial, la jonction liquide ou l'utilisation d'un capillaire conducteur. En ce qui concerne la réalisation de dépôt solide, cet impératif a conduit au développement de deux types de couplage distincts : le couplage direct avec un dépôt à l'intérieur de la source suivi d'une étape de cristallisation intégrée et le couplage indirect avec une étape de dépôt sur cible hors de la source et une étape de passage manuelle ou automatisé de la cible dans la source.

3.2.2.1. *Les interfaces CE/MALDI-MS directes.*

Le principal obstacle à la réalisation de ce couplage réside dans le fait que la séparation, la collection de fractions, le mélange avec la matrice et l'analyse MALDI doivent se faire en continu. Ceci implique des difficultés de réalisation notamment d'ordre instrumental. En effet, la première difficulté repose sur le fait que le couplage direct demande un énorme travail d'ingénierie pour modifier une source MALDI.

En 1997, le premier système a été proposé par Chang et Yeung qui décrivent un système permettant d'amener la sortie du capillaire directement dans la source MALDI[174].

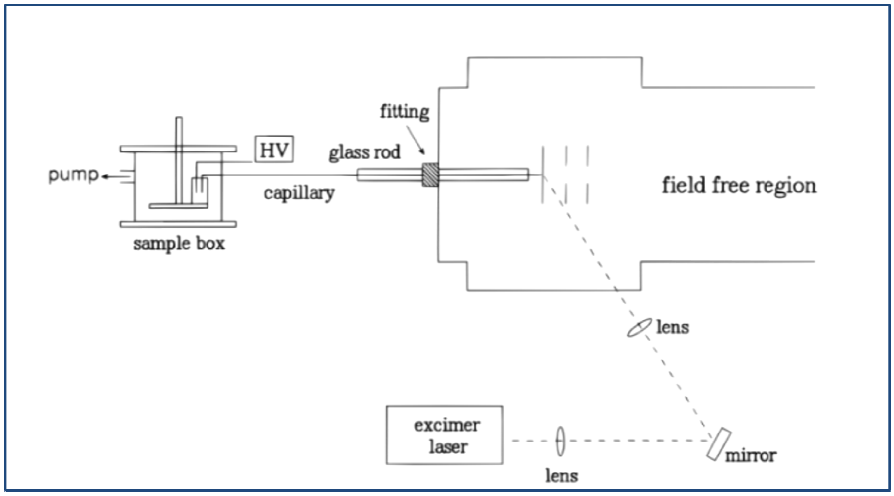


Figure 29. *Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS directe de la publication de Chang1997[174].*

En effet, l'extrémité du capillaire se place à l'endroit même du tir laser (figure 29). Afin d'établir le contact, elle est recouverte de tungstène formant une fine couche conductrice. Pour transmettre l'énergie du tir laser aux analytes, un composé ($CuCl_2$) absorbant à la longueur d'onde du laser est incorporé au BGE. La difficulté du système réside sur un compromis entre vitesse d'élution et cadence de tir laser. Une vitesse trop rapide par rapport au tir laser implique qu'une goutte se forme et gèle, pouvant boucher le système. A l'inverse, une vitesse trop lente engendre une perte de sensibilité. Les essais effectués sur de la sérotonine montre l'efficacité du système bien que des adduits de sodium et

de potassium peuvent apparaitre. Les auteurs estiment que le système permet d'analyser des analytes de masse supérieure à 50 Da sans interférence.

Plus tard d'autres systèmes de couplages directs ont été développés par Preisler *et al*. L'équipe a décrit un montage constitué d'une roue en quartz rotative[175] (figure 30) placée à l'entrée de la source MALDI.

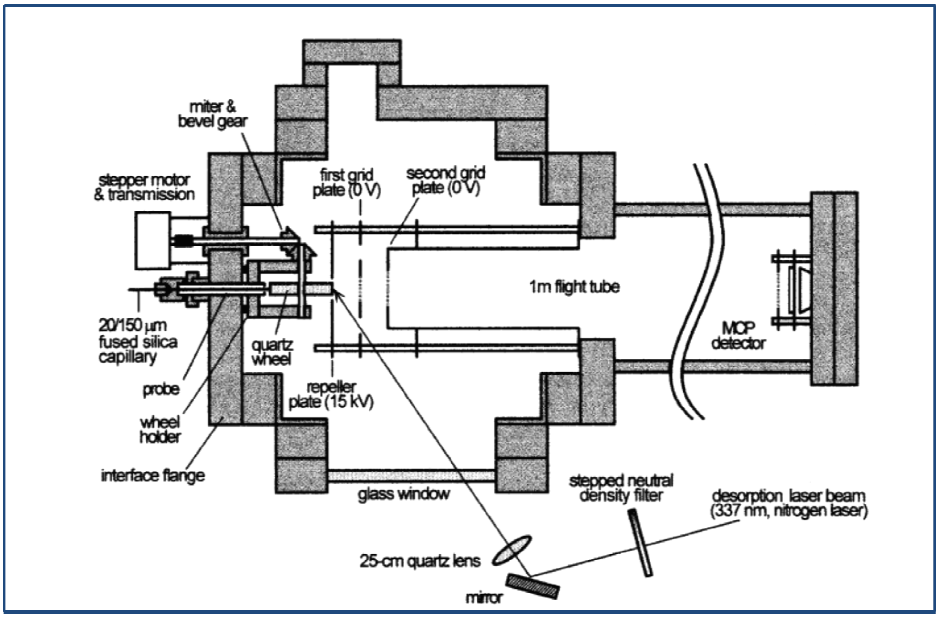


Figure 30. *Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS directe de la publication de Preisler 1998[175].*

Cette roue est le support du dépôt à la sortie du capillaire de séparation. Le dispositif se trouvant dans une enceinte à faible pression (10^{-6}Torr), la sortie du capillaire débouche sur une chambre remplie d'un liquide de jonction relié à l'électrode. Le capillaire d'infusion en regard du capillaire de séparation permet le dépôt analyte/matrice sur la roue. Une fois la séparation et la vitesse de rotation synchronisée, le mélange analyte/matrice se dépose et la roue tourne. Par la rotation du support, le dépôt est présenté dans la source (10^{-8} torr) en position pour le tir laser.

Ce système complexe a demandé un énorme travail d'optimisation. En effet, les compositions en solvant du liquide de jonction et la vitesse de rotation de la roue conditionnent la qualité du dépôt. Le bon fonctionnement du système et la finesse du dépôt a permis de retrouver 11 isoformes sur 12 de l'angiotensine. En 2000, ce même système subira, de la part de la même équipe[176], une optimisation

avec l'utilisation d'une bande déroulante permettant de s'affranchir de l'étape de lavage du dépôt (figure 31.)

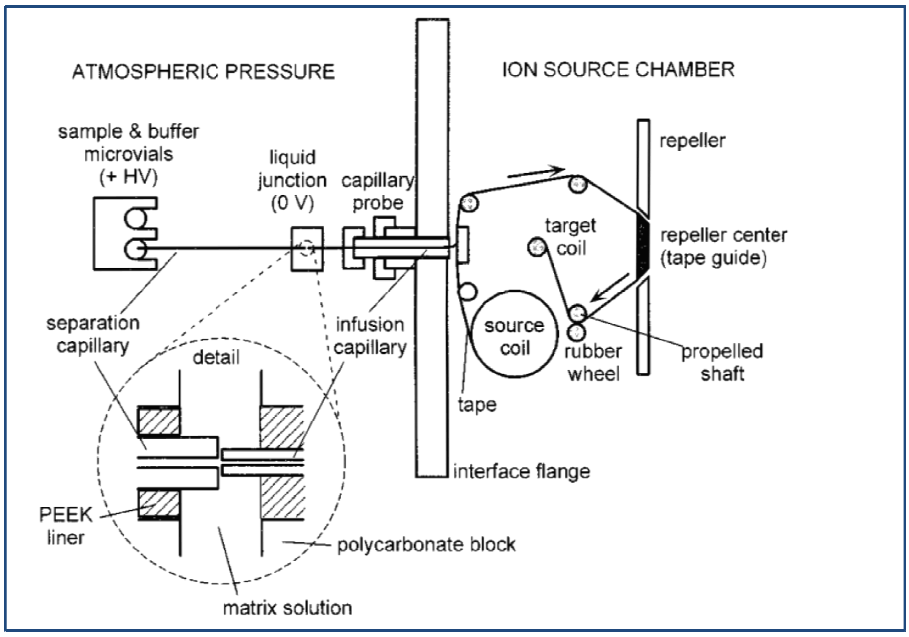


***Figure 31**. Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS directe de la publication de Preisler 2000[176].*

En 2000, grâce aux travaux de Henrik Ørsnes (1998)[177,178], un système utilisant une boule d'acier comme support de dépôt a été couplé à la sortie de la CE[179]. Dans cette technique, les analytes dans le BGE sont déposés en continu sur la surface de boule (figure 32.)

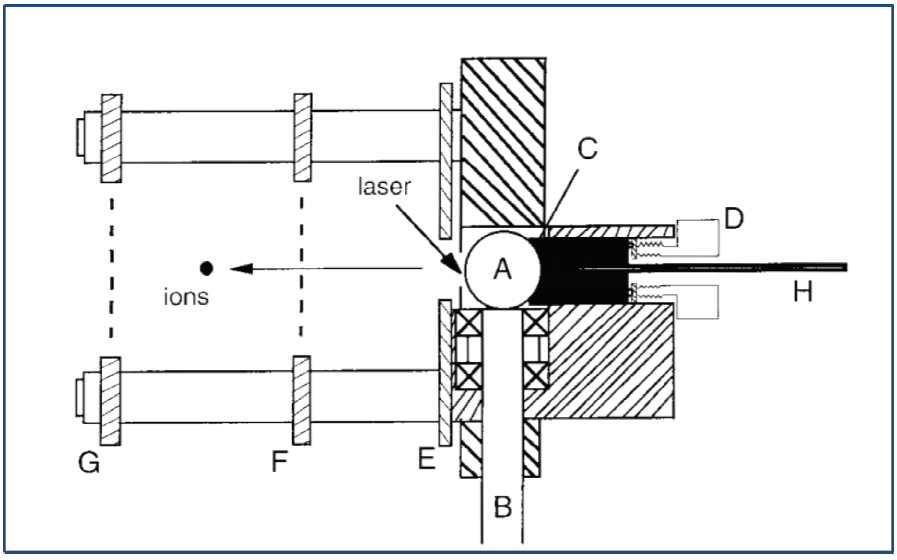


***Figure 32**. Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS directe de la publication de Ørsnes 2000[179].*

Une fois l'échantillon déposé sur la boule, une seringue reliée à un capillaire dépose la matrice en continu afin d'effectuer un dépôt de goutte séchée. La boule continue à tourner, passe par un joint téflon et présente le dépôt dans la zone de tir laser. Le joint téflon fait séparation entre les deux zones de vide. Une fois l'étape de MALDI effectuée, l'échantillon ressort de la source et est éliminé par une seringue délivrant une solution de rinçage. Ce rinçage permet de réutiliser la position pour une analyse suivante.

Ce système a été évalué sur un mélange de substance P, vasopressine et neurotensine. Il a montré que la vitesse de rotation de la boule influence la résolution de la séparation. Une vitesse trop rapide entraîne la chute du nombre de plateau théorique (HPT).

Malgré des résultats très encourageant et mettant en évidence l'apport d'une telle méthode pour les applications biologiques, les aspects techniques ont été un frein important au développement de ce couplage. A ce jour, aucun couplage CE/MALDI-MS direct n'a été commercialisé.

3.2.2.2. Les interfaces CE/MALDI-MS indirectes.

Les interfaces CE/MALDI-MS indirectes sont toutes basées sur le principe de réaliser l'analyse en deux étapes distinctes : l'étape de séparation électrophorétique avec collection de fractions et l'analyse de l'échantillon par MALDI-MS. Par rapport au couplage direct, les interfaces indirectes apportent quelques avantages.

Le premier, certainement le plus important pour son développement, est qu'il n'y a pas de modification de la source MALDI. En effet, seule l'étape de dépôt sur cible a entrainé des développements instrumentaux. Les instruments commerciaux de MALDI-MS peuvent donc être utilisés dans leur configuration « constructeur ».

Un autre avantage, aussi dû au découplage de la séparation et de la détection MALDI-MS, est le fait que les paramètres d'optimisation de séparation sont plus simples à mettre en place. Le fait de déposer l'échantillon juste après la séparation ouvre la possibilité de réaliser un traitement post-séparation sur cible (lavage, dessalage, dérivation, réaction enzymatique…)[180]. De plus, il est possible de faire varier le support de dépôt comme par exemple l'utilisation de cible MALDI avec différents traitements de membrane[168,181] (matrice[182], silicone[183], paraffine[184], silice greffée C18[185]…) ou de plaque PCR. De ce fait, il est possible de réaliser soit un dépôt direct sur cible pour avoir une analyse de l'échantillon rapide, soit un enrichissement sur plaque pour pouvoir concentrer des échantillons[186]. Enfin, ce type d'interface permet aussi de conserver et de ré-analyser des échantillons. C'est une méthode non destructrice.

D'un point de vue pratique, le principe des interfaces indirectes est basé sur le même procédé que les systèmes à collecte de fractions. La collecte s'effectue directement à la sortie du capillaire de séparation. L'expérimentateur déclenche la collecte de manière hydrodynamique (avec pression) ou électrocinétique (sans pression) à la détection du pic ou de la zone d'intérêt.

Cependant, tout comme l'interface directe, la limitation importante au bon fonctionnement de ce type d'interface est le maintien du courant de la séparation électrophorétique. Dans le cas des interfaces indirectes, les solutions proposées reprennent la géométrie des interfaces décrites pour les CE/ESI-MS. En effet, la nécessité de garder un contact électrique tout au long de la séparation malgré la collecte de fraction impose l'utilisation de procédés tels que les interfaces à liquide additionnel[187], les interfaces à liquide de jonction ou la mise en place de capillaire métallisé[188].

Le premier type d'interface développé est l'interface à liquide additionnel. Ce type d'interface utilisé en couplage CE/MALDI-MS présente deux avantages.

Le premier est de conserver un champ électrique aux extrémités du capillaire que ce soit par l'intermédiaire d'un réservoir ou par le remplissage d'un tube coaxial. Le second avantage est de créer une goutte à la sortie du capillaire dans laquelle diffusera l'analyte lors de la collecte. Dans la majorité des cas, le liquide additionnel est composé de BGE. Cependant, VanVeelen *et al*. ont montré qu'il était aussi possible d'ajouter la matrice[189,190] directement dans le liquide additionnel[191]. Cette addition permet de mélanger la fraction de l'échantillon directement avec la matrice afin de réaliser un dépôt goutte séchée. Cependant, à cause des propriétés chimiques de la matrice (pH acide, conductivité…),

son ajout directement dans le BGE peut modifier le profil électrophorétique, voire détériorer complètement la séparation[192].

Une autre limitation au caractère indirecte de l'interface est basée sur le contrôle de la séparation électrophorétique dans l'étape de collecte par un deuxième système de détection. En effet, le fait de découpler l'étape de séparation et l'étape de détection MALDI-MS impose une double détection pour contrôler à la fois l'étape de collecte et la MS. Ainsi l'expérimentateur de connait l'origine du problème dans le cas d'une analyse défectueuse. La totalité des interfaces développées avec une double détection ont été avec un détecteur UV externe[193,194]. Ceci ajoute une instrumentation supplémentaire et de ce fait limite toute automatisation. Cependant, il est à noter que, dû à leur caractère « homemade », la grande majorité des interfaces développées à ce jour n'utilisent pas de double détection.

A fur et à mesure du développement des couplages indirects, trois grandes catégories de couplages indirects se distinguent. Ces catégories diffèrent du monde de la connexion électrique mais surtout par la présence ou non d'un flux de liquide additionnel.

3.2.2.2.1. Couplage CE/MALDI-MS indirect avec interface à débit de liquide additionnel.

En 2001, Johnson propose l'utilisation d'un système robotisé commercial, Probot (Dionex, BAI) destiné à la collection de fractions en LC/MALDI-MS. L'équipe modifie le robot en intégrant une interface coaxiale en lieu et place du système de dépôt classique. Cette interface consiste à faire passer la sortie du capillaire de séparation dans une aiguille métallique. Cette aiguille métallique joue ainsi le rôle d'électrode[195]. Un système de distribution de liquide additionnel permet de distribuer l'électrolyte support et ainsi de conserver la jonction électrique avec le capillaire. Enfin, le support de dépôt est piloté permettant un déplacement sur trois axes. Ainsi l'aiguille reste fixe et le support vient se positionner afin de « récolter » les fractions. Le système ne prévoyant pas de distribution de matrice, l'expérimentateur doit recouvrir préalablement la cible MALDI avec la matrice ce qui ne permet pas la réalisation du dépôt goutte séchée.

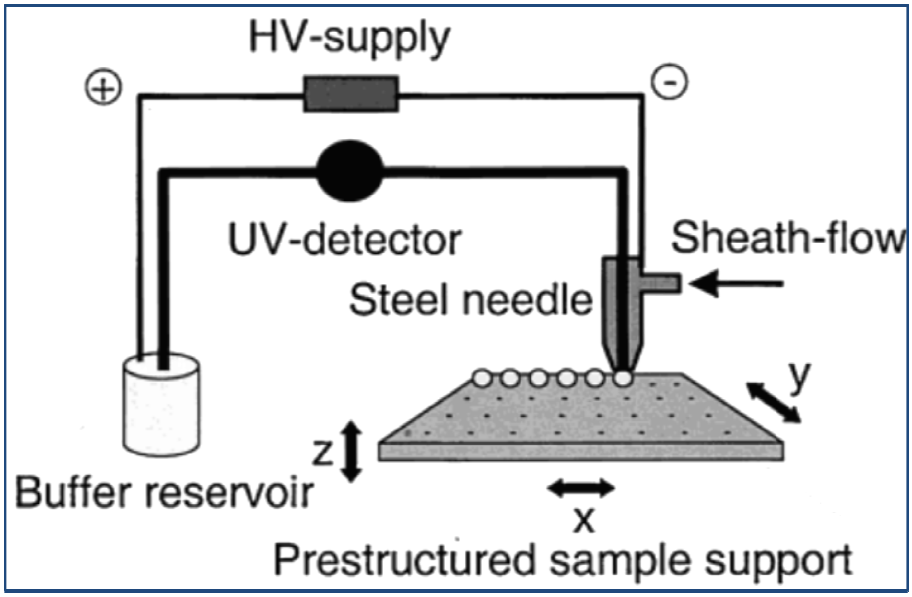


***Figure 33**. Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS indirecte de la publication de Johnson 2001*[195].

Johnson *et al.* intègrent une détection UV externe afin de contrôler la séparation électrophorétique pendant la collection de fraction. L'utilisation d'un robot commercial et de son logiciel permet l'automatisation tout au long du processus de séparation et de dépôt. Cependant la détection UV n'est pas intégrée dans l'automatisation. L'absence de contamination d'une fraction à l'autre est évaluée en comparant l'analyse MALDI de spots consécutifs correspondant à un pic sur l'électrophérogramme UV. L'équipe détermine que l'intensité du signal varie en même temps que la définition du pic et que le signal disparait sur les spots suivants. De plus, ce couplage permet de détecter des concentrations de l'ordre du femtomole de mélange de peptides. Enfin, le couplage décrit par Johnson *et al*. a montré son intérêt sur un mélange de peptides complexes en permettant une réelle augmentation de peptides détectés par rapport à un dépôt direct.

Plus tard, en 2009, Helmja *et al*. reprennent la philosophie de l'interface coaxiale[196] à liquide additionnel. La collection de fractions s'effectue dans une succession de vials (figure 34.). Le débit du liquide additionnel permet d'effectuer une goutte au bout de l'extrémité du capillaire. Lorsque la goutte devient suffisamment volumineuse (12-18 µl), la tension de surface n'est plus suffisante pour

permettre à la goutte (BGE/analyte) d'adhérer à l'aiguille. Ainsi, la goutte tombe dans le vial en passant devant un détecteur à LED.

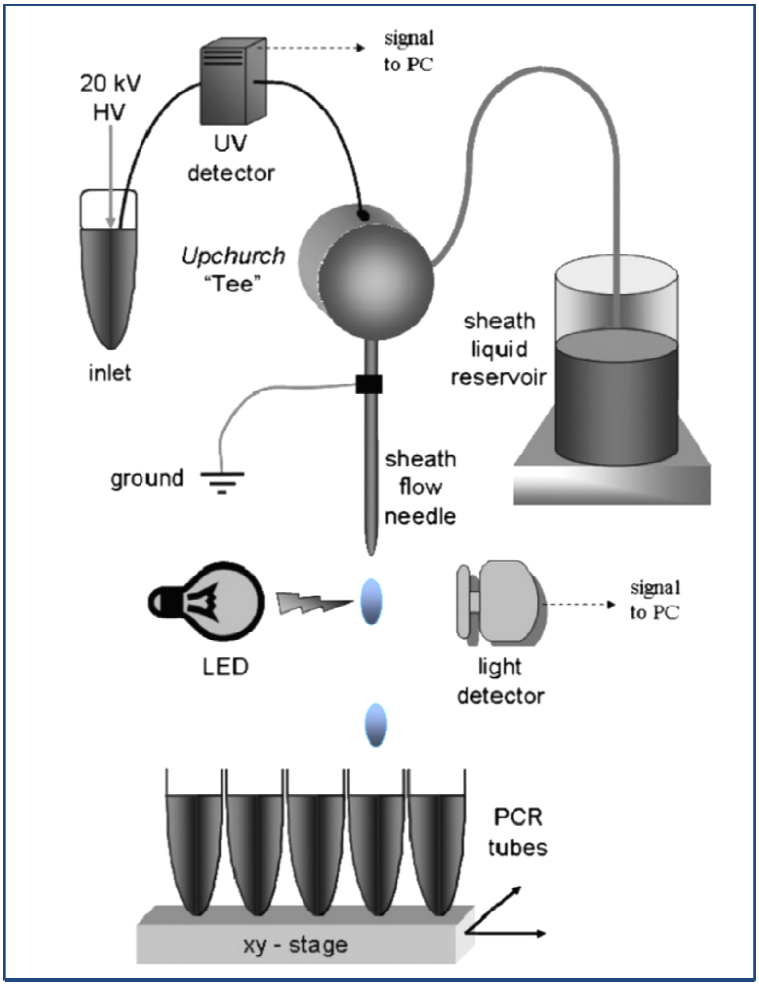


Figure 34. *Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS indirecte de la publication de Helmja 2009[196].*

La détection de la goutte indique au système de déplacer le support de collecte au vial suivant. Le volume et le temps de fractionnement dépendent directement du diamètre externe du capillaire. Ce système est avant tout utilisé comme un système automatisé sans intervention de la part de

l'opérateur. Le système a été évalué sur un mélange de protéines standards et montre une absence de contaminations d'un vial à l'autre. De plus, la particularité de la collection de fraction en vial donne la possibilité à l'opérateur de "retravailler " ou d'analyser les fractions sur différents systèmes (ESI-TOF-MS, ICP-MS).

Plus étonnant, Vannatta *and al.* en 2009, recyclent un système de distribution par valve d'une imprimante jet d'encre[197]. Grâce à l'utilisation d'une valve alimentée par hélium, le système automatisé permet de mélanger et d'insuffler le mélange matrice/effluent directement sur plaque MALDI.

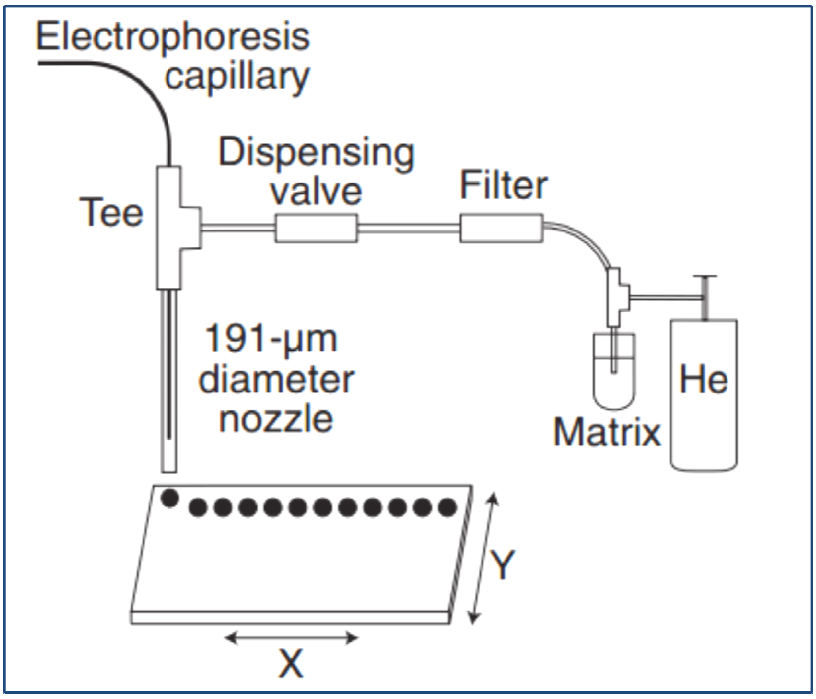


Figure 35. *Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS indirecte de la publication de Vannatta 2009[197].*

L'équipe valide le système en séparant un mélange de protéines standards et évalue l'efficacité de la séparation à 40 000 HPT et d'une sensibilité de l'ordre 500 atomoles.

3.2.2.2.2. Couplage CE/MALDI-MS indirect avec interface sans liquide additionnel.

Les systèmes sans liquide additionnel dit « sheathless » présentent l'avantage d'avoir une meilleure sensibilité. Néanmoins, la difficulté de conserver le courant électrophorétique durant les différentes phases de la collecte de fraction peut être un frein à leur développement. C'est dans l'optique d'améliorer la sensibilité en ne diluant pas l'analyte fractionné que les interfaces ont été mises au point.

Le premier couplage apparait en 1996. Zhang *et al*. proposent un système de dépôt continu (figure 36) sur une membrane de cellulose recouverte de matrice. La plaque et le support de plaque sont reliés à l'électrode[182]. La continuité du champ électrique nécessaire à la séparation électrophorétique peut se réaliser grâce au contact de la sortie du capillaire et de la cellulose. En effet, un angle de 60° entre le capillaire et la plaque assure le contact et le dépôt. Ce système a été évalué sur un mélange de protéines standards et d'un digestat d'apomyoglobine de cheval.

De plus, ce couplage en dépôt continu est dépourvu de détection UV supplémentaire. L'optimisation du système concerne majoritairement les étapes de dépôt et d'analyses MALDI. Néanmoins, la détection UV est effectuée sur un système classique afin d'établir les paramètres de séparations.

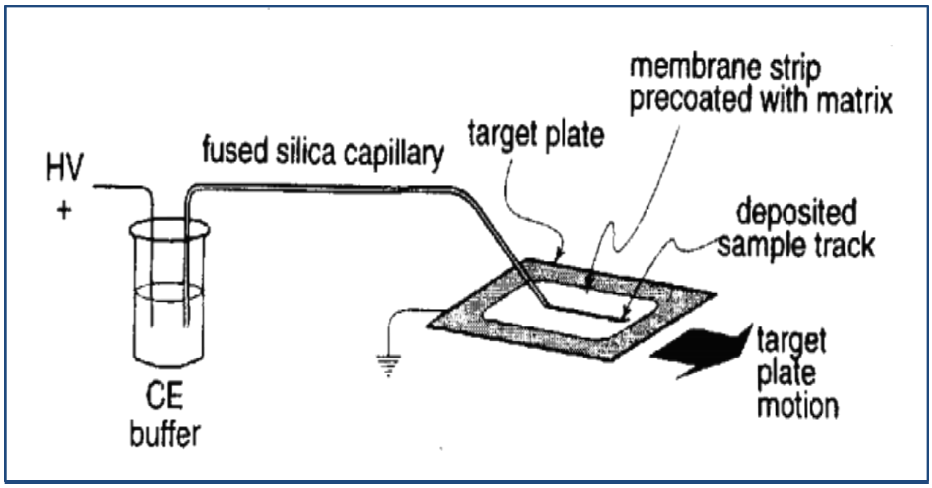


Figure 36. *Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS indirecte de la publication de Zhang 1996[182]*

Grâce au dépôt continu, les analytes séparés sont déposés en totalité sur le support. Ainsi, les paramètres de résolution et d'efficacité sont établis par la séquence de tir laser tout au long du dépôt.

Enfin, l'évaluation a montré que ce couplage à dépôt continu préserve la résolution et l'efficacité de la séparation électrophorétique (70 000 HPT) et permet de détecter des concentrations d'analytes de l'ordre de l'atomole.

Plus tard, Ojima *et al*. en 2001 proposent un système basé sur un électrocouplage par goutte de BGE (figure 37.) Afin d'établir une connexion électrique avec la sortie du capillaire, la plaque MALDI est reliée à la masse, jouant ainsi le rôle d'électrode. Afin de compenser le faible débit d'électrolyte support sortant du capillaire, l'opérateur dépose préalablement une goutte de BGE (1µL)[198]. De plus, la séparation électrophorétique est suivie par un détecteur UV additionnel pendant le processus de dépôt.

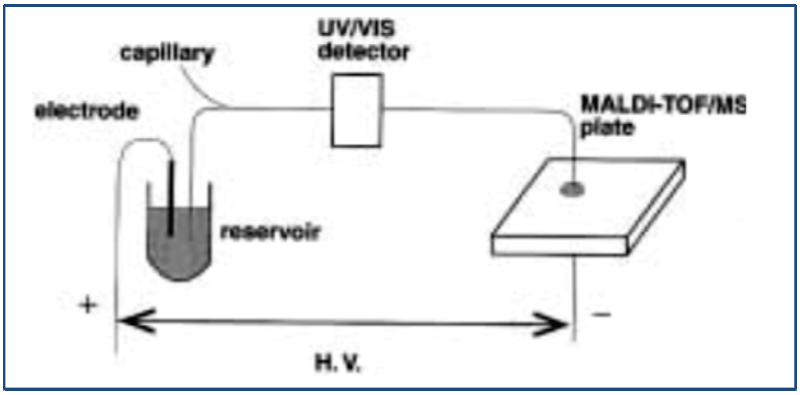


Figure 37. *Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS indirecte de la publication d'Ojima 2001[198].*

Ce système a été testé sur une séparation de lysozyme et de myoglobine intactes. La digestion enzymatique des protéines est effectuée après séparation et dépôt sur la plaque MALDI. Les résultats ont montré une stabilité du système et une absence de contamination et ceci malgré l'interruption du champ électrique à chaque changement de position de dépôt.

En 2002, une évolution du couplage indirect à dépôt continu est proposée par Rejtar *et al*. (figure 38.) Le couplage est équipé d'une interface permettant de procéder à un dépôt continu sur un support tournant[199]. La jonction liquide permet directement de mélanger l'effluant du capillaire de séparation

avec la matrice. Le mélange est ensuite déposé grâce au capillaire « de transfert » sur une plaque MALDI placée dans une enceinte sous vide.

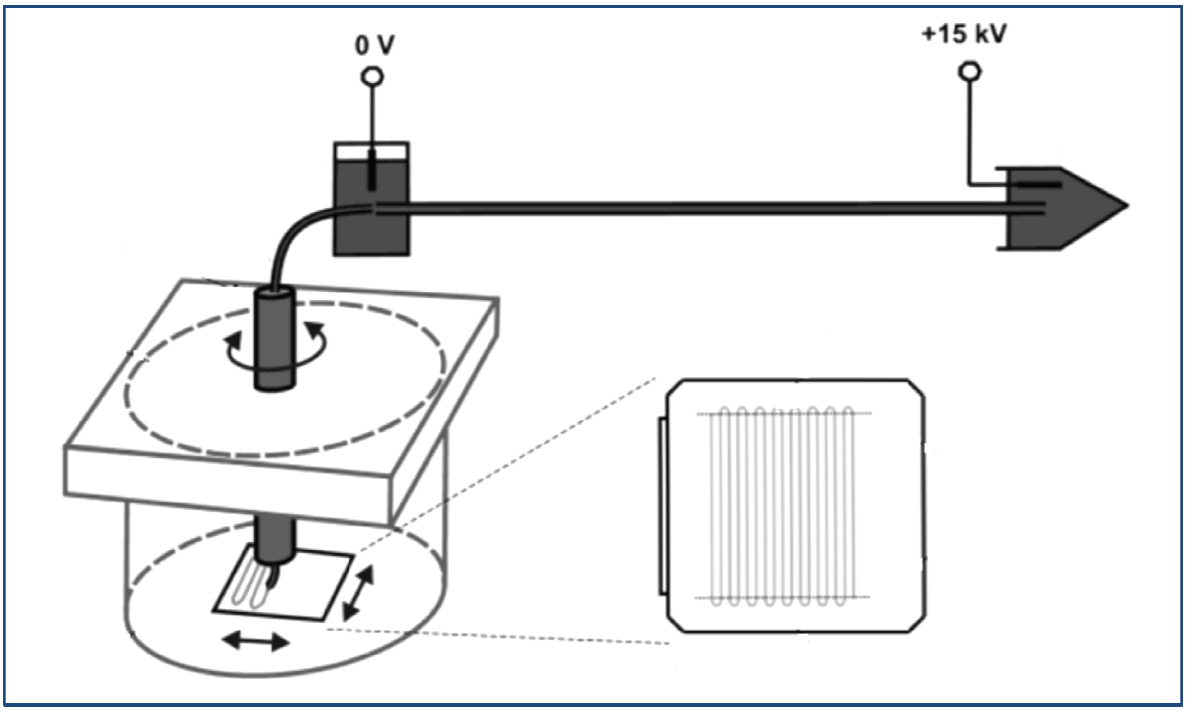


Figure 38. *Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS indirecte de la publication de Rejtar 2002*[199]*.*

L'équipe a validé le dispositif sur la séparation électrophorétique d'un digestat d'albumine bovine et montre une conservation de la résolution et l'efficacité (100 000 HPT). La comparaison avec un dépôt goutte séchée sur un mélange d'angiotensine montre une amélioration significative du rapport signal sur bruit (S/N). Cette différence est expliquée par la faible pression dans la chambre de dépôt permettant une évaporation homogène du mélange analyte/BGE/Matrice.

Enfin l'équipe a optimisé la vitesse de dépôt et la cadence du tir laser lors de l'analyse MALDI afin de définir qu'un nombre de 10 tirs laser par seconde tout au long du dépôt permet de « reconstruire » la séparation électrophorétique.

Plus tard, en 2004 Wei *et al*. présentent un système mêlant le principe de l'électronébulisation avec collecte de fractions sur plaque MALDI[200]. Ce système consiste à appliquer une tension entre la plaque MALDI et l'extrémité du capillaire. Ainsi, comme pour l'ESI, la présence d'une différence de potentiel

entre l'extrémité du capillaire et la plaque MALDI engendre l'apparition d'un cône de Taylor sur la goutte de BGE. La nébulisation du mélange BGE/analytes s'effectue. Le spray dépose le mélange BGE/analyte sur la cible MALDI. L'optimisation des dépôts consiste à maitriser le spray en variant la distance capillaire/plaque (100 - 500 µm) et la différence de potentiel pour l'électronébulisation (1.0 et 1.4 kV).

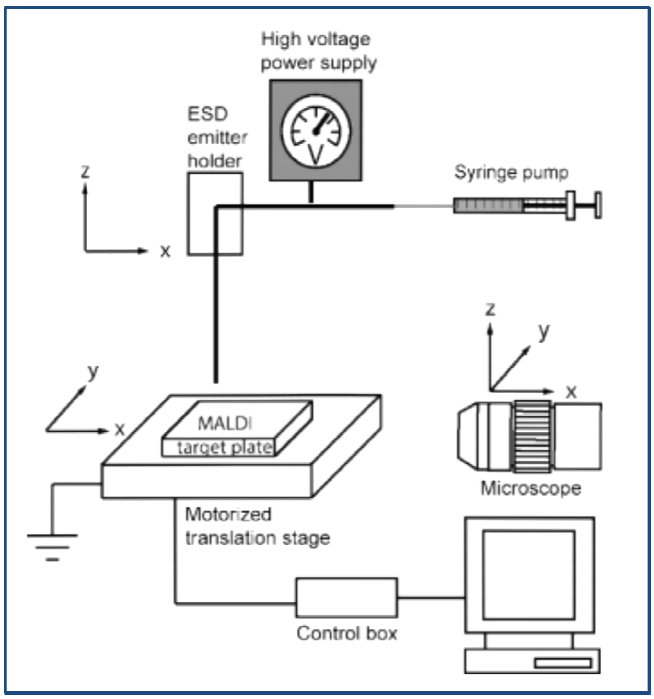


***Figure 39**. Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS indirecte de la publication de Wei 2004[200].*

L'équipe a testé ce couplage sur une gamme de concentration de bradykinine et sur un mélange de peptides. Les analyses MALDI ont montré une bonne robustesse du système et un très bon rapport S/N par rapport au dépôt classique. Enfin, la sensibilité du système a permis de détecter des concentrations de neuropeptides de l'ordre de l'atomole.

En 2009, Busnel *et al*. ont proposé un système permettant de s'affranchir de liquide de jonction à l'instar de l'électrocouplage[201]. Le procédé, appelé iontophorétique, consiste à peindre l'extrémité du capillaire avec une peinture argentée conductrice (figure 40.) L'extrémité argentée du capillaire est

reliée à la masse permettant de conserver le courant de séparation fraction après fraction. La collection de fractions s'effectue dans des gouttes de BGE ou de matrice préalablement déposées sur une plaque MALDI mobile permettant la séparation électrophorétique ininterrompue fraction après fraction. Busnel *et al*. ont compensé la dilution des analytes dans chaque fraction par l'utilisation d'une plaque MALDI préstructurée permettant de déposer l'échantillon.

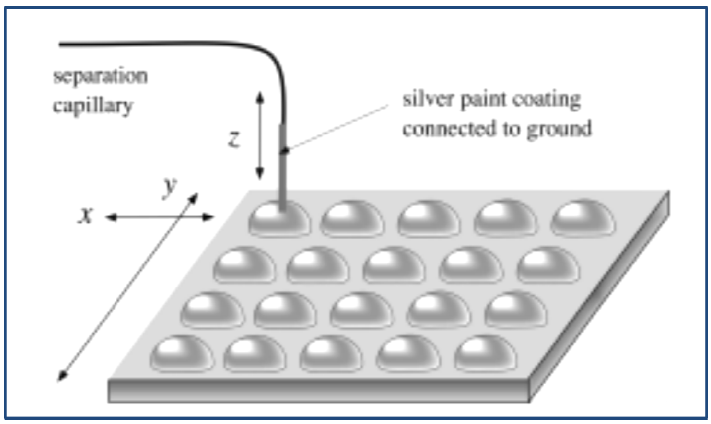


***Figure 40**. Reproduction du schéma de l'interface CE/MALDI-MS indirecte de la publication de Busnel 2009[201].*

Le couplage a été testé sur la séparation d'un digestat tryptique de 8 protéines modèles. Les résultats montrent une augmentation significative de la couverture de séquence de chaque protéine par rapport au dépôt direct.

3.3. Applications CE/MALDI-MS.

L'électrophorèse capillaire permet de séparer des composés chargés ou très polaires, voire neutre. La séparation électrocinétique apporte une solution complémentaire aux techniques chromatographiques liquides. Les phénomènes séparatifs mis en œuvre permettent de séparer des composés ou des mélanges complexes avec une très grande efficacité et une faible consommation d'échantillon. Le couplage CE/MALDI-MS allie les avantages de l'électrophorèse capillaire à la sensibilité, la précision et la robustesse de la source MALDI-MS. En effet, la meilleure tolérance aux

sels et aux détergeants autorise l'utilisation de BGE électrophorétique complexe. Un intérêt majeur a donc été porté sur l'utilisation du couplage CE/MALDI-MS pour l'analyse et la caractérisation de divers composés.

Bénéficiant des avantages apportés par les interfaces mises au point pour les couplages CE/ESI-MS, un grand nombre de systèmes de couplages ont vu le jour et ceci en fonction des nécessités de séparation et des moyens techniques à disposition.

Un grand nombre d'applications ont été recensées dans différentes revues, montrant l'intérêt grandissant pour le couplage CE/MALDI-MS[192,202,203,204,205,206,207 ,208 ,209,210]. On peut remarquer qu'une majorité de publications concerne le développement et l'évaluation des différents couplages et interfaces. Ces couplages nécessitent un important travail d'ingénierie afin de modifier la source (le couplage direct) ou l'interface de dépôt (couplage indirect). De ce fait, la plupart des travaux sont réalisés sur des mélanges de protéines modèles ou de digestat de protéines standards (albumine, cytochrome, lysosyme etc...). Dans la totalité des cas, les résultats obtenus permettent de valider les choix des équipes sur l'optimisation des couplages. Une fois le système optimisé, les couplages sont utilisés pour l'étude et la caractérisation de différents types de composés, dont les biomolécules, les polymères ou dans une moindre mesure les petites molécules. En effet, la source MALDI est particulièrement adaptée pour les composés/édifices de haut poids moléculaire. C'est la raison pour laquelle la majorité des études sont réalisées sur des composés/édifices de poids moléculaire comparable aux protéines comme les polysaccharides, des polymères voire des cellules entières comme les bactéries.

Cependant, quelques publications font référence à l'étude de petites molécules. L'étude des molécules de très faible poids moléculaire est difficile du fait de la présence de la matrice, dont les clusters conjointement ionisés avec les analytes apparaissent sur le spectre de masse. Le pic de matrice altère les spectres des analytes rendant leur détection difficile (suppression d'ions). Enfin, la haute résolution de l'électrophorèse capillaire permet l'analyse d'échantillons très complexes (fluides organiques) autorisant des études de criblage dans des études biomédicales.

Une liste correspondant à ce jour à la totalité des applications obtenues à l'aide du couplage CE/MALDI-MS est reportée et rangée par domaine d'applications dans le tableau 3. Dans ce tableau, nous avons notifié le type de méthode de séparation utilisée (CZE, CIEF…), le type de couplage (direct ou indirect), la présence ou non de détection UV et la nature de l'échantillon. Les renseignements non

fournis sont marqués (N/A). Comme nous l'avons dit précédemment, on peut noter que la grande majorité des applications (>85%) sont dans les domaines de la protéine entière et de la protéomique.

Domaine	Couplage	Séparation	UV	Analytes	Année	Publication
Bio-ingénierie	Indirect	CZE	Oui	Poly(amido amine) (PAMAM) dendrimères	2012	[211]
Biomédicales	Indirect	CZE	Non	Urines	2004	[212]
Biomédicales	Indirect	CIEF	Oui	Blood sample	2005	[213]
Cellules	Indirect	CIEF	Oui	bactéries	2013	[214]
Cellules	Indirect	CZE CIEF	Oui	bactéries	2013	[215]
Cellules	Indirect	CIEF	Oui	Bacteries*DickeyaSolani*	2013	[216]
Petites Molécules	Indirect	MEKC	N/A	polyoxyl 35 castor oil	2002	[217]
Petites Molécules	Indirect	CZE	Oui	fluorosurfactant FC134	2005	[218]
Petites Molécules	Indirect	CZE	Non	syntheticdifuroquinonederivative Acide diaminoacetylmannuroniquedisaccharide modifié	2007	[219]
Petites Molécules	Indirect	CZE	Oui	Vérapamil et Angiotensine I, II, III	2009	[220]
Polymères	Indirect	CZE	Non	ethoxylatespolyethylèneglycol	1998	[221]
Polysaccharides	Indirect	CZE	Oui	Oligosaccharides	1997	[222]
Polysaccharides	Indirect	CZE	Oui	Mannooligosaccharide	2001	[223]
Polysaccharides	Indirect	CZE	Oui	oligosaccharides	2003	[224]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Anticorps monoclonaux	1991	[167]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Mélange de protéines Standards Digestat de subtilisine	1992	[172]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Mélange de protéines Standards	1992	[161]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Endorphines.	1993	[187]
Protéines, peptides	Indirect	N/A	Non	Peptides de Neurones de Lymnaeastagnalis	1994	[189]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Mélange de peptides standards	1994	[225]

Domaine	Couplage	Séparation	UV	Analytes	Année	Publication
				Mélande de protéines standards		
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Dynorphine substance P leucine enkephalin-lysine	1994	[170]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Oui	Mélange de protéines standards Variant de l'hémoglobine	1995	[4]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Mélange de protéines standards digestat de protéines standards	1995	[226]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Neurotensine Mélange de protéines standards digestattryptiqueapomyoglobine	1996	[182]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	enzyme superoxidedismutase PEG modifié	1996	[227]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Hormone de croissance recombiante Activateur tissulaire du plasminogène	1996	[228]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Mélange de peptides standards	1996	[229]
Protéines, peptides	Direct	CZE	Non	sérotonine tryptamine	1997	[174]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Glycoprotéines	1997	[230]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Phosphopeptides	1997	[231]
Protéines, peptides	Indirect	MEKC	Oui	Methionineencéphaline	1997	[232]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	digestat d'anticorps monoclonaux Glycopeptides	1997	[233]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Bradykinine	1997	[234]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	N/A	PEG-Superoxidedismutase	1997	[235]
Protéines, peptides	Direct	CZE	Oui	Isoforme d'angiotensine Insuline Heptapeptide	1998	[175]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Peptide E Mélange de peptides standards	1999	[236]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Glycoprotéines	1999	[237]
Protéines,	Direct	CZE	Non	Mélange de peptides	2000	[176]

Domaine	Couplage	Séparation	UV	Analytes	Année	Publication
peptides						
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	atrial gland homogenate d'Aplysia californica	2000	[188]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	digestat de protéines standards	2000	[238]
Protéines, peptides	Indirect	CZECIEF	Oui	Mélange de protéines standards	2000	[239]
Protéines, peptides	Indirect	MEKC	Oui	Mélange de peptides standards	2000	[240]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	digestat de sac cellulaire dAplysiacalifornica(	2001	[241]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Mélange de protéines standards Mélange de peptides standards Alcaloids	2001	[198]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Mélange de protéines standards	2001	[242]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Digestattryptique de fragment modifié au PEG decalcitonines	2001	[243]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	digestat de protéines standards digestat de 7 protéines d'un cerveau fœtal humain	2001	[195]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	N/A	protéinases de krill de l'antarctique	2002	[244]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	N/A	Peptides	2002	[245]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Isoformes d'Angiotensine	2002	[199]
Protéines, peptides	Direct	CAE	Non	Angiotensine Peptides	2002	[246]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Neuroned'A. Californica	2002	[247]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Oui	Mélange de protéines standards	2002	[248]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Microsphère	2003	[249]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	N/A	PEGylated peptide	2003	[250]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	N/A	Mélange de peptides standards	2004	[251]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Dialysat	2004	[252]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Polypeptides	2004	[253]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Digestat de cytochrome C Digestat de protéome de	2004	[254]

Domaine	Couplage	Séparation	UV	Analytes	Année	Publication
				foie de rat		
Protéines, peptides	Indirect	N/A	Non	Mélange de peptides standards neurotensine	2004	[200]
Protéines, peptides	Indirect	CEC	Non	Digestat de protéines standards Glycoprotéines	2004	[255]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Non	Mélange de protéines standards	2004	[256]
Protéines, peptides	Direct	CZE	Oui	Vasopressine Substance P Neurotensine	2004	[257]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Mélange de peptides standards Mélange de protéines standards	2004	[258]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	PEGylationdehormonepara thyroïdienne 1–34 humaine	2004	[259]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Digestat de calcitonine de Saumon	2004	[260]
Protéines, peptides	Indirect	MEKC	N/A	Interferon alpha PEG	2004	[261]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Immunoglobuline A Profil protéique	2005	[262]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Phosphopeptides	2005	[263]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Lysozyme	2005	[264]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	N/A	Erythropoietine Proteine stimulant l'erythropoiese	2005	[265]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Profil protéique urinaire	2006	[266]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Non	Mélange de protéines standards	2006	[267]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Glycopeptides	2006	[190]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Bacteriorhodopsine	2006	[183]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Oui	Mélange de protéines standards Digestat de protéome de foie de rat	2006	[185]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Digestat de glycoprotéines	2006	[268]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Oui	Créatine phosphokinase trypsininhibitor	2006	[269]
Protéines,	Indirect	CZE	Oui	Cytochrome C	2007	[270]

Domaine	Couplage	Séparation	UV	Analytes	Année	Publication
peptides						
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Digestat protéolytique de E. Coli Digestat de protéines standards	2007	[271]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Lysozyme Cytochrome C	2007	[272]
Protéines, peptides	Indirect	pH jonction	N/A	Digestat de protéines standards	2008	[273]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Neuropeptides	2008	[274]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Oui	Mélange de protéines standards	2008	[275]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Oui	Antithrombine Ovalbumine	2008	[276]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	N/A	Digestat de BSA Neuropeptides	2008	[184]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Profil protéique	2008	[277]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Profil protéique	2009	[278]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Mélange de peptides standards	2009	[197]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	digestat de peptides Mélange de peptides standards	2009	[201]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Non	Mélange de protéines standards amyloïde p	2009	[279]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Oui	Profil protéique	2009	[280.]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Mélange de protéines standards	2009	[196]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Oui	Mélande de protéines standards	2009	[193]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Mélange de protéines standards Digestat de protéines standards	2010	[281]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Oui	Mélange de protéines standards	2010	[194]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Neuropeptides	2010	[282]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Digestat de BSA	2010	[283]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Digestat de protéines standards	2011	[284]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Neuropeptides	2011	[285]

Domaine	Couplage	Séparation	UV	Analytes	Année	Publication
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Mélange de protéines standards	2011	[286]
Protéines, peptides	Indirect	CIEF	Oui	Glycoprotéines	2011	[287]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Non	Neuropeptides	2012	[288]
Protéines, peptides	Indirect	t-ITP	Non	Protéines du Lait	2012	[289]
Protéines, peptides	Indirect	CZE	Oui	Metallothionein	2014	[290]

4. Analyse protéomique par spectrométrie de masse.

4.1. Introduction.

Le terme de protéome définit l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule, un compartiment de cellule (membrane par exemple), tissu, organe, ou fluide à un instant donné et dans des conditions données. Ce terme fut introduit par P. Kahn en 1995[291]. Le concept d'analyse protéomique définit d'une manière large l'étude d'un protéome aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

Différentes avancées technologiques ont permis le développement de stratégies d'analyse protéomique. Particulièrement, la spectrométrie de masse a considérablement améliorér la qualité des informations générées en analyse protéomique jusqu'à devenir une méthode de référence. Les évolutions techniques des spectromètres de masse mais également l'évolution des méthodes de préparation d'échantillons ont permis également de diversifier les stratégies d'identification des protéines mise en œuvre en analyse protéomique.

- L'analyse protéomique dite « *Bottom Up* » est historiquement la stratégie d'identification et de caractérisation de protéines à ce jour la plus largement utilisée. Elle consiste à soumettre une digestion protéolytique aux protéines puis d'identifier les peptides formés par spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est utilisée pour l'identification des peptides. Un liste de masses correspondant aux peptides est générée puis comparée à une base de données qui aidera à la reconstruction de la séquence protéique pour l'identification de la protéine initiale[292].

- L'analyse protéomique dite « T*op Down* » n'est apparue que très récemment dans les laboratoires de recherche. Dans ce type de stratégie, les protéines sont caractérisées par l'intermédiaire de leur masse totale et des fragments générés par la protéine intacte. Le traitement préalable de l'échantillon est volontairement minimisé. Ces dix dernières années, cette stratégie a favorisé le développement d'un grand nombre de systèmes permettent de réaliser du Top Down suivant la nature du couple source d'ionisation/analyseur du spectromètre de masse. Les ions moléculaires issus de la protéine intacte sont obtenus grâce à une source d'ionisation douce MALDI ou électrospray (ESI). Ils sont fragmentés soit par capture d'électrons (ECD) ou transfert d'électrons (ETD), par dissociation induite par collision (CID), par absorption de multiples photons infrarouges (IRMPD)[293], par dissociation induite par laser (LID), ou une dissociation directe dans la source (ISD)[294,295].

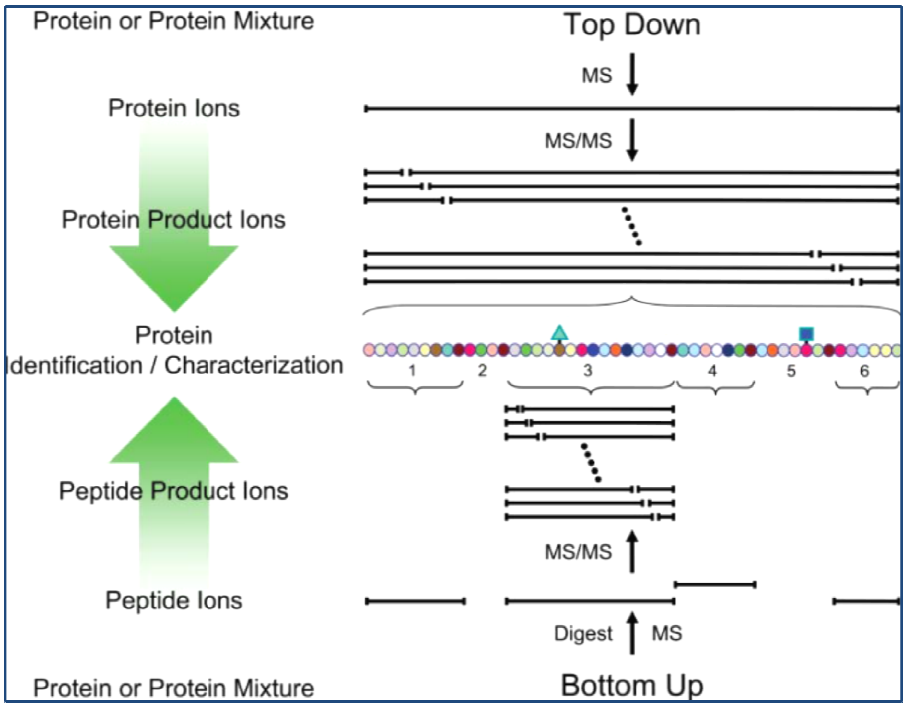


Figure 41. *Représentation schématique des différentes stratégies utilisées en analyse protéomique. Extrait de la publication de Scherperel et al*[296]*.*

Le paragraphe suivant décrit essentiellement l'interprétation de données issues d'analyse protéomique Top Down par fragmentation ISD. En effet, ce type de stratégie a été principalement utilisé dans le cadre de mes travaux de thèse.

4.2. Stratégie Top Down par fragmentation « Ion Source Decay (ISD)».

Entre 1995 et 1996, R.S Brown[297,298] dans ses travaux décrit un phénomène différent de la fragmentation « post source decay (PSD) » en provoquant une fragmentation dans la source : c'est la fragmentation ISD. En effet, la fragmentation ISD se produit après l'étape de désorption/ionisation (<100 ns)[299,300] lorsqu'une forte puissance laser est appliquée sur le mélange matrice/analytes. Ainsi l'énergie du laser est transférée, augmentant l'énergie interne du mélange. Grâce à l'utilisation d'une matrice redistribuant brusquement l'énergie du laser dite matrice « chaude »[301,302], l'augmentation très rapide d'énergie provoque l'augmentation des collisions entre les ions (matrice/analytes). Ces collisions augmentent la probabilité de fragmentation des analytes. La désorption/ionisation/fragmentation se produit dans un laps de temps bien inférieur au délai d'extraction du TOF (<300ns)[303]. Une fois les fragments formés, ils sont accélérés et injectés dans la zone libre de champs du TOF.

4.2.1. La fragmentation.

Il faut savoir que divers paramètres influent sur la qualité de la fragmentation ISD[304]. Ainsi, le choix de la matrice, de la puissance (ou fluence) laser ou la structure de la protéine[305,306,307]agissent sur la qualité et la quantité de fragments formés.

4.2.2. La fluence ou puissance laser.

Le laser est le paramètre permettant d'apporter l'afflux énergétique pour la désorption. La fluence est définie comme un afflux de photon par unité de temps. Ainsi, plus la puissance du laser augmente, plus le nombre de particules frappant la matrice est élevé. Il a été démontré qu'une puissance de 5 à 20 % au-dessus du seuil d'ionisation des analytes permet un transfert intermoléculaire d'atome d'hydrogène entre les molécules excitées de la matrice et l'oxygène du carbonyle d'un peptide[298,308,309].

4.2.3. La matrice.

Associée au laser, la matrice est sans doute le paramètre le plus critique[301] pour la qualité du spectre de masse et surtout de la fragmentation[310]. Des études dans l'article de Calligari *et al*[311] ont montré qu'il existe deux voies de fragmentation ISD[312] suivant la matrice utilisée (figure 42) :

- La voie radicalaire[313] : elle consiste en un transfert intramoléculaire d'hydrogène de la matrice au carbonyle de la biomolécule. Elle génère majoritairement des ions c_n et z_n.

- La voie thermique[314] : elle conduit à la collision des analytes entre eux. Elle génère majoritairement des ions b_n et y_n.

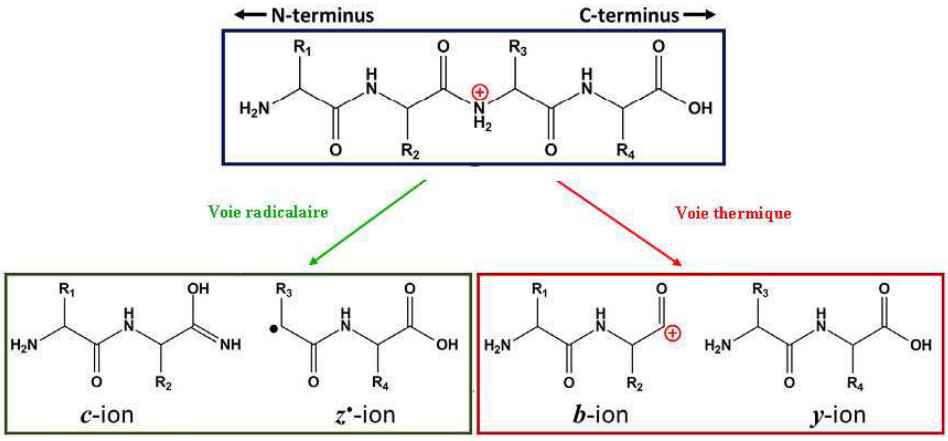


Figure 42. *Illustration des ions produits par les deux voies de fragmentation ISD[315].*

Malgré la singularité des deux voies de fragmentation, la formation des quatre types d'ions n'est pas exclusive aux voies radicalaire et thermique puisqu'une augmentation de la puissance laser peut conduire à la formation en voie radicalaire de séries d'ions b_n, y_n, a_n, et x_n.

Pour exemple, la figure 43 présente les étapes d'une fragmentation de protéines par ISD avec de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) comme matrice. La formation des ions peut être décrite en quatre étapes : l'excitation électronique de la matrice par absorption des photons du laser, le transfert intermoléculaire d'hydrogène de la matrice au carbonyle du peptide, la formation d'un peptide radicalaire et le clivage de la liaison NH-CH pour former des séries d'ions c_n et (z_n+2)[316].

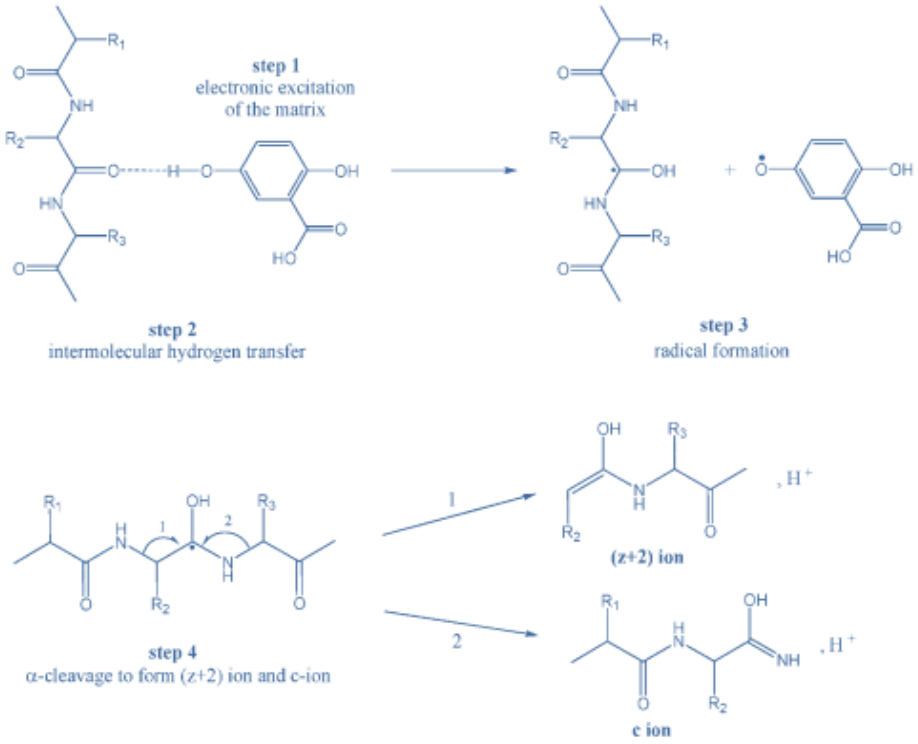


Figure 43. *Illustration de la formation d'ions cn et (zn+2) par fragmentation ISD*[317]*.*

4.2.4. La structure de la protéine.

Parallèlement aux types de matrice qui influencent la formation des ions[298,318], des études ont montré que l'abondance d'aminoacide basique, comme la lysine, l'arginine ou l'acide glutamique dans la séquence de la protéine, favorise la fragmentation ISD. Au contraire, à cause de sa nature cyclique, la proline du coté N-terminal inhibe cette fragmentation[311,319].

4.3. La caractérisation par Top Down.

La fragmentation ISD conduit au clivage du polypeptide, acide aminé par acide aminé. Cette fragmentation se traduit par une succession de pics sur le spectre de masse (figure 44.)

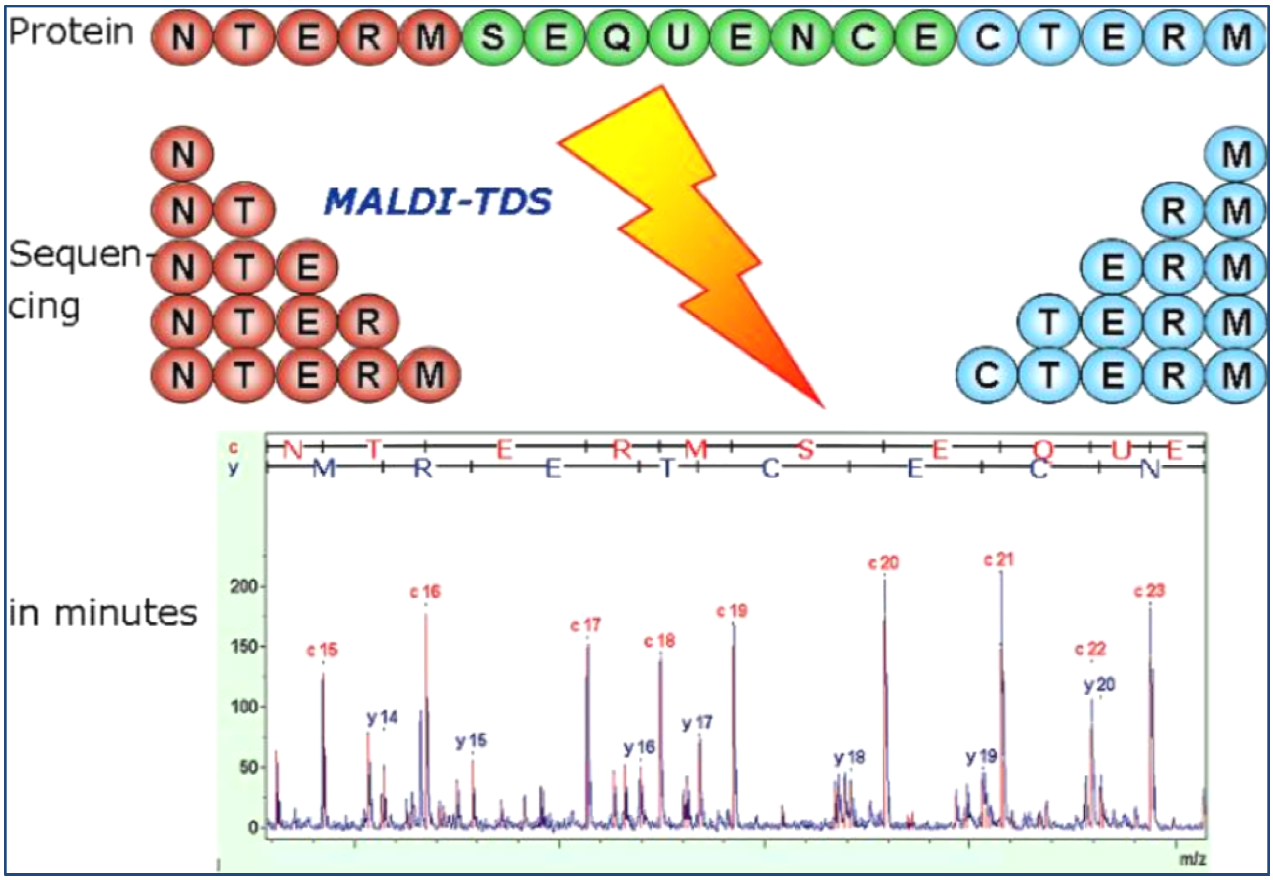


Figure 44. *Illustration de la stratégie Top Down par ISD sur une séquence peptidique*[320].

Ces pics représentent le rapport m/z de la protéine amputée successivement d'un acide aminé. La différence de masse entre chaque pic correspond à l'acide aminé de la séquence protéique (tableau 4.)

Résidus	code à 3 lettres	code à 1 lettre	masse moyenne (Da)
Glycine	Gly	G	57,05
Alanine	ALA	A	71,08
Sérine	Ser	S	87,08
Proline	Pro	P	97,12
Valine	Val	V	99,13
Thréonine	Thr	T	101,10
Cystéine	Cys	C	103,14
Leucine	Leu	L	113,16
Isoleucine	Ile	I	113,16
Asparagine	Asn	N	114,10
Acide aspartique	Asp	D	115,09
Glutamine	Gln	Q	128,13
Lysine	Lys	K	128,17
Acide glutamique	Glu	E	129,12
Méthionine	Met	M	131,19
Histidine	His	H	137,16
Phénylalanine	Phe	F	147,18
Arginine	Arg	R	156,19
Tyrosine	Tyr	Y	163,18
Tryptophane	Trp	W	186,21

Tableau 4. *Liste des acides aminés et de leurs masses respectives*

Statistiquement, la première fragmentation peut s'opérer partout tout au long de la chaine d'acide aminé. Ainsi, il existe potentiellement dans la source la même protéine clivée à chaque acide aminé. Au fur et mesure du processus ISD, les deux peptides engendrés par la première cassure se cassent à leur tour et ainsi de suite tout au long de la chaine peptidique.

Lors de l'ISD, on observe surtout une fragmentation commençant par la partie N et C terminale de la protéine[320]. En effet, les extrémités de la protéine sont potentiellement plus faciles à casser. Au fur et à mesure du processus ISD, chaque acide aminé est identifié afin de reconstruire la séquence de la protéine. Actuellement pour des protéines entières, les conditions Top Down par MALDI-MS permettent d'identifier jusqu'à 70 résidus[320].

Lors de ces travaux de thèses, nous avons eu la possibilité d'appliquer nos diverses études à la caractérisation de biomolécules d'intérêts : les anticorps monoclonaux (mabs). C'est la raison pour laquelle nous les décrirons succinctement dans le paragraphe suivant.

5. Anticorps monoclonaux

En 1890, Emil Von Behring et Shibasaburo Kitasato ont démontré que l'injection d'une dose non mortelle de toxine diphtérique à un animal (généralement des chevaux) pouvait protéger celui-ci contre une contamination létale ultérieure. De plus, l'immunité peut être transmise à un autre animal en injectant un échantillon de sérum provenant d'un animal dont la réponse immunitaire a été activée[321]. Ils en déduisirent que cette immunité est due à l'action d'une substance présente dans le sang et responsable de la protection spécifiquement contre un type d'agent infectieux. Plus tard, des études sur le sérum ont ensuite permis d'identifier des protéines appartenant aux gammas globulines du plasma[322] : les immunoglobulines ou anticorps.

Les anticorps sont exprimés en surface des lymphocytes B matures et mémoires et/ou secrétés par les plasmocytes. Lors de la réponse immunitaire et la reconnaissance d'agents étrangers ou pathogènes, ces cellules se différencient et synthétisent diverses classes et sous classes d'anticorps[323] selon une chronologie précise. Ces différentes classes diffèrent entre elles par leur structure mais aussi par leur fonction et leur lieu de sécrétion[324]. Tout d'abord en grande quantité et sous une forme ayant une reconnaissance relative vis-à-vis de l'antigène, ils vont acquérir une spécificité très forte avec la sélection des cellules immunitaires les plus spécifiques à l'antigène. Ils engendrent ainsi une forme d'anticorps ayant une très forte affinité et spécificité vis-à-vis de l'antigène.

En effet, un anticorps est spécifique d'un antigène. Cette spécificité de reconnaissance s'effectue grâce à une petite conformation de l'antigène appelé épitope. Cet épitope est en concordance exacte avec un site spécifique situé aux extrémités de l'anticorps : c'est le paratope. Le paratope fait partie de séquences variables nommées CDR, « région déterminant la complémentarité ». Cette région synthétisée par un système complexe de codage génétique est susceptible de reconnaitre toutes les configurations antigéniques possibles. Des études ont ainsi montré qu'un individu produit prêt de 10 milliards d'anticorps différents, chacun spécifique d'un antigène unique[325].

Lorsque l'anticorps est en contact avec son antigène associé, il se fixe sur celui-ci afin de faciliter l'élimination de l'agent infectieux.

L'utilisation d'anticorps à des fins thérapeutiques a longtemps été limitée par l'absence de méthodes de productions efficaces permettant la production d'anticorps spécifiques à grande échelle mais également la difficulté a identifié un épitope d'intérêt. En 1975, Köhler et Milstein décrivirent une méthode permettant de produire en grande quantité un type spécifique d'anticorps prédéfini par hybridation cellulaire entre des cellules de rate de souris et des cellules myéloïdes[326] : les hybridomes. Cette technique ouvrira la voie à la production d'anticorps monoclonaux issue d'une lignée cellulaire unique ou « clone » et spécifique à un antigène.

Du fait de la très haute spécificité de l'anticorps pour l'antigène, les mabs sont devenus rapidement des compléments voire des alternatives aux thérapeutiques classiques[327,328] et un domaine de recherche très actif.

5.1. Structure et caractéristiques des anticorps monoclonaux

Les anticorps sont des glycoprotéines de la catégorie des immunoglobulines (Ig). A l'heure actuelle les mAbs produits par l'industrie biopharmaceutique sont essentiellement des immunoglobulines G (IgG). Ils sont composés de deux chaînes lourdes (HC) et deux chaînes légères (LC) identiques. Chacune des chaînes composant le mAb peut être divisée entre deux domaines :

- Une région variable mise en jeu dans la reconnaissance avec l'épitope de l'antigène : V_H pour la HC et V_L dans le cas de la LC.
- Une région constante, commune à tous les anticorps, impliquée dans la reconnaissance avec le système immunitaire : C_H pour la HC et C_L dans le cas de la LC.

Les différentes parties variables composant le mAb contiennent des régions hypervariables : ces régions, également appelées complementaritydeterminingregion (CDR), restreintes et localisées sur la chaîne peptidique sont responsables de la spécificité entre l'épitope et la paratope (figure 45.) Les différentes chaînes sont reliées entre elles par une série de ponts disulfures, ce qui confère à l'anticorps sa flexibilité et lui donne sa forme en Y caractéristique. Le nombre de pont varie en fonction de la catégorie d'IgG. Le domaine variable de l'anticorps F_{ab} ou « Fragment antigen binding » est situé

sur la partie supérieur de la forme en Y tandis que le domaine constant de l'anticorps F_c ou « Fragment crystallizable » sur la partie inférieure.

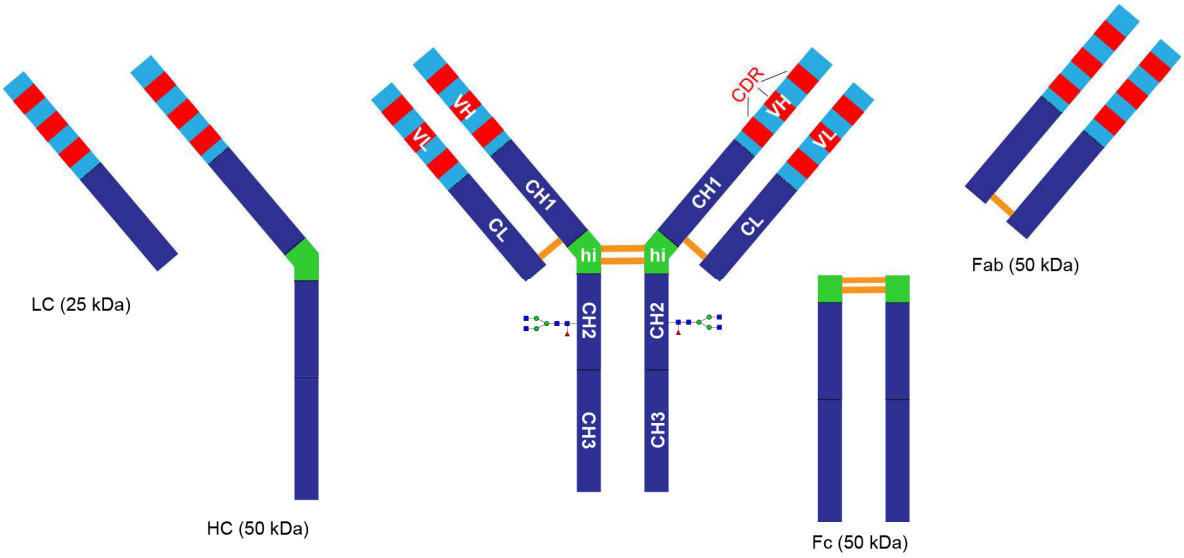
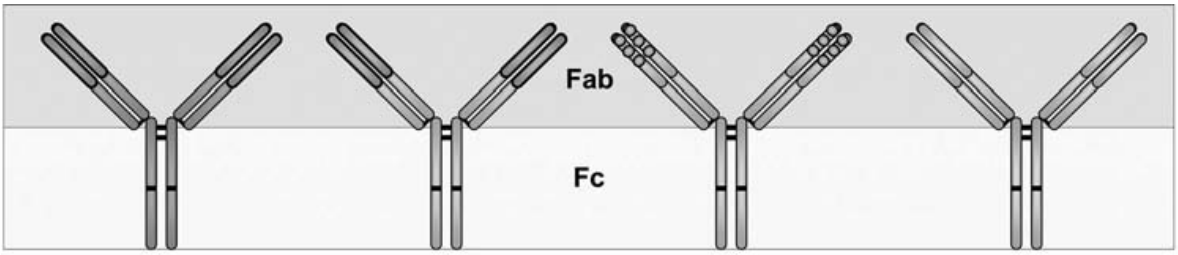


Figure 45. *Représentation schématique de la structure d'un mAb et de ces différentes régions. Au centre la structure complète en Y caractéristique des anticorps. Les masses approximatives des différentes régions sont données à titre indicatif.*

L'ensemble du mAb a une masse moléculaire proche de 150 kDa. Comme la majorité du protéome, les mAbs sont des protéines glycosylées. Bien que jouant un rôle déterminant dans les propriétés dynamique et physiologique, les glycosylations ne représentent qu'environ 3% de la masse totale du mAb. En effet, leur structure et leur composition oligosaccharidique influence de manière significative les propriétés pharmacodynamiques, pharmacocinétiques et la réponse thérapeutique en modifiant l'expression des fonctions effectrices[329]. En effet, les glycosylations influence grandement la réponse immunitaire et plus précisément l'activité cytotoxique dépendante des anticorps (antibody - dependentcell - mediated cytotoxicity, ADCC) et l'activité cytotoxique par l'intermédiaire du complément (complement dependent cytotoxicity, CDC)[330,331,332]. De part, leur origine cellulaire et leur synthèse, les mAbs et plus particulièrement leurs glycosylations sont très variables. Engendrant une hétérogénéité de motif et d'abondance au sein d'une synthèse cellulaire et donc d'un même « batch » de production. Ces motifs glycosylés sont généralement de type glycosylations complexes mais peuvent être plus simple (mais plus rare) de type mannoside. Parmi les types de glycosylations d'intérêt, les fucosylations sont les plus abondantes mais des formes afucosylées peuvent exister.

En fonction de la ligné responsable de leur synthèse et la technologie de production (murin, chimérique ou humain), l'identification des mAbs suit une nomenclature précise (figure 46.)



Prefix	Target			Antibody Source		Suffix	Some Examples
Variable	Non-tumor Target	Viral	-vir-	-u-	Human	-mab	Pali-vi-zu-mab (humanized antiviral Mab)
		Bacterial	-bac-				
		Immune	-lim-	-o-	Murine		Ada-lim-u-mab (human Mab against immune disease target)
		Infectious lesions	-les-				
		Antifungal	-fung-	-a-	Rat		E-fung-u-mab (human antifungal Mab)
		Cardiovascular	-ci(r)-				
		Neurologic	-ne(r)-	-e-	Hamster		Bapi-neu-zu-mab (humanized Mab against neurobiology target)
		Interleukins	-kin-				
		Musculoskeletal	-mul-	-i-	Primate		Uste-kin-u-mab (human anticytokine Mab)
		Bone	-os-				
		Toxin as target	-toxa-	-xi-	Chimeric		
	Tumor target	Colon	-col-	-zu-	Humanized		Den-os-u-mab (human antibone target Mab
		Melanoma	-mel-				
		Mammary	-mar-	-axo-	Rat/murine hybrid		Ab-ci-xi-mab (chimeric Mab against CV target)
		Testis	-got-				
		Ovary	-gov-				Ore-gov-o-mab (murine Mab for ovarian cancer)
		Prostate	-pr(o)-	-xizu-	Chimeric + humanized		
		Miscellaneous	-tu(m)-				Adeca-tum-u-mab (human antibody against miscellaneous tumor target)

Figure 46. *Nomenclature utilisée pour nommer les mAbs. Extrait de la publication de Zhiqiang [333].*

5.1.1. Utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux

Le premier mAb approuvé en tant que traitement thérapeutique fut muromomab-CD3 en 1986. Celui-ci fut introduit afin de prévenir les risques de rejet dans les cas de greffes du rein. A l'heure actuelle 43 mAbs sont approuvés en tant que traitements thérapeutiques par les différentes autorités compétentes mondiale ; la Food & Drug administration (FDA) aux USA et l'European Medicines Agency (EMA) pour l'UE. Faisant de cette thérapeutique, un domaine de pointe[334], pour preuve actuellement 30 nouveaux mAbs sont en phase 3 d'essais cliniques[335].

Grâce à leur très haute spécificité et efficacité d'action, l'usage des mAbs s'est largement diversifié et ce, dans des domaines thérapeutiques différents et notamment en oncologie. En effet, leur utilisation pour le traitement de plusieurs formes de cancer a notamment permis d'augmenter de manière significative la probabilité de réussite du traitement. Ainsi, Les mAbs sont utilisés dans le traitement de diverses formes de tumeurs comme le cancer du sein (Trastuzumab), le cancer colorectal (Cetuximab) ou cancer de l'estomac (Ramucirumab). Néanmoins, leurs diversités d'actions et leur spécificité d'action envers un épitope cellulaire précis leur permettent d'être utilisés dans le traitement d'autres pathologies :

- Polyarthrite rhumatoïde
- Maladies cardio-vasculaire
- Leucémies
- Lymphome non hodgkinien
- Dégénérescence maculaire
- Asthme
- Maladie de Crohn
- Sclérose
- Maladie d'Alzheimer
- Psoriasis

C'est pour toutes ces raisons, que les mAbs sont devenus la classe d'agents thérapeutiques qui enregistrent actuellement la progression la plus rapide. Leur très grande efficacité thérapeutique montre que dès l'entrée en phase clinique I, le taux de réussite final pour leur approbation est de 23 %[334] alors que le taux de réussite globale toutes molécules confondues est de 10,4 %[336].

5.2. Utilisation de la spectrométrie de masse pour la caractérisation d'anticorps monoclonaux.

5.2.1. Introduction.

Les anticorps comme toutes protéines traduites du code génétique subissent des modifications à la suite de leur synthèse[337,338]. Les anticorps monoclonaux produits dans des systèmes cellulaires ne sont pas exempts des différents modifications. De plus, les différentes étapes nécessaires à la production, à la synthèse et au conditionnement engendrent eux aussi des modifications pouvant altérer les produits. Ainsi l'accumulation des modifications « naturelles » et/ou « de production » engendrent une hétérogénéité des anticorps dans le produit final[333]. De ce fait, la caractérisation précise du produit permet le contrôle qualité aussi bien en termes de synthèse que de production et de conservation.

De plus, l'autorisation et l'utilisation des mAbs en tant que traitement thérapeutique impliquent la capacité de les caractériser de manière approfondie afin de les décrire et d'estimer leurs degrés d'hétérogénéité. Cette caractérisation du produit permet d'identifier les produits de dégradation, les artefacts de synthèse mais surtout les PTMS et glycosylations et leurs abondances respectives. En effet les micro-hétérogénéités de type glycosylations[339], PTMs[340], substitution d'acides aminés[341] ont une très grande influence (figure 47) sur la réponse thérapeutique et leur identification est devenue indispensable

Modifications post-traductionnelles (acides aminés modifiés)	Différence de masse (Da)	Exemples de leurs fonctions biologiques
Phosphorylation (Ser, Thr, Tyr)	80	Transduction du signal, régulation de l'activité enzymatique, interactions protéines-protéines ou protéines-ligands
Sulfatation (Tyr)	80	Signalisation et localisation des protéines, interactions protéines-protéines
Glycosylation (Asn, Ser, Thr)	203 à > 1000	Stabilité, solubilité, sécrétion du signal, régulation des interactions, reconnaissance et interaction extracellulaire
Ubiquitination (Lys)	> 1000	Signal pour dégradation des protéines, interactions protéines-protéines
Méthylation (Lys mono-, di- et triméthylation) (Arg mono- et diméthylation) (His monométhylation)	14, 28, 42 14, 28 14	Régulation de l'activité des protéines, interaction protéines-protéines et protéines-acides nucléiques, activité des gènes (histones)
Acétylation (Lys N-terminal)	42	Stabilité et activité des protéines, régule interactions protéines-protéines et protéines-ligands
Oxydation (Met) (Trp)	16 4, 16, 32	Peut réguler l'activité des protéines mais il s'agit souvent d'un artéfact chimique
Ponts disulfures (Cys)	- 2	Stabilise l'activité et la structure des protéines, impliqué dans des processus rédox

Figure 47. *Masses et fonctions des principales PTM*

Malheureusement, ces hétérogénéités additionnées de probabilité d'apparition et d'abondance induisent de très faible variation compte tenu des 150 kDa des mAbs, rendant leur détection et leur caractérisation difficile. Ainsi la caractérisation de mAbs doit être effectuée sur différents niveaux de la structure de la protéine, ce qui implique l'utilisation de différentes méthodologies analytiques afin de pouvoir réaliser une caractérisation approfondie de mAbs. Dans un tel contexte, la MS occupe désormais un rôle clé dans la caractérisation des mAbs. Cette évolution s'explique notamment par l'excellente sélectivité et sensibilité délivrée par la MS tout comme la possibilité d'obtenir des informations structurales suivant la méthodologie et le spectromètre de masse. La MS est impliquée dans la caractérisation de mAbs à tous les niveaux de la structure de la protéine : analyse de la protéine entière[342], caractérisation de la séquence d'acides aminés[343], glycoformes[344], étude du complexe anticorps/antigène[345], ponts disulfures[346]. Enfin des approches sont développées régulièrement dans le but caractériser toujours plus précisément les mAbs[347,348] .

5.2.2. Stratégies d'analyses des anticorps monoclonaux.

Ces travaux de thèse portant sur le développement d'une nouvelle interface CE/MALDI-MS et de stratégies pour la caractérisation des biomolécules, nous ne détaillerons pas les différentes stratégies analytiques des Mabs. Cependant, de nombreuses études décrivent des stratégies analytiques impliquant la spectrométrie de masse. Différentes revues énumèrent les stratégies Bottum Up, Middle Down et Top Down et les différentes sources de masses utilisées[349]. La revue de Fekeke[350] détaille une stratégie d'analyse pour la caractérisation des mAbs.

Cette stratégie présente deux approches complémentaires : l'approche chromatographique et l'approche électrophorétique. Ces deux approches apportent chacune des avantages en termes de résolution, d'efficacité mais aussi des inconvénients avec des difficultés de mise en place ou des altérations[351,352,353] non spécifiques des analytes. A la même période, Zhang *et al* présentent l'importance de la spectrométrie de masse comme moyen de détection et de caractérisation[354].

En fonction de l'analyseur, la SM permet d'avoir accès à plusieurs niveaux de détails quant à la détermination de la séquence peptide, à la caractérisation des PTM ou la quantitification relative des isoformes. L'analyse des mAbs sous conditions dénaturantes, combinées aux techniques chromatographiques sont largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique. En effet, ils permettent de confirmer, relativement "rapidement", le poids moléculaire ou de déceler des changements dans l'intégrité du produit. En condition native, la grande masse des mAbs demande des analyseurs ayant des domaines de mesures élevées.

La source de masse MALDI permet l'analyse des hautes masses, malheureusement dans ces domaines de mesures, les faibles différences de masses dues aux PTM restent difficiles à détecter. Grâce aux nombreux états de charges engendrés par la source ESI, l'analyse d'anticorps entiers devient possible mais nécessite des conditions d'ionisations très précises et des opérateurs qualifiés. Cependant, pour obtenir des rendements d'ionisations élevés permettant ainsi de détecter les faibles isoformes d'anticorps, il convient de réduire le débit d'entrée dans la source. Les nanosprays offrent cette possibilité et sont détaillés dans le paragraphe 2.1.2..

Ainsi nous avons pu avoir une vue d'ensemble sur l'utilisation des techniques utilisées couramment. Au cours des différents chapitres, nous allons montrer les études innovantes et inédites mises en place, grâce, tout d'abord à l'élaboration et l'évaluation de la nouvelle interface automatisée CE/MALDI-MS. Puis grâce à sa polyvalence, nous détaillerons des stratégies originales impliquant différentes sources de masse (ESI-MS, MALDI-MS) pour l'étude et la caractérisation de protéines et notamment des mAbs. Parallèlement nous avons participé à une étude pour la caractérisation de mAbs par CESI-MS et développé une application Androïd CE TOOLBOX pour l'aide à l'optimisation électrophorétique.

---

[1]Mariana Roberto GAMA, Carol H. COLLINS et Carla B. G. BOTTOLI, « Nano-Liquid Chromatography in Pharmaceutical and Biomedical Research », *Journal of Chromatographic Science*, 1 août 2013, vol. 51, n° 7, pp. 694‑703.

[2]Kohlrausch F. Annalen der Physik und Chemie, 1896;62;14

[3]Nicola VOLPI et Francesca MACCARI, *Capillary Electrophoresis of Biomolecules*, Springer, 2013.

[4]F FORET, O MÜLLER, J THORNE, W GÖTZINGER et B L KARGER, « Analysis of protein fractions by micropreparative capillary isoelectric focusing and matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry », *Journal of chromatography. A*, 17 novembre 1995, vol. 716, n° 1-2, pp. 157‑166.

[5]U. K. LAEMMLI, « Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 », *, Published online: 15 August 1970; | doi:10.1038/227680a0*, 15 août 1970, vol. 227, n° 5259, pp. 680‑685.

[6]Z L AWDEH, A R WILLIAMSON et B A ASKONAS, « Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins », *Nature*, 6 juillet 1968, vol. 219, n° 5149, pp. 66‑67.

[7]P. H. O'FARRELL, « High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. », *Journal of Biological Chemistry*, 25 mai 1975, vol. 250, n° 10, pp. 4007‑4021.

[8]Reiner WESTERMEIER, *Electrophoresis in practice : a guide to theory and practice /*, Weinheim ;, VCH,, c1993..

[9]Tiselius ARNE, « Electrophoresis of serum globulin. I », 1 février 1937 (URL complète en bibliographie, consulté le 26 avril 2014).Biochem. J. (1937) **31** (313–317)

[10]Stellan HJERTEN, « High-performance electrophoresis: the electrophoretic counterpart of high-performance liquid chromatography », *Journal of chromatography A*, 1983, vol. 270, pp. 1‑6.

[11]J W JORGENSON et K D LUKACS, « Capillary zone electrophoresis », *Science (New York, N.Y.)*, 21 octobre 1983, vol. 222, n° 4621, pp. 266‑272.

[12]Elsevier SCIENCE, *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press, 1993.

[13]Andrei R. TIMERBAEV, « Element Speciation Analysis Using Capillary Electrophoresis: Twenty Years of Development and Applications », *Chemical Reviews*, 9 janvier 2013, vol. 113, n° 1, pp. 778‑812.

[14]T. G. MORZUNOVA, « Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (A review) », *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1 mars 2006, vol. 40, n° 3, pp. 158‑170.

[15]N ANASTOS, N BARNETT et S LEWIS, « Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: A review », *Talanta*, 15 août 2005, vol. 67, n° 2, pp. 269‑279.

[16]Anthony C. OTIENO et Simon M. MWONGELA, « Capillary electrophoresis-based methods for the determination of lipids—A review », *Analytica Chimica Acta*, août 2008, vol. 624, n° 2, pp. 163‑174.

[17]Jorge MUSE, Valeria TRIPODI et Silvia LUCANGIOLI, « An Overview of Capillary Electrophoresis In Element Speciation Analysis of the Environment », *Current Analytical Chemistry*, 1 avril 2014, vol. 10, n° 2, pp. 225‑230.

[18]Kelly SWINNEY et Darryl J. BORNHOP, « Detection in capillary », *ELECTROPHORESIS*, 1 avril 2000, vol. 21, n° 7, pp. 1239‑1250.

[19]Thomas KAPPES et Peter C HAUSER, « Electrochemical detection methods in capillary electrophoresis and applications to inorganic species », *Journal of Chromatography A*, février 1999, vol. 834, n° 1-2, pp. 89‑101.

[20]Andreas J. ZEMANN, « Conductivity detection in capillary electrophoresis », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2001, vol. 20, n° 6, pp. 346‑354.

[21]Ying HAO, Rong WANG, Qiang YIN, Hua XIE, Wenbin LI et Zhengping JIA, « [Analysis of difference of proteins of gastric cancer tissue and adjacent normal tissue by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection] », *Se pu = Chinese journal of chromatography / Zhongguo hua xue hui*, octobre 2013, vol. 31, n° 10, pp. 1005‑1009.

[22]Anna Maria ENLUND, Staffan SCHMIDT et Douglas WESTERLUND, « Detectability improvements in capillary zone electrophoresis by combining single capillary isotachophoretic preconcentration and frequency doubled argon ion laser-induced fluorescence detection », *ELECTROPHORESIS*, 1 mai 1998, vol. 19, n° 5, pp. 707‑711.

[23]Rawi RAMAUTAR, Anthonius A M HEEMSKERK, Paul J HENSBERGEN, André M DEELDER, Jean-Marc BUSNEL et Oleg A MAYBORODA, « CE-MS for proteomics: Advances in interface development and application », *Journal of proteomics*, 16 juillet 2012, vol. 75, n° 13, pp. 3814‑3828.

[24]Jana KRENKOVA et Frantisek FORET, « On-line CE/ESI/MS interfacing: Recent developments and applications in », *PROTEOMICS*, 1 octobre 2012, vol. 12, n° 19-20, pp. 2978‑2990.

[25]Che-Wei WANG et Guor-Rong HER, « Sheathless capillary electrophoresis electrospray ionization-mass spectrometry interface based on poly(dimethylsiloxane) membrane emitter and thin conducting liquid film », *Electrophoresis*, septembre 2013, vol. 34, n° 17, pp. 2538‑2545.

[26]Christopher R. HARRISON, « Role of Capillary Electrophoresis in the Fight Against Doping in Sports », *Analytical Chemistry*, 6 août 2013, vol. 85, n° 15, pp. 6982‑6987.

[27]Meera SHANMUGANATHAN et Philip BRITZ-MCKIBBIN, « High quality drug screening by capillary electrophoresis: A review », *Analytica Chimica Acta*, avril 2013, vol. 773, pp. 24‑36.

[28]Angelique STALMACH, Amaya ALBALAT, William MULLEN et Harald MISCHAK, « Recent advances in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for clinical proteomic applications: CE and CEC », *ELECTROPHORESIS*, juin 2013, vol. 34, n° 11, pp. 1452‑1464.

[29]Rob HASELBERG, Gerhardus J. DE JONG et Govert W. SOMSEN, « Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins 2007-2010 », *ELECTROPHORESIS*, janvier 2011, vol. 32, n° 1, pp. 66‑82.

[30]Rob HASELBERG, Gerhardus J. DE JONG et Govert W. SOMSEN, « CE-MS for the analysis of intact proteins 2010-2012: CE and CEC », *ELECTROPHORESIS*, janvier 2013, vol. 34, n° 1, pp. 99‑112.

[31]Daniel FIGEYS et Ruedi AEBERSOLD, « High sensitivity analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry: Recent developments in technology and applications », *ELECTROPHORESIS*, 1 mai 1998, vol. 19, n° 6, pp. 885‑892.

[32]S N KRYLOV et N J DOVICHI, « Capillary electrophoresis for the analysis of biopolymers », *Analytical chemistry*, 15 juin 2000, vol. 72, n° 12, p. 111R‑128R.

[33]Ruedi AEBERSOLD et Matthias MANN, « Mass spectrometry-based proteomics », *Nature*, 2003, vol. 422, n° 6928, pp. 198‑207.

[34]Pierre GAREIL, Gabriel PELTRE, *Electrophorese*, Ed. Techniques Ingénieur.

[35]« A novel PEG coating immobilized onto capillary through polydopamine coating for separation of proteins in CE - Zeng - 2010 - ELECTROPHORESIS - Wiley Online Library ».

[36]C. HUHN, R. RAMAUTAR, M. WUHRER et G. W. SOMSEN, « Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis–mass spectrometry », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1 janvier 2010, vol. 396, n° 1, pp. 297‑314.

[37]Stellan HJERTÉN, « High-performance electrophoresis », *Journal of Chromatography A*, janvier 1985, vol. 347, pp. 191‑198.

[38]Kelly A. COBB, Vladislav. DOLNIK et Milos. NOVOTNY, « Electrophoretic separations of proteins in capillaries with hydrolytically-stable surface structures », *Analytical Chemistry*, novembre 1990, vol. 62, n° 22, pp. 2478‑2483.

[39]Ming-de Zhu STELLAN HJERTÉN, « Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing », *Journal of Chromatography A*, 1985, pp. 265‑270.

[40]S HJERTÉN, K ELENBRING, F KILÁR, J L LIAO, A J CHEN, C J SIEBERT et M D ZHU, « Carrier-free zone electrophoresis, displacement electrophoresis and isoelectric focusing in a high-performance electrophoresis apparatus », *Journal of chromatography*, 21 août 1987, vol. 403, pp. 47‑61.

[41]Ming-de Zhu STELLAN HJERTÉN, « Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing », *Journal of Chromatography A*, 1985, pp. 265‑270.

[42]Pier Giorgio RIGHETTI, *Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Application: Theory, Methodology and Application*, Elsevier, 2000.

[43]Henricus Franciscus STORMS, *Capillary isoelectric focusing - mass spectrometry for a shotgun approach in proteomics*,, S.l., s.n.], 2007.

[44]Meriem MOKADDEM, Pierre GAREIL et Anne VARENNE, « Online CIEF-ESI-MS in glycerol–water media with a view to hydrophobic protein applications », *ELECTROPHORESIS*, 1 décembre 2009, vol. 30, n° 23, pp. 4040‑4048.

[45]Johan VINDEVOGEL et Patrick SANDRA, « Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography », *Chromatogra phie Methods, eds. W. Bertsch, H. Frank, W.G. Jennings en P. Sandra, Hüthig Buch Verlag Heidelberg*, 1992.

[46]Shigeru. TERABE, Koji. OTSUKA, Kunimichi. ICHIKAWA, Akihiro. TSUCHIYA et Teiichi. ANDO, « Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries », *Analytical Chemistry*, janvier 1984, vol. 56, n° 1, pp. 111‑113.

[47]Duc Phuc Do SYED ASAD ALI RIZVI, « Fundamentals of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) », *European Journal of Chemistry*, 2011, vol. 2, n° 2, pp. 276‑281.
[48]« Analytical investigation of anions and cations by electrochromatography Lecoq, H. Bulletin de la Societe Royale des Scie ».
[49]Harold H. STRAIN, « On the Combination of Electrophoretic and Chromatographic Adsorption Methods », *Journal of the American Chemical Society*, mai 1939, vol. 61, n° 5, pp. 1292‑1293.
[50]Victor PRETORIUS, B.J. HOPKINS et J.D. SCHIEKE, « Electro-osmosis », *Journal of Chromatography A*, janvier 1974, vol. 99, pp. 23‑30.
[51]J. H. KNOX et I. H. GRANT, « Miniaturisation in pressure and electroendosmotically driven liquid chromatography: Some theoretical considerations », *Chromatographia*, 1 décembre 1987, vol. 24, n° 1, pp. 135‑143.
[52]J. H. KNOX et I. H. GRANT, « Electrochromatography in packed tubes using 1.5 to 50 µm silica gels and ODS bonded silica gels », *Chromatographia*, 1 octobre 1991, vol. 32, n° 7-8, pp. 317‑328.
[53]Christine. SCHWER, Bohuslav. GAS, Friedrich. LOTTSPEICH et Ernst. KENNDLER, « Computer simulation and experimental evaluation of on-column sample preconcentration in capillary zone electrophoresis by discontinuous buffer systems », *Analytical Chemistry*, août 1993, vol. 65, n° 15, pp. 2108‑2115.
[54]Vladislav DOLNIK, Kelly A. COBB et Milos NOVOTNY, « Capillary zone electrophoresis of dilute samples with isotachophoretic preconcentration », *Journal of Microcolumn Separations*, mai 1990, vol. 2, n° 3, pp. 127‑131.
[55]Toni J. THOMPSON, Frantisek. FORET, Paul. VOUROS et Barry L. KARGER, « Capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry: improvement of protein detection limits using on-column transient isotachophoretic sample preconcentration », *Analytical Chemistry*, avril 1993, vol. 65, n° 7, pp. 900‑906.
[56]Jean-Marc BUSNEL, Niels LION et Hubert H. GIRAULT, « Electrokinetic supercharging for highly efficient peptide preconcentration in capillary zone electrophoresis », *ELECTROPHORESIS*, avril 2008, vol. 29, n° 7, pp. 1565‑1572.
[57]Michael A. GRAYSON, *Measuring Mass: From Positive Rays to Proteins*, Chemical Heritage Foundation, 2002.
[58]« Proceedings of the American Physical Society », *Physical Review*, juin 1946, vol. 69, n° 11-12, pp. 674‑674.
[59]Malcolm DOLE, L. L. MACK, R. L. HINES, R. C. MOBLEY, L. D. FERGUSON et M. B. ALICE, « Molecular Beams of Macroions », *The Journal of Chemical Physics*, 1 septembre 1968, vol. 49, n° 5, pp. 2240‑2249.
[60]Klaus BIEMANN, « Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure », *Biological Mass Spectrometry*, octobre 1988, vol. 16, n° 1-12, pp. 99‑111.
[61]Peter JAMES, « Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics », *Quarterly Reviews of Biophysics*, novembre 1997, vol. 30, n° 4, pp. 279‑331.
[62]Masamichi YAMASHITA et John B. FENN, « Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme », *The Journal of Physical Chemistry*, septembre 1984, vol. 88, n° 20, pp. 4451‑4459.
[63]J B FENN, M MANN, C K MENG, S F WONG et C M WHITEHOUSE, « Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules », *Science (New York, N.Y.)*, 6 octobre 1989, vol. 246, n° 4926, pp. 64‑71.
[64]« Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? ».
[65]I HAYATI, A.I BAILEY et Th.F TADROS, « Investigations into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying of liquids », *Journal of Colloid and Interface Science*, mai 1987, vol. 117, n° 1, pp. 205‑221.
[66]Michael G. IKONOMOU, Arthur T. BLADES et Paul. KEBARLE, « Electrospray-ion spray: a comparison of mechanisms and performance », *Analytical Chemistry*, septembre 1991, vol. 63, n° 18, pp. 1989‑1998.
[67]Arthur T. BLADES, Michael G. IKONOMOU et Paul. KEBARLE, « Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell », *Analytical Chemistry*, octobre 1991, vol. 63, n° 19, pp. 2109‑2114.
[68]Alessandro GOMEZ et Keqi TANG, « Charge and fission of droplets in electrostatic sprays », *Physics of Fluids*, janvier 1994, vol. 6, n° 1, pp. 404‑414.
[69]Daniel C. TAFLIN, Timothy L. WARD et E. James DAVIS, « Electrified droplet fission and the Rayleigh limit », *Langmuir*, mars 1989, vol. 5, n° 2, pp. 376‑384.
[70]Andries P BRUINS, « Mechanistic aspects of electrospray ionization », *Journal of Chromatography A*, janvier 1998, vol. 794, n° 1-2, pp. 345‑357.
[71]Malcolm DOLE, « Molecular Beams of Macroions », *The Journal of Chemical Physics*, 1968, vol. 49, n° 5, p. 2240.
[72]B. A. THOMSON et J. V. IRIBARNE, « Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure », *The Journal of Chemical Physics*, 1979, vol. 71, n° 11, p. 4451.
[73]J. V. IRIBARNE, « On the evaporation of small ions from charged droplets », *The Journal of Chemical Physics*, 1976, vol. 64, n° 6, p. 2287.

[74]Richard D. SMITH, Joseph A. LOO, Rachel R. Ogorzalek LOO, Mark BUSMAN et Harold R. UDSETH, « Principles and practice of electrospray ionization—mass spectrometry for large polypeptides and proteins », *Mass Spectrometry Reviews*, septembre 1991, vol. 10, n° 5, pp. 359‑452.

[75]Craig M. WHITEHOUSE, Robert N. DREYER, Masamichi. YAMASHITA et John B. FENN, « Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers », *Analytical Chemistry*, mars 1985, vol. 57, n° 3, pp. 675‑679.

[76]J. FENN, M MANN, C. MENG, S. WONG et C. WHITEHOUSE, « Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules », *Science*, 6 octobre 1989, vol. 246, n° 4926, pp. 64‑71.

[77]Birendra N. PRAMANIK, A. K. GANGULY, Michael L. GROSS et & 0 MORE, *Applied Electrospray Mass Spectrometry: Practical Spectroscopy Series Volume 32*, 1st edition., New York, CRC Press, 2002.

[78]Bruno DOMON et Ruedi AEBERSOLD, « Mass Spectrometry and Protein Analysis », *Science*, 14 avril 2006, vol. 312, n° 5771, pp. 212‑217.

[79]Gustav SUNDQVIST, *Analysis of noncovalent and covalent protein-ligand complexes by electrospray ionisation mass spectrometry*,, Stockholm, Bioteknologi, Biotechnology, Kungliga Tekniska högskolan, 2008.

[80]Matthias WILM et Matthias MANN, « Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source », *Analytical Chemistry*, janvier 1996, vol. 68, n° 1, pp. 1‑8.

[81]Graham T.T. GIBSON, Samuel M. MUGO et Richard D. OLESCHUK, « Nanoelectrospray emitters: Trends and perspective », *Mass Spectrometry Reviews*, novembre 2009, vol. 28, n° 6, pp. 918‑936.

[82] Mark R. EMMETT et Richard M. CAPRIOLI, « Micro-electrospray mass spectrometry: ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, juillet 1994, vol. 5, n° 7, pp. 605‑613.

[83] Matthias S. WILM et Matthias MANN, « Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? », *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, septembre 1994, vol. 136, n° 2-3, pp. 167‑180.

[84]M. A. POSTHUMUS, P. G. KISTEMAKER, H. L. C. MEUZELAAR et M. C. TEN NOEVER DE BRAUW, « Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules », *Analytical Chemistry*, juin 1978, vol. 50, n° 7, pp. 985‑991.

[85]Michael. KARAS, Doris. BACHMANN et Franz. HILLENKAMP, « Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules », *Analytical Chemistry*, décembre 1985, vol. 57, n° 14, pp. 2935‑2939.

[86]M. KARAS, D. BACHMANN, U. BAHR et F. HILLENKAMP, « Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds », *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, septembre 1987, vol. 78, pp. 53‑68.

[87]Koichi TANAKA, Hiroaki WAKI, Yutaka IDO, Satoshi AKITA, Yoshikazu YOSHIDA, Tamio YOSHIDA et T. MATSUO, « Protein and polymer analyses up tom/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, août 1988, vol. 2, n° 8, pp. 151‑153.

[88]Kazumasa MURAKAMI, Asami SATO, Kenro HASHIMOTO et Tatsuya FUJINO, « Study of ionization process of matrix molecules in matrix-assisted laser desorption ionization », *Chemical Physics*, juin 2013, vol. 419, pp. 37‑43.

[89]Renato ZENOBI et Richard KNOCHENMUSS, « Ion formation in MALDI mass spectrometry », *Mass Spectrometry Reviews*, 1998, vol. 17, n° 5, pp. 337‑366.

[90]R KNOCHENMUSS et R ZENOBI, « MALDI ionization: the role of in-plume processes », *Chemical reviews*, février 2003, vol. 103, n° 2, pp. 441‑452.

[91]Richard KNOCHENMUSS, « Ion formation mechanisms in UV-MALDI », *The Analyst*, septembre 2006, vol. 131, n° 9, pp. 966‑986

[92]Richard KNOCHENMUSS, « Ion formation mechanisms in UV-MALDI », *The Analyst*, septembre 2006, vol. 131, n° 9, pp. 966‑986.

[93]Ronald C. BEAVIS et Brian T. CHAIT, « Velocity distributions of intact high mass polypeptide molecule ions produced by matrix assisted laser desorption », *Chemical Physics Letters*, juillet 1991, vol. 181, n° 5, pp. 479‑484.

[94]Franz HILLENKAMP et Michael KARAS, « The MALDI Process and Method », *in* Franz HILLENKAMP et Jasna PETER-KATALINI (dir.), *MALDI MS*, Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1‑28.

[95]Carol WONG, M. SO et T.-W. CHAN, « Origins of the proton in the generation of protonated polymers and peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization », *European Journal of Mass Spectrometry*, 1998, vol. 4, n° 1, p. 223.

[96]Steven L. COHEN et Brian T. CHAIT, « Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins », *Analytical chemistry*, 1996, vol. 68, n° 1, pp. 31‑37.

[97]John E. COLIGAN, Ben M. DUNN, David W. SPEICHER et Paul T. WINGFIELD (dir.), *Current Protocols in Protein Science*, Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc., 2001.

[98]W. C. WILEY et I. H. MCLAREN, « Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution », *Review of Scientific Instruments*, 1955, vol. 26, n° 12, p. 1150.

[99]Edmond de HOFFMANN et Vincent STROOBANT, *Mass spectrometry: principles and applications*, Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ, J. Wiley, 2007.

[100]V. S. ANTONOV, V. S. LETOKHOV et A. N. SHIBANOV, « Formation of molecular ions as a result of irradiation of the surface of molecular crystals by UV laser radiation », *ZhETF Pisma Redaktsiiu*, avril 1980, vol. 31, p. 471.
[101]R J COTTER, « Time-of-flight mass spectrometry: an increasing role in the life sciences », *Biomedical & environmental mass spectrometry*, août 1989, vol. 18, n° 8, pp. 513‑532.
[102]Bernhard. SPENGLER et Robert J. COTTER, « Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis », *Analytical Chemistry*, avril 1990, vol. 62, n° 8, pp. 793‑796.
[103]Robert S. BROWN et John J. LENNON, « Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer », *Analytical Chemistry*, juillet 1995, vol. 67, n° 13, pp. 1998‑2003.
[104]M. L. VESTAL, P. JUHASZ et S. A. MARTIN, « Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1995, vol. 9, n° 11, pp. 1044‑1050.
[105] Ryan WENZEL, Ulrich ROEHLING, Alexis NAZABAL et Franz HILLENKAMP, « A detector device for high mass ion detection, a method for analyzing ions of high mass and a device for selection between ion detectors ».
[106]Jose A. OLIVARES, Nhung T. NGUYEN, Clement R. YONKER et Richard D. SMITH, « On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis », *Analytical Chemistry*, avril 1987, vol. 59, n° 8, pp. 1230‑1232.
[107]Richard D. SMITH, Jose A. OLIVARES, Nhung T. NGUYEN et Harold R. UDSETH, « Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface », *Analytical Chemistry*, mars 1988, vol. 60, n° 5, pp. 436‑441.
[108]Lori Lee JESSOME et Dietrich A. VOLMER, « Ion suppression : A major concern in mass spectrometry », *LC GC North America*, 2006, vol. 24, n° 5, pp. 498‑510.
[109]R. D. SMITH et H. R. UDSETH, « Capillary zone electrophoresis-MS », *Nature*, 18 février 1988, vol. 331, n° 6157, pp. 639‑640.
[110]Richard D. SMITH, Charles J. BARINAGA et Harold R. UDSETH, « Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry », *Analytical Chemistry*, septembre 1988, vol. 60, n° 18, pp. 1948‑1952.
[111]L. W. TETLER, P. A. COOPER et B. POWELL, « Influence of capillary dimensions on the performance of a coaxial capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry interface », Elsevier, 1995, vol.700.
[112]J. F. BANKS, « Optimization of conditions for the analysis of a peptide mixture and a tryptic digest of cytochrome c by capillary electophoresis-electrospray-ionization mass spectrometry with an improved liquid-sheath probe », Elsevier, 1995, vol.712.
[113]A. INGENDOH, A. KIEHNE et M. GREINER, « CE-MS-MS of peptides using a novel orthogonal CE ESI sprayer and ion trap MS », *Chromatographia*, janvier 1999, vol. 49, n° S1, pp. S87‑S92.
[114]R B COLE, « Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry », *Journal of mass spectrometry: JMS*, juillet 2000, vol. 35, n° 7, pp. 763‑772.
[115]Mehdi MOINI, « Design and Performance of a Universal Sheathless Capillary Electrophoresis to Mass Spectrometry Interface Using a Split-Flow Technique », *Analytical Chemistry*, juillet 2001, vol. 73, n° 14, pp. 3497‑3501.
[116]S. PLEASANCE, P. THIBAULT et J. KELLY, « Comparison of liquid-junction and coaxial interfaces for capillary electrophoresis-mass spectrometry with application to compounds of concern to the aquaculture industry », *Journal of Chromatography A*, février 1992, vol. 591, n° 1-2, pp. 325‑339.
[117]Richard D. SMITH, Harold R. UDSETH, Charles J. BARINAGA et Charles G. EDMONDS, « Instrumentation for high-performance capillary electrophoresis—mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, octobre 1991, vol. 559, n° 1-2, pp. 197‑208.
[118]Richard D. SMITH, Jon H. WAHL, David R. GOODLETT et Steven A. HOFSTADLER, « Capillary electrophoresis/mass spectrometry », *Analytical Chemistry*, juillet 1993, vol. 65, n° 13, p. 574A‑584A.
[119]M.E. PALMER, L.W. TETLER et I.D. WILSON, « Hydrogen/deuterium exchange using a coaxial sheath-flow interface for capillary electrophoresis/mass spectrometry », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 mai 2000, vol. 14, n° 9, pp. 808‑817.
[120]Christian NEUSÜß, Matthias PELZING et Marcus MACHT, « A robust approach for the analysis of peptides in the low femtomole range by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry », *ELECTROPHORESIS*, septembre 2002, vol. 23, n° 18, pp. 3149‑3159.
[121]E. Jane MAXWELL, Xuefei ZHONG, Hong ZHANG, Nikita VAN ZEIJL et David D. Y. CHEN, « Decoupling CE and ESI for a more robust interface with MS », *ELECTROPHORESIS*, avril 2010, vol. 31, n° 7, pp. 1130‑1137.
[122]E. Jane MAXWELL, Xuefei ZHONG et David D. Y. CHEN, « Asymmetrical Emitter Geometries for Increased Range of Stable Electrospray Flow Rates », *Analytical Chemistry*, 15 octobre 2010, vol. 82, n° 20, pp. 8377‑8381.

[123]Edgar D. LEE, Wolfgang MÜCK, Jack D. HENION et Thomas R. COVEY, « On-line capillary zone electrophoresis-ion spray tandem mass spectrometry for the determination of dynorphins », *Journal of Chromatography A*, décembre 1988, vol. 458, pp. 313‑321.

[124]Edgar D. LEE, Wolfgang MÜCK, Jack D. HENION et Thomas R. COVEY, « Liquid junction coupling for capillary zone electrophoresis/ion spray mass spectrometry », *Biological Mass Spectrometry*, septembre 1989, vol. 18, n° 9, pp. 844‑850.

[125]Jianyi CAI et Jack HENION, « Capillary electrophoresis-mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, 26 juin 1995, vol. 703, n° 1–2, pp. 667‑692.

[126]*Ibid.*

[127]R L SHEPPARD et J HENION, « Quantitative capillary electrophoresis/ion spray tandem mass spectrometry determination of EDTA in human plasma and urine », *Analytical chemistry*, 1 août 1997, vol. 69, n° 15, pp. 2901‑2907.

[128]Alexander VON BROCKE, Graeme NICHOLSON et Ernst BAYER, « Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry », *ELECTROPHORESIS*, mai 2001, vol. 22, n° 7, pp. 1251‑1266.

[129]Timothy WACHS, Robin L. SHEPPARD et Jack HENION, « Design and applications of a self-aligning liquid junction-electrospray interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry », *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, octobre 1996, vol. 685, n° 2, pp. 335‑342.

[130]Haleem J ISSAQ, George M JANINI, King C CHAN et Timothy D VEENSTRA, « Sheathless electrospray ionization interfaces for capillary electrophoresis-mass spectrometric detection advantages and limitations », *Journal of chromatography. A*, 22 octobre 2004, vol. 1053, n° 1-2, pp. 37‑42.

[131]Matthias WILM et Matthias MANN, « Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source », *Analytical Chemistry*, janvier 1996, vol. 68, n° 1, pp. 1‑8.

[132]Robert A. MEYERS (dir.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, Chichester, UK, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

[133]John F. KELLY, Louis RAMALEY et Pierre THIBAULT, « Capillary Zone Electrophoresis−Electrospray Mass Spectrometry at Submicroliter Flow Rates: Practical Considerations and Analytical Performance », *Analytical Chemistry*, janvier 1997, vol. 69, n° 1, pp. 51‑60.

[134]Jon H. WAHL, David C. GALE et Richard D. SMITH, « Sheathless capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry using 10 µm I.D. capillaries: Analyses of tryptic digests of cytochrome c », *Journal of Chromatography A*, janvier 1994, vol. 659, n° 1, pp. 217‑222.

[135]M. Scott. KRIGER, Kelsey D. COOK et Roswitha S. RAMSEY, « Durable Gold-Coated Fused Silica Capillaries for Use in Electrospray Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, janvier 1995, vol. 67, n° 2, pp. 385‑389.

[136]Yan Zin CHANG et Guor Rong HER, « Sheathless Capillary Electrophoresis/Electrospray Mass Spectrometry Using a Carbon-Coated Fused-Silica Capillary », *Analytical Chemistry*, février 2000, vol. 72, n° 3, pp. 626‑630.

[137]Kevin P. BATEMAN, Robert L. WHITE et Pierre THIBAULT, « Disposable Emitters for On-line Capillary Zone Electrophoresis/Nanoelectrospray Mass Spectrometry », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 février 1997, vol. 11, n° 3, pp. 307‑315.

[138]James N. ALEXANDER, Gary A. SCHULTZ et Janet B. POLI, « Development of a nano-electrospray mass spectrometry source for nanoscale liquid chromatography and sheathless capillary electrophoresis », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 septembre 1998, vol. 12, n° 17, pp. 1187‑1191.

[139]Joop C. M. WATERVAL, Petra BESTEBREURTJE, Henk LINGEMAN, Cees VERSLUIS, Albert J. R. HECK, Auke BULT et Willy J. M. UNDERBERG, « Robust and cost-effective capillary electrophoresis-mass spectrometry interfaces suitable for combination with on-line analyte preconcentration », *ELECTROPHORESIS*, août 2001, vol. 22, n° 13, pp. 2701‑2708.

[140]P CAO et M MOINI, « A novel sheathless interface for capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an in-capillary electrode », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, mai 1997, vol. 8, n° 5, pp. 561‑564.

[141]Mehdi MOINI*, « Simplifying CE−MS Operation. 2. Interfacing Low-Flow Separation Techniques to Mass Spectrometry Using a Porous Tip », 21 avril 2007 (URL complète en bibliographie, consulté le 26 avril 2014).

[142]Jean-Marc BUSNEL, Bart SCHOENMAKER, Rawi RAMAUTAR, Alegria CARRASCO-PANCORBO, Chitra RATNAYAKE, Jerald S. FEITELSON, Jeff D. CHAPMAN, André M. DEELDER et Oleg A. MAYBORODA, « High Capacity Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Coupling a Porous Sheathless Interface with Transient-Isotachophoresis », *Analytical Chemistry*, 15 novembre 2010, vol. 82, n° 22, pp. 9476‑9483.

[143]Klaus FASERL, Bettina SARG, Leopold KREMSER et Herbert LINDNER, « Optimization and Evaluation of a Sheathless Capillary Electrophoresis–Electrospray Ionization Mass Spectrometry Platform for Peptide Analysis: Comparison to Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, octobre 2011, vol. 83, n° 19, pp. 7297‑7305.

[144]Jean-Marc BUSNEL, Bart SCHOENMAKER, Rawi RAMAUTAR, Alegria CARRASCO-PANCORBO, Chitra RATNAYAKE, Jerald S. FEITELSON, Jeff D. CHAPMAN, André M. DEELDER et Oleg A. MAYBORODA, « High Capacity Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization Mass Spectrometry », *op. cit.*

[145]Anthonius A. M. HEEMSKERK, Jean-Marc BUSNEL, Bart SCHOENMAKER, Rico J. E. DERKS, Oleg KLYCHNIKOV, Paul J. HENSBERGEN, André M. DEELDER et Oleg A. MAYBORODA, « Ultra-Low Flow Electrospray Ionization-Mass Spectrometry for Improved Ionization Efficiency in Phosphoproteomics », *Analytical Chemistry*, 15 mai 2012, vol. 84, n° 10, pp. 4552‑4559.

[146]Anthonius A. M. HEEMSKERK, Manfred WUHRER, Jean-Marc BUSNEL, Carolien A. M. KOELEMAN, Maurice H. J. SELMAN, Gestur VIDARSSON, Rick KAPUR, Bart SCHOENMAKER, Rico J. E. DERKS, André M. DEELDER et Oleg A. MAYBORODA, « Coupling porous sheathless interface MS with transient-ITP in neutral capillaries for improved sensitivity in glycopeptide analysis: CE and CEC », *ELECTROPHORESIS*, février 2013, vol. 34, n° 3, pp. 383‑387.

[147]Rabah GAHOUAL, Alicia BURR, Jean-Marc BUSNEL, Lauriane KUHN, Phillipe HAMMANN, Alain BECK, Yannis-Nicolas FRANÇOIS et Emmanuelle LEIZE-WAGNER, « Rapid and multi-level characterization of trastuzumab using sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry », *mAbs*, 1 mai 2013, vol. 5, n° 3, pp. 479‑490.

[148]Rawi RAMAUTAR, Jean-Marc BUSNEL, André M. DEELDER et Oleg A. MAYBORODA, « Enhancing the Coverage of the Urinary Metabolome by Sheathless Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 17 janvier 2012, vol. 84, n° 2, pp. 885‑892.

[149]R. HASELBERG, S. HARMSEN, M.E.M. DOLMAN, G.J. DE JONG, R.J. KOK et G.W. SOMSEN, « Characterization of drug-lysozyme conjugates by sheathless capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry », *Analytica Chimica Acta*, juillet 2011, vol. 698, n° 1-2, pp. 77‑83.

[150]Rob HASELBERG, Gerhardus J. DE JONG et Govert W. SOMSEN, « Low-Flow Sheathless Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry for Sensitive Glycoform Profiling of Intact Pharmaceutical Proteins », *Analytical Chemistry*, 19 février 2013, vol. 85, n° 4, pp. 2289‑2296.

[151]Rabah GAHOUAL, Jean-Marc BUSNEL, Philippe WOLFF, Yannis Nicolas FRANÇOIS et Emmanuelle LEIZE-WAGNER, « Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, février 2014, vol. 406, n° 4, pp. 1029‑1038.

[152]Richard B. COLE, « Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry », *Journal of Mass Spectrometry*, 1 juillet 2000, vol. 35, n° 7, pp. 763‑772.

[153]P. KEBARLE, « A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry », *Journal of Mass Spectrometry*, juillet 2000, vol. 35, n° 7, pp. 804‑817.

[154]Jozef MARÁK et Andrea STAŇOVÁ, « Buffer salt effects in off-line coupling of capillary electrophoresis and mass spectrometry: CE and CEC », *ELECTROPHORESIS*, mai 2014, vol. 35, n° 9, pp. 1268‑1274.

[155]Lijuan PENG et Gary R. KINSEL, « Improving the sensitivity of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry by using polyethylene glycol modified polyurethane MALDI target », *Analytical Biochemistry*, mai 2010, vol. 400, n° 1, pp. 56‑60.

[156]Anthonius A. M. HEEMSKERK, Jean-Marc BUSNEL, Bart SCHOENMAKER, Rico J. E. DERKS, Oleg KLYCHNIKOV, Paul J. HENSBERGEN, André M. DEELDER et Oleg A. MAYBORODA, « Ultra-Low Flow Electrospray Ionization-Mass Spectrometry for Improved Ionization Efficiency in Phosphoproteomics », *op. cit.*

[157]Nariyasu MANO et Junichi GOTO, « Biomedical and biological mass spectrometry », *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, janvier 2003, vol. 19, n° 1, pp. 3‑14.

[158]K O BÖRNSEN, « Influence of salts, buffers, detergents, solvents, and matrices on MALDI-MS protein analysis in complex mixtures », *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2000, vol. 146, pp. 387‑404.

[159]Hugo M. SANTOS, Petri KOUVONEN, Jose-Luis CAPELO et Garry L. CORTHALS, « On-target ultrasonic digestion of proteins », *PROTEOMICS*, 1 mai 2013, vol. 13, n° 9, pp. 1423‑1427.

[160]Yuntao ZHANG, Takeo IWAMOTO, Gary RADKE, Yutaka KARIYA, Kiyoshi SUZUKI, Abigail H CONRAD, John M TOMICH et Gary W CONRAD, « On-target derivatization of keratan sulfate oligosaccharides with pyrenebutyric acid hydrazide for MALDI-TOF/TOF-MS », *Journal of mass spectrometry: JMS*, juin 2008, vol. 43, n° 6, pp. 765‑772.

[161]John A. CASTORO, Rick W. CHIU, Curtis A. MONNIG et Charles L. WILKINS, « Matrix-assisted laser desorption/ionization of capillary electrophoresis effluents by Fourier transform mass spectrometry », *Journal of the American Chemical Society*, septembre 1992, vol. 114, n° 19, pp. 7571‑7572.

[162]E.R. Williams, G.C. Jones, Jr., L. Fang and R.N. Zare, « *CZE Using Tandem Time-of-Flight Mass Spectrometry* » ,Proc. 39th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Nashville, TN, 19-24 mai, 1991, pp. 1273-1274

[163]Lacey, M. P.; Keogh, T.; Takigiku, R.; Schneider, R. E.; Asquith, T.N.; Purdon, M. P.; Sanders, R. A.; Pinkston, J. D.; Hentshel, R. T. Proc. 39th,ASMS Conf. Mass Spectrom. Allied Topics., Nashville, TN, 19-24 mai, 1991;358-359.

[164]Donald J. ROSE et James W. JORGENSON, « Fraction collector for capillary zone electrophoresis », *Journal of Chromatography A*, 1988, vol. 438, pp. 23‑34.
[165]Christine SCHWER et Friedrich LOTTSPEICH, « Analytical and micropreparative separation of peptides by capillary zone electrophoresis using discontinuous buffer systems », *Journal of Chromatography A*, 1992, vol. 623, n° 2, pp. 345‑355.
[166]Xiaohua HUANG et Richard N. ZARE, « Use of an on-column frit in capillary zone electrophoresis: sample collection », *Analytical Chemistry*, 1990, vol. 62, n° 5, pp. 443‑446.
[167]Norberto A GUZMAN, Maria A TREBILCOCK et Juan P ADVIS, « Capillary electrophoresis for the analytical separation and semi-preparative collection of monoclonal antibodies », *Analytica Chimica Acta*, janvier 1991, vol. 249, n° 1, pp. 247‑255.
[168]M ALBIN, S M CHEN, A LOUIE, C PAIRAUD, J COLBURN et J WIKTOROWICZ, « The use of capillary electrophoresis in a micropreparative mode: methods and applications », *Analytical biochemistry*, 1 novembre 1992, vol. 206, n° 2, pp. 382‑388.
[169]Yung-Fong CHENG, Martin FUCHS, David ANDREWS et William CARSON, « Membrane fraction collection for capillary electrophoresis », *Journal of Chromatography A*, 1992, vol. 608, n° 1, pp. 109‑116.
[170]Huey G. LEE et Dominic M. DESIDERIO, « Preparative capillary zone electrophoresis of synthetic peptides Conversion of an autosampler into a fraction collector », *Journal of Chromatography A*, décembre 1994, vol. 686, n° 2, pp. 309‑317.
[171]K O ERIKSSON, A PALM et S HJERTÉN, « Preparative capillary electrophoresis based on adsorption of the solutes (proteins) onto a moving blotting membrane as they migrate out of the capillary », *Analytical biochemistry*, mars 1992, vol. 201, n° 2, pp. 211‑215.
[172]Thomas KEOUGH, Ray TAKIGIKU, Martin P. LACEY et Michael PURDON, « Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of proteins isolated by capillary zone electrophoresis », *Analytical chemistry*, 1992, vol. 64, n° 14, pp. 1594‑1600.
[173]Odilo MULLER, Frantisek FORET et Barry L. KARGER, « Design of a high-precision fraction collector for capillary electrophoresis », *Analytical chemistry*, 1995, vol. 67, n° 17, pp. 2974‑2980.
[174]Sarah Y. CHANG et Edward S. YEUNG, « Laser vaporization/ionization interface for capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry », *Analytical chemistry*, 1997, vol. 69, n° 13, pp. 2251‑2257.
[175]Jan PREISLER, Frantisek FORET et Barry L. KARGER, « On-Line MALDI-TOF MS Using a Continuous Vacuum Deposition Interface », *Analytical Chemistry*, décembre 1998, vol. 70, n° 24, pp. 5278‑5287.
[176]Jan PREISLER, Ping HU, Tomas REJTAR et Barry L. KARGER, « Capillary Electrophoresis−Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Using a Vacuum Deposition Interface », *Analytical Chemistry*, octobre 2000, vol. 72, n° 20, pp. 4785‑4795.
[177]Henrik ØRSNES, Thomas GRAF, Sandor BOHATKA et Hans DEGN, « Rotating ball inlet for continuous mass spectrometric monitoring of aqueous solutions », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 janvier 1998, vol. 12, n° 1, pp. 11‑14.
[178]Henrik ØRSNES, Thomas GRAF et Hans DEGN, « Stopped-Flow Mass Spectrometry with Rotating Ball Inlet: Application to the Ketone−Sulfite Reaction », *Analytical Chemistry*, novembre 1998, vol. 70, n° 22, pp. 4751‑4754.
[179]H ORSNES, T GRAF, H DEGN et K K MURRAY, « A rotating ball inlet for on-line MALDI mass spectrometry », *Analytical chemistry*, 1 janvier 2000, vol. 72, n° 1, pp. 251‑254.
[180]Yan LI, Bo YAN, Chunhui DENG, Jia TANG, Junyan LIU et Xiangmin ZHANG, « On-plate digestion of proteins using novel trypsin-immobilized magnetic nanospheres for MALDI-TOF-MS analysis », *Proteomics*, octobre 2007, vol. 7, n° 20, pp. 3661‑3671.
[181]H.J. BOSS, M.F. ROHDE et R.S. RUSH, « Multiple Sequential Fraction Collection of Peptides and Glycopeptides by High-Performance Capillary Electrophoresis », *Analytical Biochemistry*, septembre 1995, vol. 230, n° 1, pp. 123‑129.
[182]H ZHANG et R M CAPRIOLI, « Capillary electrophoresis combined with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry; continuous sample deposition on a matrix-precoated membrane target », *Journal of mass spectrometry: JMS*, septembre 1996, vol. 31, n° 9, pp. 1039‑1046.
[183]Johan JACKSÉN, Theres REDEBY et Åsa EMMER, « Capillary electrophoretic separation and fractionation of hydrophobic peptides onto a pre-structured matrix assisted laser desorption/ionization target for mass spectrometric analysis », *Journal of Separation Science*, février 2006, vol. 29, n° 2, pp. 288‑295.
[184]Junhua WANG, Ruibing CHEN, Mingming MA et Lingjun LI, « MALDI MS Sample Preparation by Using Paraffin Wax Film: Systematic Study and Application for Peptide Analysis », *Analytical Chemistry*, janvier 2008, vol. 80, n° 2, pp. 491‑500.
[185]Wenjia YU, Yan LI, Chunhui DENG et Xiangmin ZHANG, « Comprehensive two-dimensional separation in coupling of reversed-phase chromatography with capillary isoelectric focusing followed by MALDI-MS identification using on-target digestion for intact protein analysis », *ELECTROPHORESIS*, juin 2006, vol. 27, n° 11, pp. 2100‑2110.
[186]Hongyan BI, Liang QIAO, Jean-Marc BUSNEL, Valerie DEVAUD, Baohong LIU et Hubert H. GIRAULT, « TiO_2 Printed Aluminum Foil: Single-Use Film for a Laser Desorption/Ionization Target Plate », *Analytical Chemistry*, février 2009, vol. 81, n° 3, pp. 1177‑1183.

[187]P.A. VAN VEELEN, U.R. TJADEN, J. VAN DER GREEF, A. INGENDOH et F. HILLENKAMP, « Off-line coupling of capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, 24 septembre 1993, vol. 647, n° 2, pp. 367‑374.

[188]Jason S. PAGE, Stanislav S. RUBAKHIN et Jonathan V. SWEEDLER, « Direct cellular assays using off-line capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *The Analyst*, 2000, vol. 125, n° 4, pp. 555‑562.

[189]P. A. VAN VEELEN, C. R. JIMENEZ, K. W. LI, W. P. M. GERAERTS, U. R. TJADEN et J. VAN DER GREEF, « New advanced analytical tools in peptide/protein research: matrix assisted laser desorption mass spectrometry », *Journal of controlled release*, 1994, vol. 29, n° 3, pp. 223‑229.

[190]Sabine AMON, Alexander PLEMATL et Andreas RIZZI, « Capillary zone electrophoresis of glycopeptides under controlled electroosmotic flow conditions coupled to electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry », *ELECTROPHORESIS*, mars 2006, vol. 27, n° 5-6, pp. 1209‑1219.

[191]« Compatible buffer for capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry - Analytical Methods (RSC Publishing) », *Analytical Methods*.

[192]Christian W HUCK, Rania BAKRY, Lukas A HUBER et Günther K BONN, « Progress in capillary electrophoresis coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry », *Electrophoresis*, juin 2006, vol. 27, n° 11, pp. 2063‑2074.

[193]Linda H. H. SILVERTAND, Javier Sastre TORAÑO, Gerhardus J. DE JONG et Wouter P. VAN BENNEKOM, « Development and characterization of cIEF-MALDI-TOF MS for protein analysis », *ELECTROPHORESIS*, mai 2009, vol. 30, n° 10, pp. 1828‑1835.

[194]Noah G. WEISS, Nicole L. ZWICK et Mark A. HAYES, « Capillary isoelectric focusing coupled offline to matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, janvier 2010, vol. 1217, n° 1, pp. 179‑182.

[195]Torbjörn JOHNSON, Jonas BERGQUIST, Rolf EKMAN, Eckhard NORDHOFF, Martin SCHÜRENBERG, Klaus-Dieter KLÖPPEL, Martin MÜLLER, Hans LEHRACH et Johan GOBOM, « A CE−MALDI Interface Based on the Use of Prestructured Sample Supports », *Analytical Chemistry*, avril 2001, vol. 73, n° 8, pp. 1670‑1675.

[196]Kati HELMJA, Maria BORISSOVA, Tatjana KNJAZEVA, Martin JAANUS, Urmas MUINASMAA, Mihkel KALJURAND et Merike VAHER, « Fraction collection in capillary electrophoresis for various stand-alone mass spectrometers », *Journal of Chromatography A*, avril 2009, vol. 1216, n° 17, pp. 3666‑3673.

[197]Michael W. VANNATTA, Colin D. WHITMORE et Norman J. DOVICHI, « CE-MALDI interface based on inkjet technology », *ELECTROPHORESIS*, décembre 2009, vol. 30, n° 23, pp. 4071‑4074.

[198]N OJIMA, T SHINGAKI, T YAMAMOTO et T MASUJIMA, « Droplet electrocoupling between capillary electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectroscopy and its application », *Electrophoresis*, octobre 2001, vol. 22, n° 16, pp. 3478‑3482.

[199]Tomas REJTAR, Ping HU, Peter JUHASZ, Jennifer M. CAMPBELL, Marvin L. VESTAL, Jan PREISLER et Barry L. KARGER, « Off-Line Coupling of High-Resolution Capillary Electrophoresis to MALDI-TOF and TOF/TOF MS », *Journal of Proteome Research*, avril 2002, vol. 1, n° 2, pp. 171‑179.

[200]Hui WEI, Kerstin NOLKRANTZ, David H. POWELL, James H. WOODS, Mei-Chuan KO et Robert T. KENNEDY, « Electrospray sample deposition for matrix-assisted laser desorption/ionization(MALDI) and atmospheric pressure MALDI mass spectrometry with attomole detection limits », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 juin 2004, vol. 18, n° 11, pp. 1193‑1200.

[201]Jean-Marc BUSNEL, Jacques JOSSERAND, Niels LION et Hubert H GIRAULT, « Iontophoretic fraction collection for coupling capillary zone electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry », *Analytical chemistry*, 15 mai 2009, vol. 81, n° 10, pp. 3867‑3872.

[202]Michael J. CHALMERS et Simon J. GASKELL, « Advances in mass spectrometry for proteome analysis », *Current opinion in biotechnology*, 2000, vol. 11, n° 4, pp. 384‑390.

[203]Matthias MANN, Ronald C. HENDRICKSON et Akhilesh PANDEY, « Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry », *Annual review of biochemistry*, 2001, vol. 70, n° 1, pp. 437‑473.

[204]Philippe SCHMITT-KOPPLIN et Moritz FROMMBERGER, « Capillary electrophoresis– mass spectrometry: 15 years of developments and applications », *ELECTROPHORESIS*, décembre 2003, vol. 24, n° 2223, pp. 3837‑3867.

[205]Václav KAŠIČKA, « Recent developments in CE and CEC of peptides », *ELECTROPHORESIS*, janvier 2008, vol. 29, n° 1, pp. 179‑206.

[206]Václav KAŠIČKA, « Recent developments in CE and CEC of peptides (2009-2011) », *ELECTROPHORESIS*, janvier 2012, vol. 33, n° 1, pp. 48‑73.

[207]Rob HASELBERG, Gerhardus J. DE JONG et Govert W. SOMSEN, « Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins 2007-2010 », *ELECTROPHORESIS*, janvier 2011, vol. 32, n° 1, pp. 66‑82.

[208]Rob HASELBERG, De JONG, Gerhardus J et Govert W. SOMSEN, « CE-MS for the analysis of intact proteins 2010–2012 », *ELECTROPHORESIS*, 1 janvier 2013, vol. 34, n° 1, pp. 99‑112.

[209]Xuefei ZHONG, Zichuan ZHANG, Shan JIANG et Lingjun LI, « Recent advances in coupling capillary electrophoresis-based separation techniques to ESI and MALDI-MS », *Electrophoresis*, 29 octobre 2013.

[210]Karel KLEPÁRNÍK, « Recent advances in the combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry: From element to single-cell analysis: CE and CEC », *ELECTROPHORESIS*, janvier 2013, vol. 34, n° 1, pp. 70‑85.

[211]Emma-Dune LERICHE, Florian MAIRE, Martin C. GROSSEL, Catherine M. LANGE et Corinne LOUTELIER-BOURHIS, « Off-line capillary electrophoresis/matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry for analysis of synthesized poly(amido)amine dendrimers », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 août 2012, vol. 26, n° 15, pp. 1718‑1724.

[212]T. KAISER, « Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation », *Blood*, 15 juillet 2004, vol. 104, n° 2, pp. 340‑349.

[213]Timothy A. CROWLEY et Mark A. HAYES, « Analysis of human blood serum using the off-line coupling of capillary isoelectric focusing to matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry », *PROTEOMICS*, septembre 2005, vol. 5, n° 14, pp. 3798‑3804.

[214]Marie HORKÁ, Pavel KARÁSEK, Jiří ŠALPLACHTA, Filip RŮŽIČKA, Marie VYKYDALOVÁ, Anna KUBESOVÁ, Vladimír DRÁB, Michal ROTH et Karel ŠLAIS, « Capillary isoelectric focusing of probiotic bacteria from cow's milk in tapered fused silica capillary with off-line matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification », *Analytica Chimica Acta*, juillet 2013, vol. 788, pp. 193‑199.

[215]Jiří ŠALPLACHTA, Anna KUBESOVÁ, Dana MORAVCOVÁ, Marie VYKYDALOVÁ, Sándor SÜLE, Hana MATOUŠKOVÁ, Jaroslav HORKÝ et Marie HORKÁ, « Use of electrophoretic techniques and MALDI–TOF MS for rapid and reliable characterization of bacteria: analysis of intact cells, cell lysates, and « washed pellets » », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, avril 2013, vol. 405, n° 10, pp. 3165‑3175.

[216]Marie HORKÁ, Jiří ŠALPLACHTA, Pavel KARÁSEK, Anna KUBESOVÁ, Jaroslav HORKÝ, Hana MATOUŠKOVÁ, Karel ŠLAIS et Michal ROTH, « Combination of Capillary Isoelectric Focusing in a Tapered Capillary with MALDI-TOF MS for Rapid and Reliable Identification of *Dickeya* Species from Plant Samples », *Analytical Chemistry*, 16 juillet 2013, vol. 85, n° 14, pp. 6806‑6812.

[217]Thomas MEYER, Dietmar WAIDELICH et August Wilhelm FRAHM, « Separation and first structure elucidation of Cremophor EL-components by hyphenated capillary electrophoresis and delayed extraction-matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry », *Electrophoresis*, avril 2002, vol. 23, n° 7-8, pp. 1053‑1062.

[218]Suhair Yousif AL-JARAH, Johan SJÖDAHL, Andreas WOLDEGIORGIS et Åsa EMMER, « Capillary electrophoretic and mass spectrometric analysis of a polydisperse fluorosurfactant », *Journal of Separation Science*, février 2005, vol. 28, n° 3, pp. 239‑244.

[219]Justyna RECHTHALER, Andreas RIZZI et Günter ALLMAIER, « A one-way hydrophobic surface foil as sample support for MALDI and off-line CZE/MALDI mass spectrometry: An alternative for low and high molecular mass compounds », *International Journal of Mass Spectrometry*, décembre 2007, vol. 268, n° 2-3, pp. 131‑138.

[220]Andrea AMANTONICO, Pawel L. URBAN et Renato ZENOBI, « Facile analysis of metabolites by capillary electrophoresis coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using target plates with polysilazane nanocoating and grooves », *Analyst*, 20 juillet 2009, vol. 134, n° 8, pp. 1536‑1540.

[221]John P. BARRY, Douglas R. RADTKE, William J. CARTON, Rana T. ANSELMO et James V. EVANS, « Analysis of ethoxylated polymers by capillary electrophoresis in UV-transparent polymer networks and by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, mars 1998, vol. 800, n° 1, pp. 13‑19.

[222]Hirofumi SUZUKI, Odilo MÜLLER, András GUTTMAN et Barry L. KARGER, « Analysis of 1-aminopyrene-3, 6, 8-trisulfonate-derivatized oligosaccharides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *Analytical chemistry*, 1997, vol. 69, n° 22, pp. 4554‑4559.

[223]Pascal LUDWICZAK, Thérèse BRANDO, Bernard MONSARRAT et Germain PUZO, « Structural Characterization of *Mycobacterium t uberculosis* Lipoarabinomannans by the Combination of Capillary Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, mai 2001, vol. 73, n° 10, pp. 2323‑2330.

[224]Hyun Joo AN, Andreas H FRANZ et Carlito B LEBRILLA, « Improved capillary electrophoretic separation and mass spectrometric detection of oligosaccharides », *Electrophoresis in Tubes, Capillaries and Microchips: With Recognition of Stellan Hjerten*, 4 juillet 2003, vol. 1004, n° 1–2, pp. 121‑129.

[225]Wolfgang WEINMANN, Carol E. PARKER, Leesa J. DETERDING, Damon I. PAPAC, John HOYES, Michael PRZYBYLSKI et Kenneth B. TOMER, « Capillary electrophoresis—matrix-assisted laser-desorption ionization mass spectrometry of proteins », *Journal of Chromatography A*, 1994, vol. 680, n° 2, pp. 353‑361.

[226]Kathleen L. WALKER, Rick W. CHIU, Curtis A. MONNIG et Charles L. WILKINS, « Off-Line Coupling of Capillary Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, novembre 1995, vol. 67, n° 22, pp. 4197‑4204.

[227]John BULLOCK, Swapan CHOWDHURY et David JOHNSTON, « Characterization of Poly(ethylene glycol)-Modified Superoxide Dismutase: Comparison of Capillary Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, janvier 1996, vol. 68, n° 18, pp. 3258‑3264.

[228]Hongfeng YIN, Catherine KEELY-TEMPLIN et Douglass MCMANIGILL, « Preparative capillary electrophoresis with wide-bore capillaries », *8th International Symposium on High Performance Capillary Electrophoresis Part I*, 13 septembre 1996, vol. 744, n° 1–2, pp. 45‑54.

[229]A C BERGMAN et T BERGMAN, « Micropreparation of peptides by capillary electrophoresis for matrix assisted laser desorption mass spectrometry », *FEBS letters*, 11 novembre 1996, vol. 397, n° 1, pp. 45‑49.

[230]John A. CHAKEL, Erno PUNGOR JR, William S. HANCOCK et Sally A. SWEDBERG, « Analysis of recombinant DNA-derived glycoproteins via high-performance capillary electrophoresis coupled with off-line matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry », *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, vol. 689, n° 1, pp. 215‑220.

[231]Sook Yoo YOUNG, Sun Han YE, Jin Suh MOO et Jongsei PARK, « Analysis of phosphopeptides by capillary electrophoresis and matrix-assisted laser-desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, 28 février 1997, vol. 763, n° 1–2, pp. 285‑293.

[232]« 1997 Mcleod Comparison of novel sampling methods for CE MALDI- joint poreux .. droplet sur plaque preparer matrix deposé ou electrospray.pdf ».

[233]N BIHOREAU, C RAMON, M LAZARD et J M SCHMITTER, « Combination of capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for glycosylation analysis of a human monoclonal anti-Rhesus(D) antibody », *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications*, 12 septembre 1997, vol. 697, n° 1-2, pp. 123‑133.

[234]Ann-Charlotte BERGMAN et Tomas BERGMAN, « Combination of Micropreparative Capillary Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for Peptide Analysis », *Journal of protein chemistry*, 1997, vol. 16, n° 5, pp. 421‑423.

[235]J BULLOCK, S CHOWDHURY, A SEVERDIA, J SWEENEY, D JOHNSTON et L PACHLA, « Comparison of results of various methods used to determine the extent of modification of methoxy polyethylene glycol 5000-modified bovine cupri-zinc superoxide dismutase », *Analytical biochemistry*, 15 décembre 1997, vol. 254, n° 2, pp. 254‑262.

[236]H ZHANG, M STOECKLI, P E ANDREN et R M CAPRIOLI, « Combining solid-phase preconcentration, capillary electrophoresis and off-line matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: intracerebral metabolic processing of peptide E in vivo », *Journal of mass spectrometry: JMS*, avril 1999, vol. 34, n° 4, pp. 377‑383.

[237]Gargi CHOUDHARY, John CHAKEL, William HANCOCK, Armida TORRES-DUARTE, Gillian MCMAHON et Irving WAINER, « Investigation of the Potential of Capillary Electrophoresis with Off-Line Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Clinical Analysis: Examination of a Glycoprotein Factor Associated with Cancer Cachexia », *Analytical Chemistry*, février 1999, vol. 71, n° 4, pp. 855‑859.

[238]Simon EKSTRÖM, Patrik ÖNNERFJORD, Johan NILSSON, Martin BENGTSSON, Thomas LAURELL et György MARKO-VARGA, « Integrated Microanalytical Technology Enabling Rapid and Automated Protein Identification », *Analytical Chemistry*, janvier 2000, vol. 72, n° 2, pp. 286‑293.

[239]Marek MINARIK, Frantisek FORET et Barry L. KARGER, « Fraction collection in micropreparative capillary zone electrophoresis and capillary isoelectric focusing », *Electrophoresis*, 2000, vol. 21, n° 1, pp. 247‑254.

[240]Ahmad AMINI, Shelly J. DORMADY, Larry RIGGS et Fred E. REGNIER, « The impact of buffers and surfactants from micellar electrokinetic chromatography on matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry of peptides: effect of buffer type and concentration on mass determination by MALDI-time-of-flight mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 894, n° 1, pp. 345‑355.

[241]Stanislav S. RUBAKHIN, Jason S. PAGE, Brian R. MONROE et Jonathan V. SWEEDLER, « Analysis of cellular release using capillary electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry », *ELECTROPHORESIS*, septembre 2001, vol. 22, n° 17, pp. 3752‑3758.

[242]Ken K.-C. YEUNG, Andrea G. KICENIUK et Liang LI, « Capillary electrophoresis using a surfactant-treated capillary coupled with offline matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for high efficiency and sensitivity detection of proteins », *Journal of Chromatography A*, 2001, vol. 931, n° 1, pp. 153‑162.

[243]Dong Hee NA, Myung Ok PARK, So Yoen CHOI, Yong Suk KIM, Seung Seok LEE, Sun Dong YOO, Hye Suk LEE et Kang Choon LEE, « Identification of the modifying sites of mono-PEGylated salmon calcitonins by capillary electrophoresis and MALDI–

TOF mass spectrometry », *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001, vol. 754, n° 1, pp. 259‑263.

[244]Johan SJÖDAHL, \AAsa EMMER, Jan VINCENT et Johan ROERAADE, « Characterization of proteinases from Antarctic krill (< i> Euphausia superba</i>) », *Protein expression and purification*, 2002, vol. 26, n° 1, pp. 153‑161.

[245]Hui-Sun NAM, Eunmi BAN, Eunah YOO et Young Sook YOO, « Determination of protein phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase using capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry », *Journal of Chromatography A*, 2002, vol. 976, n° 1, pp. 79‑85.

[246]Jan PREISLER, Ping HU, Tomáš REJTAR, Eugene MOSKOVETS et Barry L. KARGER, « Capillary Array Electrophoresis-MALDI Mass Spectrometry Using a Vacuum Deposition Interface », *Analytical Chemistry*, janvier 2002, vol. 74, n° 1, pp. 17‑25.

[247]Jason S. PAGE, Stanislav S. RUBAKHIN et Jonathan V. SWEEDLER, « Single-Neuron Analysis Using CE Combined with MALDI MS and Radionuclide Detection », *Analytical Chemistry*, février 2002, vol. 74, n° 3, pp. 497‑503.

[248]Anne CHARTOGNE, Marco GASPARI, Sonja JESPERSEN, Brigitte BUSCHER, Elwin VERHEIJ, Robert van der HEIJDEN, Ubbo TJADEN et Jan van der GREEF, « On-target fraction collection for the off-line coupling of capillary isoelectric focusing with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 février 2002, vol. 16, n° 3, pp. 201‑207.

[249]Dong Hee NA, Yu Seok YOUN, Sang Deuk LEE, Mi-Won SON, Won-Bae KIM, Patrick P. DELUCA et Kang Choon LEE, « Monitoring of peptide acylation inside degrading PLGA microspheres by capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry », *Journal of Controlled Release*, octobre 2003, vol. 92, n° 3, pp. 291‑299.

[250]Dong Hee NA, Yu Seok YOUN et Kang Choon LEE, « Optimization of the PEGylation process of a peptide by monitoring with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 octobre 2003, vol. 17, n° 19, pp. 2241‑2244.

[251]Haixia ZHANG et Ken K.-C. YEUNG, « Nanoliter-Volume Selective Sampling of Peptides Based on Isoelectric Points for MALDI-MS », *Analytical Chemistry*, novembre 2004, vol. 76, n° 22, pp. 6814‑6818.

[252]E. M. WEISSINGER, T. KAISER, N. MEERT, R. DE SMET, M. WALDEN, H. MISCHAK, R. C. VANHOLDER et FOR THE EUROPEAN UREMIC TOXIN WORK GROUP, « Proteomics: a novel tool to unravel the patho-physiology of uraemia », *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1 décembre 2004, vol. 19, n° 12, pp. 3068‑3077.

[253]Harald MISCHAK, Thorsten KAISER, Michael WALDEN, Meike HILLMANN, Stefan WITTKE, Alena HERRMANN, Stefan KNUEPPEL, Hermann HALLER et Danilo FLISER, « Proteomic analysis for the assessment of diabetic renal damage in humans », *Clinical Science*, 2004, vol. 107, n° 5, pp. 485‑496.

[254]Jie ZHANG, Hualing HU, Mingxia GAO, Pengyuan YANG et Xiangmin ZHANG, « Comprehensive two-dimensional chromatography and capillary electrophoresis coupled with tandem time-of-flight mass spectrometry for high-speed proteome analysis », *ELECTROPHORESIS*, juillet 2004, vol. 25, n° 14, pp. 2374‑2383.

[255]Tony J. TEGELER, Yehia MECHREF, Kirk BORAAS, James P. REILLY et Milos V. NOVOTNY, « Microdeposition Device Interfacing Capillary Electrochromatography and Microcolumn Liquid Chromatography with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, novembre 2004, vol. 76, n° 22, pp. 6698‑6706.

[256]Michelle L.-S. MOK, Lin HUA, Jonathan B.-C. PHUA, Michael K.-T. WEE et Newman S.-K. SZE, « Capillary isoelectric focusing in pseudo-closed channel coupled to matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for protein analysis », *The Analyst*, 2004, vol. 129, n° 2, p. 109.

[257]Harrison K MUSYIMI, Damien A NARCISSE, Xia ZHANG, Wieslaw STRYJEWSKI, Steven A SOPER et Kermit K MURRAY, « Online CE-MALDI-TOF MS using a rotating ball interface », *Analytical chemistry*, 1 octobre 2004, vol. 76, n° 19, pp. 5968‑5973.

[258]Aida ZUBEROVIC, Sara ULLSTEN, Ulf HELLMAN, Karin E. MARKIDES et Jonas BERGQUIST, « Capillary electrophoresis off-line matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of intact and digested proteins using cationic-coated capillaries », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 décembre 2004, vol. 18, n° 23, pp. 2946‑2952.

[259]Dong Hee NA et Kang Choon LEE, « Capillary electrophoretic characterization of PEGylated human parathyroid hormone with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *Analytical Biochemistry*, août 2004, vol. 331, n° 2, pp. 322‑328.

[260]Ahmad AMINI et Ing-Marie OLOFSSON, « Analysis of calcitonin and its analogues by capillary zone electrophoresis and matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry », *Journal of Separation Science*, juin 2004, vol. 27, n° 9, pp. 675‑685.

[261]Dong H. NA, Eun J. PARK, Yu S. YOUN, Byung W. MOON, Yeong W. JO, Sung H. LEE, Won-Bae KIM, Yeowon SOHN et Kang C. LEE, « Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of polyethylene glycolylated interferon alpha », *ELECTROPHORESIS*, février 2004, vol. 25, n° 3, pp. 476‑479.

[262]Stefan WITTKE, Harald MISCHAK, Michael WALDEN, Walter KOLCH, Thomas RÄDLER et Klaus WIEDEMANN, « Discovery of biomarkers in human urine and cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry: Towards new diagnostic and therapeutic approaches », *ELECTROPHORESIS*, 1 avril 2005, vol. 26, n° 7-8, pp. 1476‑1487.

[263]Haixia ZHANG, Cunjie ZHANG, Gilles A. LAJOIE et Ken K.-C. YEUNG, « Selective Sampling of Phosphopeptides for Detection by MALDI Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, septembre 2005, vol. 77, n° 18, pp. 6078‑6084.

[264]Zhi-hong CHENG, Yue-bo WANG et Yin-long GUO, « Electrophoretic ion migration directly to probe can concentrate charged analyte species for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15 février 2005, vol. 19, n° 3, pp. 424‑428.

[265]Victoria SANZ-NEBOT, Fernando BENAVENTE, Estela GIM ·NEZ et Jos ·BARBOSA, « Capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry for analysis of the novel erythropoiesis-stimulating protein (NESP) », *ELECTROPHORESIS*, avril 2005, vol. 26, n° 7-8, pp. 1451‑1456.

[266]Petra ZÜRBIG, Matthew B. RENFROW, Eric SCHIFFER, Jan NOVAK, Michael WALDEN, Stefan WITTKE, Ingo JUST, Matthias PELZING, Christian NEUSÜß, Dan THEODORESCU, Karen E. ROOT, Mark M. ROSS et Harald MISCHAK, « Biomarker discovery by CE-MS enables sequence analysisvia MS/MS with platform-independent separation », *ELECTROPHORESIS*, juin 2006, vol. 27, n° 11, pp. 2111‑2125.

[267]Xun GUO, Mary B. CHAN-PARK, Soon Fatt YOON, Jung-hoon CHUN, Lin HUA et Newman S.-K. SZE, « UV Embossed Polymeric Chip for Protein Separation and Identification Based on Capillary Isoelectric Focusing and MALDI-TOF-MS », *Analytical Chemistry*, mai 2006, vol. 78, n° 10, pp. 3249‑3256.

[268]Sergei I. SNOVIDA, Vincent C. CHEN, Oleg KROKHIN et Hélène PERREAULT, « Isolation and Identification of Sialylated Glycopeptides from Bovine α_1 -Acid Glycoprotein by Off-Line Capillary Electrophoresis MALDI-TOF Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, septembre 2006, vol. 78, n° 18, pp. 6556‑6563.

[269]Machiko FUJITA, Wataru HATTORI, Tohru SANO, Masakazu BABA, Hiroko SOMEYA, Kenji MIYAZAKI, Ken'ichi KAMIJO, Katsutoshi TAKAHASHI et Hisao KAWAURA, « High-throughput and high-resolution two dimensional mapping of pI and m/z using a microchip in a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer », *Journal of Chromatography A*, avril 2006, vol. 1111, n° 2, pp. 200‑205.

[270]Mahmoud M. YASSINE, Nan GUO, Hongying ZHONG, Liang LI et Charles A. LUCY, « Off-line coupling of preparative capillary zone electrophoresis with microwave-assisted acid hydrolysis and matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for protein sequencing », *Analytica Chimica Acta*, juillet 2007, vol. 597, n° 1, pp. 41‑49.

[271]Brad J. WILLIAMS, William K. RUSSELL et David H. RUSSELL, « Utility of CE–MS Data in Protein Identification », *Analytical Chemistry*, mai 2007, vol. 79, n° 10, pp. 3850‑3855.

[272]Johan JACKSÉN, Thomas FRISK, Theres REDEBY, Varun PARMAR, Wouter VAN DER WIJNGAART, Göran STEMME et Åsa EMMER, « Off-line integration of CE and MALDI-MS using a closed–open–closed microchannel system », *ELECTROPHORESIS*, juillet 2007, vol. 28, n° 14, pp. 2458‑2465.

[273]Chandra A. NESBITT, Kristina JURCIC et Ken K.-C. YEUNG, « Nanoliter-volume protein enrichment, tryptic digestion, and partial separation based on isoelectric points by CE for MALDI mass spectral analysis », *ELECTROPHORESIS*, janvier 2008, vol. 29, n° 2, pp. 466‑474.

[274]Junhua WANG, Mingming MA, Ruibing CHEN et Lingjun LI, « Enhanced Neuropeptide Profiling via Capillary Electrophoresis Off-Line Coupled with MALDI FTMS », *Analytical Chemistry*, août 2008, vol. 80, n° 16, pp. 6168‑6177.

[275]Linda H. H. SILVERTAND, Javier Sastre TORAÑO, Gerhardus J. DE JONG et Wouter P. VAN BENNEKOM, « Improved repeatability and matrix-assisted desorption/ionization – time of flight mass spectrometry compatibility in capillary isoelectric focusing », *ELECTROPHORESIS*, mai 2008, vol. 29, n° 10, pp. 1985‑1996.

[276]Michael LECHNER, Alexandra SEIFNER et Andreas M. RIZZI, « Capillary isoelectric focusing hyphenated to single- and multistage matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry using automated sheath-flow-assisted sample deposition », *ELECTROPHORESIS*, mai 2008, vol. 29, n° 10, pp. 1974‑1984.

[277]Aida ZUBEROVIC, Jörg HANRIEDER, Ulf HELLMAN, Jonas BERGQUIST et Magnus WETTERHALL, « Proteome profiling of human cerebrospinal fluid: exploring the potential of capillary electrophoresis with surface modified capillaries for analysis of complex biological samples », *European journal of mass spectrometry (Chichester, England)*, 2008, vol. 14, n° 4, pp. 249‑260.

[278]Aida ZUBEROVIC, Magnus WETTERHALL, Jörg HANRIEDER et Jonas BERGQUIST, « CE MALDI-TOF/TOF MS for multiplexed quantification of proteins in human ventricular cerebrospinal fluid », *ELECTROPHORESIS*, mai 2009, vol. 30, n° 10, pp. 1836‑1843.

[279]Kristina JURCIC et Ken K.-C. YEUNG, « Sphingomyelins as semi-permanent capillary coatings for protein separations in CE and off-line analysis with MALDI-MS », *ELECTROPHORESIS*, mai 2009, vol. 30, n° 10, pp. 1817‑1827.

[280]Jörg HANRIEDER, Aida ZUBEROVIC et Jonas BERGQUIST, « Surface modified capillary electrophoresis combined with in solution isoelectric focusing and MALDI-TOF/TOF MS: A gel-free multidimensional electrophoresis approach for proteomic profiling—Exemplified on human follicular fluid », *Journal of Chromatography A*, avril 2009, vol. 1216, n° 17, pp. 3621‑3628.

[281]Stefan BACHMANN, Rainer VALLANT, Rania BAKRY, Christian W. HUCK, Danilo CORRADINI et Günther K. BONN, « CE coupled to MALDI with novel covalently coated capillaries », *ELECTROPHORESIS*, janvier 2010, vol. 31, n° 4, pp. 618‑629.

[282]Junhua WANG, Yuzhuo ZHANG, Feng XIANG, Zichuan ZHANG et Lingjun LI, « Combining capillary electrophoresis matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and stable isotopic labeling techniques for comparative crustacean peptidomics », *Journal of Chromatography A*, juin 2010, vol. 1217, n° 26, pp. 4463‑4470.

[283]Johan JACKSÉN, Kenneth DAHL, Ann-Therese KARLBERG, Theres REDEBY et Åsa EMMER, « Capillary electrophoresis separation and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry characterization of bovine serum albumin–fluorescein isothiocyanate conjugates », *Journal of Chromatography B*, mai 2010, vol. 878, n° 15-16, pp. 1125‑1134.

[284]Stefan BACHMANN, Rania BAKRY, Christian W. HUCK, Fabio POLATO, Danilo CORRADINI et Günther K. BONN, « Peptide mapping using capillary electrophoresis offline coupled to matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry », *ELECTROPHORESIS*, octobre 2011, vol. 32, n° 20, pp. 2830‑2839.

[285]Junhua WANG, Hui YE, Zichuan ZHANG, Feng XIANG, Gary GIRDAUKAS et Lingjun LI, « Advancing Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometric Imaging for Capillary Electrophoresis Analysis of Peptides », *Analytical Chemistry*, mai 2011, vol. 83, n° 9, pp. 3462‑3469.

[286]Mohammad Reza POURHAGHIGHI, Jean-Marc BUSNEL et Hubert H. GIRAULT, « High-sensitive protein analysis by FESI-CE-MALDI-MS », *ELECTROPHORESIS*, juillet 2011, vol. 32, n° 14, pp. 1795‑1803.

[287]Noah G. WEISS, Jason W. JARVIS, Randall W. NELSON et Mark A. HAYES, « Examining serum amyloid P component microheterogeneity using capillary isoelectric focusing and MALDI-MS », *PROTEOMICS*, janvier 2011, vol. 11, n° 1, pp. 106‑113.

[288]Zichuan ZHANG, Hui YE, Junhua WANG, Limei HUI et Lingjun LI, « Pressure-Assisted Capillary Electrophoresis Coupling with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometric Imaging for Quantitative Analysis of Complex Peptide Mixtures », *Analytical Chemistry*, 18 septembre 2012, vol. 84, n° 18, pp. 7684‑7691.

[289]Natalia GASILOVA, Anne-Laure GASSNER et Hubert H. GIRAULT, « Analysis of major milk whey proteins by immunoaffinity capillary electrophoresis coupled with MALDI-MS: CE and CEC », *ELECTROPHORESIS*, août 2012, vol. 33, n° 15, pp. 2390‑2398.

[290]Iva TOMALOVÁ, Pavla FOLTYNOVÁ, Viktor KANICKÝ et Jan PREISLER, « MALDI MS and ICP MS Detection of a Single CE Separation Record: A Tool for Metalloproteomics », *Analytical Chemistry*, 7 janvier 2014, vol. 86, n° 1, pp. 647‑654.

[291] Patricia KAHN, « From Genome to Proteome: Looking at a Cell's Proteins », *Science*, 20 octobre 1995, vol. 270, n° 5235, pp. 369‑370.

[292] John R. YATES, Cristian I. RUSE et Aleksey NAKORCHEVSKY, « Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications », *Annual Review of Biomedical Engineering*, août 2009, vol. 11, n° 1, pp. 49‑79.

[293] Daniel P. LITTLE, J. Paul. SPEIR, Michael W. SENKO, Peter B. O'CONNOR et Fred W. MCLAFFERTY, « Infrared Multiphoton Dissociation of Large Multiply Charged Ions for Biomolecule Sequencing », *Analytical Chemistry*, septembre 1994, vol. 66, n° 18, pp. 2809‑2815.

[294] Neil L. KELLEHER, Hong Y. LIN, Gary A. VALASKOVIC, David J. AASERUD, Einar K. FRIDRIKSSON et Fred W. MCLAFFERTY, « Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry », *Journal of the American Chemical Society*, février 1999, vol. 121, n° 4, pp. 806‑812.

[295] Mi Jin XUEMEI HAN, « Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. », *Science (New York, N.Y.)*, 2006, vol. 314, n° 5796, pp. 109‑12.

[296] Gwynyth SCHERPEREL et Gavin E. REID, « Emerging methods in proteomics: top-down protein characterization by multistage tandem mass spectrometry », *The Analyst*, 2007, vol. 132, n° 6, p. 500.

[297] R. S. BROWN et J. J. LENNON, « Sequence-specific fragmentation of matrix-assisted laser-desorbed protein/peptide ions », *Analytical Chemistry*, 1 novembre 1995, vol. 67, n° 21, pp. 3990‑3999.

[298] Robert S. BROWN, Bryan L. CARR et John J. LENNON, « Factors that influence the observed fast fragmentation of peptides in matrix-assisted laser desorption », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, mars 1996, vol. 7, n° 3, pp. 225‑232.

[299]Robert S. BROWN, Jinhua FENG et Duane C. REIBER, « Further studies of in-source fragmentation of peptides in matrix-assisted laser desorption-ionization », *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry*, décembre 1997, vol. 169–170, n° 0, pp. 1‑18.

[300]M. TAKAYAMA, « In-source decay characteristics of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, avril 2001, vol. 12, n° 4, pp. 420‑427.
[301]Mahmud HOSSAIN et Patrick A. LIMBACH, « A Comparison of MALDI Matrices », *in Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, Second Edition*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 215‑244.
[302] Kevin DEMEURE, Loïc QUINTON, Valérie GABELICA et Edwin DE PAUW, « Rational Selection of the Optimum MALDI Matrix for Top-Down Proteomics by In-Source Decay », *Analytical Chemistry*, novembre 2007, vol. 79, n° 22, pp. 8678‑8685.
[303] M. L. VESTAL, P. JUHASZ et S. A. MARTIN, « Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1 janvier 1995, vol. 9, n° 11, pp. 1044‑1050.
[304]Zhaoyang LIU et Kevin L. SCHEY, « Optimization of a MALDI TOF-TOF mass spectrometer for intact protein analysis », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, avril 2005, vol. 16, n° 4, pp. 482‑490.
[305]Mitsuo TAKAYAMA et Akira TSUGITA, « Does in-source decay occur independent of the ionization process in matrix-assisted laser desorption? », *International Journal of Mass Spectrometry*, 30 décembre 1998, vol. 181, n° 1–3, pp. L1‑L6.
[306]Mitsuo TAKAYAMA, « In-source decay characteristics of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, avril 2001, vol. 12, n° 4, pp. 420‑427.
[307]M. TAKAYAMA et A. TSUGITA, « Sequence information of peptides and proteins with in-source decay in matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry », *Electrophoresis*, mai 2000, vol. 21, n° 9, pp. 1670‑1677.
[308]Mitsuo TAKAYAMA, « Susceptible Region of Myoglobins to In-source Decay Using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Coupled with Delayed Extraction Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometer », *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, décembre 2002, vol. 50, n° 6, pp. 304‑310.
[309]Mitsuo TAKAYAMA, « N-Cα bond cleavage of the peptide backbone via hydrogen abstraction », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1 septembre 2001, vol. 12, n° 9, pp. 1044‑1049.
[310]Kevin DEMEURE, Loïc QUINTON, Valérie GABELICA et Edwin DE PAUW, « Rational Selection of the Optimum MALDI Matrix for Top-Down Proteomics by In-Source Decay », *op. cit.*
[311]David CALLIGARIS, Claude VILLARD et Daniel LAFITTE, « Advances in top-down proteomics for disease biomarker discovery », *Journal of Proteomics*, 10 juin 2011, vol. 74, n° 7, pp. 920‑934.
[312]Kevin DEMEURE, Valérie GABELICA et Edwin Andre DE PAUW, « New advances in the understanding of the in-source decay fragmentation of peptides in MALDI-TOF-MS », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, novembre 2010, vol. 21, n° 11, pp. 1906‑1917.
[313]Thomas KÖCHER, Åke ENGSTRÖM et Roman A. ZUBAREV, « Fragmentation of Peptides in MALDI In-Source Decay Mediated by Hydrogen Radicals », *Analytical Chemistry*, janvier 2005, vol. 77, n° 1, pp. 172‑177.
[314]Yong Jin BAE, Young Sik SHIN, Jeong Hee MOON et Myung Soo KIM, « Degree of ionization in MALDI of peptides: thermal explanation for the gas-phase ion formation », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, août 2012, vol. 23, n° 8, pp. 1326‑1335.
[315] Adam D. CATHERMAN, Owen S. SKINNER et Neil L. KELLEHER, « Top Down proteomics: Facts and perspectives », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, mars 2014, vol. 445, n° 4, pp. 683‑693.
[316]Mitsuo TAKAYAMA, « In-source decay characteristics of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, avril 2001, vol. 12, n° 4, pp. 420‑427.
[317]Julie HARDOUIN, « Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry », *Mass Spectrometry Reviews*, octobre 2007, vol. 26, n° 5, pp. 672‑682.
[318]M. TAKAYAMA, « In-source decay characteristics of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *op. cit.*
[319]Zhaoyang LIU et Kevin L. SCHEY, « Optimization of a MALDI TOF-TOF mass spectrometer for intact protein analysis », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, avril 2005, vol. 16, n° 4, pp. 482‑490.
[320]Anja Resemann DETLEV SUCKAU, « MALDI Top-Down sequencing: calling N- and C-terminal protein sequences with high confidence and speed. », *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 2009, vol. 20, n° 5, pp. 258‑62.
[321] E. VON BEHRING et S. KITASATO, « [The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890] », *Molecular Immunology*, décembre 1991, vol. 28, n° 12, pp. 1317, 1319‑1320.
[322] Arne TISELIUS et Elvin A. KABAT, « AN ELECTROPHORETIC STUDY OF IMMUNE SERA AND PURIFIED ANTIBODY PREPARATIONS », *The Journal of Experimental Medicine*, 1 janvier 1939, vol. 69, n° 1, p. 119.
[323] Harry W. SCHROEDER et Lisa CAVACINI, « Structure and function of immunoglobulins », *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, février 2010, vol. 125, n° 2, pp. S41‑S52.
[324] David MALE et Paul FONTENEAU, *Immunologie : Aide-mémoire illustré*.

[325] L. J. FANNING, A. M. CONNOR et G. E. WU, « Development of the immunoglobulin repertoire », *Clinical Immunology and Immunopathology*, avril 1996, vol. 79, n° 1, pp. 1‑14.
[326] G KÖHLER et C MILSTEIN, « Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity », *Nature*, 7 août 1975, vol. 256, n° 5517, pp. 495‑497.
[327] Gilles PAINTAUD, Fabien LEJARRE, David TERNANT, Philippe GOUPILLE et Hervé WATIER, « Les anticorps monoclonaux : une avancée thérapeutique récente et majeure », *Thérapie*, janvier 2009, vol. 64, n° 1, pp. 1‑7.
[328] Gilles PAINTAUD, Marine DIVINÉ, Philippe LECHAT et PARTICIPANTS OF ROUND TABLE N°5 OF GIENS XXVII, « Monoclonal Antibodies for Therapeutic Use: Specific Characteristics of Clinical Development, Evaluation by the Agencies, and Long-term Monitoring of Safety », *Thérapie*, juillet 2012, vol. 67, n° 4, pp. 329‑337.
[329] James N ARNOLD, Mark R WORMALD, Robert B SIM, Pauline M RUDD et Raymond A DWEK, « The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins », *Annual review of immunology*, 2007, vol. 25, pp. 21‑50.
[330] S. KRAPP, Y. MIMURA, R. JEFFERIS, R. HUBER et P. SONDERMANN, « Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity », *Journal of Molecular Biology*, 31 janvier 2003, vol. 325, n° 5, pp. 979‑989.
[331] Martin DALZIEL, Max CRISPIN, Christopher N. SCANLAN, Nicole ZITZMANN et Raymond A. DWEK, « Emerging Principles for the Therapeutic Exploitation of Glycosylation », *Science*, 3 janvier 2014, vol. 343, n° 6166, p. 1235681.
[332] Royston JEFFERIS, « Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action », *Trends in Pharmacological Sciences*, juillet 2009, vol. 30, n° 7, pp. 356‑362.
[333] Zhiqiang AN, *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, 1 edition., Wiley, 2011.
[334] Janice M. REICHERT, « Antibodies to watch in 2014 », *mAbs*, 1 janvier 2014, vol. 6, n° 1, pp. 5‑14.
[335] Alain BECK, Thierry WURCH, Christian BAILLY et Nathalie CORVAIA, « Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies », *Nature Reviews. Immunology*, mai 2010, vol. 10, n° 5, pp. 345‑352.
[336] Michael HAY, David W. THOMAS, John L. CRAIGHEAD, Celia ECONOMIDES et Jesse ROSENTHAL, « Clinical development success rates for investigational drugs », *Nature Biotechnology*, 2014, vol. 32, n° 1, pp. 40‑51.
[337] Ole N. JENSEN, « Interpreting the protein language using proteomics », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, juin 2006, vol. 7, n° 6, pp. 391‑403.
[338] Harvey LODISH, Arnold BERK, S. Lawrence ZIPURSKY, Paul MATSUDAIRA, David BALTIMORE et James DARNELL, « Folding, Modification, and Degradation of Proteins », 2000 (URL complète en bibliographie, consulté le 29 mai 2014).
[339] Dmitrij HRISTODOROV, Rainer FISCHER et Lars LINDEN, « With or without sugar? (A)glycosylation of therapeutic antibodies », *Molecular biotechnology*, juillet 2013, vol. 54, n° 3, pp. 1056‑1068.
[340] « Folding, Modification, and Degradation of Proteins - Molecular Cell Biology - NCBI Bookshelf ».
[341] Ole N. JENSEN, « Interpreting the protein language using proteomics », *op. cit.*
[342] Santosh G. VALEJA, Nathan K. KAISER, Feng XIAN, Christopher L. HENDRICKSON, Jason C. ROUSE et Alan G. MARSHALL, « Unit mass baseline resolution for an intact 148 kDa therapeutic monoclonal antibody by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry », *Analytical Chemistry*, 15 novembre 2011, vol. 83, n° 22, pp. 8391‑8395.
[343] Anton V. MANUILOV, Czeslaw H. RADZIEJEWSKI et David H. LEE, « Comparability analysis of protein therapeutics by bottom-up LC-MS with stable isotope-tagged reference standards », *mAbs*, août 2011, vol. 3, n° 4, pp. 387‑395.
[344] Elsa WAGNER-ROUSSET, Audrey BEDNARCZYK, Marie-Claire BUSSAT, Olivier COLAS, Nathalie CORVAÏA, Christine SCHAEFFER, Alain VAN DORSSELAER et Alain BECK, « The way forward, enhanced characterization of therapeutic antibody glycosylation: comparison of three level mass spectrometry-based strategies », *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1 septembre 2008, vol. 872, n° 1-2, pp. 23‑37.
[345] Igor A. KALTASHOV, Cedric E. BOBST, Rinat R. ABZALIMOV, Guanbo WANG, Burcu BAYKAL et Shunhai WANG, « Advances and challenges in analytical characterization of biotechnology products: mass spectrometry-based approaches to study properties and behavior of protein therapeutics », *Biotechnology Advances*, février 2012, vol. 30, n° 1, pp. 210‑222.
[346] Juan Carlos ALMAGRO, Gopalan RAGHUNATHAN, Eric BEIL, Dariusz J. JANECKI, Qiang CHEN, Thai DINH, Ann LACOMBE, Judy CONNOR, Mark WARE, Paul H. KIM, Ronald V. SWANSON et Johan FRANSSON, « Characterization of a high-affinity human antibody with a disulfide bridge in the third complementarity-determining region of the heavy chain », *Journal of Molecular Recognition*, 1 mars 2012, vol. 25, n° 3, pp. 125‑135.
[347] Sara ROSATI, Ewald T. J. VAN DEN BREMER, Janine SCHUURMAN, Paul W. H. I. PARREN, Johannis P. KAMERLING et Albert J. R. HECK, « In-depth qualitative and quantitative analysis of composite glycosylation profiles and other micro-heterogeneity on intact monoclonal antibodies by high-resolution native mass spectrometry using a modified Orbitrap », *mAbs*, décembre 2013, vol. 5, n° 6, pp. 917‑924.

[348] Natalie J. THOMPSON, Sara ROSATI, Rebecca J. ROSE et Albert J. R. HECK, « The impact of mass spectrometry on the study of intact antibodies: from post-translational modifications to structural analysis », *Chemical Communications*, 12 décembre 2012, vol. 49, n° 6, pp. 538‑548.

[349] Hao ZHANG, Weidong CUI et Michael L. GROSS, « Mass spectrometry for the biophysical characterization of therapeutic monoclonal antibodies », *FEBS Letters*, 21 janvier 2014, vol. 588, n° 2, pp. 308‑317.

[350] Szabolcs FEKETE, Anne-Laure GASSNER, Serge RUDAZ, Julie SCHAPPLER et Davy GUILLARME, « Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, janvier 2013, vol. 42, pp. 74‑83.

[351] Armando J CORDOBA, Bao-Jen SHYONG, Deirdre BREEN et Reed J HARRIS, « Non-enzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution », *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 25 avril 2005, vol. 818, n° 2, pp. 115‑121.

[352] Glen TESHIMA, Ming-Xiang LI, Rahima DANISHMAND, Chidi OBI, Robert TO, Carol HUANG, Jacob KUNG, Vafa LAHIDJI, Joel FREEBERG, Lauren THORNER et Milan TOMIC, « Separation of oxidized variants of a monoclonal antibody by anion-exchange », *Journal of Chromatography A*, avril 2011, vol. 1218, n° 15, pp. 2091‑2097.

[353] Kenneth R. WILLIAMS et Kathryn L. STONE, « Enzymatic cleavage and HPLC peptide mapping of proteins », *Molecular Biotechnology*, 1 octobre 1997, vol. 8, n° 2, pp. 155‑167.

[354] Hao ZHANG, Weidong CUI et Michael L. GROSS, « Mass spectrometry for the biophysical characterization of therapeutic monoclonal antibodies », *op. cit.*

CHAPITRE II : Analyse d'Anticorps Monoclonaux à l'aide d'un Nouveau Couplage CE-UV/MALDI-MS.

1. Introduction.

Les protéines et les peptides jouent un rôle primordial dans les voies de régulation biologiques. Ces dernières années, la caractérisation de ce type de biomolécules représente un des plus grands défis dans de nombreux domaines de recherche tels que la biologie ou la pharmacie. Depuis 1986, et l'approbation du Murumomab-CD3 par la « Food and Drug Administration » (FDA), les anticorps monoclonaux (mAbs) ont pris une part majeur sur le marché des produits développés par l'industrie biopharmaceutique. Ce type de composés, en constante croissance en termes de développement, sont particulièrement intéressant car ils présentent des propriétés thérapeutiques favorables aussi bien d'un point de vue pharmacocinétique que pharmacodynamique et peuvent de plus permettre la réduction d'effets secondaires. Les mAbs sont des glycoprotéines très complexes présentant potentiellement de nombreuses micro-hétérogénéités naturelles. Le besoin constant de caractérisations fines, précises et rapides pour cette famille de protéines est un défi permanant pour les méthodes d'analyse.

Aujourd'hui, la méthode de choix pour l'identification et la caractérisation de protéines est la MS généralement couplée avec une méthode séparative comme l'HPLC ou de l'électrophorèse en gel. Techniquement, la facilité de mise en œuvre de l'HPLC/MS ajouté à la grande robustesse du système fait de ce couplage une référence en termes de caractérisation protéique. Cependant, une méthode ne permet pas de répondre aux besoins infinis d'une telle caractérisation. Une alternative majeure au couplage HPLC/MS est l'utilisation de la CE en tant que méthode séparative en remplacement de l'HPLC. La CE est une méthode électrophorétique en veine liquide permettant de réaliser des séparations rapides, de très hautes efficacités et hautes résolutions. Cependant, les propriétés intrinsèques de la CE comme des électrolytes supports (BGE) de fortes forces ioniques ainsi que la nécessité de maintenir le courant tout au long de la séparation, font du couplage CE/MS un système compliqué à mettre en place. En effet, le détecteur MS est très sensible à la présence de sels qui peut provoquer des phénomènes de suppressions d'ions. Néanmoins, malgré ces aspects techniques, la

CE/MS apparaît comme un couplage très attrayant permettant de réaliser des avancées significatives dans de nombreux domaines de recherche tels que la protéomique et la caractérisation de protéines entières.

Depuis la fin des années 1980, un grand nombre d'interfaces CE/MS ont été développées. Dû à son caractère direct, c'est-à-dire intégré à la source MS, le couplage CE/ESI-MS a été fortement implanté. Afin de permettre le maintien du courant tout au long de la séparation, trois types d'interfaces basées sur des principes différents ont été décrits : l'interface coaxiale à liquide additionnel dite « Sheath liquid », l'interface à jonction liquide dite « Junction liquid » et l'interfaces sans liquide additionnel dite « Sheathless ». Cependant, l'une des limites majeures du couplage CE/ESI-MS est que la nature du BGE (présence de sel, volatilité) peut affecter fortement la stabilité du spray et donc limiter le nombre de milieu de séparations compatibles avec l'ESI-MS. La source MALDI est une technologie MS qui présente une meilleure tolérance en présence de sels ou de détergents. Le couplage CE/MALDI-MS représente donc une alternative intéressante au couplage CE/ESI-MS. Tout comme le couplage avec l'ESI, une grande variété d'interfaces ont été développées. Concernant les procédés permettant de maintenir le courant au long de la séparation, la quasi-totalité des interfaces reprennent les principes physiques du couplage de la CE avec une source ESI, à savoir l'utilisation d'un liquide additionnel coaxial, la jonction liquide ou l'utilisation d'un capillaire conducteur. En ce qui concerne la réalisation de dépôt solide, principe fondamentale du MALDI, cet impératif a conduit au développement de deux types de couplage distincts : le couplage direct avec un dépôt à l'intérieur de la source suivi d'une étape de cristallisation intégrée et le couplage indirect avec une étape de dépôt sur cible hors de la source et une étape de passage manuelle ou automatisé de la cible dans la source. Quelques équipes de recherche ont réalisé le couplage direct en faisant un lourd développement instrumental, notamment en modifiant la source MALDI. Ce paramètre n'a pas aidé au développement de ce type de couplage. Parallèlement au couplage direct, le couplage indirect a été réalisé. Cette stratégie, plus facile à mettre en œuvre, ne fait pas intervenir de modifications instrumentales sur le MALDI-MS. De plus, le caractère indirect ouvre de nouvelles voies dans le domaine du traitement de l'échantillon. En effet, le fait de fractionner l'échantillon permet de le retraiter (enrichissement, digestion enzymatique, dérivation chimique…) indépendamment avant analyse MALDI ou même de le déposer sur différent supports : plaque ELISA, capillaire creux, membrane greffée ou cible MALDI. Cependant, malgré le fait que la quasi-totalité des interfaces CE/MALDI-MS aient été évaluées en termes de d'efficacité et de robustesse, aucune d'entre elles n'est automatisable et commercialisée ce qui rend ce couplage

confidentiel par rapport au couplage LC/MS. Malgré cela, un grand nombre de publications ont été recensées montrant l'intérêt grandissant pour ce couplage particulièrement pour l'étude de protéines entières ou digérées.

Dans ce travail, nous avons développé le premier couplage CE-UV/MALDI-MS/MS avec système de dépôt de matrice totalement automatisé. En effet, plusieurs évolutions ont été réalisées pour rendre ce couplage robuste, autonome et polyvalent (ANNEXE 1). Pour ce faire, nous nous sommes basés sur la modification de deux systèmes commerciaux. Afin de contrôler la séparation électrophorétique, la cellule UV originelle de l'appareil de CE a été déportée pour permettre simultanément la détection UV et la collection de fraction. Ceci permet d'éviter l'ajout d'un spectrophotomètre UV externe. De plus, basé sur la propriété de l'appareil de CE à permettre l'application simultanée d'une différence de potentiel et de pression et dans le but de développer un système permettant de déposer la matrice directement après le dépôt de l'échantillon, une modification de la cartouche CE a été optimisée afin de rendre le couplage universel en termes de mode de dépôt MALDI. Ainsi, la séparation, le suivi UV, la collecte de fraction et l'adjonction de matrice sont automatisés et pilotés par seulement deux logiciels. Le caractère polyvalent du système est conféré par la possibilité de déposer sur tout type de support et d'élaborer tout type de dépôt quel que soit la stratégie analytique.

Dans un premier temps, les performances du système ont été évaluées avec la séparation d'un mélange de 5 protéines entières. Les résultats obtenus montrent la haute résolution et la grande répétabilité de séparation conservés en utilisant le couplage CE-UV/MALDI-MS. Dans un second temps, le système a été évalué sur un digestat trypsique de 9 protéines. Un grand nombre de peptides ont été identifiés à l'aide des spectres MS/MS permettant la caractérisation des protéines avec une couverture de séquence > 60%. Une comparaison avec le couplage référence HPLC/MS a été réalisé sur l'approche de peptide mapping. Cela a permis de montré une très grande complémentarité entre les deux approches. Enfin, dans le but de confirmer les performances du système pour la séparation de protéines entières de haut poids moléculaire, l'application à la séparation de mAbs intacts et digérés a été réalisée à l'aide du couplage CE-UV/MALDI-MS. Ce travail représente la première analyse de mAb intactes à l'aide d'un couplage de la CE avec une détection MS. Concernant l'étude du digestat trypsique de mAb, l'étude a permis d'obtenir la quasi-totalité de la couverture de séquence ainsi que la caractérisation de plusieurs formes glycosylées en une seule analyse.

2. Article

Analysis of monoclonal antibody by a novel CE-UV/MALDI-MS interface

Michael Biacchi[1], Ricky Bhajun[1], Nassur Saïd[1], Alain Beck[2], Yannis Nicolas François[1] and Emmanuelle Leize-Wagner[1]

*Electrophoresis***2014**, online available

1 Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes (LSMIS), CNRS – UMR 7140, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

2 Centre d'immunologie Pierre Fabre; Saint-Julien-en-Genevois, France

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (mAb) are highly complex proteins that advertise a wide range of microheterogeneity that requires multiple analytical methods for full structure assessment and quality control. As a consequence, the characterization of mAbs on different levels is particularly product - and time - consuming. Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry (CE-MS) couplings, especially to matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) appear really attractive methods for the characterization of biological samples. In this work, we report on the last instrumental development and performance of the first totally automated off-line CE-UV/MALDI-MS/MS. This interface is based on the removal of the original UV cell of the CE apparatus, the modification of the spotting device geometry and the creation of an integrated delivery matrix system. The performance of the method was evaluated with separations of 5intact proteins and a tryptic digest mixture of 9 proteins. Intact proteins application shows the acquisition of electropherograms with high resolution and high repeatability. In the peptide mapping approach, a total number of 154 unique identified peptides were characterized using MS/MS spectra corresponding to average sequence coverage of 64.1%. Comparison with NanoLC/MALDI-MS/MS showed complementarity at the peptide level with an increase by 42% when using CE/MALDI-MS coupling. Finally, this work represents the first analysis of intact mAb charge variants by capillary zone electrophoresis using a MS detection. Moreover, using a peptide mapping approach CE-UV/MALDI-MS/MS fragmentation allowed 100% sequence coverage of the light chain and 92 % on the heavy chain and the separation of the 4 major glycosylated peptides and their structural characterization.

1 Introduction

The characterization of complex protein and peptide mixtures represents one of the biggest challenge in many research fields such as biological [1-3]or biopharmaceutical sciences [4-5].Since 1986 and the approbation of Muromonab-CD3 by the Food and Drug Administration (FDA), monoclonal antibodies (mAbs) have taken a major market share in the pharmaceutical industry and their development is constantly increasing [6-7]. mAbs are particularly interesting because they have good therapeutic efficiency, favorable pharmacokinetic and pharmacodynamics, and lead to reduction of side-effects [8]. mAbs are highly complex glycoproteins potentially displaying many naturally-occurring molecular micro-heterogeneities combined with imperfect processing. There is a continuous need for analytical methods improvement to be ultimately able to provide a fast and accurate characterization. Today, the method of choice for the identification of proteins and peptides is the mass spectrometry(MS) [9] generally coupled with separation techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC) or gel electrophoresis. Technically, HPLC-MS is the most widely used coupling thanks to its high reproducibility and its great resolution but also especially for the relative ease of coupling with a fraction collector device or directly in the source of a mass spectrometer. As an alternative to HPLC, capillary electrophoresis (CE) has been demonstrated to be a useful and powerful separation method for the characterization of charged and neutral molecules [10-12]. Advantages of CE are fast separation, high efficiency and high resolution. However, properties of CE such as an ultralow flow rate, a background electrolyte (BGE) that can be highly salted, and the necessity of maintaining the electric field during the separation make the CE-MS coupling more difficult to implement [13-14]. Nevertheless, despite these technical aspects, the hyphenation of CE to MS appears as a very attractive coupling allowing to perform significant advances in many research areas such as proteomics [15-16], metabolomics [17] and intact proteins characterization [18-19]. Since the end of the 80s, a large number of CE-MS interfaces has been developed. Due to the direct coupling property, most innovation have been realized on the coupling between CE and electrospray ionization (ESI) [20] by sheath-flow [21-22], liquid-junction [23-24], or sheathless [25-26] interfaces. However, the nature of the BGE (presence of salts, volatility) can affect the stability of the spray and then limits the number of BGE which does not prevent the performances of MS. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight MS (MALDI-TOF-MS) is a MS technology which presents a greater tolerance to the presence of salts or surfactants [22]. Moreover, hyphenation of electrophoretic methods with MALDI-MS allows easily to detect in positive and negative modes in MS. Then, as an interesting alternative to CE/ESI-MS, a great number of CE/MALDI-MS interfaces have been developed [27-43]. The first strategy to hyphenate electrophoretic method with MALDI-MS has consisted to develop on-line interface [30-32].However, because of sample is first dried on a solid surface before insertion into the MALDI source, heavy instrumental development appeared as one of the most significant issue for the implementation of this interface. The second option consisted to promote the off-line coupling using CE collection fractions on a MALDI plate. This strategy opens the way to sample treatment

directly on the plate such as enzymatic digestion [44] or enrichment [45]. Concerning the deposit process, majority of the existing interfaces used a T-junction with sheath-flow [33-39]. More recently sheathless interfaces have been developed. In 2008, Wang et al. have realized an interface based on the use of a junction liquid which allows to eliminate the addition of the sheath liquid [42]. In 2009, Busnel et al. have designed an iontophoretic fraction collection approach to avoid the sheath-flow and the possible suction effect [43]. However, one of the interface drawbacks is having to fill little reservoir on the plate before deposit process. This prevents automation and high-throughput analysis. Concerning fraction collection devices, only one commercial system is compatible with CE/MALDI-MS [37]. However, this interface is originally designed for HPLC/MALDI-MS coupling and presents some geometry drawbacks for CE/MALDI-MS such as the minimum length of the capillary. At the same time, homemade robotic systems have been developed, such as electrospray [40] or inkjet spotting [41]. Meanwhile, since 2001 interfaces between MALDI-MS and micro fluidic devices have been developed [46]. The easiest strategy was reported to carry out CE separation in an open channel, where the separated analytes were directly ionized from the open channel to a mass spectrometer [47-48]. However, the open channel was filled by gel to suppress electroosmotic flow (EOF) and reduce analyte dispersion after the CE separation. In that case, only capillary gel electrophoresis is applicable. Then this strategy is not possible to regular free-solution CE modes including CZE.

The efficiency and the robustness of these interfaces have been reported, but none of these systems allows the automation. Most off-line CE/MALDI-MS coupling do not possess a second detection systems to control the separation. Few interfaces used an additional external UV system which made the methodology more expensive and made difficult the automation with the development of synchronized software [35-36].

In this work we have developed the first totally automated off-line CE-UV/MALDI-MS/MS with integrated delivery matrix system. Based on different homemade modifications performed on a commercial CE device and a fraction collection system, we introduced a totally automated approach to make protein separation and peptide mapping strategy. In order to control the CE separation, the original UV cell of the CE apparatus was deported to allow the simultaneous UV detection and fraction collection without external UV system. Modification of the spotting device geometry allowed to reduce the total capillary length. Based on the properties of the CE apparatus to apply simultaneously a pressure and a power supply, and the modification on the external cartridge, an integrated homemade delivery matrix system was developed to be universally compatible in terms of MALDI deposition types. The performance of the method was evaluated with the separations of five intact proteins and a tryptic digest mixture of nine proteins. Finally, in order to confirm the performances of the system for the characterization of mAbs, application to the separation of intact mAb and bottom up approach have been realized using the CE-UV/MALDI-MS interface.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and Materials. All chemicals used were of analytical grade or high purity grade and purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Water used to prepare buffers and sample solutions was obtained using an ELGA purelab UHQ PS water purification system (Bucks, UK). Cytochrome c (Cyt c), ribonuclease A ((RNase A), α-lactalbumin (αLac), insulin (Ins), myoglobin (Myo), bovine serum albumin (BSA), lysozyme (Lys), β-Casein (βCas), carbonic anhydrase II (CAII) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Trypsin (modified, sequencing grade) was purchased from Promega AG (Dübendorf, Switzerland).

2.2 Standard protein mixtures. For intact protein study, a standard protein solution of αLac (14.2kDa), RNase A (13.6kDa), Cyt c (12.3 kDa), Lys (14.3 kDa) and Myo (16.9 kDa) were prepared in Water at 120nM, 50nM, 40 nM, 40nM and 50nMrespectively.

2.3 Tryptic digestion procedure. Tryptic digests of protein solution were prepared using sequence-grade trypsin (1:10 w/w). Before digestion, each protein was diluted to a concentration of 3µM in 1% formic acid. Dithiothreitol (DTT) was then added to the protein solution at a final concentration of 10 mM.The mixture was incubated for 5 minutes at 95°C, then cooled to ambient temperature. Then, Iodoacetamide (IAM) 100 mM was added at a final concentration of 20 mMand the mixture was placed in the dark for 20 minutes. 10 µL of trypsin was added and the mixture was incubated at room temperature for 3 hours; additional 10 µL of trypsin were added to the sample for overnight digestion at room temperature. This solution was then analyzed directly by CE/MALDI-MS without any further purification step. Amounts of protein tryptic digests with 300 fmol of each proteins were injected.

2.4 Capillary Electrophoresis. The CE experiments were carried out on a P/ACE MDQ^{TM}CE system from Beckman Coulter (Brea, CA) equipped with a temperature controlled autosampler and a power supply able to deliver up to 30 kV. A 32 Karat^{TM} (Beckman Coulter, Brea, CA) was used for instrument control, data acquisition and data handling. Polymicro bare fused-silica capillaries of 50 µm i.d. were obtained from Photonlines (St-Germain-en-Laye, France). Concerning modified capillaries, capillaries were coated in laboratory with hydroxypropylcellulose (HPC) following the protocol described by Shen *et al*. [49]. For model protein separation, 83.3mM ionic strength ammonium acetate (pH 4.0) has been used as BGE. Samples were introduced into the capillary by electrokinetic injections (3 kV, 8 min), and the separation of proteins was performed by applying 20 kV across the capillary. For intact mAbs separation, 400 mM ε-Amino-caproic acid (EACA)-acetic acid, 0.05% m/v, pH 5.7 has been used as BGE. For peptide mapping approach, solution of 1% formic acid and ammonium acetate (pH 9.3, 935 m Mionic strength) were used in CE as background electrolyte (BGE) and

leading electrolyte (LE), respectively [50]. Except for the model proteins separation, injection volumes have been calculated using CEToolbox application (Pansanel, Google Play).

2.5 Nano-HPLC. Protein digests were analyzed using an UltiMate 3000 nano-HPLC system (Dionex, Germering, Germany) coupled to a Proteineer FC (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A Pepmap100 C18 column (Dionex, Germering, Germany) was used. The gradient (solvent A, 0.1% trifluofoacetic acid (TFA); solvent B, 0.1% TFA in 80% acetonitrile) was as follows: 0-4 min, 4% B; 4-32 min, 4-55% B; 32-34 min, 55-90% B; 34-40 min 90% B; 40-45 min, 90-4% B; 45-65 min, 4% B. A flow rate of 300nL/min was applied. The sample injection volume was 1 µL.

2.6 CE/MALDI-MS Interface. Automated off-line coupling of CE to MALDI-MS was performed by using a homemade modified automatic spotting device, Proteineer FC (BrukerDaltonics, Bremen, Germany) for the sheath flow-assisted spotting from the CE capillary end onto a MALDI target. The capillary outlet was positioned inside a fixed steel needle, being a modified part of a robotic *x-y-z* axis motion system. The original set-up delivered from Bruker Daltonics was modified by us in order to reduce the distance between CE output and the MALDI target. This change has consisted to shift the original steel needle close to CE output and has reduced the minimum total capillary length from110cm to 60cm. At the upper end of the needle a cross connection was fitted. On one side of the cross, the sheath liquid, which is the separation BGE, was supplied by means of the syringe-pump included in the Proteineer FC (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and on the other side, the ground was connected. The steel needle functioned as an electrode for the CE and the current was maintained by a liquid junction between the steel needle and the end of the capillary(Fig. 1). During CE separation, the emerging droplet of CE effluent and sheath liquid made contact with the MALDI target. The original set up of the UV cell in the P/ACE MDQ^{TM}(Beckman Coulter, Brea, CA) was modified in order to allow the simultaneous UV detection near the outlet of the capillary and fraction collection (Fig. 1). A homemade UV-window compatible with P/ACE MDQ system (Beckman Coulter, Brea, CA) was mounted at the upper of the cross connection. Using three optical fibers with one couple connected in pairs, UV-detection was deported out of the CE instrument without instrumental modification and without additional UV spectrometer. Therefore, for CE with fraction collection, a capillary with the UV detection window positioned 10 cm from the CE capillary end was used.

In order to be universally compatible in terms of MALDI deposition types, a homemade delivery matrix system was developed to add the matrix just after sample deposition allowing dried droplet fraction collection directly onto the MALDI target. The matrix interface consisted of a second steel needle surrounding the matrix capillary (100cm total length, 100µm i.d.) in the form of a coaxial tube. Matrix capillary end was placed at a distance of 5 millimeters from CE capillary end corresponding to the distance between two consecutive spots of a MALDI target provided by Bruker Daltonics. To avoid the use of an additional syringe pump to deposit the matrix, a

modification was made on the external cartridge delivered by Beckman Coulter. The external extremity of the cartridge was pierced to allow the setup of a second capillary. Separation and matrix capillaries were then placed in the external cartridge and positioned in the CE inlet for matrix capillary and the CE outlet for separation capillary. Properties of P/ACE MDQ^{TM}(Beckman Coulter, Brea, CA) allowing to applied at the same time a pressure and a power supply allowed performing simultaneously CE separation while delivery matrix. The interface is also compatible with a thin layer deposition types. In that case, matrix capillary was removed.Hystar 3.2 (BrukerDaltonics, Bremen, Germany) was used for Proteineer FC control.

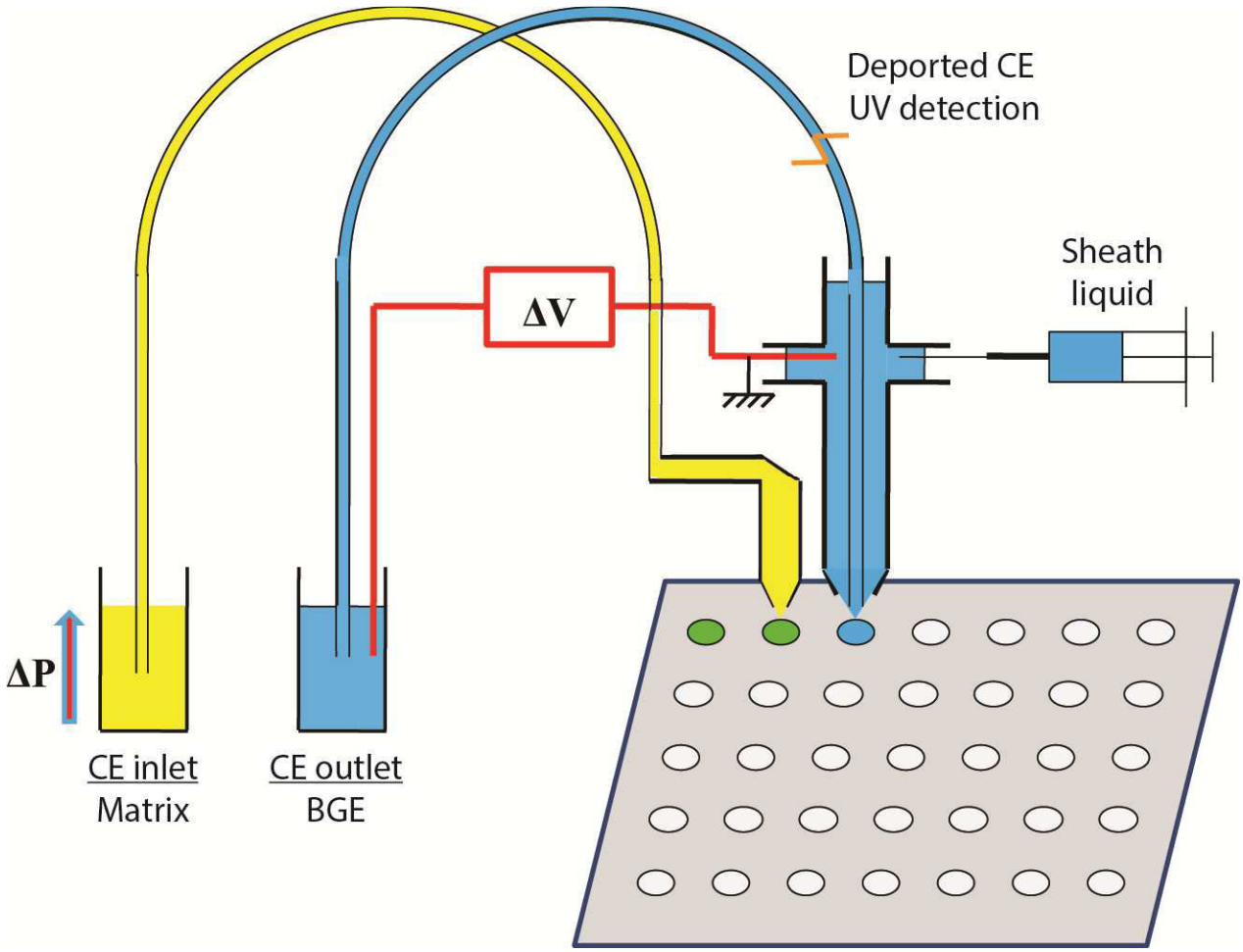


Figure 1. Schematic representation of the experimental set up of the CE-UV/MALDI-MS interface including the deported UV detection and the integrated delivery matrix system.

2.7 MALDI-TOF-MS and MALDI-TOF-TOF MS/MS. For intact protein and intact mAb separations, the matrix was prepared by dissolving 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (2g.L^{-1}) in 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile (TFA/ACN) (50/50). Fraction collection fraction was realized using Ground Steel MALDI target (Bruker Daltonics, Bremen,

Germany). For peptide mapping approach, α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)(5g/L) matrix was prepared following the classical AnchorChip protocol provided by Bruker Daltonics. Fraction collection was realized using AnchorChip MALDI target (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). When the samples were directly collected on a MALDI target with 0.6µL sheath liquid, 0.6 µL of the matrix solution were automatically deposited on the same spot.

Mass spectra of the CE fractions were recorded using an Autoflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), operating in reflector mode and with Flex Control software. Positively charged ions were detected and sums of 1500 single-shot spectra were acquired automatically from each sample by using the AutoXecute software. For peptide mapping study WarpLC 1.2 software was used. Data processing was performed with Flex Analysis 3.0 and Biotools 3.2 provided by the mass spectrometer manufacturer. All spectra were calibrated according an external calibration using Protein calibration standard I (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for intact protein separation and Peptide calibration standard II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for peptide mapping study. Data obtained from CE-MALDI-MS/MS experiments were processed using Mascot search algorithm developed by Matrix Science (Boston, MA, USA).

3 Results and discussion

3.1 Evaluation of the CE-UV/MALDI-MS interface.

CE-UV/MALDI-MS interface has been evaluated in terms of repeatability and robustness following the optimized separation conditions described by the team of Prof. Girault [51]. As a first step, we have evaluated the external UV detection (Fig. 1)by studying the repeatability in terms of migration time, peak area and resolution, of a standard protein separation in CE/MALDI-MS configuration. This is a significant parameter to determine if the developed system is adapted to CE collection. Indeed, especially for the coupling between CE and MALDI-MS, the off-line nature requires a second detection system to control the separation and then to approve the fraction collection. Moreover, an electropherograms obtained with the external UV detection as a control allowed optimizing the spotting process in terms of deposit window and deposit time interval. A neutral coated capillary has been used with a standard protein mixture, containing αLac, RNase A, Cyt c, Lys and Myo at 120nM, 40nM, 50 nM, 50nM and 40nM respectively. Samples were introduced into the capillary by electrokinetic injections (3 kV, 8 min), and the separation of proteins was performed by applying 20 kV across the capillary. No fraction collection has been made (Fig. 2a); CE capillary tip was positioned in the external BGE vial placed on the Proteineer FC (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). In order to avoid Joule heating effect during the separation, the length of the cartridge tubing was optimized to perform thermostated capillary until the UV cell. The UV detection window is located at 10 cm from the outlet when the total length of the capillary is 60 cm. In term of migration time, peak area and resolution, obtained RSD (n=4) are less than 0.5%, 2.5% and

3% respectively. In addition, we have calculated signal-to-noise ratio ranging from 6 to 52. These results confirm that the externalization of the UV detection allows acquiring electropherograms with good quality, high repeatability and a good robustness. In addition this confirms the good stability of the HPC coating during the separation. Information concerning migration times allows defining the window of fraction collection, and assessing time interval for each deposit. These results confirm the possibility of obtaining CE-UV/MALDI-MS coupling without heavy instrumental development and without using an additional external UV detector. In addition, due to the use of single software to control CE apparatus, this UV modification contributes to strengthening the totally automated aspect of the coupling.

As a second step, in order to evaluate the impact of the spotting process on the separation, we have studied with the external UV detection the evolution of resolution and efficiency of the same standard protein mixture separation with fraction collection. For direct deposit on a MALDI plate, fraction collection window has been defined between 15 and 36 minutes and a spotting time interval of 30 s has been chosen.

To prove the automated spotting process, Fig. 2 shows the UV electropherograms with (Fig.2b) and without (Fig. 2a) fraction collection and in the case of collection the representation of the experimental fraction using MS spectra of each spotting position.

Concerning the deposition process, UV electropherogram (Fig.2b) shows a preservation of the resolution and efficiency as compared to the separation without fraction collection (Fig. 2a). The steel needle served as outlet electrode for the CZE. Liquid junction between steel needle and capillary tip maintained electrical current. Then, even if the steel needle moves on the *z* axis to reposition the capillary tip from a spotting position to the next, no current breakdown takes place throughout the separation and then electro migration never stops during the analysis. The localization of each protein, represented in the Fig. 2c, shows a time shift between the UV detection and the spotting process. This is totally in agreement by the fact that UV detection is located at 10 cm from the capillary outlet. Moreover, offsets in time, between 1 minute for Cyt c and 4-5 minutes for αLac, can be explained by the difference of protein effective mobilities described by the equation:

$$\mu_{eff} = \frac{L\, l}{t\, V}$$

with μ_{eff} the effective mobilities, L and l the total capillary length and length to detection window, respectively, V the applied voltage and t the migration time.

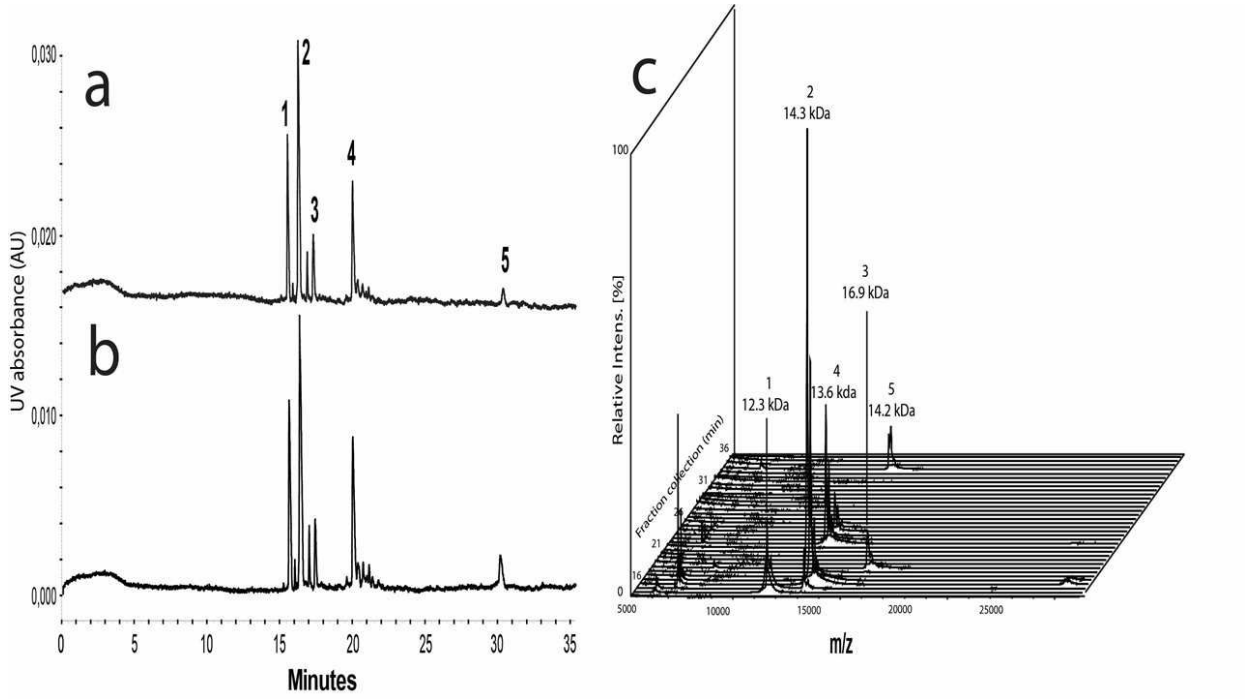


Figure 2. UV Electropherogram without (a) and with fraction collection (b) and the corresponding MS spectra of each fraction (c) of a five protein sample by CE-UV/MALDI-MS. Experimental conditions: HPC coated capillary, 50 µm d.i. x 60 cm (detection cell, 60 cm); BGE: 83.3mM ionic strength ammonium acetate (pH 4.0); Voltage: 20 kV; Temperature: 25°C; UV Detection: 200 nm; Injection: 3 kV, 8 min; Sample: (1) 40 nMCyt c, (2) 40 nM Lys, (3) 50 nMMyo, (4) 50 nMRNase A and (5) 120 nM αLac in water, MS Experimental conditions: See Experimental.

For example for RNase A, a time shift of 3 min between detection time (20 min) and spotting time (23 min) correspond to a value of µeff = $12.9.10^{-5}$ cm^2. $V^{-1}.s^{-1}$.Good agreement between time shift values and effective mobilities showed that the interface does not induce any significant suction effect. This confirms the use of a sheath liquid junction. Under these experimental conditions, it appears that the automated interface supports intact protein separations. In addition, flexibility of spotting parameters (spotting interval, sheath liquid flow rate…) combine with UV control electropherograms allow high possibility of optimization as function of the sample complexity.

3.2 Evaluation of the CE-UV/MALDI-MS/MS for peptide mapping approach

Peptide mapping is essential for the characterization of a complex mixture of digested proteins. In comparison to peptide mass fingerprinting (PMF), MS/MS peptide identification is not only based on digested peptide m/z ratio measure, but also on the fragmentation of those peptides, increasing the confidence of the identification. WarpLC1.2 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) is a software initially dedicated to perform peptide mapping strategy using off-line coupling between HPLC and MALDI-MS/MS. This software is fully compatible and could be easily adapted to the CE-UV/MALDI-MS/MS approach. Due to the complexity of biological samples, a low carry over may involve the presence of the same m/z ratio in two or three adjacent spots. In that case, the software selects the spot with the most intense m/z parent ion to perform MS/MS. After MS/MS spectra acquisition, WarpLC1.2 proceeds to the exclusion of the same m/z parent ion present in the adjacent spots. The software allows a drastic reduction in the possible redundant peptides and improves the number of selected m/z ratios which increase the number of possible unique peptides.

To further characterize the fraction collection interface, 100 nL of a peptide mixture sample containing the tryptic digests of βCas, RNase A, CAII, BSA, Lys, Ins, Cyt c, αLac and Myo (each at 3 µM) has been analyzed. Amounts of protein tryptic digests with300 fmol of each proteins were injected. In this study, a neutral coated capillary has been used and a transient isotachophoresis (t-ITP) preconcentration step has been implemented. For its compatibility with MALDI-MS, we used ammonium acetate (pH 9.3; 935mM ionic strength) as the leading electrolyte (LE) as in the Busnel et al. study[50]. Prior to the sample injection, a short zone of LE has been injected to allow t-ITP phenomena. A first separation without collection fraction allowed with UV electropherogram to fix the spotting parameters. At the beginning of the separation, for 25 minutes, the capillary tip was positioned in the external BGE vial placed on the Proteineer FC (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

	CE-UV/MALDI-MS/MS		NanoLC/MALDI-MS/MS		Direct MALDI-MS		Combination of the three deposition modes	
	identified peptides	Sequencecoverage (%)	identified peptides	Sequencecoverage (%)	identified peptides	Sequencecoverage (%)	identified peptides	Sequencecoverage (%)
βCas	3	22.3	4	20.5	3	14.7	7	34.4
CAII	20	58.8	11	34.2	5	37.7	28	59.6
Cyt C	13	58.1	7	43.8	1	10.5	16	74.3
αLac	9	40.8	12	51.4	1	7.0	18	53.5
Lys	28	79.6	24	83.0	12	58.5	41	85.7
BSA	55	73.0	68	77.3	13	23.6	113	90.1
Myo	15	85.1	6	44.2	0	0	19	85.1
Ins	1	58.8	4	100	2	43.1	5	100
RNase A	10	100	25	93.5	8	54.4	32	100
	Total of id. pep.	**AverageSeq. Cov. (%)**	**Total of id. pep.**	**AverageSeq. Cov. (%)**	**Total of id. pep.**	**AverageSeq. Cov. (%)**	**Total of id. pep.**	**AverageSeq. Cov. (%)**
	154	64.1	161	60.8	45	27.7	279	75.9

Table 1. Number of Unique Identified Peptides and Sequence Coverage for a nine protein Tryptic digest using CE-UV/MALDI-MS-MS, NanoLC/MALDI-MS/MS, direct MALDI-MS and the combination of the three deposition modes. CE Experimental conditions: HPC coated capillary, 50 µm d.i. x 80 cm (detection cell, 70 cm); BGE: 1% formic acidacid, pH 2.1; Voltage: - 25 kV; Temperature: 25°C; UV Detection: 200 nm; Injection: 1 psi, 76 s (100nL injected); NanoLC and MS Experimental conditions; See Experimental; Sample: digests of βCas, RNase A, CAII, BSA, Lys, Ins, Cyt c, αLac and Myo

According to electropherogram, during this time no peptide has been detected by the UV. Fraction collection began after 25 minutes with spotting intervals of 30 s. In order to perform MS/MS, a dried droplet deposition protocol has been involved. Using the homemade delivery matrix system, CHCA matrix was placed in the inlet position of P/ACE MDQ^{TM} system (Beckman Coulter, Brea, CA) and delivered by a second capillary with a flow rate of 1.2 µL/min in accordance to deposit 0.6 µL per spot. To determinate the exact value of the pressure to perform 1.2 µL/min, we followed the protocol described by Gahoual *et al*[3]. The separation was stopped after 65 min. A total of 80 fractions have been collected.

In order to evaluate the strength of the present CE-UV/MALDI-MS/MS coupling, the same 9 proteins digest loading amounts (300 fmol of each protein) were applied for both NanoLC/MALDI-MS/MS and direct MALDI-MS.

For LC-MS/MS analysis, NanoLC coupled with the same spotting device was used. Sample were separated onto a reverse phase C18 analytical column for a 65 min gradient and deposited on the MALDI target with a 30s spotting intervals. Dried droplet deposition protocol has been performed in order to be similar to CE-MS/MS analysis. For direct MALDI-MS deposition, a 9 proteins mixture (each at 300 fmol) without separation process has been deposited in the same MALDI target using the same dried droplet protocol. Table 1 summarizes the number of unique identified peptides and the sequence coverage for each protein using CE-UV/MALDI-MS/MS, NanoLC/MALDI-MS/MS, direct MALDI-MS and the combination of the three deposition modes.

When the number of peptides identified with the three techniques is compared, CE-UV/MALDI-MS/MS and NanoLC/MALDI-MS/MS appeared to obtain identical performances and are superior to direct MALDI-MS. While the direct MALDI-MS analysis allowed the identification of 45 peptides, CE-MS/MS analysis and NanoLC-MS/MS analysis resulted respectively in the identification of a total number of 154 different peptides ranging from 1 (Ins) to 55 (BSA) corresponding to average sequence coverage of 64.1%, and in the identification of a total number of 161 different peptides ranging from 1 (Cytc) to 68 (BSA) corresponding to average sequence coverage of 60.8%, with a mass accuracy of 20 ppm in MS and 0.5 Da in MS/MS. These results confirmed the usefulness of integrating a separation step prior to MS analysis. The results of the combination of the three deposition modes (Table 1) show a significant improvement of the total number of identified peptides, and of the average sequence coverage. Furthermore, we represented the merger of peptides from CE-MS/MS, NanoLC-MS/MS and direct MALDI-MS analysis (Fig.3). Results from the Venn comparison clearly show that CE-UV/MALDI-MS/MS and NanoLC/MALDI-MS/MS were complementarity methods at the peptide level with an increaseof 42% in terms of unique identified peptides from 161 (NanoLC analysis only) to 276 (NanoLCand CE analysis). This complementarity also was useful for improvement of sequence coverage (Table 1). Using the combination of both NanoLC and CE analysis, we obtained an average sequence coverage of 75.9 % as compared to 60.8% for single NanoLC analysis. This represented an increase of 20% in terms of average sequence coverage. This resulted in more confident protein identification.

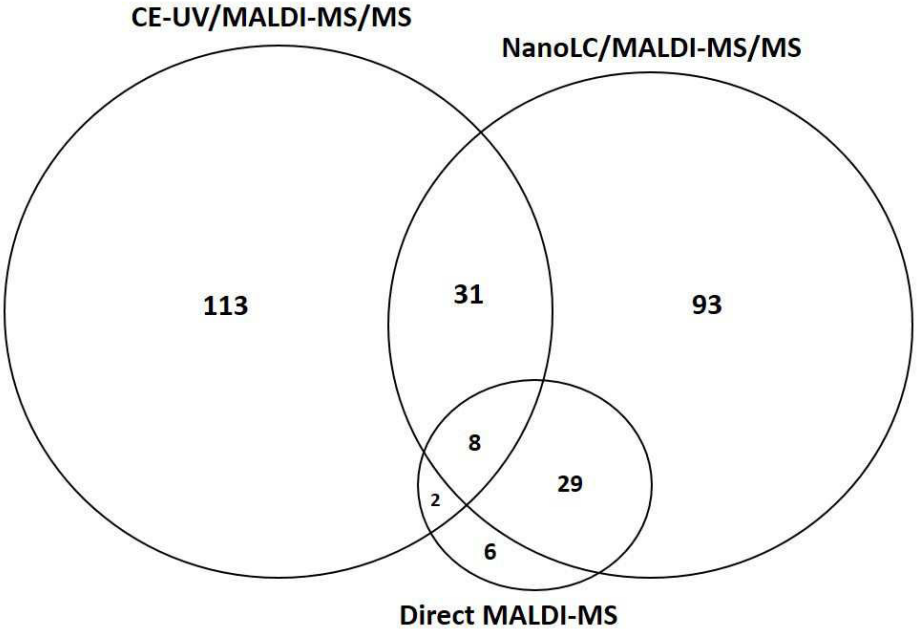


Figure 3. Venn comparisons representing the overlap of identified peptides by CE-UV/MALDI-MS/MS, NanoLC/MALDI-MS/MS and direct MALDI-MS. Data originate from Table 1.

Due to the ability of CE to separate a wide variety of peptides regardless of their chemical nature, these results unambiguously show the possibility of using CE-UV/MALDI-MS/MS to perform MS/MS peptide mapping characterization. Moreover, the automated setting up of a dried droplet deposition protocol which is essential in MALDI for MS/MS acquisition in the case of complex protein mixture, demonstrate the fully compatibility of the system for peptide mapping approach.

3.3 Analysis of mAb using CE-UV/MALDI-MS/MS.

mAbs are tetrameric glycoproteins having molecular mass of approximately 150 kDa. They are composed of two heavy chains (HC) and two light chains (LC) linked to each other by several disulfide bonds. This type of compounds presents a large number of micro heterogeneities commonly found in proteins such as PTMs including glycosylations and small chemical modifications [52]. In this work we performed the analysis of a model commercially marketed humanized mAb following two strategies: the separation of intact mAb and the peptide mapping approach both using CE-UV/MALDI-MS interface.

The use of capillary zone electrophoresis (CZE) as a tool for the analysis of charge heterogeneity of intact therapeutic mAbs was investigated by several groups [53-55]. However, due to the drastic condition in terms of salt concentration, no MS detection have been investigated. Indeed, CZE separation of intact proteins is highly affected by the pH and the ionic strength of the BGE. This represent a major drawback especially for the ESI-MS detection. Due to a greater tolerance to the presence of salts [22], MALDI-MS represent a good alternative. To

demonstrate the CE-UV/MALDI-MS/MS fraction collection approach, an intact model humanized mAb has been considered. These experiments have been performed following the optimized condition described by the group of Dr. Ruesch [53].BGE contained 400 mM EACA-acetic acid, 0.05% m/v, pH 5.7 has been used. He et al. demonstrated the influence of the pH and the EACA concentration on the mAb separation. As charge variants of mAbs have different acid-base dissociation constants but similar Stokes' radii, pH buffer has to be selected such that the analytes exhibit significant relative difference in charge, increasing relative difference in electrophoretic mobility. Concerning EACA concentration, they demonstrated that increasing EACA concentration may improve separation efficiency and resolution. To avoid any protein adsorption to the capillary wall, HPC neutral capillary coated has been performed [55].In addition, concentrated EACA buffer also was used to suppress protein adsorption to the capillary wall and to interact with residual silanol groups that are not covered by HPC [53]. According to electropherograms represented Fig.4a, tip was positioned in the external BGE vial placed on the Proteineer FC (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) for 45 min then fraction collection began with spotting intervals of 30 s. Fig.4b represent the reconstruction of the separation using MS spectra of each fractions.

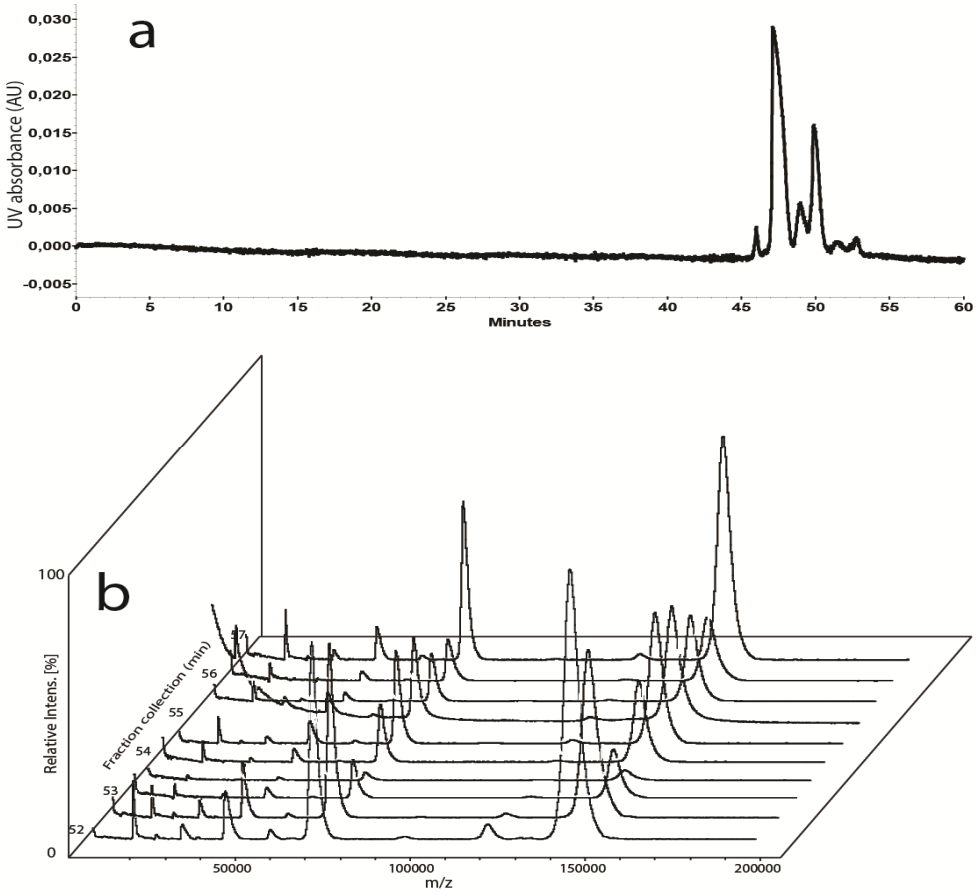


Figure 4.UV Electropherogram (a) and corresponding MS spectra of each fraction (b) of intact mAb charge variants by CE-UV/MALDI-MS.Experimental conditions: HPC coated capillary, 50 µm d.i. x 80 cm (detection cell, 70 cm); BGE: 400 mM EACA-acetic acid, 0.05% m/v, pH 5.7; Voltage: 30 kV; Temperature: 25°C; UV Detection: 200 nm; Injection: 2 psi, 30 s; Sample: mAb at 4 g/L, MS Experimental conditions: See Experimental.

First of all, these experiments showed the availability of the MALDI-MS to detect intact mAb using highly salted conditions. Moreover, the CE/MALDI-MS profile (Fig.4b)confirms the good agreement between the UV detection and the deposition time. This confirm the absence of carryover effect and diffusion phenomenon. Unfortunately, limitation of MALDI-MS resolution for molecules up to 100 kDa does not allow to measure the exact mass of the charge variants and then to characterize these glycoproteins. But this study is the proof of principle of the first analysis of intact mAb charge variants by CZE using a MS detection. This opens new pathways on the characterization of intact mAbs by CE-MS such as fraction collection, enrichment or Top-down approach.

The second strategy consisted to characterize mAb by bottom-up approach. As discussed previously, peptide mapping is commonly used to determine protein amino acid sequence. Moreover, this method allows to locate and/or quantify post translational modification (PTM). This methodology is quite important in early development of therapeutic antibodies as well as during long term life cycle management of the biopharmaceutical products. As part of this work, one of the objective was to investigate the peptide mapping of the same model humanized mAb by CE-UV/MALDI-MS/MS. A sample of mAbs was digested with trypsin enzyme following the same protocol previously described. Fig.5a shows a separation obtained for the tryptic digest of mAb (500 fmol injected). The total duration of the separation was less than 50 minutes with a detection window of 20 minutes between 25 and 45 minutes.

In this work, peptide identification was automated and based on MS/MS data meaning that identification was performed on parent ion mass measure and fragment identification. Results of Mascot search showed sequence coverage of 92% for the HC and 100% for the LC of mAb corresponding to a total of 92 unique identified peptides (Fig. 5b). Some peptides were selected and fragmented several times during the analysis leading to the same identification. These phenomenon reinforce the confidence of the identification by enabling peptide overlapping.

mAbs are heterogeneous by nature due to different structural modification which may experience the protein during the lifetime. Those modifications can be Critical Quality Attributes (CQA) as they can change the protein conformation and therefore influence the antibody activity. mAb glycosylations represent a class of PTM which can significantly influence its structure, immunogenicity and stability [56]. Results obtained on the same set of data allowed to characterize the 4 major N-Glycosylation carried by the mAb (G0F, G1F, G2F and Man5). As expected by the work of Gahoual et al. [5], we detected glycans still linked to the corresponding peptide backbone of the HC and we confirmed the ability of CE migration mechanism to separate glycopeptides having a difference of only one galactose (Fig. 5a). The glycopeptide were detected between 34.1 and 36.1 min. Fig. 5c represents the MS/MS fragmentation spectra of the glycopeptide bearing G1F. As expected, pro duct ions

observed in MS/MS mainly correspond to the fragmentation of the glycan moiety. Study of the fragmentation spectra allowed to deduce the structure of the glycan G1F.

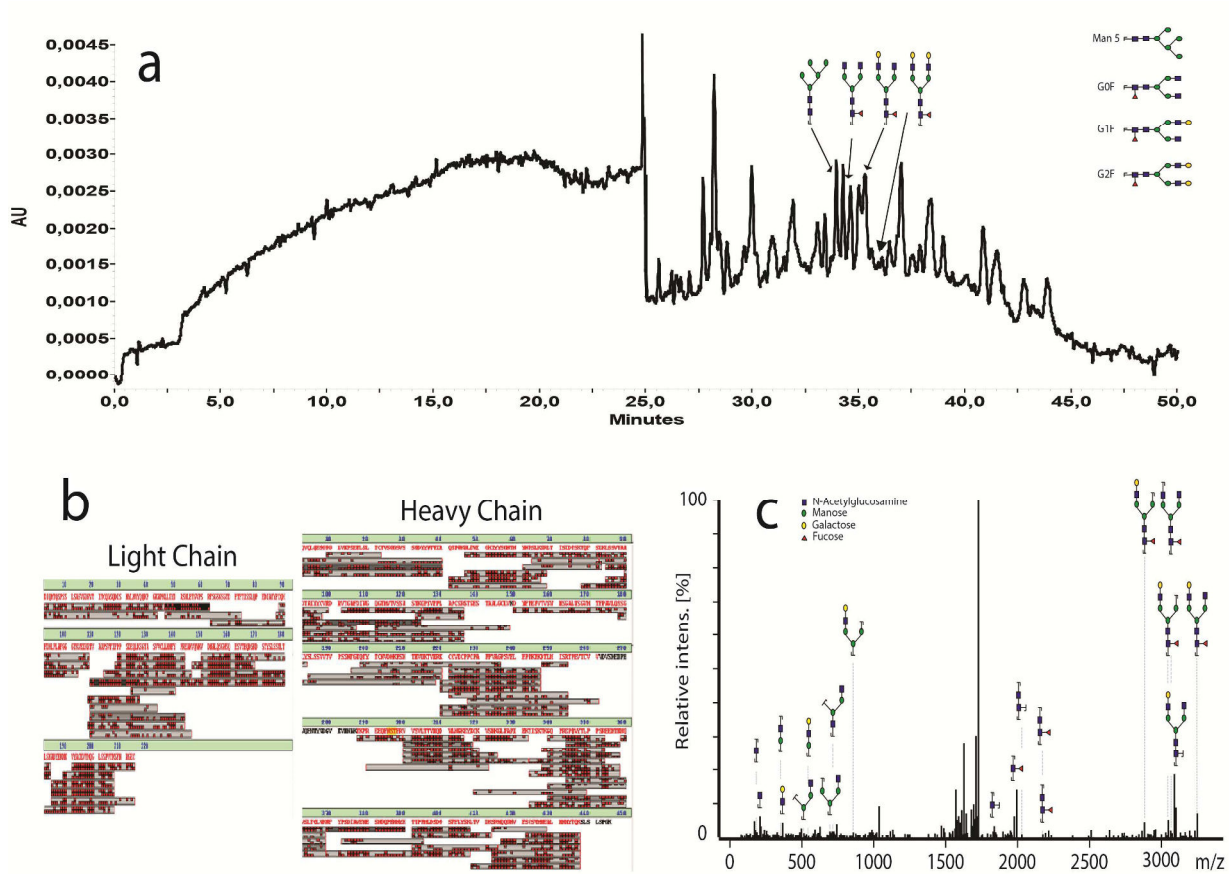


Figure 5.UV Electropherogram corresponding to the analysis by CE-UV/MALDI-MS/MS of mAbtryptic digest (a), Sequence coverage obtained for mAb HC and LC (b) and MS/MS fragmentation spectra of G1F glycopeptide (c). CE Experimental conditions and MS Experimental conditions: See Table 1 and Experimental.

Such advanced characterization of digested mAb peptide mixture in a 50 min analysis shows the potential of CE-UV/MALDI-MS/MS as a fast and sensitive method in mAb characterization.

4 Conclusion

On this work, we have developed the first automated off-line CE-UV/MALDI-MS/MS with integrated delivery matrix system. The system is based on different homemade modifications performed on a P/ACE MDQ^{TM} CE system (Beckman Coulter, Brea, CA) and a Proteineer FC automatic spotting device (Bruker Daltonics, Bremen,

Germany). In order to control the CE separation, the original set up of the UV cell in the CE apparatus was deported to allow the simultaneous UV detection near the outlet of the capillary and fraction collection. In order to reduce the total capillary length, the spotting device was modified with a shift of the original steel needle close to the CE output. Minimum total capillary length can be 60 cm. Finally, in order to be universally compatible in terms of MALDI deposition modes, a homemade delivery matrix system was developed. Neutral coated capillary can therefore be used for the achievement of intact protein or peptide separation. The evaluation of the system on the separation of five proteins showed the acquisition of electropherograms with high resolution and high repeatability. Migration times allow defining the window of fraction collection, and assessing time interval for each spot. Concerning peptide mapping approach on a nine digested proteins mixture, 154 unique identified peptides were characterized using MS/MS spectra corresponding to average sequence coverage of 64.8%. On the basis of the results obtained and as compared to NanoLC/MALDI-MS/MS, CE-UV/MALDI-MS/MS can be considered as a complementarity methods to conventional LC-MALDI/MS especially to improve the confidence in protein identification. Finally, this system has been used for the characterization of a humanized mAb following intact protein separation and peptide mapping strategies. In spite of the lack of resolution of the MALDI-MS, this work represents the first analysis of intact mAb charge variants by CZE using a MS detection and opens new ways of research for the characterization of intact mAbs. Moreover, the CE-UV/MALDI-MS/MS fragmentation allowed 100% sequence coverage of the LC and 92 % on the HC and the separation of the 4 major glycosylated peptides and their structural characterization in the same analysis data set. These results analysis demonstrates the power of CE-UV/MALDI-MS/MS as a sensitive method in mAb characterization and more generally in bottom-up proteomic approach.

Acknowledgments

Michael Biacchi would like to thank the ANFH for funding his Ph.D work. LSMIS would like to thank Dr. Bernard Capolaghi (Hospital Bel Air, Thionville) for his support. LSMIS would like to thank Paape Rainer, Pierre-Olivier Schmit and Anja Resemann from Bruker for their help. The authors would like also to express their gratitude Dr. E. Wagner-Rousset, Dr. D. Ayoub, MC. Janin-Bussat, O. Colas (Centre d'immunologie Pierre Fabre, St Julien en Genevois, France) and Rabah Gahoual (LSMIS, Strasbourg, France) for helpful discussions around antibody structural characterization. Dr. Yannis François would like to thank Dr. Jean-Marc Busnel for very fruitful discussions.

5 References

[1]Skalnikova, H.K.*Biochimie*2013,*95 (12)*, 2196-2211.

[2]Ma, N., Ling, R.,Zaidah, L., Su, S.*Int.J.Mol.Sci.*2013,*14 (4)*, 7515-7541.

[3]Gahoual, R.,Busnel, J.M., Wolff, P., Francois, Y.N., Leize-Wagner, E.*Anal.Bioanal.Chem.*2014,*406*, 1029-1038.

[4]Beck, A., Sanglier-Cianférani, S., Van Dorsselaer, A.*Anal. Chem.*2012,*84*, 4637-4646.

[5]Gahoual, R., Burr, A., Busnel, J.M., Kuhn, L.,Hammann, P., Beck, A., François,Y.N., Leize-Wagner, E.*mAbs*2013,*5 (3)*, 479-490.

[6] Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., Corvaia, N. Nat Rev *Immunol.* 2010, *10*, 345-352.

[7] Reichert, J.M.*mAbs* 2012,*4(3)*, 413-415.

[8] Wang, W., Singh, S., Zeng, D. L., King, K., Nema, S*J.Pharm*. *Sci*. 2007, *96*, 1–26.

[9]Aebersold, R., Mann, M.*Nature*2003,*422*, 198-207.

[10]Krylov, S.N.,Dovichi, N.*Anal. Chem.*2000,*72*, 111R-128R.

[11]Kasicka, V.*Electrophoresis*2010,*31*, 122-146.

[12]El Rassi,Z.*Electrophoresis*2010, *31*, 174-191.

[13] Smith, R.D.,Udseth, H.R.*Nature*1988,*331*, 639-640.

[14]Rose, D.J., Jorgenson, J.W.*J.Chromatogr.A*1988,*438*, 23-34.

[15] Ahmed, F.E*J.Chromatogr.B*2009,*877*, 1963-1981.

[16]Faserl, K., Sarg, B., Kremser, L., Lindner, H.*Anal. Chem.*2011,*83*, 7297-7305.

[17]Ramautar, R.,Mayboroda, O.A., Somsen,G.W., de Jong, G.J.*Electrophoresis*2011,*32*, 52-65.

[18] Haselberg, R, de Jong, G.J., Somsen, G.W. *Journal of Chromatography A* 2007, *1159*, 81-109.

[19]Haselberg, R., de Jong,G.J.,Somsen, G.W.*Electrophoresis*2013,*34*, 99-112.

[20]Ramautar, R., Heemskerk, A.A.M., Hensbergen, P.J., Deelder, A.M., Busnel, J.M., Mayboroda, O.A.*J.Proteomics*2012,*75*, 3814-3828.

[21] Smith, R.D., Olivares, J.A., Nguyen, N.T.,Udseth, H.R.*Anal. Chem.*1988,*60*, 436-441.

[22]Hommerson, P., Khan, A.M., de Jong, G.J.,Somsen, G.W.*Mass.Spectrom.Rev.*2011,*30*, 1096-1120.

[23]Wachs, T., Sheppard,R.L., Henion, J.*J.Chromatogr.BBiomed.Appl*.1996,*685*, 335-342.

[24]Zhu, G., Sun, L., Yan, X.,Dovichi, N.*Anal. Chem.*2013,*85*, 2569-2573.

[25]Moini, M.*Anal. Chem.*2007,*79*, 4241-4246.

[26]Busnel, J.M., Schoenmaker, B., Ramautar, R., Carrasco-Pancorbo, A., Ratnayake, C., Feitelson, J.S., Chapmann, J.D., Deelder, A.M., Mayboroda, O.A. *Anal. Chem.*2010,*82*, 9476-9483.

[27] Chang, S.Y., Yeung, E.S., *Anal. Chem.* 1997, *69*, 2251-2257.

[28] Murray, K.K., *Mass. Spectr. Rev.* 1997, 16, 283-299.

[29] Mechref, Y., *Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary Electrophoresis: Principles, Applications, and Limitations*, Wiley, 2013, 367-380.

[30] Preisler, J., Hu, P., Rejtar, T., Karger, B.L. *Anal. Chem.* 2000, *72*, 4785-4795.

[31]Preisler, J., Foret, F., Karger, B.L. *Anal. Chem.* 1998, *70*, 5278-5287.

[32]Musyimi, H.K., Narcisse, D.A., Zhang, X., Stryjewski, W., Soper, S.A., Murray, K.K. *Anal. Chem.* 2004, *76*, 5968-5973.

[33] Amon, S., Plematl, A., Rizzi, A. *Electrophoresis* 2006, *27*, 1209-1219.

[34]Lechner, M., Seifner, A.,Rizzi, A.*Electrophoresis*2008,*29*, 1974-1984.

[35]Silvertand, L.H.H., SastreToraño, J., de Jong, G.J., van Bennekom, W.P.*Electrophoresis*2009,*30*, 1828-1835.

[36] Weiss, N.G., Zwick, N.L., Hayes, M.A.*J.Chromatogr.A*2010,*1217*, 179-182.

[37]Johnson, T., Bergquist, J., Ekman, R.,Nordhoff, E., Schürenberg, M., Klöppel, K.D., Müller, M., Lehrach, H.,Gobom, J.*Anal. Chem.*2001,*73*, 1670-1675.

[38] Wang, J., Ye, H., Zhang, Z., Xiang, F., Girdaukas, G., Li, L.*Anal. Chem.*2011,*83*, 3462-3469.

[39]Bachmann, S., Bakry, R., Huck, C.W., Polato, F., Corradini, D., Bonn, G.K.*Electrophoresis*2011,*32*, 2830-383.

[40]Hanton, S.D.,Hyder, I.Z., Stets, J.R., Owens, K.G., Blair, W.R., Guttman, C.M.,Giuseppetti,A.A.*J.Am. Soc. Mass.Spectr.*2004, *15*, 168-179.

[41]Vannatta, M.W., Whitmore,C.D.,Dovichi, N.J.*Electrophoresis*2009,*30*, 4071-4074.

[42] Wang, J., Ma, M., Chen, R., Li, L., *Anal*. *Chem*. 2008, *80*, 6168-6177.

[43]Busnel, J.M.,Josserand, J., Lion, N.,Girault, H.H.*Anal. Chem.*2009,*81*, 3867-3872.

[44] Li, Y., Yun, B., Deng, C., Tang, J., Liu, J., Zhang, X.*Proteomics*2007,*7*, 3661-3671.

[45] Bi, H., Qiao, L., Busnel, J.M., Devaud, V., Liu, B., Girault, H.H.*Anal. Chem.*2009,*80*, 1177-1183.

[46] Luo, Y.Q., Xu, S.Y., Schiling, J.W., Lau, K.H., Whitin, J.C.,Yu, T.T.S., Cohen, H.H. *JALA*, 2009, *14*, 252-261.

[47]Liu, J., Tseng, K., Garcia, B., Lebrilla, C. B., Mukerjee, E., Collins, S., Smith, R. *Anal. Chem.* 2001, *73*, 2147-2151.

[48] Xu, Y., Little, M.W., Murray, K.K. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006, *17*, 469-474.

[49] Shen,Y., Smith, R.D.*J.Microcolumn.Sep.*2000,*12*, 135-141.

[50]Busnel, J.M.,Lion, N., Girault, H.H.*Electrophoresis*2008,*29*, 1565-1572.

[51]Pourhaghighi, M.R., Busnel, J.M., Girault, H.H.*Electrophoresis*2011,*32*, 1795-1803.

[52] Walsh, G.,Jefferis, R. *Nat.Biotech.* 2006, *24*, 1241-1252.

[53] He, Y, Lacher, N.A., Hou, W., Wang, Q., Isele, C., Starkey, J., Ruesch, M. *Anal. Chem.* 2010, *82*, 3222-3230.

[54] He, Y., Isele, C., Hou, W., Ruesch, M*. J. Sep. Sci*. 2011, *34*, 548-555.

[55] Gassner, A.L., Rudaz, S., Schappler, J. *Electrophoresis*2013, *34*, 2718-2724.

[56] Jefferis, R.*Biotechnol.Prog.* 2005,*21*, 11-16.

3. Conclusion

Lors ce travail, nous avons développé le premier couplage CE-UV/MALDI-MS/MS avec système de dépôt de matrice totalement automatisé. En effet, plusieurs évolutions ont été réalisées pour rendre ce couplage robuste, autonome et polyvalent. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur la modification de deux systèmes commerciaux. Afin de contrôler la séparation électrophorétique, la cellule UV originelle de l'appareil de CE a été déportée pour permettre simultanément la détection UV et la collection de fraction. Ceci permet d'éviter l'ajout d'un spectrophotomètre UV externe. De plus, basé sur la propriété de l'appareil de CE à permettre l'application simultanée d'une différence de potentiel et de pression et dans le but de développer un système permettant de déposer la matrice directement après le dépôt de l'échantillon, une modification de la cartouche CE a été optimisée afin de rendre le couplage universel en termes de mode de dépôt MALDI. Ainsi, la séparation, le suivi UV, la collecte de fraction et l'adjonction de matrice sont automatisés et pilotés par seulement deux logiciels. Le caractère polyvalent du système est conféré par la possibilité de déposer sur tout type de support et d'élaborer tout type de dépôt quel que soit la stratégie analytique.

Les performances du système ont été évaluées avec la séparation d'un mélange de 5 protéines entières ainsi qu'un digestat tryspique de 9 protéines. La séparation de protéines entières montre la robustesse du système en termes d'efficacité, de résolution et de temps de migrations. Dans l'approche protéomique, un nombre total de 154 peptides uniques ont été caractérisés par MS/MS correspondant à une couverture de séquence moyenne de 64,1%. Une comparaison avec le couplage de référence HPLC/MS a été réalisé et a montré une très grande complémentarité entre les deux approches représentée par l'augmentation de 42% au niveau du nombre de peptides identifiés. Enfin, dans le but de confirmer les performances du système pour la séparation de protéines entières de haut poids moléculaire, l'application à la séparation de mAbs intacts et digérés ont été réalisées à l'aide du couplage CE-UV/MALDI-MS. En dépit de l'absence de résolution du MALDI-MS, ce travail représente la première analyse des variants de charge de mAbs intactes à l'aide d'un couplage de la CE avec une détection MS et ouvre de nouvelles voies de recherche pour la caractérisation des mAbs intactes tel que l'approche Top Down. Concernant l'analyse du digestat trypsique de mAbs, l'étude a permis d'obtenir 100 % de couverture de séquence de la chaine légère et 92 % de la chaine lourde ainsi que la séparation et la caractérisation des quatre formes majoritaires de glycosylation en une

seules analyse. Ces résultats démontrent la puissance du couplage CE-UV/MALDI-MS/MS comme une méthode sensible et robuste pour la caractérisation de mAbs.

CHAPITRE III : Caractérisation de protéines entières par enrichissement d'échantillon et stratégie Top Down à l'aide du Couplage CE-UV/MALDI-MS

Introduction

Au cours du chapitre II, nous avons développé et évalué le premier couplage CE-UV/MALDI-MS/MS à interface coaxiale avec système de distribution et de dépôt de matrice entièrement automatisé. La cellule de détection UV déportée permet de suivre la séparation jusqu'au dépôt des analytes, le tout étant entièrement piloté par deux logiciels. Grâce à sa conception robuste et entièrement paramétrable, nous avons démontré la répétabilité et la polyvalence du couplage sur une séparation de protéines entières. De plus, l'analyse de mAbs entiers a confirmé la possibilité d'utiliser le système CE-UV/MALDI-MS/MS pour la séparation de protéines de haut poids moléculaire. L'évaluation du couplage a permis d'obtenir des analyses successives répétables sans dégradation de séparation avec des RSD < 2% sur les temps de migrations. Les performances du système de collecte de fraction/mélange matrice ont montré l'absence de contamination entre les dépôts en retrouvant les analytes attendus dans leur fraction respective.

Cependant, l'absence de résolution du MALDI-MS apparait comme une limitation importante à la caractérisation fine de protéines par cette méthode. Partis de ce constat et des alternatives en termes de stratégie pour l'analyse de protéines entières, nous avons décidé d'envisager une stratégie par Top Down.

En effet, aujourd'hui, la caractérisation d'une protéine en MS peut se faire selon deux approches complémentaires : une approche dite Bottom Up et une approche dite Top Down. L'approche Bottom Up est à ce jour la méthode la plus utilisée en protéomique. Elle consiste à soumettre une digestion protéolytique aux protéines puis d'identifier par spectrométrie de masse les peptides formés. Cette approche a été mise en œuvre dans le Chapitre II pour évaluer le système sur un mélange de 9 protéines modèles. Au cours de ces dernières années, l'approche Bottom Up a pris beaucoup d'ampleur grâce aux nouveaux enzymes de digestion[1] de plus en plus spécifiques et efficaces et grâce aux avancées technologiques des analyseurs de masse[2,3]. Toutefois, les différentes étapes nécessaires à la protéolyse sont susceptibles de conduire à des pertes d'informations[4]. C'est pourquoi des

stratégies d'analyses de protéines entières et natives[5,6] ont vu le jour réduisant les étapes de préparation de l'échantillon. C'est pour cette raison que l'approche Top Down s'est développée. Elle consiste à caractériser une ou plusieurs protéines entières sans digestion préalable. Cette dernière permet de travailler sur des protéines dans des conditions très proches du natif. Grâce à la fragmentation directe de la protéine entière par MS, il est possible d'obtenir des spectres de masse de la protéine fragmentée d'acides aminés en acides aminés. Et c'est à partir de l'analyse des spectres de fragmentation que l'on peut remonter à la séquence de la protéine[7,8] et aux éventuelles modifications post traductionnelles[2] (chapitre I, paragraphe 4.2.). De nos jours, la stratégie Top Down connait un développement considérable notamment dans la recherche et la caractérisation de biomarqueurs[9], de micro-organismes[10] ou d'anticorps monoclonaux[11]. La plupart de ces études mettent en jeu des spectromètres de masse à sources d'ionisation ESI pour l'analyse Top Down. Cependant, lors d'analyses de mélanges complexes, la production d'ions multi chargés complexifie les spectres MS/MS. C'est la raison pour laquelle la source MALDI et sa production d'ions majoritairement mono chargés est plus aisée à mettre en œuvre pour la stratégie Top Down des protéines entières. Néanmoins, cette stratégie nécessite une grande pureté et une haute quantité (> 1 pM)[12] d'analytes. En effet, si la protéine n'est pas pure sur le dépôt, le phénomène de fragmentation s'appliquera aussi aux impuretés complexifiant fortement le spectre de masse. De plus, la source MALDI nécessite un analyte concentré afin d'enclencher le processus de fragmentation permettant le séquençage des acides aminés. Ainsi, afin d'isoler chaque protéine, une technique séparative est indispensable surtout lors de l'utilisation de mélanges complexes. Aujourd'hui, les techniques chromatographiques permettent de fournir des analytes purs et concentrés pour des protéines de faibles poids moléculaires[13,14,15]. Mais la résolution de ces séparations chute dramatiquement à mesure que l'échantillon se complexifie et/ou augmente en masse molaire[16]. En effet, en HPLC, les faibles différences de masses sur de haut poids moléculaire deviennent très difficilement séparables. Ceci est dû principalement aux phénomènes de rétention et de diffusion. Notons que récemment, quelques analyseurs de masse à très haute résolution, comme le LTQ-orbitrap[17] ou encore les FTICR ont montré leur capacité à séparer des clusters isotopiques multichargés de protéines allant jusqu'à 229kDa[18]. Mais, hormis la difficulté de couplage de la LC avec le FTICR, la production de spectre de masse à nombreux ions multichargés rend encore l'interprétation des spectres Top Down difficiles[19]. C'est pour ces raisons que ces couplages sont limités à l'étude de protéines isolées ou aux mélanges simples.

D'un autre côté, comme nous l'avons montré dans le chapitre II avec la séparation d'anticorps intacts, la CE est capable de séparer des échantillons complexes et de haut poids moléculaire avec de très hautes résolutions. C'est cette résolution qui permet de séparer des analytes avec une grande pureté. Cependant, concernant la quantité de l'échantillon déposé, la CE peut difficilement fournir des fractions concentrées. En effet, dues aux propriétés de diffusion en front plat des zones d'échantillons, la capacité de chargement d'un capillaire ne peut excéder 1 % du volume total. Dans notre cas, le capillaire de séparation de 80 cm de longueur et de 50 µm de diamètre interne correspond à un volume total d'environ 1µl de BGE. Les volumes d'échantillons communément injectés ne dépassent donc pas 10 nL. Dans le but de trouver une alternative à l'augmentation du volume d'échantillon, des techniques de préconcentrations sont utilisées. Cependant dans certains cas, ces méthodes ne sont pas suffisantes pour la stratégie Top Down par fragmentation ISD. C'est parti de ce postulat que nous avons décidé d'utiliser la nouvelle interface CE/MALDI-MS afin de collecter et ainsi de faire de l'enrichissement de fractions. En effet la répétabilité tant dans la séparation que dans la collecte et le dépôt de fraction va nous permettre de « purifier » les protéines d'intérêt tout en les concentrant par dépôts successifs.

La mise au point de cette stratégie d'enrichissement a tout d'abord été évaluée sur un mélange de 3 protéines modèles. Cette première séparation effectuée dans des conditions de BGE simple nous offre la possibilité d'optimiser notre technique de dépôts successifs et nos paramètres d'analyses par Top Down. Dans une deuxième partie, nous décrirons l'évaluation de notre stratégie sur la séparation d'un mélange un peu plus complexe de 5 protéines modèles mais dans des conditions de séparations, décrites au Chapitre II, plus représentatives des capacités de la CE. Par ailleurs, nous emmétrons des hypothèses sur l'influence du support de collecte. Enfin, toujours dans le but de prouver la polyvalence de cette stratégie, nous décrirons notre évaluation d'enrichissement sur l'étude d'un mAbs partiellement digéré à l'IdeS. Ce travail représente la parfaite continuité de l'étude initiée au Chapitre II. A notre connaissance, aucune publication ne relate l'utilisation d'un couplage CE/MALDI-MS pour l'analyse Top Down de protéines entières.

1. Matériels et méthodes

1.1. Réactifs et matériels

Tous les réactifs ont été utilisés dans des qualités analytiques et pures fournies par Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). L'eau servant à préparer les tampons et les échantillons a été obtenue en utilisant le système de purification d'eau ELGA purelab UHQ PS (Bucks, UK.) Cytochrome c (Cyt c), ribonuclease A ((RNase A), α-lactalbumin (αLac), insulin (Ins), myoglobin (Myo), bovine serum albumin (BSA), lysozyme (Lys), β-Casein (βCas), carbonic anhydrase II (CAII) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Cetuximab a été fourni par le centre immunologique Pierre Fabre (Saint-Julien-en-Genevois, France). Le FabRICATOR (IdeS) a été fourni par Genovis (Lund, Sweden)

1.2. Composition d'échantillons

Pour l'étude des 3 protéines, une solution de protéines standards BSA (66,4 kDa), Rnase A (13,6 KDa), CA II (29,0 KDa) a été préparée dans l'eau désionisée à 100 µM chacune. Pour l'étude des 5 protéines, une solution de protéines standard αLac (14.2kDa), RNase A (13.6kDa), Cyt c (12.3 kDa), Lys (14.3 kDa) and Myo (16.9 kDa) a été préparée respectivement dans l'eau désionisée à 120nM, 50nM, 40 nM, 40nM and 50nM. Pour l'étude du Cetuximab, l'échantillon a été préparé à 1 g/L.

1.3. Protocole de digestion à l'IdeS

La solution d'IdeS est reconstituée dans l'eau à 67 unités/µL. L'échantillon de Cetuximab (1 g/L) est reconstitué dans le tampon de digestion (tampon phosphate 50 mM, 150 mM phosphate de sodium, pH 6,6). L'IdeS est ensuite ajouté dans les proportions 1 unit/µg mAb. Le mélange est incubé 30 minutes à 37°C.

1.4. L'électrophorèse capillaire.

Les séparations électrophorétiques ont été effectuées sur le système P/ACE MDQ^{TM}CE de Beckman Coulter (Brea, CA) équipée d'un passeur automatique thermostaté et un générateur capable de délivrer une tension jusqu'à 30 kV. Le logiciel 32 Karat^{TM} (Beckman Coulter, Brea, CA) est utilisé pour piloter l'instrument, acquérir et traiter les données. Polymicro bare fused-silica capillaries de 50 µm i.d. a été fourni par Photonlines (St-Germain-en-Laye, France). Concernant le capillaire modifié, la surface du capillaire a été greffée en laboratoire avec de l'hydroyxypropylcellulose (HPC) en suivant le protocole décrit par Shen *et al*. [20].

Pour la séparation des 3 protéines modèles, un BGE composé d'acide formique 10% (pH 2.2) a été utilisé. Les échantillons ont été introduits dans le capillaire par injection hydrodynamique (0.5 psi, 6 sec.) La séparation des protéines a été effectuée en appliquant une tension de 10 kV à travers le capillaire.

Pour la séparation des 5 protéines modèles, un BGE composé d'acétate d'ammonium 83.3mM 10 % (pH 4.0) a été utilisé. Les échantillons ont été introduits dans le capillaire par injection électrocinétique (5 kV, 8 min.) La séparation des protéines a été effectuée en appliquant une tension de 20 kV à travers le capillaire.

Pour la séparation du digest IdeS de Cetuximab, un BGE composé de ε-Amino-caproïc acid (EACA) / Acétate d'ammonium 400mM/75mM (pH 5.7) a été utilisé. Les échantillons ont été introduits dans le capillaire par injection hydrodynamique (0.5 psi, 6sec.)

La séparation des protéines a été effectuée en appliquant une tension de 20 kV à travers le capillaire. Les différents volumes d'injection ont été calculés en utilisant l'application gratuite CEToolbox (Pansanel, Google Play.)

1.5. L'interface CE/MALDI-MS.

Le détail complet de l'interface automatisée pour le couplage CE à la spectrométrie de masse MALDI-MS est décrite dans le chapitre II. Cette interface permet de séparer, de collecter et d'effectuer un dépôt goutte séchée de manière automatique. La confection d'une cellule de détection UV déportée permet de suivre le processus de séparation jusqu'à la collecte de fractions. Les paramètres de

séparation, de distribution de matrice, d'acquisition, de traitement des données et de collecte sont entièrement gérés par deux logiciels.

1.6. Collecte de fractions

Le protocole complet de collecte de fractions est représenté sur la figure 1. Cependant quelques différences ont été apportées pour l'étude du mélange de 5 protéines et pour le Cetuximab traité à l'IdeS. Pour l'étude des 3 protéines, la collecte de fractions a été effectuée dans une plaque PCR en plastique, les puits ont été remplis de 15 µl de BGE (figure 4.) Les fractions ont été évaporées à l'aide d'un miVac DNA concentrator (Genevac, NY, USA) jusqu'à un volume de 5µl puis évaporées sous vide et reprises avec 2 µl de TA 30 pour les dépôts DHB. Les dépôts ont été effectués sur cible MALDI Ground Steel (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) en mélangeant les fractions avec de la matrice (v/v).

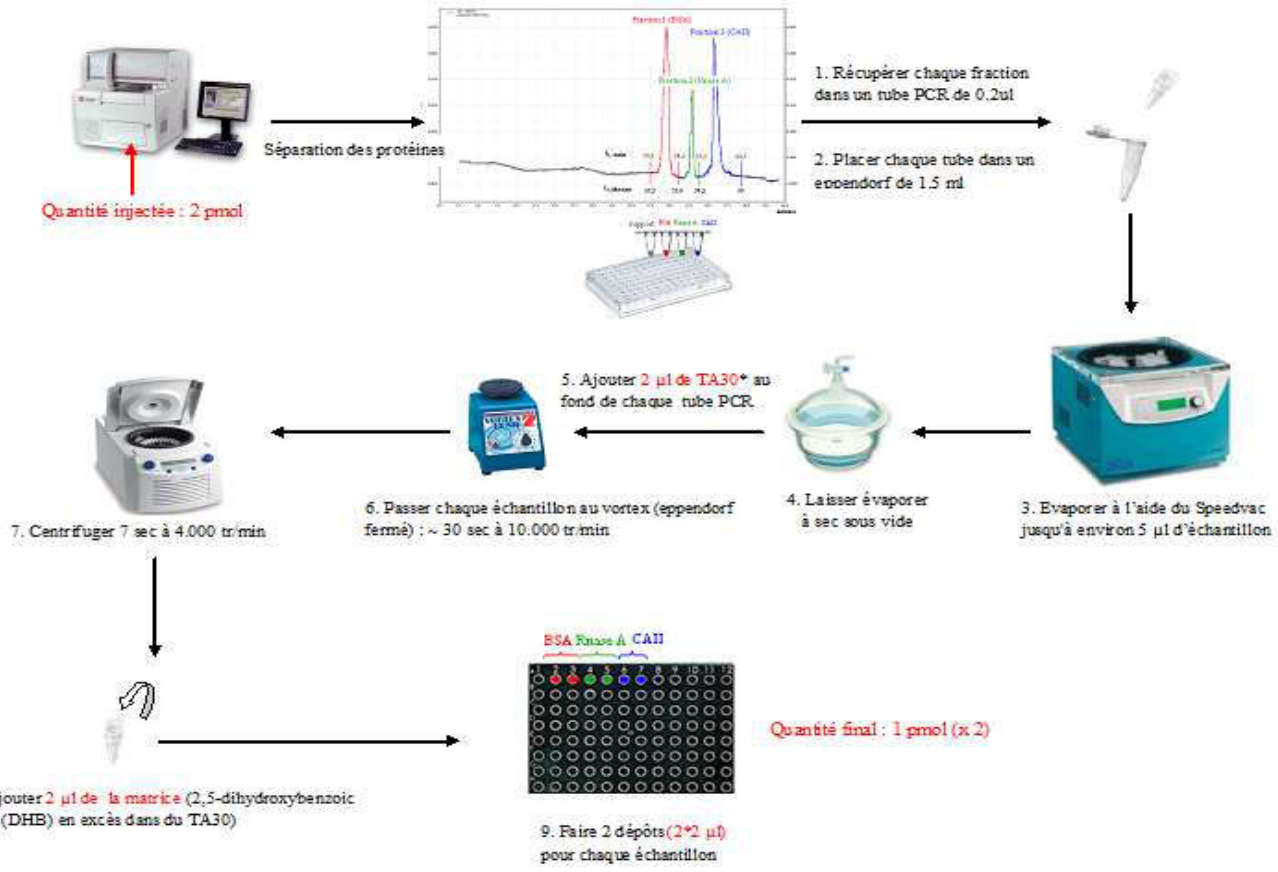


***Figure 1**. : Protocole de collecte des fractions en plaque PCR et traitement de celle-ci jusqu'au dépôt goutte séché MALDI*

Pour l'étude des 5 protéines et du Cetuximab traité à l'IdeS, l'enrichissement et la collecte de fractions ont été effectués directement sur cible MALDI à l'aide de l'interface automatisée.

1.7. MALDI-TOF-MS.

Pour les séparations des différents mélanges de protéines et du Cetuximab traité à l'IdeS, la matrice a été préparée en dissolvant du 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) saturé dans du TA30 (0.1%TFA, 70% eau et 30% acétonitrile). L'étude a été réalisée sur un Autoflex II MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) à l'aide du logiciel FlexControl. Le MALDI-MS a été utilisé en mode positif.

Pour l'étude de protéines entières, le mode linéaire a été mis en œuvre sur deux gammes de masse 6000-100000 pour la BSA et le Cetuximab/IdeS et 6000-30000 pour les autres protéines. L'acquisition spectrale a été réalisée en accumulant 2000 tirs laser (puissance à 70 %) pour chaque fraction. Tous les spectres ont été calibrés à l'aide du calibrant externe Protein calibration Standard I (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) pour les mélanges de protéines et une solution de BSA à 20 µM pour le digestat IdeS de Cetuximab.

Pour l'étude Top Down, le mode réflectron a été utilisé. Les spectres ont été réalisés en accumulant 12000 tirs laser (72 % de puissance) pour chaque fraction. Tous les spectres ont été calibrés par rapport à un calibrant externe : le Peptide calibration Standard II (BrukerDaltonics, Bremen, Germany).

2. Résultats et discussion.

2.1. Etude d'un mélange de 3 protéines.

Dans le but d'avoir une séparation à la résolution suffisante et afin d'optimiser nos paramètres de collecte de fraction, nous avons décidé de travailler sur un mélange relativement simple. En effet, nous avons utilisé un mélange de trois protéines modèles composées de l'Albumine bovine (BSA), de la Ribonucléase A (RNase A) et de la Carbonic anhydrase II (CAII) respectivement de 66 kDa, 13.4 kDA et 22 kDa.

2.1.1. La séparation des 3 protéines

Ces trois protéines ont été utilisées sans traitement préalable. Les conditions de séparations ont été choisies de manière à ce que la résolution entre ces trois protéines soit significative et adaptée, c'est-à-dire avec un retour à la ligne de base. Ici, la différence de temps d'élution des différentes protéines est largement supérieure à la minute (figure 2.)

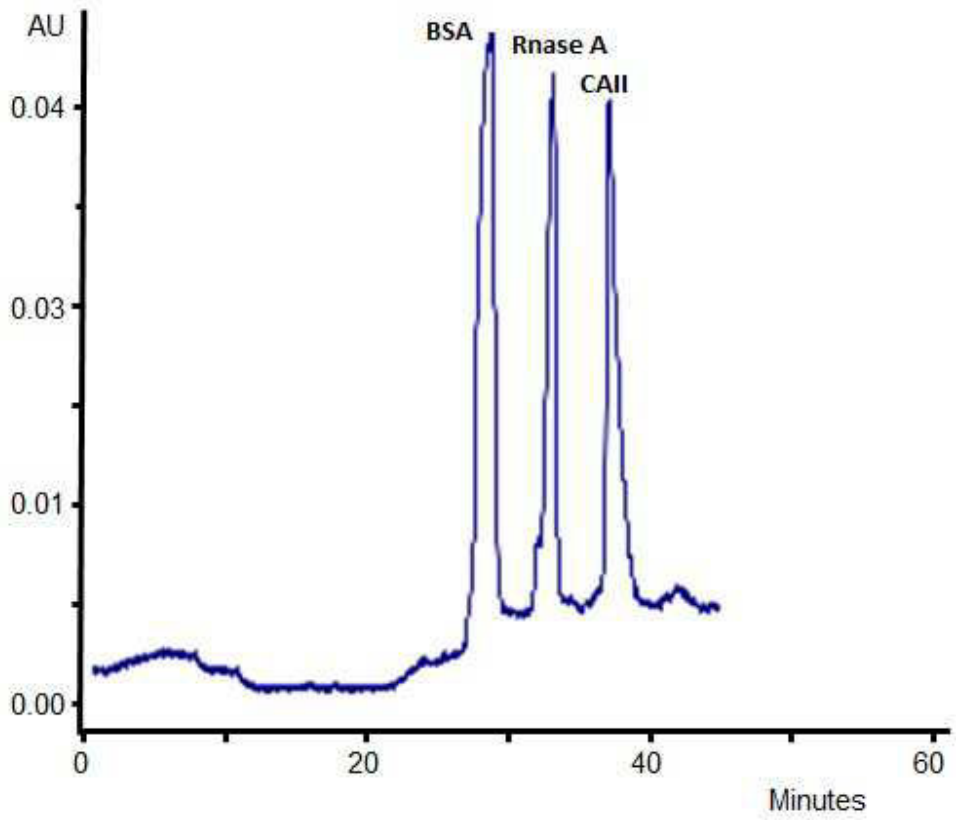


***Figure 2**. Electrophérogramme UV de la séparation de trois protéines modèles. Conditions de séparations : injection hydrodynamique 0.5 psi 1sec soit 2,45 pmol, Ld= 53 cm Lt = 60 cm, 8 kV, 10% FA, greffage HPC, détection UV à 200 nm, 25°C.*

La bonne résolution de la séparation nous permet d'injecter des concentrations élevées de protéines (1pM). On peut constater un temps de 3 minutes entre chaque pic de protéines. Ces intervalles de temps nous autorisent l'augmentation de la quantité de protéines injectées. En effet, la résolution suffisante des 3 pics évite les éventuels coélutions même en cas de surcharge modérée du capillaire. Ainsi la résolution, évitant toute coélution, et la bonne efficacité, assurant de collecter le maximum de composé en une fraction, nous a permis de retrouver les analytes pures dans leurs fractions respectives (voir Chapitre II paragraphe 3.1.). Cependant une séparation ne suffit pas pour atteindre les concentrations de 1pM souhaitées pour l'analyse Top Down, il faut donc une séparation répétable si l'on veut pouvoir enrichir les fractions en analytes par séparations successives.

2.1.2. Répétabilité de la séparation

Afin d'enrichir les fractions et d'atteindre une quantité adéquate supérieure à 1pmol en protéines pour l'analyse Top Down, il faut pouvoir exécuter plusieurs séparations sans dégradation ni changement de mobilité des analytes. En effet, une séparation répétable va permettre de fixer les temps des analytes en sortie de capillaire et par conséquent de déposer toujours les mêmes analytes dans les mêmes fractions. Ainsi il sera possible de fixer les paramètres du module de collection de fractions. La répétabilité de la séparation des 3 protéines a été évaluée en répétant 5 fois de suite, l'injection et la séparation de l'échantillon (figure 3.)

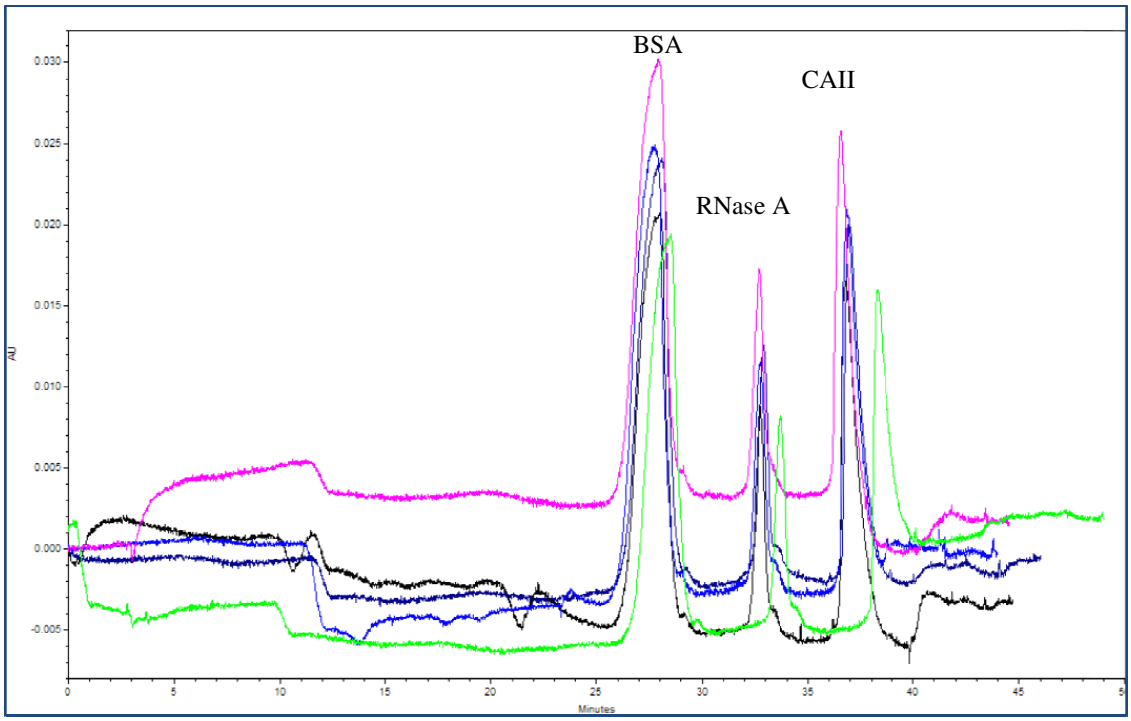


***Figure 3**. Superposition des cinq Electrophérogrammes obtenus pour l'étude de répétabilité. Conditions de séparations : injection hydrodynamique 0.5 psi 1sec soit 2,45 pmol, Ld= 53 cm Lt = 60 cm, 8 kV, 10% FA, greffage HPC, détection UV à 200 nm, 25°C.*

L'analyse de la figure 3 nous montre une très bonne répétabilité pour les 5 séparations. Les données des RSD pour chaque pic sont répertoriées dans le tableau 1.

Temps de migrations (min)	Inject1	Inject2	Inject3	Inject4	Inject5	Moyenne (û)	RSD (%)
BSA	27,98	27,74	28,02	27,97	28,46	28,03	0,9
RNase A	32,74	32,8	32,96	32,89	33,72	33,02	1,2
CAII	36,58	36,88	36,98	36,83	38,33	37,12	1,9

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des RSD.

Les RSD de la BSA et de la Rnase A restent proche de 1 % tandis que la CA II est inférieur à 2 %. Néanmoins, on peut remarquer que la dernière séparation (électrophérogramme en vert) est décalée par rapport aux autres répétitions. Son élimination améliore les RSD (< 1,5.) L'hypothèse retenue est un échauffement du capillaire, puisque la moitié de celui-ci n'est pas thermostaté et est soumis aux variations de température. Cependant, le paramétrage complet de la nouvelle interface CE/MALDI-MS permet de programmer les temps de collectes indépendamment les uns des autres.

De plus, de faibles RSD, la conservation de la symétrie et l'efficacité des pics confirment que les séparations successives n'altèrent ni le greffage du capillaire ni le BGE. Grâce à des mobilités répétables, il est possible d'optimiser le processus de collecte. Cette optimisation a été basée sur les temps de sortie des analytes du capillaire extrapolés par rapport aux temps de leur passage dans la cellule de détection. C'est grâce au suivi UV en temps réel de la séparation que nous avons programmé les logiciels afin d'effectuer automatiquement les différents dépôts successifs. Cette succession de séparations et de dépôt nous ont permis d'enrichir les échantillons.

2.1.3. Collecte de fractions pour l'enrichissement des dépôts.

Le bon déroulement de la collection de fractions a été évalué en analysant la première séparation de la série de répétition. Les résultats sont présentés ci-dessous (figure 4.)

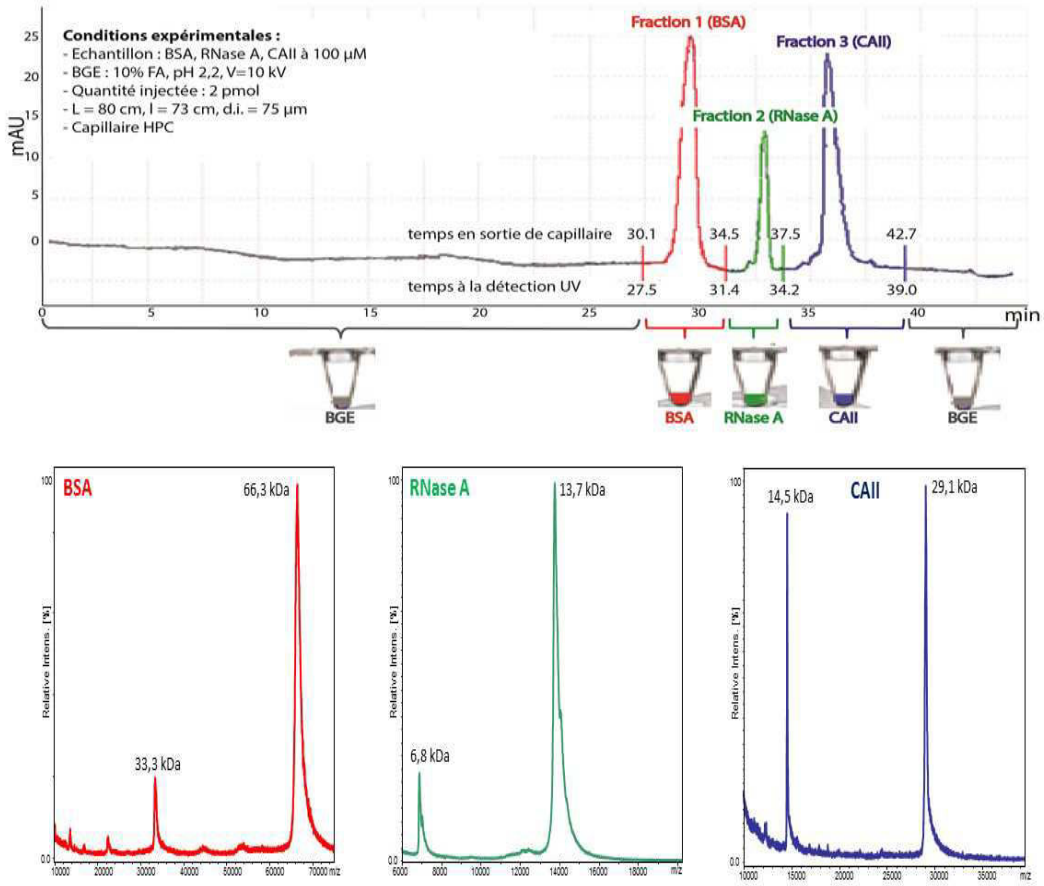


***Figure 4**. Illustration du processus de collection de fractions pour le mélange de 3 protéines entières*

Tout d'abord, nous pouvons remarquer que le processus de collection de fraction ne dénature pas la séparation. Cet élément important a été démontré dans le Chapitre II. Les temps indiqués en-dessous et au-dessus de la ligne de base (27,5 min et 30.1 min pour la BSA ; 31.4 min et 34.5 pour la Rnase A ; 34.2 min et 37.5 pour CAII ; 39.0 min et 42.7 min pour le Blanc BGE) correspondent aux temps auxquels passe l'analyte devant la cellule UV et à sa sortie du capillaire. Le décalage de 3 min correspond aux 7 cm de capillaire.

De plus, nous avons décidé d'optimiser le temps de collecte (3 min pour BSA à 5 minutes pour CAII) en se basant sur la largeur du pic de l'analyte. La durée de collecte permet de récupérer la totalité du pic de la protéine. Enfin, le blanc BGE été effectué pour le retraitement des spectres MALDI-MS.

L'analyse des différentes fractions confirme bien la présence des protéines et ceci sans contamination entre elles. Les masses mesurées correspondent aux masses attendues pour les 3 protéines. Il est à noter la présence des masses correspondant à la protéine sous forme di chargée. Le bon rapport signal sur bruit montre une bonne réponse du MALDI MS et une absence de contamination. Ces constatations importantes nous ont confortés dans le fait de pouvoir répéter le processus de collecte afin d'obtenir le maximum de concentration d'analyte dans sa fraction.

2.1.4. L'enrichissement des dépôts.

L'enrichissement a été évalué en déposant de 3 à 5 fois les collectes de fractions. Grâce à la répétabilité de la séparation et de la robustesse de la nouvelle interface, des séparations successives ont été collectées à des intervalles permettant la récupération totale de la protéine. Les fractions ont été effectuées dans les puits d'une plaque PCR. Cette dernière permet de conserver les collectes de fractions et surtout de pouvoir les retravailler. Les puits ont été remplis de 15 µl de BGE pour établir une jonction électrique entre l'aiguille et la sortie du capillaire. De plus, ce volume de BGE permet de compenser les phénomènes d'évaporation durant les 5 répétitions. Un débit de 3µl par minute de liquide additionnel est appliqué aux extrémités du capillaire. Une fois les séparations successives déposées, nous avons procédé au traitement des fractions comme indiqué dans le paragraphe 1.6. Une évaporation à l'aide d'un appareil de speedvac et une reprise dans un volume 2µl de TA 30 a permis de concentrer encore un peu plus les fractions. Les fractions ont été analysées à une répétition, 3 répétitions et 5 répétitions pour mettre en évidence l'augmentation successive des concentrations. Les résultats sont représentés figure 5.

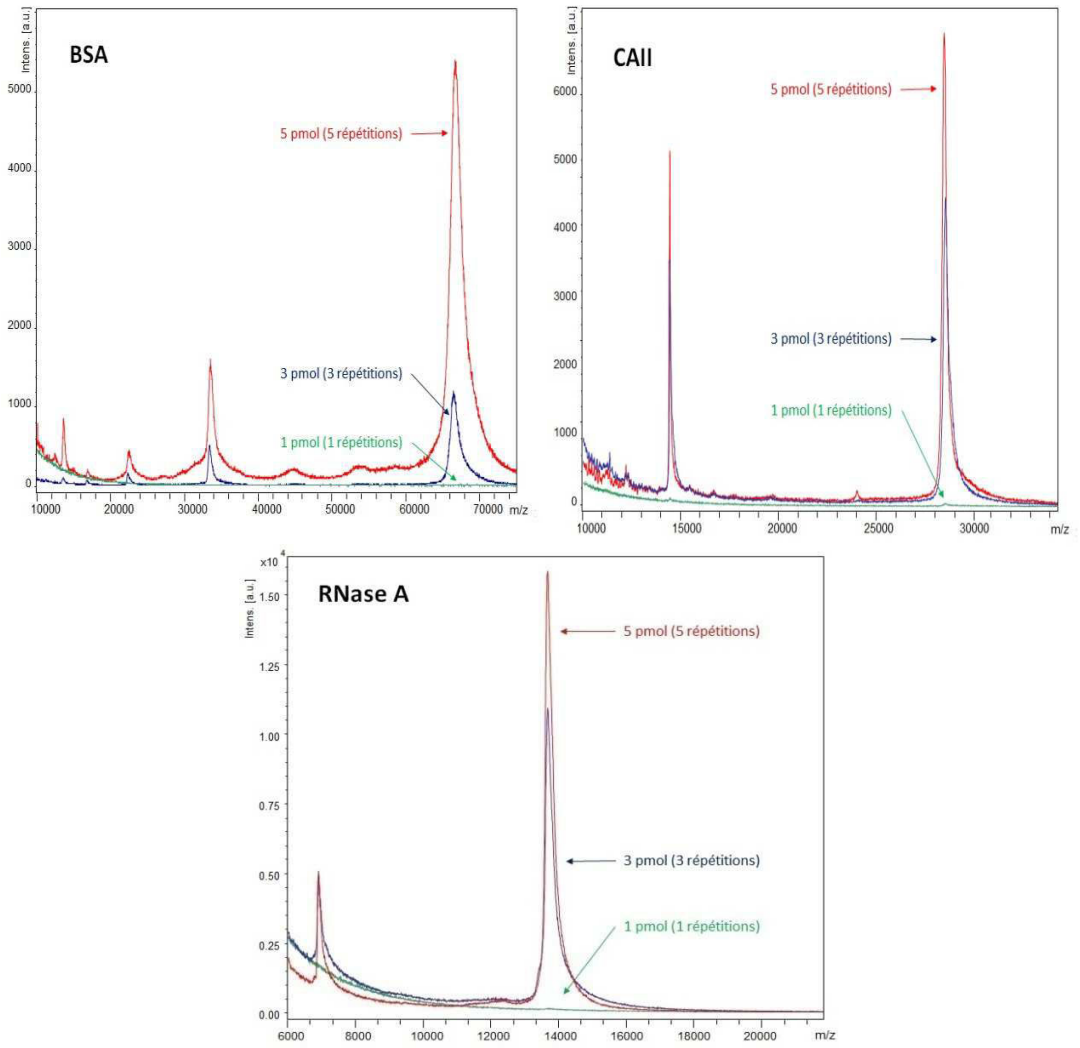


Figure 5. *Illustration de l'étude sur l'enrichissement de protéine. Superposition des spectres de masse des 3 protéines à 1, 3 et 5 répétitions ; Puissance laser : 71% Matrice : 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (saturé) dans du TA30 (0.1%TFA, 70% eau et 30% acétonitrile).*

L'analyse MALDI en mode linéaire montre une augmentation du signal à mesure que la fraction est enrichie. La première séparation montre une quasi-absence de signal pour toutes les protéines. Les résultats pour les études des 3 et 5 répétitions montrent une augmentation de signal ce qui corrèle l'augmentation d'analytes dans toutes les fractions. Il est intéressant de noter que cette augmentation est identique en proportion quelle que soit la nature de la protéine. Cette constatation confirme que le processus d'enrichissement s'est déroulé dans de bonnes conditions sans dénaturation de la séparation ni contamination inter-fraction.

Néanmoins, nous constatons que théoriquement, à la première séparation la quantité de 1pmol déposée devrait être suffisante pour être détectée par MALDI-TOF-MS. L'hypothèse principale retenue est qu'une partie des analytes sont perdus lors des étapes d'évaporation par SpeedVac et/ou lors de la reprise de l'extrait sec.

En effet, le volume de 2 µl est sans doute insuffisant pour récupérer la totalité de l'extrait sec sur les parois du cône Eppendorf. Néanmoins, l'analyse des différentes répétitions montre un enrichissement des fractions jusqu'à 5 pmol théorique. Les fractions contiennent chacune des protéines pures et dans des concentrations permettant l'analyse Top Down.

2.1.5. L'analyse Top Down.

La robustesse de la nouvelle interface CE-MALDI/MS, ainsi que la très bonne répétabilité de la séparation du mélange de 3 protéines a donné la possibilité de collecter et d'enrichir les fractions jusqu'à obtenir une quantité théorique de 5 pmol d'analytes par fraction. Nous avons pu voir qu'il était fort probable que cette quantité soit surévaluée du fait de possibles pertes lors du traitement de l'échantillon.

Cependant, pour l'étude à 5 répétitions, l'analyse MALDI-MS de chaque fraction montre la présence des protéines pures et concentrées. De ce fait, nous avons procédé à l'ISD en utilisant le spectromètre de masse en mode Réflectron. L'augmentation de la puissance laser à 72 % ainsi que l'utilisation d'une matrice chaude 2.5 DHB, nous a permis d'obtenir des spectres Top Down sur chaque fraction. Les résultats de l'analyse Top Down de la Rnase A sont représentés dans la figure 6.

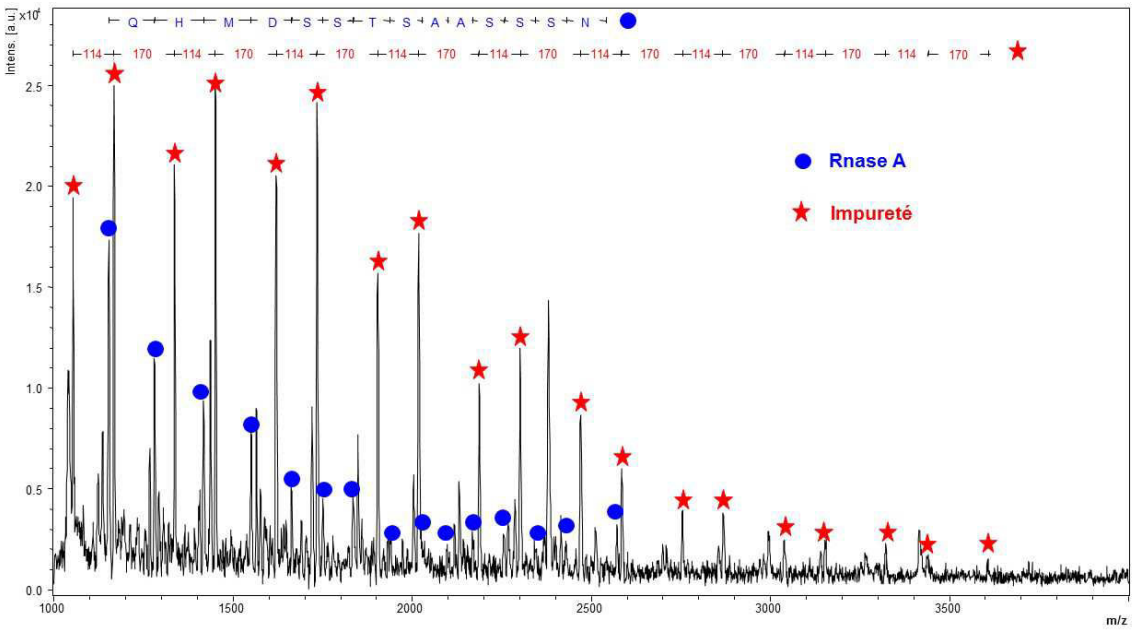


***Figure 6**. Spectre Top Down de la ribonucléase A (5pmol) contaminé par un polymère; Puissance laser : 71% Matrice : 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (saturé) dans du TA30 (0.1%TFA, 70% eau et 30% acétonitrile).*

La première chose que nous avons pu remarquer sur ce spectre Top Down de la RNase A est la présence de deux composés. En bleu figure le spectre de la Rnase A et en rouge une impureté.

L'impureté est absente lors de l'analyse seule de la protéine pure. Cette impureté a été retrouvée dans toutes les fractions. L'hypothèse retenue est un relarguage possible des plastiques. En effet, les différentes étapes partant de la séparation au dépôt font intervenir de nombreux polymères. Que ce soit le greffage HPC, la gaine de polyimide du capillaire ou des récipients (plaque PCR, Eppendorf), tous sont susceptibles de relarguer un polymère. Or, dans le chapitre II, nous avons vu qu'il n'y avait pas de dégradation du greffage du capillaire ni de la gaine polyamide.

Nous nous sommes donc tournés vers les plastiques des consommables. Ces consommables souvent composés de polypropylène ou de polystyrène Crystal sont connus pour relarguer des contaminants en présence de solvant[21,22,23]. En outre, malgré la présence du contaminant complexifiant le spectre, nous avons distingué une succession de pics correspondant à la fragmentation ISD de la RNase A. Chaque pic est espacé d'une différence de masse correspondant à un fragment de la protéine clivée

d’un acide aminé. La succession de ces différences nous permet de déterminer une partie d’une séquence correspondant à celle de la RNase A (figure 7.)

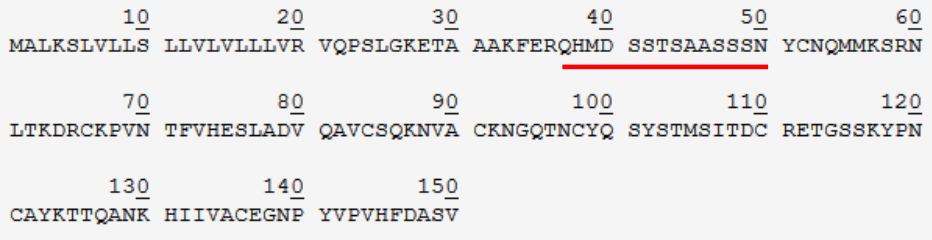


Figure 7. *Séquence Acides Aminés de Ribonucléase A bovine (source Uniprot) (en rouge la séquence identifiée par Top Down)*

Ces premiers résultats nous ont montré la faisabilité du processus séparation/collecte/enrichissement/Top Down sur le mélange de 3 protéines entières. Cependant, les autres protéines donnent des résultats similaires en terme d’impureté polymérique, mais malheureusement pas en terme de recouvrement de séquence.

Malgré cela, les résultats de la RNase A sont très encourageants. A la suite de ces résultats, nous avons décidé de reproduire notre protocole sur un mélange un peu plus complexe et d’éliminer au maximum les plastiques entraînant une contamination. De ce fait, nous avons décidé de reprendre les conditions de séparations de 5 protéines, décrites dans le chapitre II, qui utilisent des concentrations et une nature de BGE plus représentatif des séparations classiques de la CE. Concernant la nature du support, nous avons choisi d’enrichir directement sur plaque MALDI pour éliminer toutes sources de contaminations pouvant venir des plaques PCR et dans le même temps de simplifier le protocole chronophage d’évaporation et de reprise de l’échantillon.

2.2. Etude d'un mélange de 5 protéines.

Après les résultats encourageants de séparation, de collecte, d'enrichissement et d'analyse Top Down sur le mélange de 3 protéines, nous avons décidé de travailler sur un mélange un peu plus complexe représentant des échantillons plus couramment rencontrés. De plus, nous avons voulu tester la polyvalence de notre interface sur une séparation ayant une résolution et une efficacité plus représentative de la CE. Les conditions de séparations sont directement reprises du Chapitre II paragraphe 2.4. Les résultats ont montré une très bonne résolution et une très bonne répétabilité. Ces critères sont essentiels pour appliquer notre protocole d'enrichissement en vue de l'analyse Top Down.

2.2.1. Séparation, répétabilité et collection de fractions

Tous les résultats ont été décrits dans le chapitre II. La séparation des 5 protéines (figure 9.A) montre une bonne résolution, l'ordre de sortie des pics étant plus rapide. Les 4 premiers pics sortent en 20 minutes, avec des rapports signal sur bruit compris entre 6 et 52. La répétabilité sur 4 séparations successives a été évaluée à 0.5 % jusqu'à 3 % pour les derniers pics. Les mobilités entre les 3 premiers pics étant proches, un réajustement des paramètres de collection de fractions a été nécessaire pour correspondre aux contraintes de cette séparation.

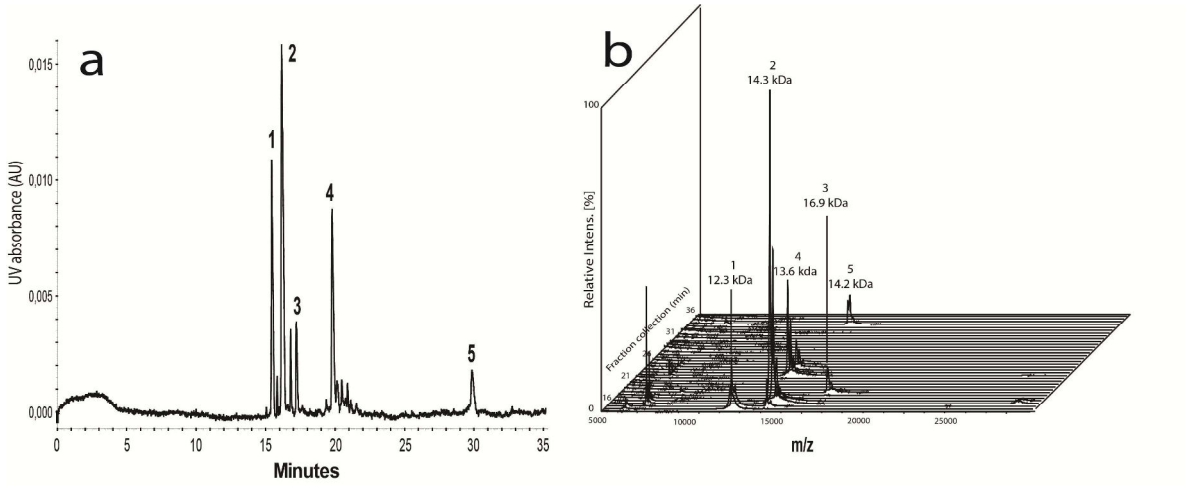


***Figure 8**. Electrophérogramme du mélange des 5 protéines [22].Conditions : Injection : 5kV 8 min ; tampon : 83 mM de force ionique d'une solution d'acétate d'ammonium à pH=4 ; Lt= 60 cm, ld= 53 cm, Φ = 50 µm ; greffage : HPC, UV à 200 nm, 25°C. (1) 40 nM Cyt c, (2) 40 nM Lys, (3) 50 nMMyo, (4) 50 nMRnase A and (5) 120 nM αLac dans l'eau.*

Afin d'éviter de contaminer les fractions avec le polymère retrouvé dans la séparation des 3 protéines, nous avons remplacé la plaque PCR par une plaque MALDI en acier inoxydable. Les paramètres de dépôt de fraction et de mélange de matrices ont été intégrés dans le module de dépôt. Une goutte de 2 µl de BGE a été pré-déposée à l'endroit de chaque spot. Cette goutte permet d'établir une jonction électrique entre la plaque MALDI et la sortie du capillaire. Cela évite les coupures pendant les phases de dépôts. Le débit de liquide additionnel a été réduit à 2 µL/min pour éviter les débordements d'un spot à l'autre. Les calculs de mobilités ont permis de s'assurer des fractionnements de la séparation. La première séparation / collecte a été analysée par MALDI-TOF MS. Les spectres ont confirmé, comme précédemment, la présence des protéines seules sur les spots respectifs. La figure 8.B issue du chapitre II montre les spectres de masse MALDI-TOF. Chaque spectre correspondant à une fraction, l'addition de tous les spectres donne un aperçu de la distribution des analytes sur les spots. La distribution est en totale adéquation avec la séparation électrophorétique (Figure 8.A). De plus, la singularité des pics de masses de chaque protéine montrent l'absence totale de contamination inter fraction et ceci malgré une séparation rapide. Ainsi, comme pour le mélange de 3 protéines, la séparation et la collecte de fraction répétables permettent l'enrichissement progressif des fractions déposées sur plaque MALDI.

2.2.2. L'enrichissement

L'enrichissement a été effectué en déposant successivement 3 séparations sur les mêmes dépôts. De cette façon, les mêmes analytes sont déposés au même endroit. Grâce à la répétabilité de la séparation et à la robustesse de la nouvelle interface, des séparations successives ont été collectées à des intervalles permettant la récupération totale de la protéine. Comme expliqué précédemment, les fractions ont été effectuées directement sur la plaque MALDI. Une fois les séparations successives déposées, nous avons procédé au mélange avec 2µl de matrice à l'aide du système de distribution intégrée (décrit au chapitre II). La plaque a été déposée dans un dessiccateur pour accélérer l'évaporation et uniformiser les cristaux du mélange analytes/matrice. Les fractions ont été analysées à une répétition et 3 répétitions pour mettre en évidence l'augmentation successive des concentrations. Les résultats pour les 5 protéines sont représentés figure 9.

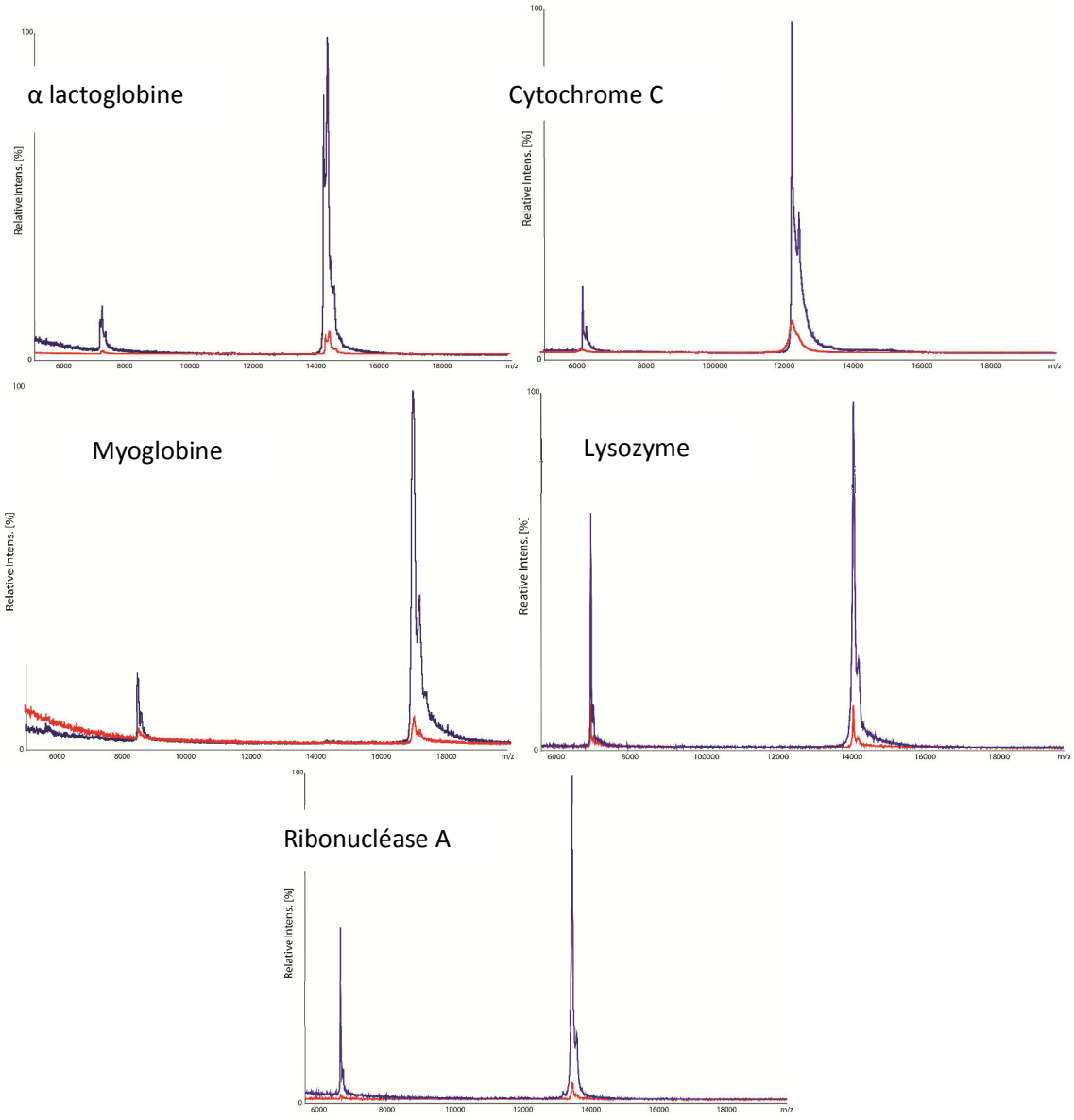


Figure 9. *Illustration de l'étude sur l'enrichissement de protéine. Superposition des spectres de masse des 5 protéines à 1 (Rouge) et 3 (Bleu) répétitions ; Puissance laser : 71% Matrice : 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (saturé) dans du TA30 (0.1%TFA, 70% eau et 30% acétonitrile).*

L'analyse MALDI en mode linéaire montre une augmentation successive à mesure qu'on enrichit la fraction. La première séparation montre un signal peu intense sur toutes les protéines, alors que l'étude de 3 répétitions montre une augmentation de signal qui traduit l'enrichissement d'analytes dans toutes les fractions et ceci dans les mêmes proportions. Ces constations confirment que le

processus d'enrichissement s'est déroulé dans de bonnes conditions sans dénaturation de la séparation ni contamination inter-fraction. Néanmoins, l'analyse de la première séparation de collecte montre un spectre caractérisant la présence des protéines dans chaque fraction. Nous remarquons que ce signal est significatif en comparaison du signal du premier dépôt pour l'analyse des 3 protéines. En effet, lors du premier dépôt, aucun signal n'avait été détecté.

L'hypothèse principale retenue est que la collecte de fraction directement sur plaque MALDI permet de déposer la majeure partie des analytes. Les diverses étapes d'évaporation et de reprise de l'extrait sec sont donc responsables d'une perte significative d'analytes. De ce fait, la stratégie de dépôt direct sur plaque supprime les biais pouvant compromettre l'analyse. L'analyse de la 3ème répétition montre l'enrichissement des fractions caractérisé par l'augmentation significative du signal dans toutes les fractions. Cependant, l'intensité des pics est comparable à celle retrouvée lors de l'analyse des 5 répétitions du mélange des 3 protéines. Ainsi, la présence des protéines pures et dans des concentrations élevées permet de procéder à l'analyse Top Down de chaque fraction.

2.2.3. L'analyse Top Down.

La robustesse de la nouvelle interface CE-MALDI/MS ainsi que la très bonne répétabilité de la séparation du mélange de 5 protéines a donné la possibilité de collecter et d'enrichir les fractions jusqu'à l'obtention d'une concentration conséquente d'analytes par fraction. L'analyse MALDI de chaque fraction montre la présence des protéines pures et concentrées. De ce fait, nous avons procédé à l'analyse par ISD de chaque fraction. L'augmentation de la puissance laser à 72 % ainsi que l'utilisation d'une matrice chaude 2.5 DHB nous a permis d'obtenir des spectres Top Down sur chaque fraction. L'analyse Top Down des protéines Rnase A, Lyso, et Cyt C est représentée respectivement sur la figure 10 A, B, C.

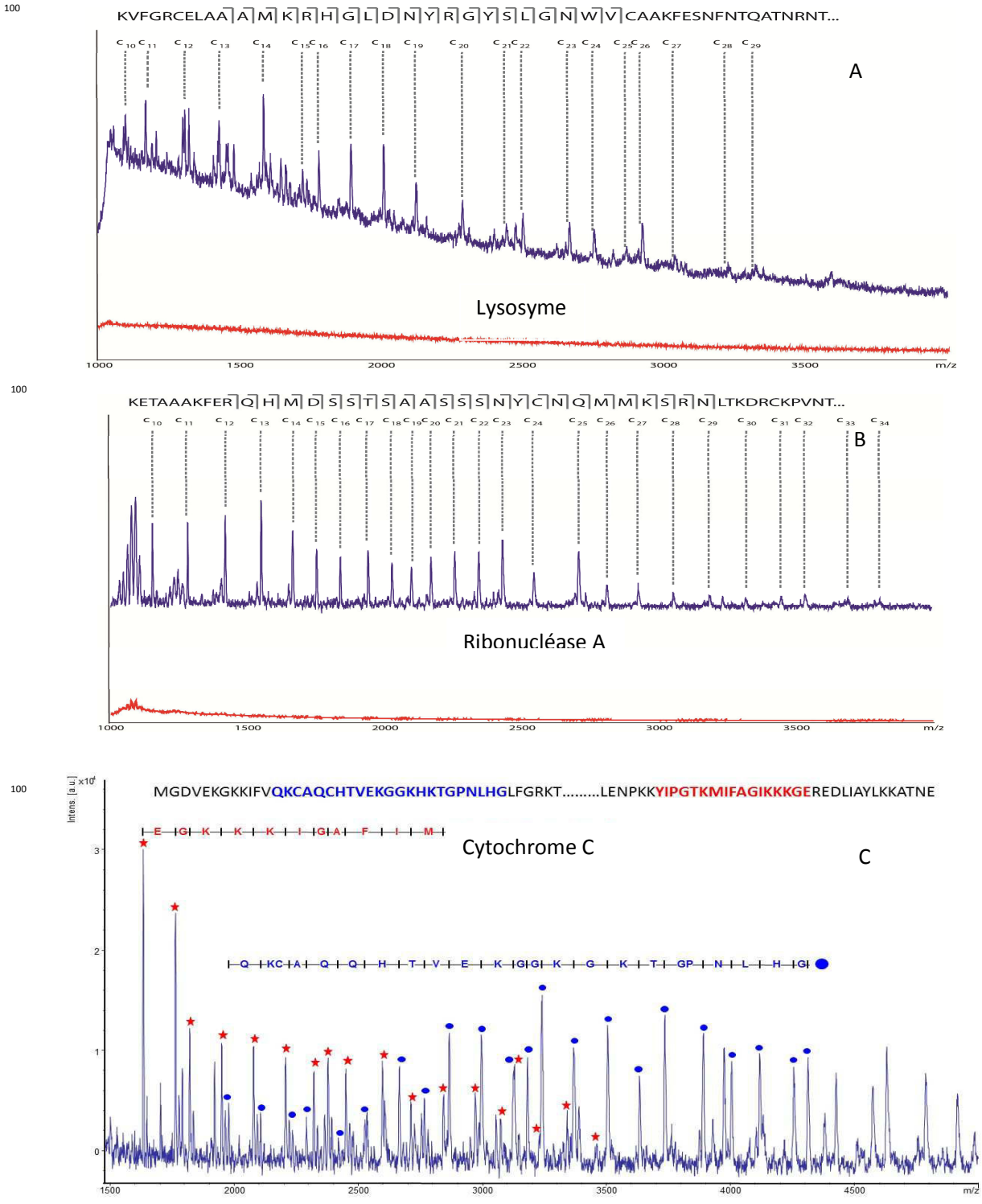


Figure 10. *Spectre Top Down A, B et C respectif de la lysosyme, ribonucléase A et Cytochrome C (5pmol); Puissance laser : 71 % Matrice : 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (saturé) dans du TA30 (0.1%TFA, 70% eau et 30% acétonitrile). En Rouge sur analyse du premier dépôt et En Bleu Après enrichissement.*

Tout d'abord, l'analyse Top Down des protéines Myo et αLac n'a donné aucun spectre Top Down malgré l'enrichissement des dépôts. Les hypothèses retenues sont que αLac a la mobilité électrophorétique la plus faible donc le temps d'injection électrocinétique est trop court pour avoir une concentration suffisante. L'absence du spectre Top Down de myoglobine proviendrait d'une mauvaise réponse à l'ISD ou d'une concentration insuffisante. Des études avec des enrichissements supplémentaires ou avec d'autres matrices chaudes sont prévues afin d'éliminer ces hypothèses.

Pour les autres protéines, les spectres Top Down ont permis d'identifier 20 AA pour la Lys, 25 AA pour la Rnase A, et 39 pour le Cyto C. Les séquences identifiées sont retrouvées dans les séquences complètes des différentes protéines (figure 11).

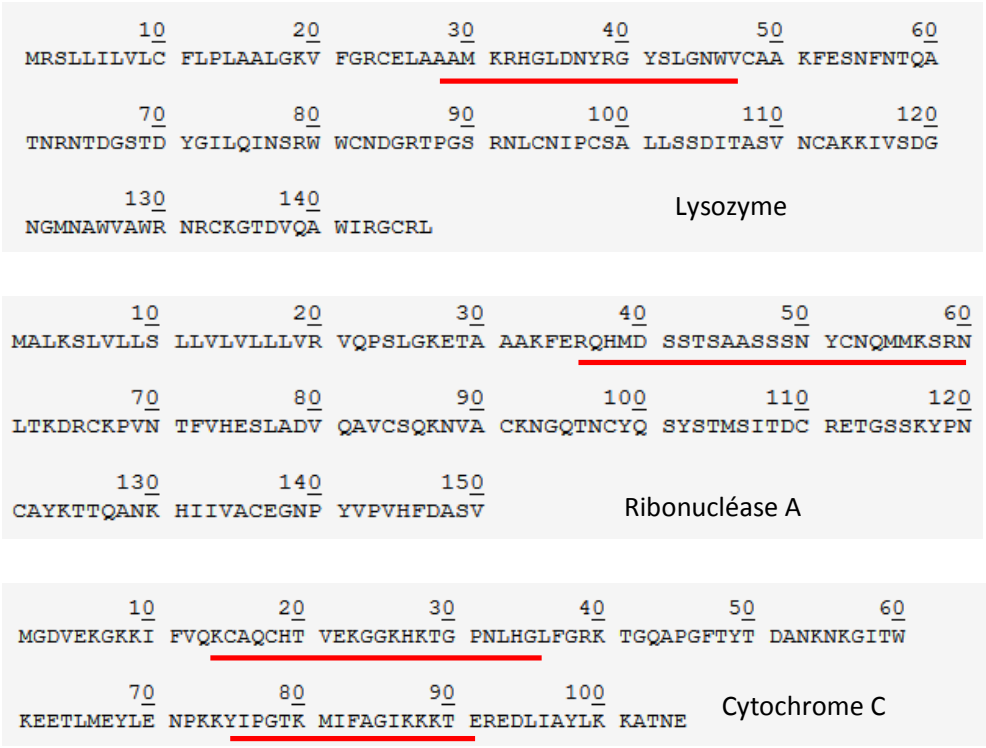


***Figure 11**. Séquence Acides Aminés de Lysozyme, Ribonucléase A et Cytochrome C (source Uniprot) (en rouge la séquence identifiée par Top Down)*

Les spectres ne présentent aucun pic de contaminant prouvant que le polymère provient du traitement des fractions lors de la séparation en plaque PCR. L'intensité des spectres permet d'identifier les séquences sans ambigüité. La majorité des protéines a très bien répondu à l'ISD, ceci malgré l'augmentation conjointe d'ions apportés par le BGE et les analytes.

Ces résultats nous confortent dans la stratégie d'enrichissement pour l'analyse Top Down. En effet, quel que soit le support, les résultats prouvent que la stratégie d'enrichissement de dépôt MALDI par séparation et dépôts successifs permettent d'atteindre des concentrations favorables à l'ISD et à l'analyse Top Down. L'enrichissement nous permet donc d'obtenir des concentrations d'analytes impossibles à atteindre en une seule injection. Ainsi, l'enrichissement permet de conserver la capacité séparative de la CE surtout pour des séparations de protéines entières.

Ces résultats sont dans la parfaite continuité du chapitre II. L'utilisation du couplage CE/MALDI-MS pour la caractérisation par Top Down de protéines entières ouvre la voie à de nombreuses applications biologiques avec notamment l'étude de protéines de haut poids moléculaire.

En effet, la stratégie d'analyse Top Down après collecte et enrichissement a montré de très bons résultats sur des protéines modèles. Dans le but d'aller sur des protéines plus complexes, nous avons tenté d'adapter ce système à l'analyse Top Down de biomolécules de haut poids moléculaire : les mAbs. Dans le chapitre II, nous avons démontré que le système CE/MALDI-MS permettait de séparer et de détecter différents variants de charges d'un mAb entier. En dépit de l'absence de résolution du MALDI-MS ne permettant pas d'identifier les différents isoformes, la qualité de séparation ainsi que la stratégie d'enrichissement peuvent permettre une caractérisation fine du mAb par approche Top Down. Cependant, les mAbs sont des biomolécules de haut poids moléculaire (environs 150 kDa). Cela représente un défi très dur à relever pour notre stratégie car le système a été évalué sur des molécules inférieures à 20 kDa. C'est la raison pour laquelle, nous avons décidé dans un premier temps de travailler sur un digestat IdeS de mAb permettant l'obtention de deux fragments de l'anticorps : le F(ab')2 de 97 kDa et le Fc/2 de 25 kDa.

2.3. Etude du digestat IdeS de Cetuximab.

Tout d'abord, il est à noter que ces travaux ont été effectués en fin de doctorat. Cela représente une étude préliminaire de la caractérisation par Top Down de fragment IdeS de Cetuximab à l'aide du couplage CE/MALDI-MS. Concernant les conditions de séparation, celles-ci ont été mises au point lors de l'étude de la séparation de mAbs entiers avec infusion nanospray. Pour des raisons purement logistique, cette étude a été réalisée avant l'approche Top Down par CE/MALDI-MS, mais sera décrite dans le chapitre suivant. Nous n'allons donc pas détailler à nouveau l'optimisation des conditions qui sera expliquée dans le chapitre IV. Les conditions sélectionnées sont : BGE BI EACA/$AcNH_4$, 200mM/25 mM pH 5,7 et BGE B0 $AcNH_4$ 50 mM pH 5,7.

Pour cette étude, nous avons sélectionné Cetuximab. Ce mAb est approuvé par les agences de régulations Européennes (EMEA) et Américaines (FDA) et est souvent pris comme modèle, car extrêmement décrit dans la littérature[24].Cetuximab est une IgG2 caractérisée par 18 ponts disulfures. Parmi les PTMs entrant en jeu dans le processus de reconnaissance avec l'antigène, on peut noter une cyclisation de l'acide glutamique en N-terminal de la HC et quatre déamidations d'asparagine. Par ailleurs, Cetuximab possède deux sites de glycosylation, une sur HC et l'autre sur LC. Lors de notre expérience, Cetuximab a été digéré à l'aide d'une enzyme appelée IdeS qui coupe spécifiquement la protéine lorsqu'il y a présence de l'enchainement de deux Glycines. L'action de l'IdeS, sans réduction des ponts disulfure, coupe le mAb en deux fragments distincts : le F(ab')2 (97 kDa) et le FC/2 (25 KDa).

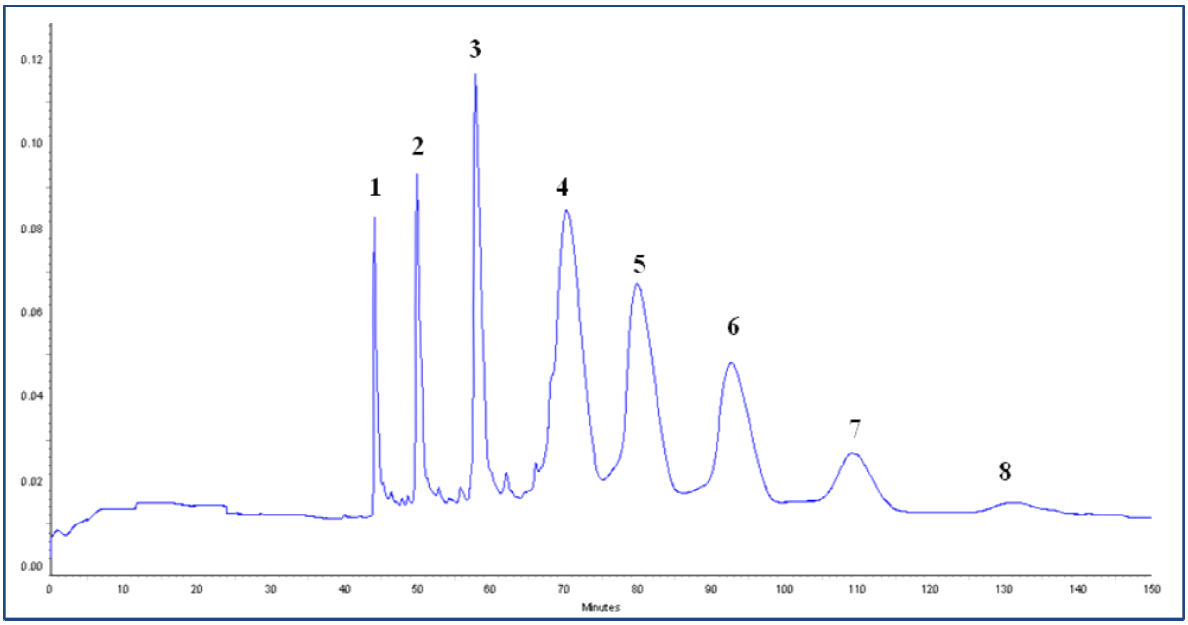


Figure 12. *Electrophérogramme du Cetuximab digéré à l'IdeS. Conditions : Injection hydrodynamique 0.5 psi 20 sec, Lt= 60 cm ld= 50 cm Φ = 75 µm, greffage : HPC ; détection UV à 200 nm ; 25°C.*

L'électrophérogramme présenté figure 12, correspondant à la séparation d'un échantillon de digestat IdeS de Cetuximab 1 g/L, montre 8 pics distincts. Le profil de cette séparation, avec retour à la ligne de base entre chaque pic, permet une collection de fractions sans risque de contamination. Les analytes ont été déposés directement sur la plaque MALDI à l'instar du mélange des 5 protéines. L'enrichissement a été effectué en dix répétitions d'une injection correspondant à 1 pmol injecté afin d'obtenir une quantité finale théorique de 10 pmol. La matrice DHB a été déposée manuellement après dépôt de la dernière répétition. Ce dépôt a fait l'objet d'une optimisation afin d'obtenir une bonne cristallisation du mélange échantillon/matrice. L'analyse MALDI-MS a été effectuée sur les différents spots en mode linéaire.

2.3.1. Optimisation du dépôt de la matrice

Le principal inconvénient des conditions de séparation pour une étude en MS est la forte concentration en EACA dans le BGE d'entrée BI. En effet, malgré une optimisation des conditions de séparation permettant l'élimination de ce composé dans le BGE de sortie BO (optimisation décrite

dans le chapitre IV), la forte concentration en EACA peut gêner la cristallisation de l'échantillon avec la matrice surtout lors des phases d'enrichissement. Une étape de dessalage à l'aide d'un Microcon Ultracell 10 KDa a donc été appliquée à chaque fraction avant étude en MALDI. La figure 13 représente le dépôt des trois premières fractions avec (cercle rouge) et sans (cercle bleu) étape de dessalage.

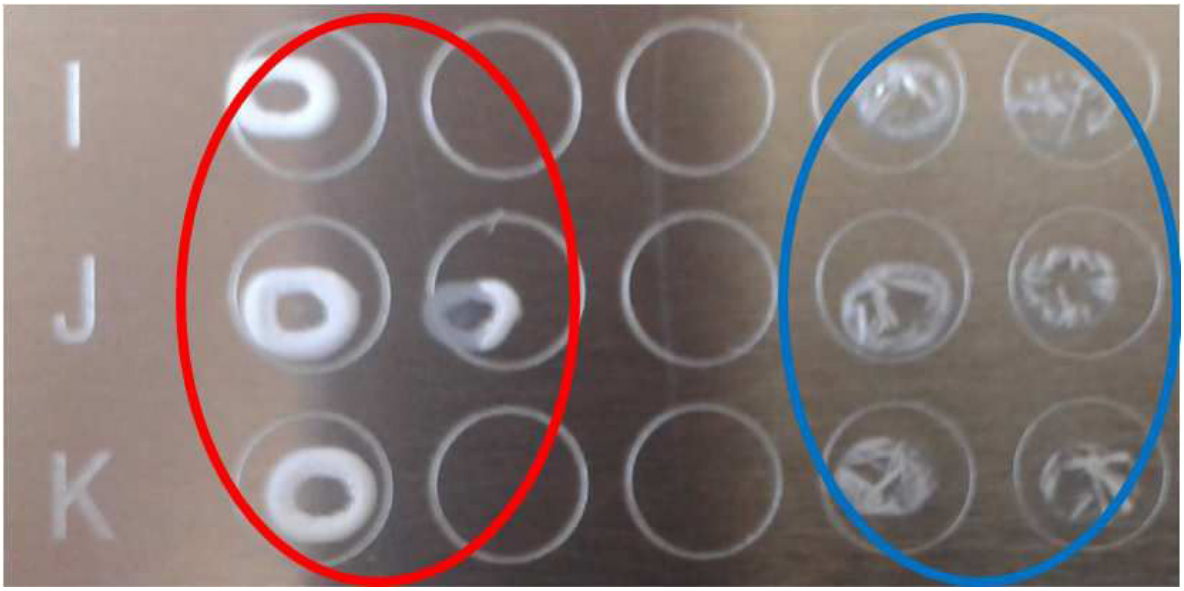


***Figure 13**. Photographie des dépôts MALDI goutte séchée avec DHB avant (rouge) et après dessalage (bleu)*

Il est à noter la grande différence de cristallisation des deux types de dépôt. Avec présence d'EACA, l'étape de cristallisation est lente et forme une couche blanche uniforme alors qu'avec une étape de dessalage éliminant l'EACA, la cristallisation est caractéristique d'un dépôt goutte séchée avec de la matrice DHB. Nous avons donc conclu que, malgré la possible perte d'échantillon, l'étape de dessalage était obligatoire dans notre méthode.

2.3.2. L'analyse MALDI-MS.

L'analyse MALDI-MS de chaque dépôt a été réalisée en mode linéaire. Dans le but de confirmer l'étape de dessalage, nous avons effectué l'analyse des dépôts avec et sans dessalage. Les résultats correspondant au pic 1 de la séparation électrophorétique sont représentés figure 14. Ces spectres sont représentatifs des résultats obtenus sur chaque duo de dépôt. Nous pouvons voir que la qualité

du spectre MS du dépôt ayant subi une étape de dessalage est bien meilleure que le dépôt sans dessalage. En effet, le spectre MS du dépôt sans dessalage (spectre en rouge sur la figure 14) est de forme « patatoïde » et ne permet pas de mesurer une masse à l'apex du pic. De plus, nous pouvons remarquer un fort décalage du pic vers les masses inférieures à 22 kDa ce qui n'est absolument pas en accord avec la masse théorique proche de 24 kDa. Le spectre noir correspondant au dépôt avec dessalage présente un profil classique avec une masse supérieure à 24 kDa. Cela confirme donc que ce traitement de l'échantillon est impératif.

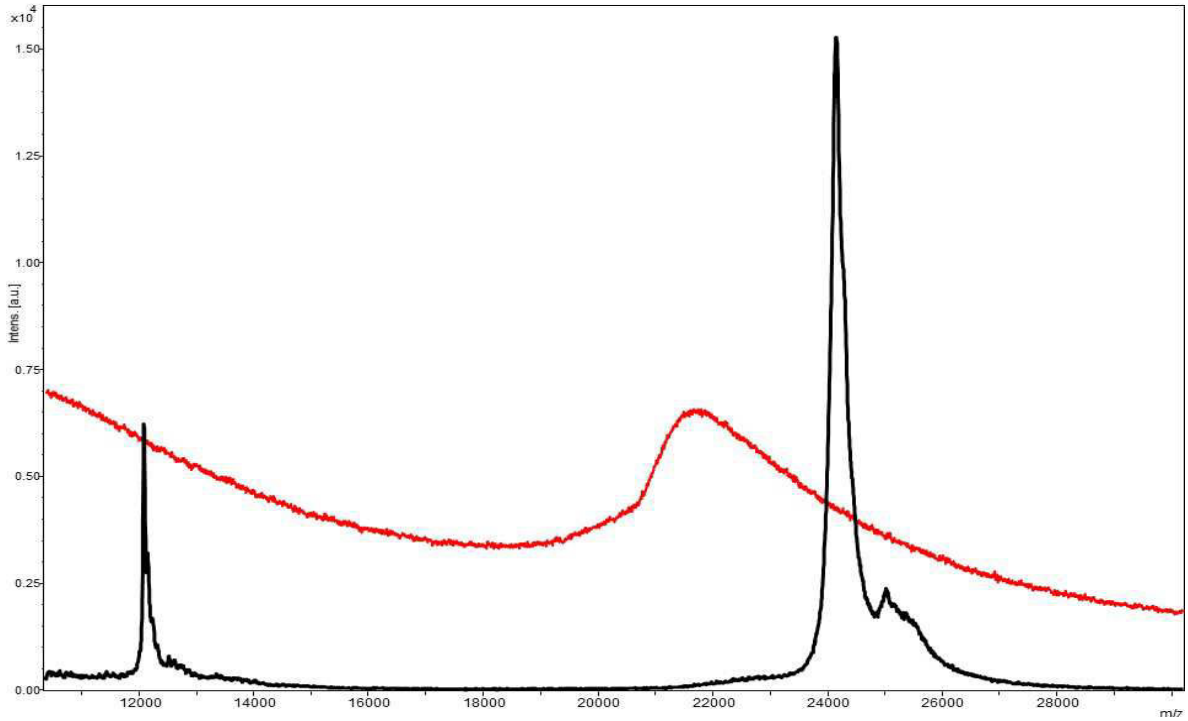


***Figure 14**. Spectre MALDI de la fraction comprenant le pic 1 sur la séparation électrophorétique de Cetuximab IdeS. Dépôt goutte séchée avec DHB avant dessalage (rouge) et après dessalage (noir)*

Les spectres MS obtenus sur les dépôts (figure 15) ayant subi un dessalage ont permis d'identifier les masses des 6 premiers pics de l'électrophérogramme.

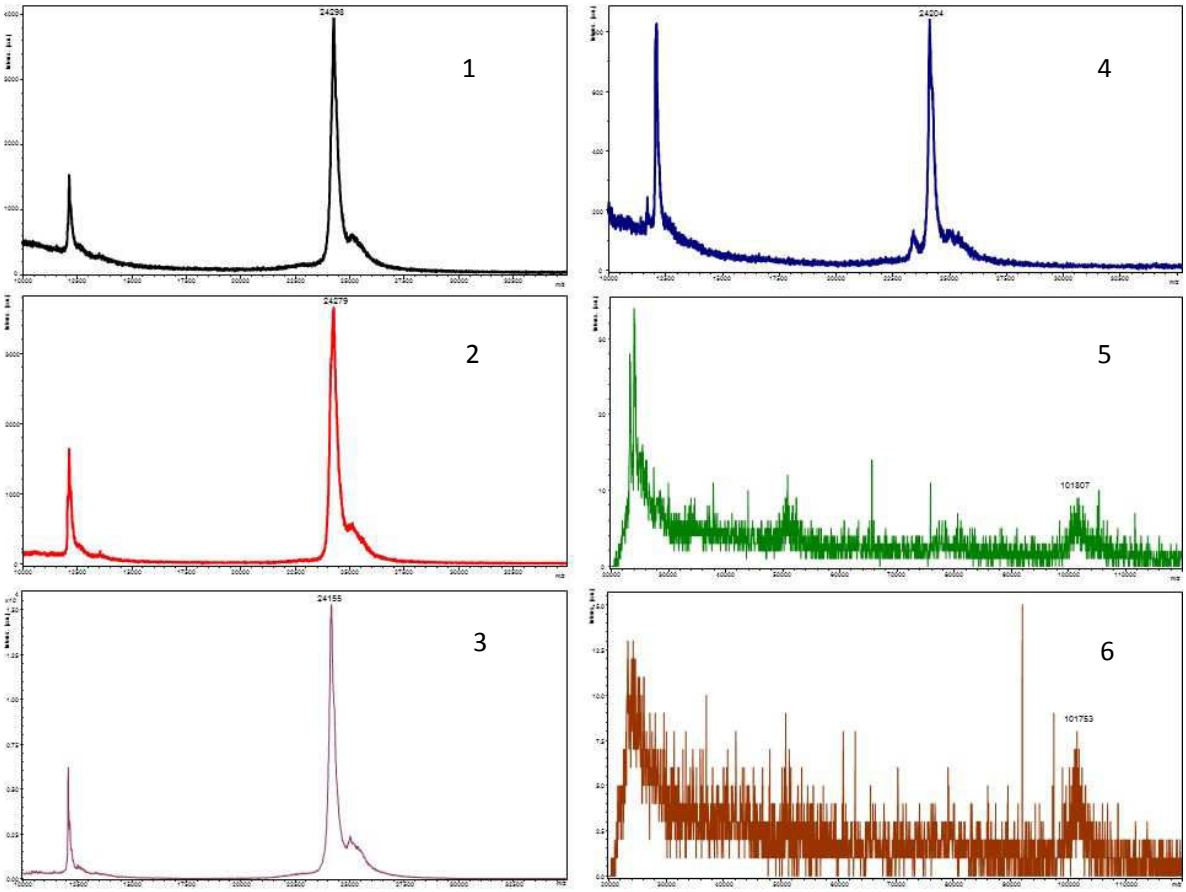


Figure15. *Spectres de masse des fractions collectées. 3 répétitions de collecte pour les pics 1 à 6 Mode Linéaire Puissance laser : 70 %, addition de 3000 tirs Matrice : 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) saturé dans du TA30.*

Les fractions 1 à 4 contiennent respectivement des analytes de masses 24298, 24279,23155, 24204Da qui correspondent aux masses approximatives de sous-unités Fc/2. Les fractions 5 et 6 contiennent des pics supérieurs à 101 000 Da pouvant correspondre au variant de F(ab')2 avec une forte erreur de calibration. Ceci laisse à penser que le pouvoir résolutif de la CE permet de séparer quatre groupes d'isoformes correspondant à la Fc/2 et au moins deux groupes d'isoformes correspondant au fragment F(ab')2.

Malheureusement, les faibles intensités et les résolutions des pics ne permettent pas de donner des masses précises des différents isoformes. L'ensemble des pics de la séparation électrophorétique sont donc partiellement identifiés. Néanmoins, l'analyse des spectres MALDI-MS montre encore une fois le bon déroulement du processus d'enrichissement avec la présence d'analytes relativement purs dans

les différentes fractions. La stratégie Top Down apparait comme une solution pour caractériser ces différentes fractions.

2.3.3. L'analyse Top Down.

Les résultats obtenus précédemment sur la séparation des quatre groupes d'isoformes du fragment Fc/2 combinés à la quantité matière de 10 pmol théorique réalisée à l'aide de l'enrichissement nous ont donc permis d'effectuer une étude Top Down des différents dépôts. Comme précédemment, l'étude a été réalisée sur les dépôts ayant subi ou non un dessalage (figure 16.)

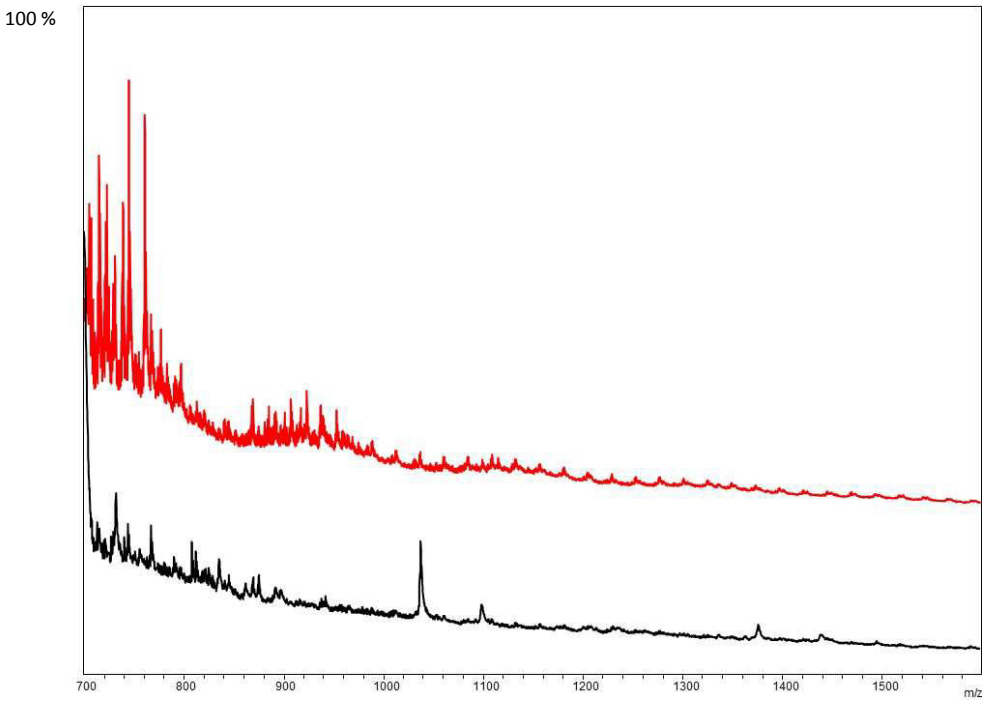


***Figure 16**. Spectre Top Down de la fraction comprenant le pic 1 sur la séparation électrophorétique de Cetuximab IdeS. Dépôt goutte séchée avec DHB Avant dessalage (rouge) et après dessalage (noir.)*

Les résultats correspondant au pic 1 sont représentés figure 15. Ces spectres sont représentatifs des résultats obtenus sur chaque duo de dépôt. Nous pouvons voir que les profils des spectres Top Down des deux dépôts sont totalement différents. En présence d'EACA (spectre rouge), deux massifs de pics ne correspondant pas à la protéine masquent potentiellement les fragments du Cetuximab. De plus, un profil répétitif tout au long du spectre, laisse à penser à la présence d'un polymère tout au long du spectre. En revanche, ce profil disparait totalement sur le spectre noir correspondant au spectre du dépôt avec étape de dessalage. Les deux massifs de pics ont aussi disparu laissant place à d'autres pics sur le spectre. Cela confirme encore que ce traitement de l'échantillon est impératif. Malheureusement, aucune caractérisation n'a pu être réalisée, car les pics des spectres Top Down des dépôts dessalés n'ont pas pu être attribués. De plus, des pics de masses identiques ont été retrouvés pour chaque fraction ne permettant donc pas de mettre en évidence des différences entre les fractions. Ces résultats préliminaires sont donc extrêmement encourageants mais demandent d'autres expérimentations comme une augmentation de l'enrichissement des fractions afin d'être sûr de la quantité suffisante d'échantillon pour réaliser la caractérisation Top Down. Ces expériences sont actuellement en cours de réalisation au laboratoire.

3. Conclusion

Lors ce travail, nous avons réalisé le premier système de collection de fractions et d'enrichissement par électrophorèse capillaire pour l'analyse Top Down de protéines entières. Cette stratégie inédite a été mise au point en utilisant le premier couplage CE-UV/MALDI-MS/MS avec un système de dépôt de matrice totalement automatisé. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur la capacité de la nouvelle interface à collecter les analytes en sortie de capillaire et ceci de manière très précise. La possibilité de suivre en temps réel la séparation électrophorétique grâce à la cellule UV déportée nous a donné la possibilité de programmer le déclenchement des collectes de fractions en fonction des mobilités des différents analytes. La polyvalence de la nouvelle interface donne la possibilité de déposer des analytes dans différents supports de collecte comme une plaque PCR ou directement sur plaque MALDI. Pour cela nous nous sommes basés sur l'ergonomie de la nouvelle interface afin qu'elle soit complètement paramétrable avec l'activation ou non de la distribution de matrice en fonction du type de support. Ensuite, nous avons utilisé les capacités résolutives de la CE pour la séparation des protéines entières (10 kDa à 100 kDa) dans le but de les séparer et de les collecter et ce, de manière très répétitive. La bonne répétabilité nous permet alors d'enrichir pour atteindre des concentrations choisies en vue de l'analyse Top Down nécessitant pureté et concentration d'analyte. Dans le but de réaliser notre stratégie, nous avons tout d'abord travaillé sur une séparation d'un mélange simple et très résolutif de 3 protéines modèles. La séparation effectuée dans des conditions électrophorétiques relativement simples a permis de tester la répétabilité du processus de dépôt. Les performances (RSD < 2%) compatibles avec des dépôts successifs ont donné la possibilité de multiplier les séparations dans le but de déposer et enrichir les fractions en analytes d'intérêt jusqu'à atteindre une quantité théorique de 5 pmol par protéine. Pour évaluer le bon déroulement de l'enrichissement, nous avons séparé et collecté les protéines dans les puits d'une plaque PCR. L'enrichissement a été effectué afin d'obtenir une concentration suffisante pour établir un spectre Top Down. L'analyse des fractions en cours d'enrichissement montre une augmentation significative à chaque processus de dépôt pour chaque fraction tout en gardant les analytes pures. Une fois les dépôts enrichis, l'analyse Top Down de la fraction contenant la ribonucléase A a pu être effectuée et a montré l'obtention d'un spectre permettant la détection de 14 résidus correspondant à une partie de la séquence de la protéine. La qualité du spectre d'un point de vue de résolution et d'intensité a permis d'identifier la protéine sans ambiguïté et ceci malgré une perte d'analyte et la contamination d'un polymère. Ce sont ces résultats

très encourageants qui nous conforté dans le fait de réitérer la stratégie sur un mélange plus complexe de 5 protéines modèles dans des conditions électrophorétiques différentes en terme de nature de BGE, de concentration d'échantillons (qq nM) et de résolutions reflétant les capacités de la CE. De plus, dans le but, de réduire les pertes d'analytes et surtout la contamination du polymère, les étapes de retraitement des fractions ont été éliminées en effectuant la collecte et l'enrichissement directement sur plaque MALDI. Le dépôt sur plaque été rendu possible par la polyvalence de la nouvelle interface CE/MALDI et sa distribution automatisée de matrice. Comme pour le mélange des 3 protéines, l'analyse MALDI-MS des dépôts a montré l'enrichissement des fractions à chaque dépôt successif mais aussi l'absence de perte d'analytes et surtout la disparition complète du contaminant. Mais plus important, les analyses Top Down effectuées sur les dépôts enrichis ont permis de reconnaître sur chaque dépôt 20 à 40 résidus en fonction de la protéine étudiée. Ces résultats significatifs ont permis de reconnaitre sans ambiguïté analytique la séquence peptidique spécifique de la protéine. Enfin, devant la problématique des techniques classiques pour l'analyse par Top Down d'un mélange de variants de mAbs, nous avons appliqué notre stratégie sur un échantillon de Cetuximab partiellement digéré. Cette stratégie a non seulement montré la possibilité de séparer des chaînes polypeptidiques de 25 kDa à 100 Kda en fonction de modifications post traductionnelles mais surtout d'enrichir ces polypeptides jusqu'à atteindre des concentrations théoriques de 10 pmol susceptibles de déclencher l'ISD et donc l'obtention de spectres Top Down. Cependant, des analyses complémentaires sont actuellement en cours afin d'éliminer les résidus de sels amenés par la séparation et l'enrichissement et qui dénaturent les spectres Top Down. Néanmoins les résultats partiels ont tout de même permis d'identifier sans ambiguïté la nature des différents pics visibles sur la séparation électrophorétique de Cetuximab partiellement digérée avec la confirmation d'au moins quatre groupes d'isoformes de Fc/2 et deux groupes d'isoformes pour F(ab')2. Enfin, ce nouveau protocole, inédit et original pour l'analyse Top Down par séparation, collection et enrichissement de fraction grâces à la nouvelle interface CE/MALDI-MS, se révèle comme une stratégie robuste pour l'analyse d'une ou plusieurs protéines d'intérêts dans un mélange complexe, mais surtout comme une piste sérieuse pour la caractérisation des mAbs entiers.

[1]Aaron A. KLAMMER et Michael J. MACCOSS, « Effects of Modified Digestion Schemes on the Identification of Proteins from Complex Mixtures », *Journal of Proteome Research*, mars 2006, vol. 5, n° 3, pp. 695‑700.

[2]John R. YATES, Cristian I. RUSE et Aleksey NAKORCHEVSKY, « Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications », *Annual Review of Biomedical Engineering*, août 2009, vol. 11, n° 1, pp. 49‑79.

[3]Neil L. KELLEHER, Hong Y. LIN, Gary A. VALASKOVIC, David J. AASERUD, Einar K. FRIDRIKSSON et Fred W. MCLAFFERTY, « Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry », *Journal of the American Chemical Society*, février 1999, vol. 121, n° 4, pp. 806‑812.

[4]Da REN, Gary D. PIPES, Dingjiang LIU, Liang-Yu SHIH, Andrew C. NICHOLS, Michael J. TREUHEIT, David N. BREMS et Pavel V. BONDARENKO, « An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins », *Analytical Biochemistry*, 392-1, 1 septembre 2009, p. 12‑21.

[5]Gavin E. REID et Scott A. MCLUCKEY, « 'Top down' protein characterization via tandem mass spectrometry », *Journal of Mass Spectrometry*, 1 juillet 2002, vol. 37, n° 7, pp. 663‑675.

[6]YING GE, BRIAN G. LAWHORN, MARIAM ELNAGGAR, ERICK STRAUSS, JOO-HEON PARK, and TADHG P. BEGLEY et Fred W. MCLAFFERTY*, « Top Down Characterization of Larger Proteins (45 kDa) by Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry », 5 janvier 2002 (URL complète en bibliographie, consulté le 1 juillet 2014).

[7]D. C. REIBER, T. A. GROVER et R. S. BROWN, « Identifying proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization in-source fragmentation data combined with database searching », *Analytical Chemistry*, 15 février 1998, vol. 70, n° 4, pp. 673‑683.

[8]Detlev SUCKAU et Anja RESEMANN, « T3-sequencing: targeted characterization of the N- and C-termini of undigested proteins by mass spectrometry », *Analytical Chemistry*, 1 novembre 2003, vol. 75, n° 21, pp. 5817‑5824.

[9]David CALLIGARIS, Claude VILLARD et Daniel LAFITTE, « Advances in top-down proteomics for disease biomarker discovery », *Journal of Proteomics*, 10 juin 2011, vol. 74, n° 7, pp. 920‑934.

[10]Plamen A. DEMIREV, Andrew B. FELDMAN, Paul KOWALSKI et Jeffrey S. LIN, « Top-Down Proteomics for Rapid Identification of Intact Microorganisms », *Analytical Chemistry*, novembre 2005, vol. 77, n° 22, pp. 7455‑7461.

[11]Anja RESEMANN, Dirk WUNDERLICH, Ulrich ROTHBAUER, Bettina WARSCHEID, Heinrich LEONHARDT, Jens FUCHSER, Katja KUHLMANN et Detlev SUCKAU, « Top-Down *de Novo* Protein Sequencing of a 13.6 kDa Camelid Single Heavy Chain Antibody by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight/Time-of-Flight Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 15 avril 2010, vol. 82, n° 8, pp. 3283‑3292.

[12]Han ZHANG et Ying GE, « Comprehensive Analysis of Protein Modifications by Top-down Mass Spectrometry », *Circulation. Cardiovascular Genetics*, décembre 2011, vol. 4, n° 6, p. 711.

[13]John R. YATES, Cristian I. RUSE et Aleksey NAKORCHEVSKY, « Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications », 10 juillet 2009, http://dx.doi.org/10.1146/annurev-bioeng-061008-124934 (URL complète en bibliographie, consulté le 3 juillet 2014).

[14]Irina NEVEROVA et Jennifer E. VANEYK, « Role of chromatographic techniques in proteomic analysis », *Proteomic Databases Part III*, 5 février 2005, vol. 815, n° 1–2, pp. 51‑63.

[15]Wei-Jun QIAN, Jon M. JACOBS, Tao LIU, David G. CAMP et Richard D. SMITH, « Advances and Challenges in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-based Proteomics Profiling for Clinical Applications », *Molecular & Cellular Proteomics*, 1 octobre 2006, vol. 5, n° 10, pp. 1727‑1744.

[16]Anna Laura CAPRIOTTI, Chiara CAVALIERE, Patrizia FOGLIA, Roberto SAMPERI et Aldo LAGANÀ, « Intact protein separation by chromatographic and/or electrophoretic techniques for top-down proteomics », *Journal of Chromatography. A*, 9 décembre 2011, vol. 1218, n° 49, pp. 8760‑8776.

[17]Leonie F. Waanders BORIS MACEK, « Top-down protein sequencing and MS3 on a hybrid linear quadrupole ion trap-orbitrap mass spectrometer. », *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2006, vol. 5, n° 5, pp. 949‑58.

[18]Mi Jin XUEMEI HAN, « Extending top-down mass spectrometry to proteins with masses greater than 200 kilodaltons. », *Science (New York, N.Y.)*, 2006, vol. 314, n° 5796, pp. 109‑12.

[19]Neil L. KELLEHER, « Peer Reviewed: Top-Down Proteomics », *Analytical Chemistry*, juin 2004, vol. 76, n° 11, p. 196 A‑203 A.

[20]Yufeng SHEN et Richard D. SMITH, « High-resolution capillary isoelectric focusing of proteins using highly hydrophilic-substituted cellulose-coated capillaries », *Journal of Microcolumn Separations*, 1 janvier 2000, vol. 12, n° 3, pp. 135‑141.

[21]Bernd O. KELLER, Jie SUI, Alex B. YOUNG et Randy M. WHITTAL, « Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry », *Analytica Chimica Acta*, octobre 2008, vol. 627, n° 1, pp. 71‑81.

[22]John WATSON, Emily B. GREENOUGH, John E. LEET, Michael J. FORD, Dieter M. DREXLER, James V. BELCASTRO, John J. HERBST, Moneesh CHATTERJEE et Martyn BANKS, « Extraction, identification, and functional characterization of a bioactive substance from automated compound-handling plastic tips », *Journal of Biomolecular Screening*, juin 2009, vol. 14, n° 5, pp. 566‑572.

[23]G. Reid MCDONALD, Alan L. HUDSON, Susan M. J. DUNN, Haitao YOU, Glen B. BAKER, Randy M. WHITTAL, Jonathan W. MARTIN, Amitabh JHA, Dale E. EDMONDSON et Andrew HOLT, « Bioactive contaminants leach from disposable laboratory plasticware », *Science (New York, N.Y.)*, 7 novembre 2008, vol. 322, n° 5903, p. 917.
[24]« Structural Characterization and Physicochemical Testing of Erbitux (Cetuximab) | Biopharmaspec »

Chapitre IV : Stratégie à deux dimensions par collection de fraction à l'aide de l'interface du couplage CE-UV/MALDI-MS et infusion nanoESI par CESI-MS pour la séparation et la caractérisation d'isoformes d'anticorps monoclonaux.

Introduction

Au cours des chapitres II et III, nous avons développé et évalué le premier couplage CE-UV/MALDI-MS à interface coaxiale avec système de distribution et de dépôt de matrice entièrement automatisé. Grâce à sa conception robuste et entièrement paramétrable, nous avons démontré la répétabilité et la polyvalence du couplage sur une séparation de protéines entières. De plus, nous avons démontré les performances du système pour la caractérisation fine de protéine entière par stratégie Top Down. En effet, le couplage CE-UV/MALDI-MS permet de purifier et d'enrichir l'échantillon par dépôt successif sur une plaque MALDI. Enfin, l'analyse de mAbs entiers a confirmé la possibilité d'utiliser le système CE-UV/MALDI-MS/MS pour la séparation de protéines de haut poids moléculaire. Cependant, l'absence de résolution du MALDI-MS ne nous a pas permis d'identifier avec précision les masses des différents variants de charge. De plus, malgré l'apport de l'étape d'enrichissement, les conditions de séparation fortement concentrée en sels ne nous ont pas permis d'obtenir des spectres Top Down des différents variants de charge du mAb analysé. Partis de ce constat, tout en conservant notre stratégie de collection de fractions, nous avons décidé d'utiliser un spectromètre de masse plus résolutif : l'ESI-QTOF. En effet la source ESI, associée au quadripôle et au temps de vol, ont montré l'efficacité et la précision de masse dans de nombreuses études pour la caractérisation des mAbs[1,2,3]. La résolution de ces analyseurs permet de distinguer les différences de masses allant de la glycosylation (>1500 Da), jusqu'à la déamidation d'acides aminés (< 1Da) suivant la stratégie appliquée (Bottom Up, Middle Down, Top Down). Lors d'analyses de mélanges complexes ou de haut poids moléculaire, l'analyse par ESI-QTOF demande des temps d'acquisitions relativement conséquents. En effet, dans le but de déterminer avec précision les masses des différents analytes, il est nécessaire de multiplier les acquisitions des spectres de masse. Cette accumulation de spectres permet d'améliorer la précision de mesure de masse lors de la déconvolution des pics multichargés. Ce délai d'acquisition implique un

temps de passage et un volume d'échantillon important. En effet, en ESI classique, les modèles actuels demandent des volumes d'échantillons de l'ordre de la centaine de microlitres. La stratégie idéale consiste donc à infuser l'échantillon préalablement purifié directement dans la source ESI. Malheureusement, l'étape de purification de l'échantillon n'est pas évidente à réaliser et peut être très chronophage. De nous jours, les couplages avec les techniques séparatives par chromatographie liquides sont utilisés afin de purifier les protéines. Cependant, ces techniques font preuve d'une résolution encore insuffisante pour la séparation de mAbs entiers ou partiellement digérés. Alternativement au couplage HPLC-MS, les couplages CE-ESI-MS permettent une meilleure séparation de mAbs entiers. Mais, les conditions de séparations (présence de sels, volatilité réduite…) additionnées aux impératifs pour le maintien du courant (liquide additionnel) provoquent respectivement suppression d'ions et dilution des composés.

Comme nous l'avons vu dans les deux chapitres précédents, notre nouvelle interface CE/MALDI nous a permis de séparer, de collecter et de concentrer par enrichissement des variants de charges de mAbs. Cette méthode, couplée à l'infusion par ESI-MS, permettant d'allier les avantages de la CE, la purification et la préconcentration par collecte de fractions et la détection ESI-MS par infusion apparaît comme une alternative de choix au couplage direct LC-ESI-MS ou CE-ESI-MS. Malheureusement, les volumes des différentes fractions, de l'ordre de quelques µL, sont difficilement injectables directement dans la source ESI.

Depuis quatre ans, le LSMIS a été sélectionné en tant que laboratoire d'application de la nouvelle interface nano spray CESI-MS développée par la société ABSciex (San Francisco, USA). Ce système fait intervenir une interface brevetée permettant de coupler la CE à une source ESI sans liquide additionnel (Chapitre 1 paragraphe 3.1.3.). L'interface CESI fait intervenir uniquement le nano-débit de BGE pour la formation du spray. En 2014, Gahoual *et al* ont évalué cette interface en tant que simple plateforme d'infusion nanoESI[4]. Basée sur la théorie décrite par Wilm *et al*[5], l'utilisation d'une source nanoESI favorise la formation de gouttelettes de diamètre plus faible par rapport à l'ESI classique. La formation de gouttelettes plus petites favorise le processus d'ionisation, car elles facilitent les divisions de Rayleigh durant le processus de désolvatation. La conséquence au niveau des spectres MS sont une sensibilité du signal améliorée et une réduction du phénomène de suppression d'ions. Concernant l'interface CESI, les résultats décrits par Gahoual *et al.* ont permis de démontrer que le système CESI-MS est capable de produire un spray stable pour des débits d'infusion d'échantillon inférieurs à 4

nL/min, que la sensibilité du signal peut être améliorée d'un facteur 40 par la diminution du débit d'infusion de 400 à 10nL/min et que la consommation d'échantillons peut être réduite à un volume inférieur au µL.

Au vu des avantages apportés par le couplage de CESI-QTOF, nous avons établis une stratégie à deux dimensions avec une séparation et une collection de fractions à l'aide de notre couplage CE/MALDI-MS puis l'infusion de chaque fraction à l'aide du CESI-QTOF.

Au cours de ce chapitre, nous développerons la mise au point des conditions de séparations pour deux type d'échantillons : un mAb entier et un digestat IdeS de mAbs. Cette séparation, décrite dans le chapitre II et basée sur les travaux de He *et al.* [6,7] (400 mM d'EACA pH 5,7), a été améliorée afin de la rendre compatible avec les exigences relatives à la source ESI (volatilité et faible concentration en sels du BGE). En effet, les sels présents en concentrations conséquentes engendrent des phénomènes de suppressions d'ions. De plus, le caractère très peu volatile de l'EACA engendre un dépôt risquant l'encrassement voire la détérioration de la source d'ionisation.

Ainsi dans le but de diminuer la concentration en sels et de rendre les fractions collectées plus compatibles avec une infusion ESI, nous avons modifié la composition du BGE à la sortie du capillaire. A l'instar des couplages CE/MALDI-MS intégrant la matrice dans le liquide additionnel ou aux couplages CE-ESI-MS nécessitant un liquide additionnel compatible avec une source ESI, nous avons adapté le BGE de sortie. Nous avons donc mis en place de nouvelles conditions mettant en jeu l'utilisation combinée d'EACA et d'acétate d'ammonium. Ces conditions ont été appliquées à une séparation de mAbs entiers et à une séparation d'un digestat IdeS de Mabs. Les fractions récupérées ont ensuite été infusées à l'aide de l'interface CESI-MS. Les analytes identifiés par notre stratégie ont été comparés à une méthode de références HPLC-MS.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Réactifs et matériels

Tous les réactifs ont été utilisés dans des qualités analytiques pures fournies par Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). L'eau, qui sert à préparer les tampons et les échantillons, a été obtenue en utilisant le système de purification d'eau ELGA purelab UHQ PS (Bucks, UK). Cetuximab et Trastuzumab ont été fournis par le centre immunologique Pierre Fabre (Saint-Julien-en-Genevois, France). Le FabRICATOR (IdeS) a été fourni par Genovis (Lund, Sweden).

1.2. Composition d'échantillons

Pour l'étude de Trastuzumab, une solution a été préparée à 5 g/L. Pour l'étude du Cetuximab, l'échantillon a été préparé dans l'eau ultra pure à 1 g/L.

1.3. Protocole de digestion à l'IdeS

La solution d'IdeS est reconstituée dans l'eau à 67 units/µL. L'échantillon de Trastuzumab (10 g/L) est reconstitué dans le tampon de digestion (tampon phosphate 50 mM, 150 mM phosphate de sodium, pH 6,6). L'IdeS est ensuite ajouté dans les proportions 1 unit/µg mAb. Le mélange est incubé 30 minutes à 37°C.

1.4. L'électrophorèse capillaire

Les séparations électrophorétiques ont été effectuées sur le système P/ACE MDQ^{TM}CE de Beckman Coulter (Brea, CA) équipé d'un passeur automatique thermostaté et un générateur capable de délivrer une tension jusqu'à 30 kV. Le logiciel 32 Karat^{TM} (Beckman Coulter, Brea, CA) est utilisé pour piloter l'instrument, pour acquérir et traiter les données. Polymicro bare fused-silica capillaries de 50 µm i.d. a été fourni par Photonlines (St-Germain-en-Laye, France). Concernant le capillaire modifié, sa surface a été greffée en laboratoire avec de l'hydroyxypropylcellulose (HPC) en suivant le protocole décrit par Shen *et al*.[8] Pour la séparation de mAbs entiers selon les conditions « mixtes », un BGE compose ε-Amino-caproïcacid (EACA) / Acétate d'ammonium 400mM/50mM (pH 5.7) en entrée de capillaire de séparation CE/MALDI et un BGE Acétate d'ammonium 50mM en sortie. Les échantillons ont été introduits dans le capillaire par injection hydrodynamique (1 psi, 50sec). La séparation des Mabs a été faite en appliquant une tension de 30 kV à travers le capillaire.

Les infusions ont été effectuées sur un système PA 800 plus de Beckman Coulter (Brea, CA) équipée d'un passeur automatique thermostaté et un générateur capable de délivrer une tension jusqu'à 30 kV. Le logiciel 32 Karat^{TM} (Beckman Coulter, Brea, CA) est utilisé pour piloter l'instrument, pour acquérir et traiter les données. Le capillaire, fourni par Beckman Coulter (Brea, CA), a une longueur de 90 cm et un diamètre interne de 30µm. L'extrémité du capillaire (environ 3 cm) a été traité avec de l'HF afin de le rendre poreux et de permettre le contact avec le BGE. Le capillaire est conditionné par rinçage de 10 min avec du MeOH, 10 min avec NaOH 0.1 M et 10 min avec HCl0.1 M, 20 min d'eau désionisée et enfin 10 min de BGE. Chaque rinçage est effectué à 50 psi. Le BGE utilisé est de l'acide formique 10 %. L'infusion des échantillons a été effectuée dans un mélange v/v ACN/acide formique 10 % par pression de 1 psi pendant 5 min. Les différents volumes d'injection ont été calculés en utilisant l'application gratuite CEToolbox (Pansanel, Google Play).

1.5. La collecte de fractions.

Le détail complet de l'interface automatisée pour le couplage CE à la spectrométrie de masse MALDI-MS est décrite dans le chapitre II. Le protocole de dépôt est décrit dans le chapitre III. Dans cette étude, l'interface a été utilisée afin de collecter dans les puits d'une plaque PCR. Les puits ont été remplis de 5 µl de BGE de sortie. Les fractions ont été évaporées à l'aide d'un dessiccateur et repris avec 2 µl de mélange ACN/AF 10 % v/v.

1.6. L'ESI-MS

Pour l'infusion CESI-MS, la CE a été couplée à un spectromètre de masse microTOF-Q II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Pour la caractérisation des mAbs, les paramètres de transfert ont été optimisés en infusant l'échantillon mAbs entiers et digestat par la CESI, à l'aide d'une pression de 2 psi. Les paramètres du spectromètre de masse ont été optimisés afin que les ions lourds soient transmis correctement dans l'analyseur TOF. Les tensions «ion funnels » ont été fixées à 300 et 400 Vpp. Le voltage de l'electrospray varie entre −1.2 et −1.8 kV. Aucun gaz de nébulisation n'est utilisé à cause de la géométrie de l'interface CESI. Le gaz de séchage est réglé à 1.5 L/min et la température de la source à 180 °C.

2. Résultats et discussions.

2.1. Optimisation des conditions de séparation des Mabs.

Lors de cette optimisation, nous avons pris comme base les conditions de séparation décrites par He *et al*[6,7]. Cependant, comme nous l'avons montré dans le Chapitre II, leur méthode a été partiellement transposée sur notre nouvelle interface de collecte de fractions. En effet, dans le but de rendre les conditions compatibles avec la détection MALDI-MS, nous avons réalisé la séparation d'un mAb entier à l'aide d'un BGE composé de 400 mM EACA, pH 5,7. L'optimisation de notre méthode a donc consisté

à remplacer le greffage dynamique HPMC 0.05 % par un greffage physique HPC et à retirer le TETA du BGE. En effet He *et al.* procèdent à un greffage HMPC renouvelé à chaque injection. Cette démarche, totalement justifiée dans une étude CE/UV, est incompatible avec notre stratégie car elle apporte un polymère dans les fractions empêchant l'analyse par infusion ESI-MS. Nous avons donc préféré un greffage covalent HPC permettant d'éliminer tout relarguage lors de la séparation. Concernant le TETA et dans une optique de simplification du BGE, nous avons éliminé de notre BGE cet additif. En effet, He *et al* ont montré que le TETA améliore la symétrie des pics et contribue à éliminer les phénomènes d'adsorption des protéines sur le capillaire. Cependant, la présence de TETA contribue à la complexification du BGE et ainsi aux phénomènes de suppression d'ions lors de l'infusion ESI-MS. Les résultats obtenus dans nos conditions, représentés en figure 1, montrent un profil électrophorétique similaire aux données de la littérature.

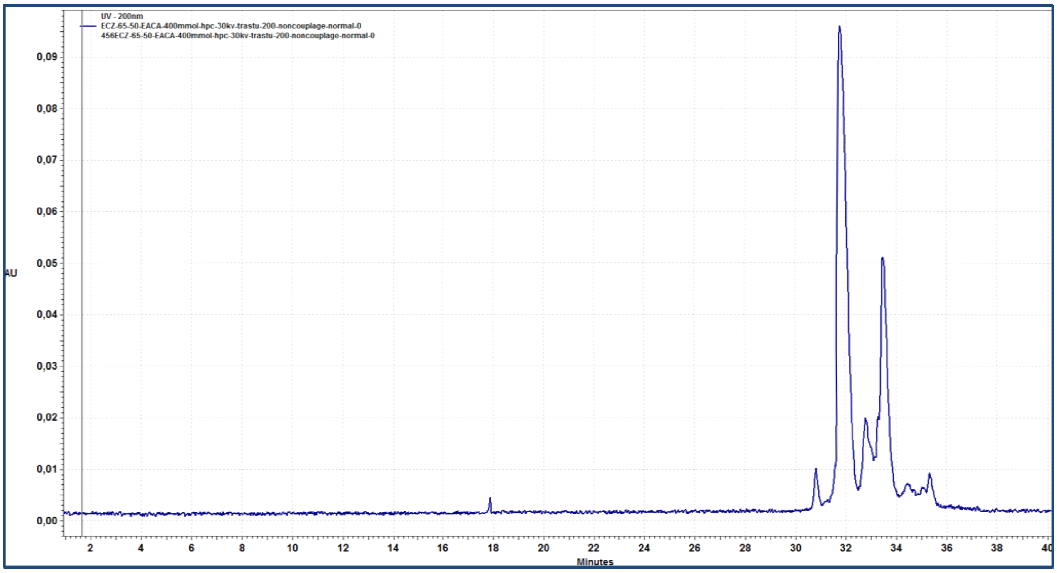


***Figure 1**. Electrophérogramme de Trastuzumab 0.5 g/L Capillaire greffé HPC 75x50 BGE EACA 400mmol, pH 5.7, 30 kV, 12 µA, Non Couplé, Non déposé, Condition « EACA »*

En effet, nous pouvons voir un pic principal avec une distribution de part et d'autre des composés « acides » et « basiques »[6]. Dus aux manques d'informations structurales de la détection UV, ces composés peuvent être des variants de charges de mAbs engendrés par des PTMs, des artéfacts et des dégradations issus de la synthèse ou de la conservation. Cependant nous avons vu dans le Chapitre II

qu'à l'aide de la détection MALDI, nous pouvions observer que ces pics correspondent en quasi-totalité à des variants de charge (figure 2.)

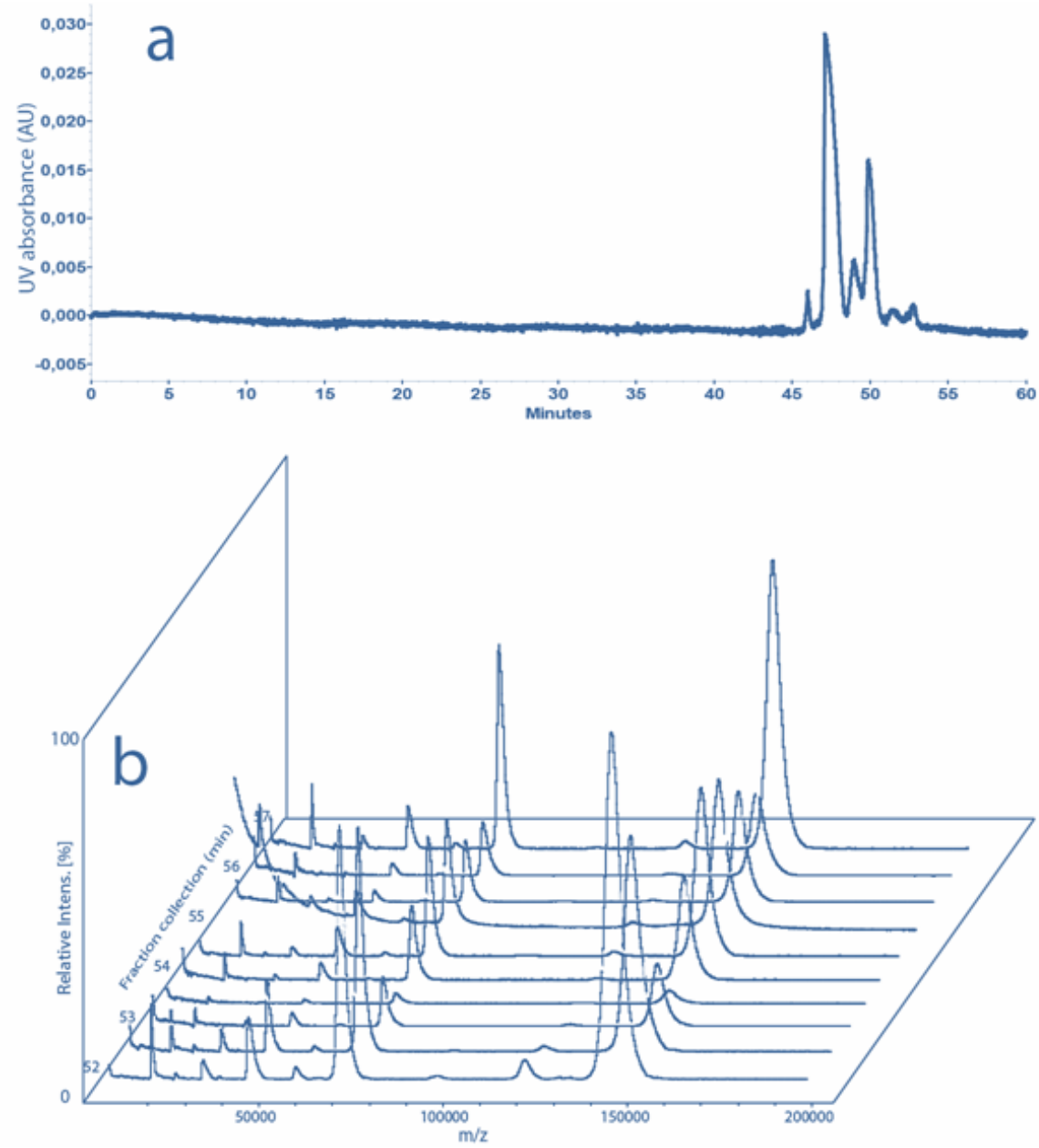


Figure 2. *Électrophérogramme UV (a) et Spectre de masse correspondant au fraction (b) contenant les variants de charge du mAbs entiers grâce au CE-UV/MALDI-MS. Trastuzumab 4 g/L couplé, déposé, Condition « Mixte »*

En effet, l'absence ou la présence de charge supplémentaire sur un variant provoque un changement de mobilité qui se traduit par un pic en aval ou en amont du pic principal. Une légère baisse de

sensibilité a été remarquée due à la détection UV déportée. Ce travail représente la première analyse des variants de charge de mAbs intacts à l'aide d'un couplage de la CE avec une détection MALDI-MS.

Néanmoins, les conditions initiales de BGE EACA 400 mM ne permettent pas l'analyse par ESI. En effet, la forte concentration d'EACA, présente dans le BGE, engendre la suppression d'ions et risque l'encrassement de la source. Partis de cette constatation, nous avons entrepris une démarche consistant à diminuer la concentration EACA uniquement dans le BGE de sortie tout en conservant les conditions du BGE d'entrée du capillaire. Cette optimisation des conditions de séparation ont été nommée conditions « asymétriques ».

2.1.1. Mise en place des conditions « asymétriques ».

La mise au point des conditions « asymétriques » a été inspirée par les conditions de couplages CE-MS mettant en jeu un liquide additionnel. En effet de nombreux couplages CE/MALDI-MS ou couplages CE/ESI-MS, décrit dans le chapitre I, utilisent des liquides additionnels contenant de la matrice ou des solvants. L'ajout d'un composé supplémentaire permet un gain de temps ou une meilleure comptabilité avec la source de masse. Toutefois, le choix de la composition du liquide additionnel est issu d'un compromis efficacité/résolution de la séparation et comptabilité analytique. En effet, il a été montré qu'à l'instar des liquides additionnels en CE-ESI-MS, l'utilisation d'un BGE de sortie légèrement différent de celui présent à l'entrée du capillaire pouvait ne pas modifier fondamentalement la séparation[9,10].

Dans cette optique, nous avons décidé d'évaluer l'influence de la diminution en concentration d'EACA dans le BGE de sortie afin de rendre la nature du milieu des fractions plus compatible avec une source ESI. Les figures 3 et 4 représentent les séparations de Trastuzumab et Cetuximab à l'aide de différentes conditions « asymétriques » avec comme BGE d'entrée (noté BI) à 400 mM d'EACA pH 5,7 et deux différents BGE de sortie (noté BO) respectivement à 100 mM d'EACA pH 5,7 et 50 mM d'EACA pH 5,7.

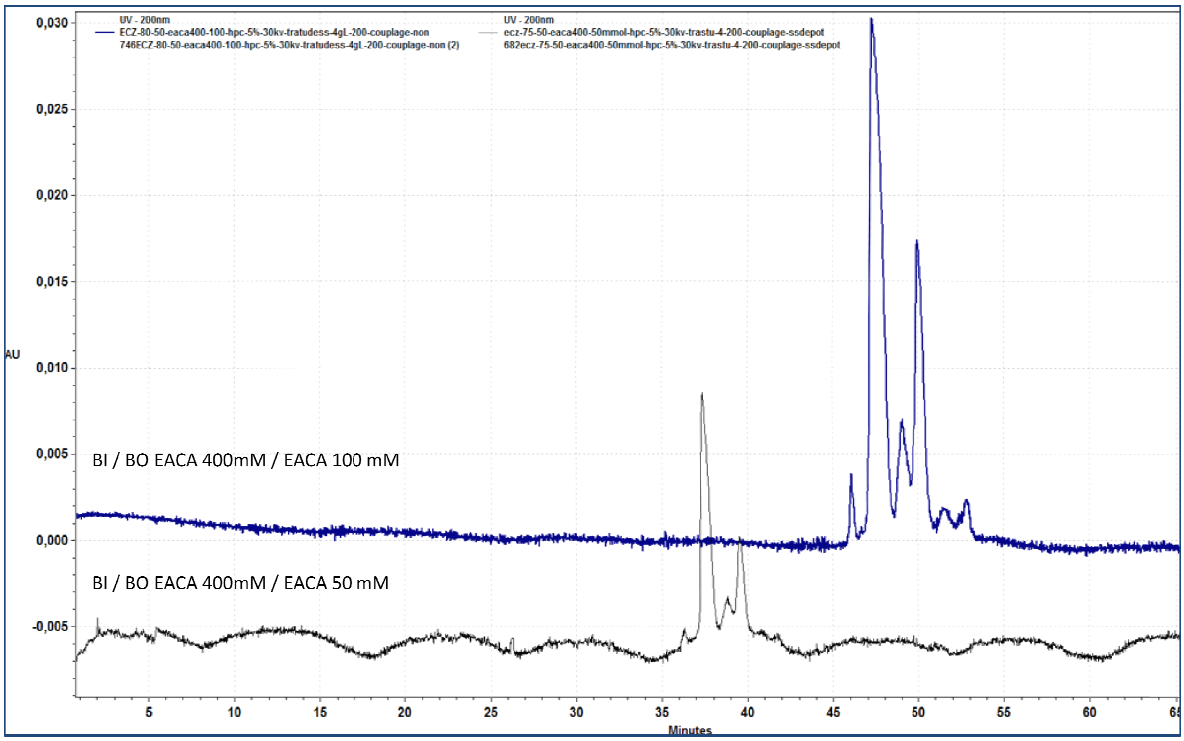


Figure 3. *Electrophérogrammes UV sur la nouvelle interface, BGE EACA, conditions « asymétriques », couplé, non déposé. En Bleu : Trastuzumab entier 2 g/L BI EACA 400 mmol/L BO EACA 100mM En Noir : Trastuzumab entier 2 g/L BI EACA 400 mmol/L BO EACA 50mM*

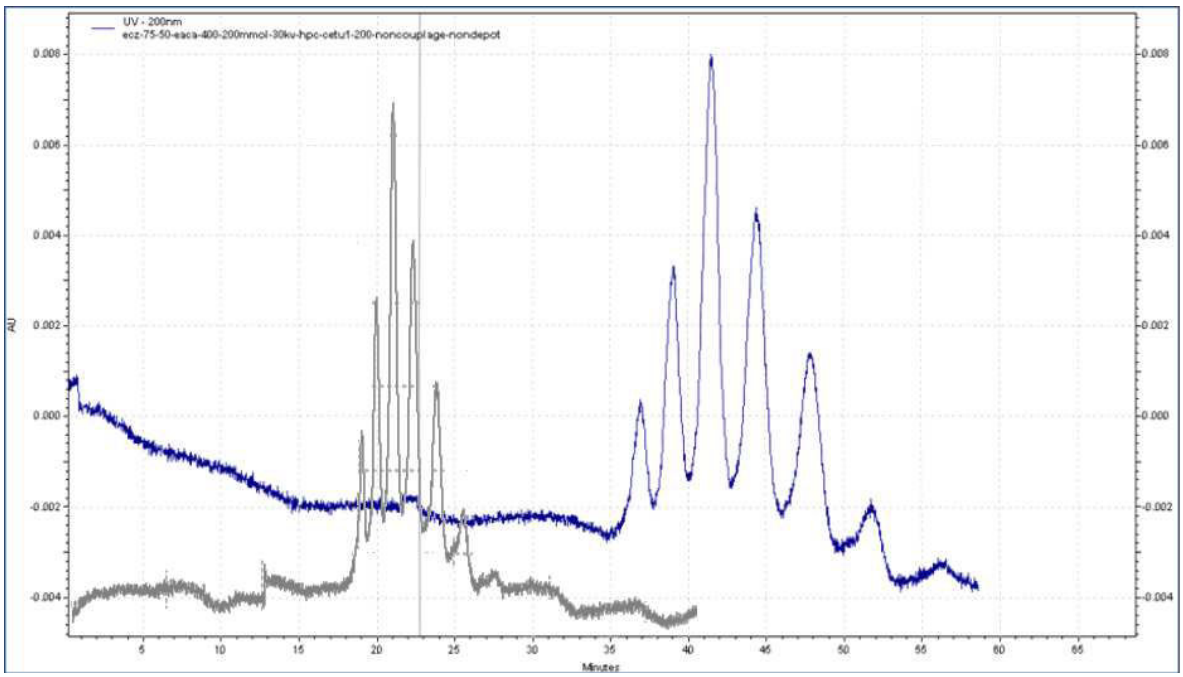


Figure 4. *Electrophérogrammes UV sur la nouvelle interface, BGE EACA, Conditions « asymétrique »En Bleu : Cetuximab entier 0,5 g/L BI EACA 400 mmol/L BO EACA 200mmolEn Noir : Cetuximab entier 0,5 g/L BI EACA 400 mmol/L BO EACA 20mmol*

Tout d'abord, il est à noter que, comme attendu, les séparations de Trastuzumab et Cetuximab montrent des profils totalement différents. Ces différences viennent de la nature même des mAbs. En effet, les mAbs font partie de la même famille de protéines mais diffèrent énormément les uns des autres notamment suivant le nombre de modifications post traductionnelles. Par exemple, Trastuzumab possède un site de glycosylation tandis que Cetuximab en possède deux. Ces différences augmentent l'hétérogénéité de l'échantillon et par conséquent le nombre de variants de charges. Ces électrophérogrammes ont été effectués sur le couplage CE-UV/MALDI-MS sans procéder à la collecte de fractions. La plaque PCR a été remplacée par un vial contenant du BGE (BO) et l'aiguille de dépôt ne se déplace pas. Les profils électrophorétiques montrent des temps d'analyses raccourcis et une diminution de la résolution à mesure que l'on baisse la concentration d'EACA du BGE utilisé comme liquide additionnel. Néanmoins, les profils généraux restent conservés avec une résolution suffisante pour effectuer une collection de fractions. Dans un premier temps, nous avons donc décidé d'utiliser un BGE d'entrée à 400 mmol/L d'EACA ph 5.7 et un BGE de sortie d'EACA 50 mM pH 5.7. Ces conditions sont les meilleurs compromis entre résolution et temps d'analyses mais restent très compliquées pour la mise en place d'infusion en CESI-MS. En effet, aucun signal n'a été obtenu en infusion CESI-MS.

Au cours de nos recherche sur la mise au point des conditions « asymétriques », une étude sur la séparation de mAbs entiers en CE/UV faisant intervenir des BGE compatibles avec la MS a été publiée. Gassner *et al*[11] ont montré des résultats assez similaires aux travaux de He *et al* mettant en jeu un BGE composé d'une solution d'acétate d'ammonium pH 5,7. Faisant écho à une étude préliminaire que nous avions réalisée très tôt dans mes travaux de thèse dans les mêmes conditions de séparation (Acétate d'ammonium - $AcNH_4$ 100 mM pH 5,7), nous avions dans notre cas obtenu de bonnes séparations mais nous avions du abandonné cette option pour un grand nombre de problèmes techniques avec notamment une cassure systématique du capillaire après 3 répétitions. Cependant, au vu des propriétés volatiles de l'acétate d'ammonium et de sa comptabilité avec les sources ESI, nous avons donc décidé de tester à nouveau ces conditions nommées dans ce manuscrit condition « $AcNH_4$ ».

2.1.2. Choix des conditions « $AcNH_4$ ».

La figure 5 représente la séparation de Trastuzumab entiers séparés sur capillaire greffé HPC à l'aide d'un BGE composé d'acétate d'ammonium 100 mM ph 5,7. La séparation a été effectuée sur le couplage CE-UV/MALDI-MS sans collecter les analytes. Le profil électrophorétique représente un pic majoritaire autour duquel se distribuent des composés plus « acides » et plus « basiques ».

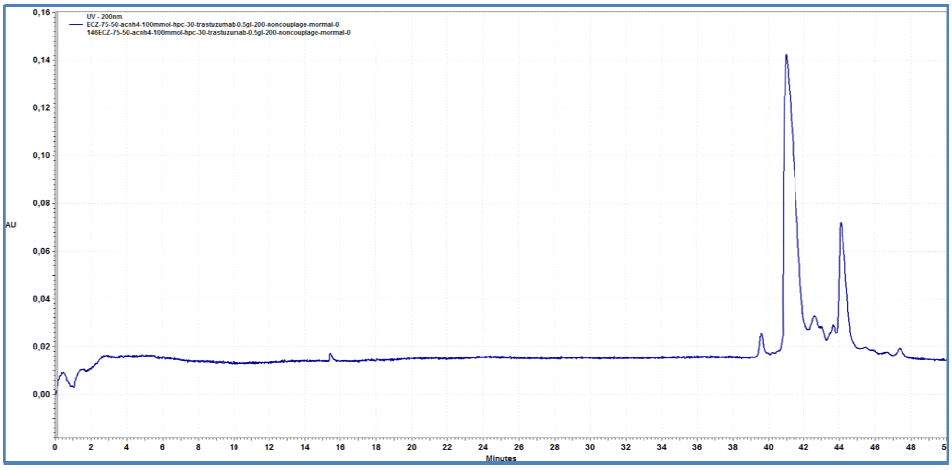


***Figure 5**. Electrophérogramme de Trastuzumab 0.5 g/L Capillaire greffé HPC 75x50 BGE $AcNH_4$ 100mmol, 30 kV, 100 µA, Non Couplé, Non déposé. Condition inspirée de Gassner et al[11]*

En comparaison avec les conditions concentrées d'EACA, les conditions du BGE acétate d'ammonium provoquent une augmentation significative du courant (>100µA). Cette augmentation de courant combinée aux répétitions des analyses détériorent le greffage HPC et fragilisent le capillaire. En continuant les séparations, l'intégrité physique du capillaire se modifie provoquant des cassures au niveau de la cellule de détection. L'hypothèse retenue est l'attaque de la silice par de l'acétate d'ammonium[12] combiné à un effet Joule important provenant de la forte intensité du courant et de l'énergie de la lampe UV. Ce BGE s'est donc révélé incompatible avec notre nouvelle interface. Néanmoins, les profils électrophorétiques sont relativement identiques à ceux rencontrés avec le BGE EACA. Il semblerait que les interactions mis en jeu soient similaires. Partis de cette réflexion et toujours dans le but de rendre notre séparation compatible à l'infusion ESI-MS, nous avons décidé de réaliser un compromis en mélangeant les deux BGE (EACA et $AcNH_4$) dans des proportions sélectionnées dans le but de combiner le pouvoir très résolutif de la séparation de He *et al.* et le

caractère « ESI compatible » des conditions de Gassner *et al*. Nous nommerons cette troisième stratégie, les « conditions mixtes ».

2.1.3. Choix des Conditions « mixtes».

En étudiant les profils électrophorétiques des séparations EACA et $AcNH_4$, nous pouvons remarquer une similitude dans la distribution des analytes. Sur cette constatation, nous avons décidé de mélanger les deux BGE. Dans un premier temps, nous avons fait le choix de réduire la concentration d'EACA de 400 mM à 200 mM. En effet, d'après la littérature, la concentration de 200 mM d'EACA, principale source d'incompatibilité ESI pour notre méthode, est la limite basse à laquelle nous pouvons travailler tout en conservant un profil acceptable pour réaliser une collecte de fractions. Nous avons donc décidé, dans la suite de notre étude, de fixer cette condition et de faire varier la concentration en acétate d'ammonium dans nos BGE. Après nous être assurés de la comptabilité des deux BGE, nous avons procédé à un criblage de mélange en faisant varier la concentration d'acétate d'ammonium de 2 à 50 mM (figure 6.) A noter que dans cette expérience, les conditions d'entrée et de sortie (BI et BO) sont identiques.

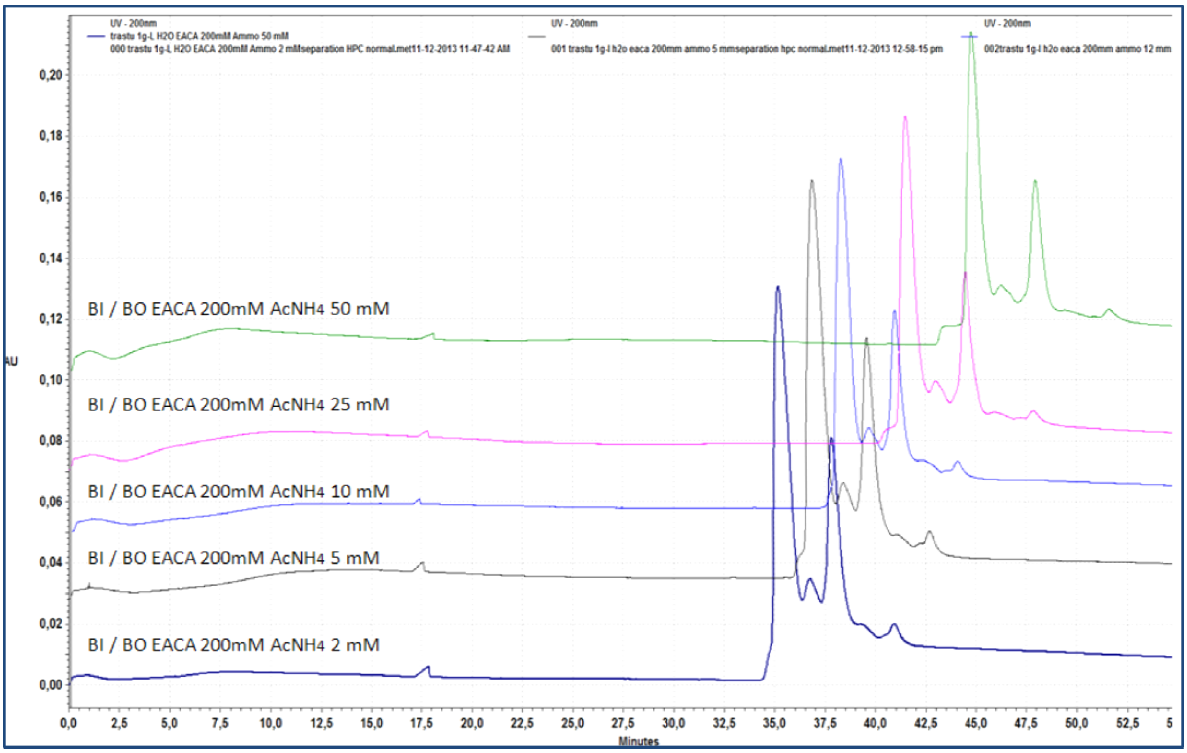


Figure 6 *: Criblage BGE sur Trastuzumab 1 g/L entier BGE in/out 200 mM /X mM EACA/ACNH₄-30 kv 200 nm HPC 60*50*

Là encore une faible modification de résolutions dans la séparation de Trastuzumab a été mise en évidence. De plus, les temps de migrations diminuent lorsqu'on baisse la concentration d'acétate d'ammonium. Ils passent de 36 minutes pour le pic principal avec le mélange EACA 200 mM/$AcNH_4$ 2 mM à 46 min pour le mélange EACA 200 mM/$AcNH_4$ 50 mM. Afin d'améliorer le confort de manipulation, nous avons décidé d'opter pour la séparation contenant 25 mM d'$AcNH_4$ qui apparait comme la plus adaptée pour une collection de fractions efficace. Les problèmes de robustesse mis en évidence dans des conditions exclusives d'acétate d'ammonium (paragraphe 2.1.2) ont été complètement rectifiés du à la baisse du courant de séparation (<60µA) permettant une atténuation de l'effet Joule et donc une utilisation répétée du capillaire de séparation. Ces résultats importants ne nous ont cependant pas permis de réaliser une infusion en ESI, car la présence d'EACA 200 mM dans le BO interdit tout signal en ESI-MS. Partis du même constat, nous avons décidé d'appliquer notre stratégie de conditions « mixtes » en utilisant un BO composé de 50 mM d'acétate d'ammonium sans EACA. La figure 7 présente une séparation de Trastuzumab à 4 g/L dans les conditions BGE d'entrée (BI) EACA 200 mM/ $AcNH_4$ 25 mM à pH 5.7 et du BGE (BO) $AcNH_4$ 50mM à ph 5.7 pour le liquide additionnel.

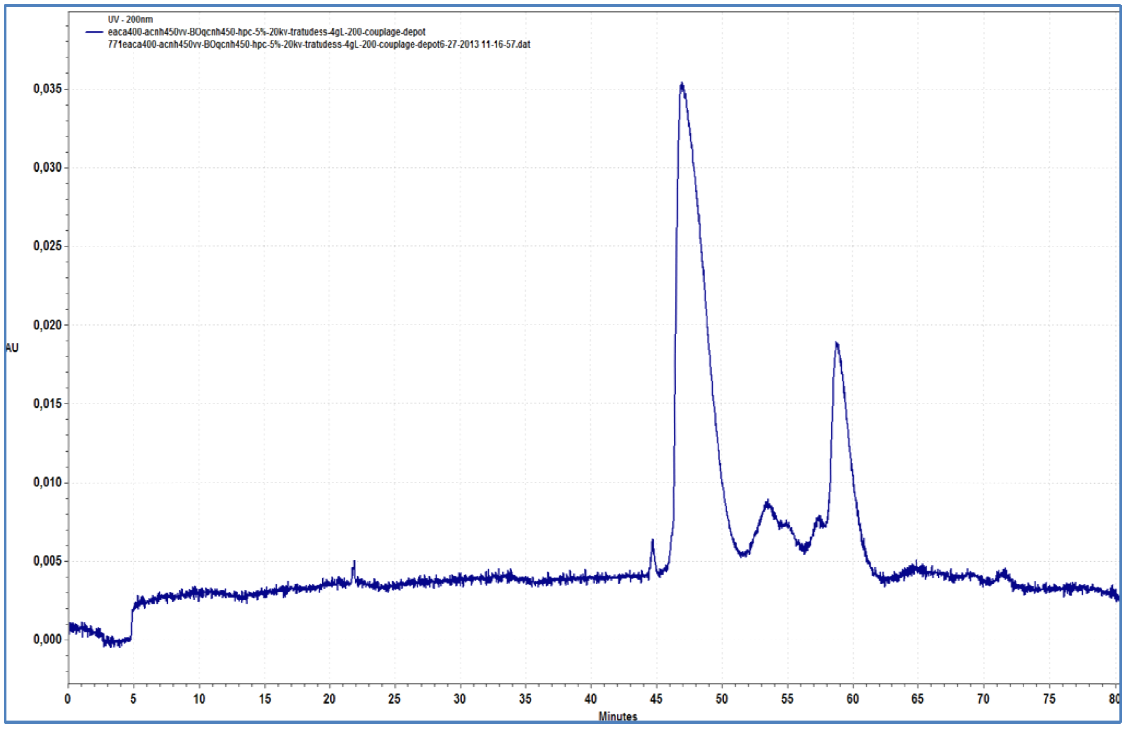


***Figure 7**. Electrophérogramme de Trastuzumab 4 g/L Capillaire greffé HPC 75x50 BGE In EACA 200mM/ $AcNH_4$ 25mM BGE Out AcNH4 50mM, 30 kV, 40 µA, Couplé, Non déposé. Condition « Mixte »*

L'électrophérogramme ne présente quasiment aucune différence avec une séparation contenant l'EACA dans le liquide additionnel. La résolution est tout à fait compatible avec une collection de fractions permettant de récupérer des analytes purs et concentrés. L'intégrité du capillaire est préservée même après 10 analyses par jour pendant 5 jours consécutifs. L'utilisation d'un liquide additionnel exclusivement composé d'$AcNH_4$ minimise l'apport d'EACA provenant uniquement du capillaire de séparation. Ainsi les analytes collectés se retrouvent dans un BGE composé en très grande majorité de $AcNH_4$ 50 mM et d'une faible concentration d'EACA ce qui est beaucoup plus compatible avec la source ESI.

2.2. Collecte de fractions et infusion CESI-MS

2.2.1. Collecte de fractions

La collection de fractions s'effectue comme décrite chapitre III. Grâce à la cellule UV déportée, la séparation et la collection de fractions sont suivies par la détection UV tout au long du processus. La collection commence à l'apparition du premier pic du profil électrophorétique. Le délai entre le passage dans la cellule UV et le dépôt dans les puits d'une plaque PCR dépend de la mobilité électrophorétique des pics. L'aiguille creuse remplie de liquide additionnel fait office d'électrode et est reliée à la masse. Le débit du liquide additionnel ($AcNH_4$ 50mM) a été fixé à 5 µl/min. Ce débit a pour rôle d'établir constamment un contact électrique entre le capillaire et l'électrode, mais aussi d'entraîner les analytes vers le support de collecte. La séparation de Trastuzumab a été effectuée dans le but d'optimiser les conditions de séparations ainsi que les paramètres de collection de fractions. Le bon déroulement de ces étapes a été confirmé en analysant les fractions par MALDI-TOF-MS. Les résultats ont été décrits dans le chapitre II (figure 2) et montrent une très bonne concordance entre le profil UV et la collecte de fractions. Ceci confirme l'absence de contamination et de phénomène de diffusion. Malheureusement, les limitations du MALDI-MS Autoflex II pour des molécules supérieures à 100 kDa ne permettent pas d'obtenir des mesures de masse précises. Cependant, ces analyses confirment la présence d'analytes différents dans les fractions successives. Ainsi, après constatation de la validité des conditions de séparation CE / collecte de fractions en vue de l'analyse par CESI-QTOF-MS, nous avons appliqué cette méthodologie à deux types d'échantillons :

- Un anticorps entier : CETUXIMAB

- Un anticorps digéré partiellement par IDES : TRASTUZUMAB.

Nous avons décidé de sélectionner deux mAbs (Trastuzumab et Cetuximab) et de les étudier suivant deux stratégies (entier ou partiellement digéré). Trastuzumab et Cetuximab sont des mAbs approuvés par les agences de régulations Européennes (EMEA) et Américaines (FDA) et qui sont souvent pris comme modèles car extrêmement décrit dans la littérature[13,14.] Nous avons donc décidé d'étudier le Cetuximab entier car son profil électrophorétique présente un nombre significatif de pic (figure 4) avec une résolution compatible pour une collection de fractions. Cependant, du à la complexité des variants de charges et à leur masse (150 kDa) l'étude de mAb entier peut s'avérer très complexe. Nous avons donc décidé d'étudier en parallèle un digestat IdeS de Trastuzumab permettant d'avoir deux types de fragments de 25 kDa et 97 kDa.

2.2.2. L'infusion CESI-MS

Dans les deux cas étudiés, les fractions, récoltées dans un volume de 10 µl de $AcNH_4$ 50 mM, ont été transférées dans des microtubes PCR de 0,2ml. L'ensemble de la collecte a été évaporée sous vide dans un dessiccateur. L'extrait sec a été repris par 2µl d'un mélange AF 10%/ACN (v/v). Nous avons choisi de retraiter les collectes avec un mélange AF 10%/ACN pour bénéficier des meilleures conditions pour l'infusion ESI-MS. Les fractions ont donc été infusées à l'aide de l'interface CESI-MS avec un début de 20 nL/min.

2.3. Etude du digestat IDES de Trastuzumab.

2.3.1. Infusion par CESI-MS

La figure 8 représente la description schématique de la structure de Trastuzumab et de ces principales PTMs. Trastuzumab est une IgG1 caractérisée par 16 ponts disulfures. Parmi les PTMs rentrant en jeu dans le processus de reconnaissance avec l'antigène, on peut noter une cyclisation de l'acide glutamique en N-terminal de la HC, trois déamidations d'asparagine et deux oxydations de

méthionine. De plus, cet IgG1 est caractérisé par un site de glycosylation sur une asparagine de la HC. Lors de notre expérience, Trastuzumab a été digéré à l'aide d'une enzyme appelée IdeS qui coupe spécifiquement la protéine lorsqu'il y a présence de l'enchainement de deux Glycines. La flèche rouge sur la figure 8 indique l'endroit d'action de l'IdeS sur le Trastuzumab. L'action de l'IdeS, sans réduction des ponts disulfure, coupe le Mab en deux parties distinctes : le F(ab')2 (97 kDa) et le FC/2 (25 KDa). (Figure 9)

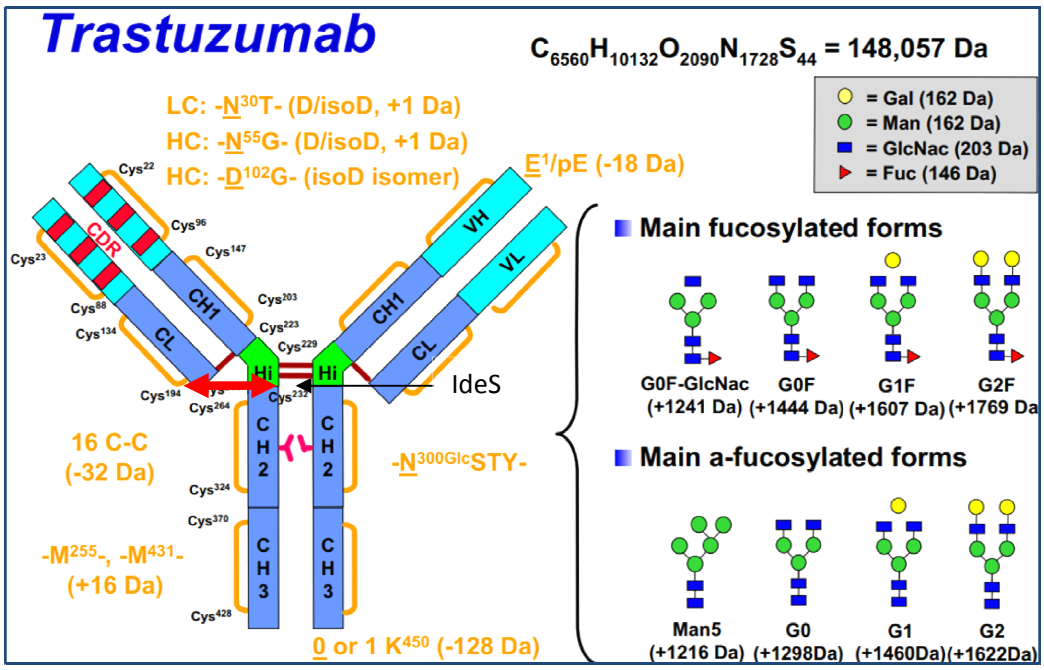


Figure 8. *Représentation de Trastuzumab et des différentes PTMS*

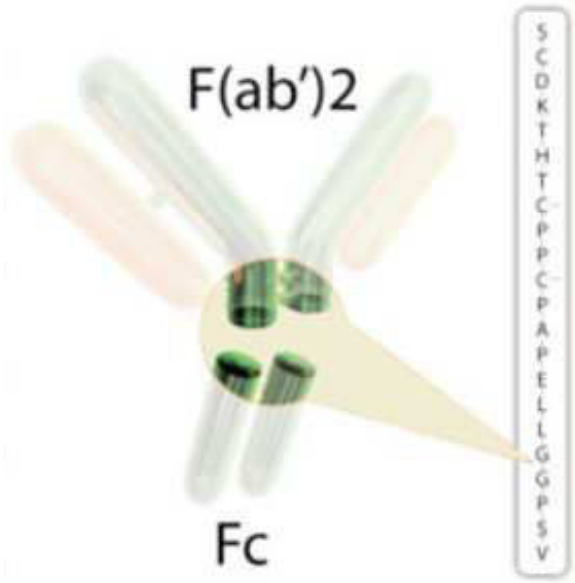


***Figure 9**. Illustration du mécanisme d'action de la protéase IDES « Fabricator ».*

L'échantillon concentré à 4 g/L a été injecté et séparé sur un capillaire greffé HPC de 70 cm de longueur et 50 µm de diamètre interne. Les conditions de séparation optimisées précédemment sont pour BI un BGE EACA / AcNH4 200 mM / 25 mM à ph 5.7 et BO servant de liquide additionnel composé d'$AcNH_4$ 50 mM. La détection UV déportée à 200 nm a donné l'électrophérogramme représenté figure 10. La quantité injectée de Trastuzumab est de 3 pmol. Cette quantité a été choisie au détriment d'une résolution représentative de la CE mais dans le but de récupérer un maximum de composé dans les fractions. Ceci explique donc la largeur des pics.

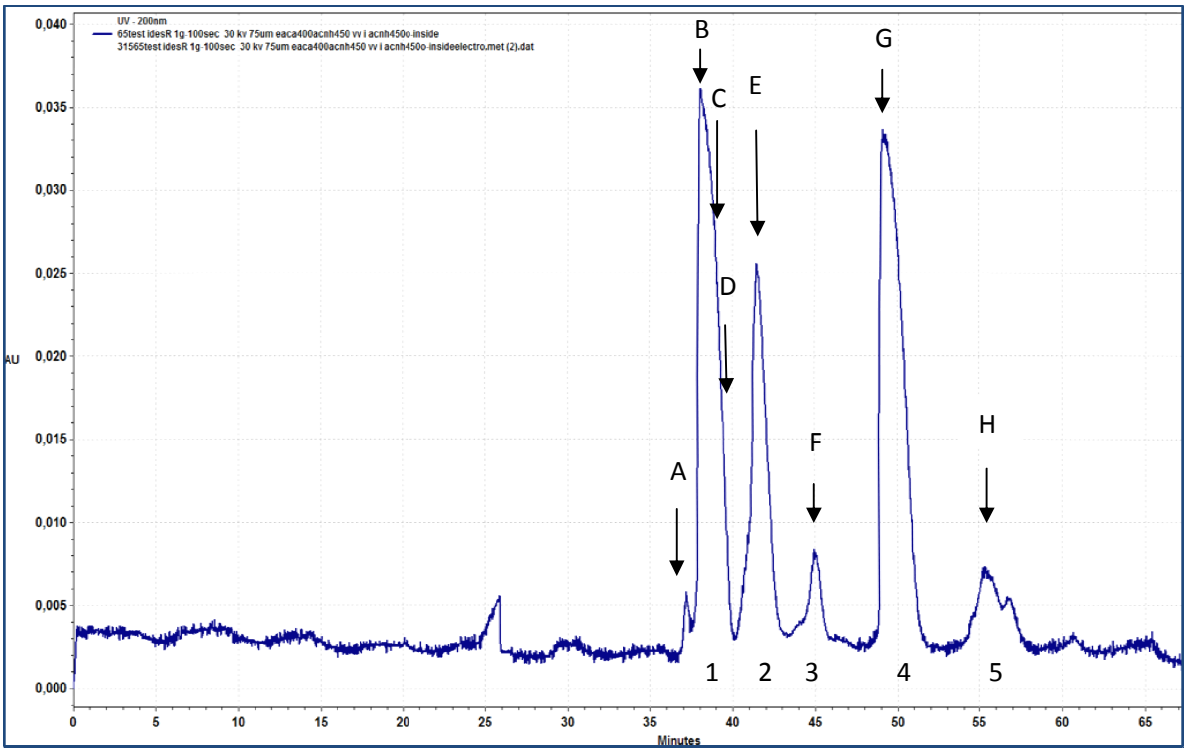


Figure 10. *Electrophérogramme de Trastuzumab IDES 2 g/L (3pmol injecté) Capillaire greffé HPC 70cmx 75µm BGE In EACA 200mM/AcNH4 25mM, BGE Out AcNH₄ 50mM, 30 kV, 40 µA, 200 nm, Couplé, Collecté. Condition « Mixte », les flèches noires représentent les différentes fractions collectées*

Le profil électrophorétique présente cinq pics distincts séparés avec retour à la ligne de base. Ce profil autorise une collection de fractions. La collection a été effectuée dans les puits d'une plaque PCR toutes les minutes dans 5 µL de liquide additionnel composé d'acétate d'ammonium à 50 mM. Les fractions ont été évaporées sous vide d'air et reprises à l'aide de 2 µL d'un mélange 50/50 acide formique 10% / ACN. Les résultats suivants présentent les composés dans l'ordre d'apparition sur l'électrophérogramme UV. Les cinq principaux pics arrivent dans l'ordre de leur mobilité et sont collectés respectivement dans les fractions A, B, C et D (figures 11 à 14) pour le pic 1, E (figure 15) pour le pic 2 , F (figure 16) pour le pic 3, G et H (figures 17, 18) pour le quatrième et cinquième pics. Sur chaque figure, un encart représente la séparation du digestat Ides de Trastuzumab. La flèche noire présente la position de la fraction sur l'électrophérogramme.

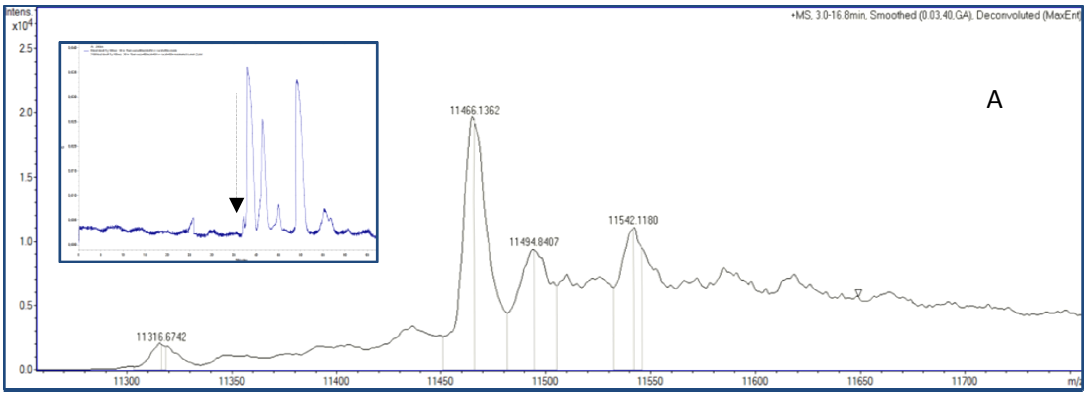


***Figure 11**. Spectre Déconvolué de la fraction A de la séparation d'IdeS de Trastuzumab*

La figure 11 correspondant à la fraction A, montre le spectre de masse d'un composé de 11462 Da. Ce composé n'a pas pu être identifié et ne correspond à aucun produit de digestion à l'IdeS. Il est possible que ce composé soit un produit de dégradation ou une impureté issue de la synthèse du Trastuzumab.

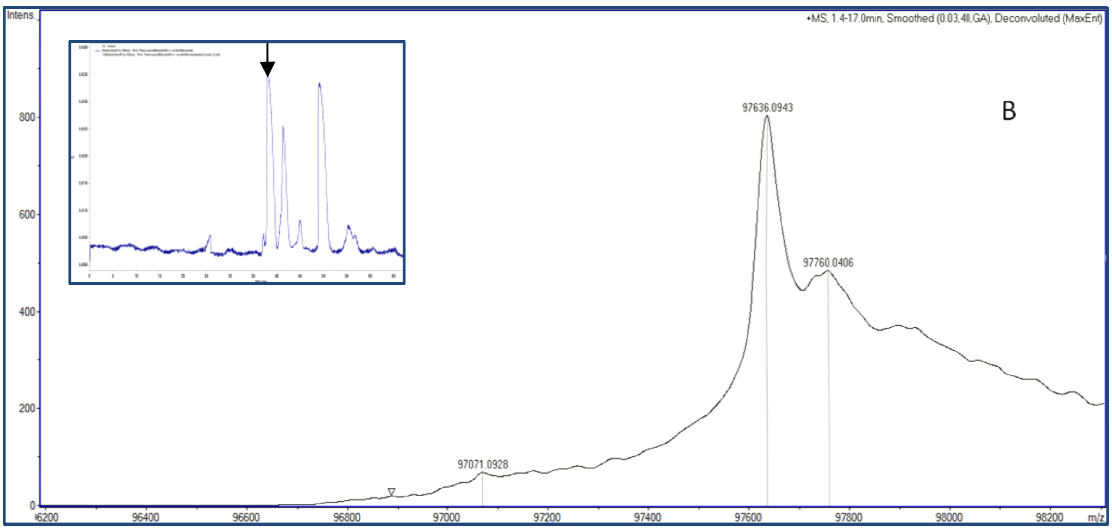


***Figure 12.** Spectre Déconvolué de la fraction B de la séparation d'IdeS de Trastuzumab*

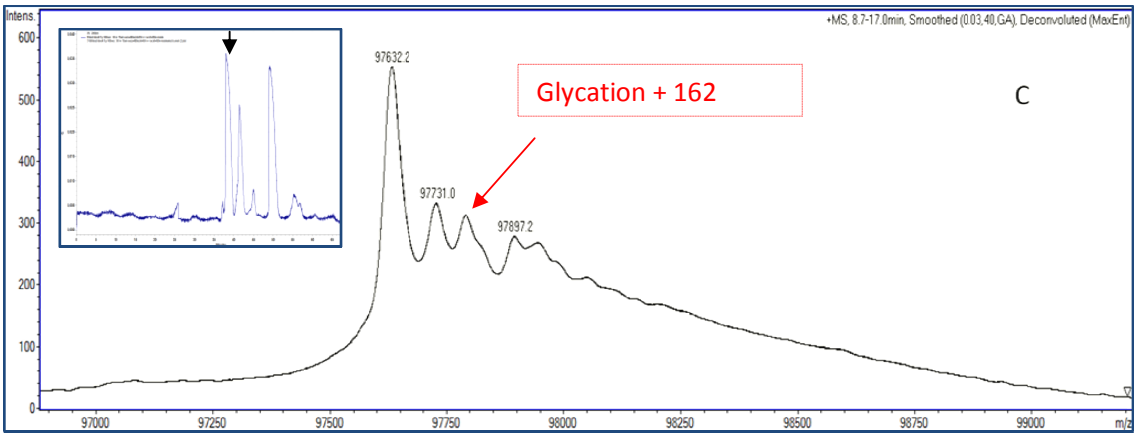


Figure 13. *Spectre Déconvolué de la fraction C de la séparation d'IdeS de Trastuzumab*

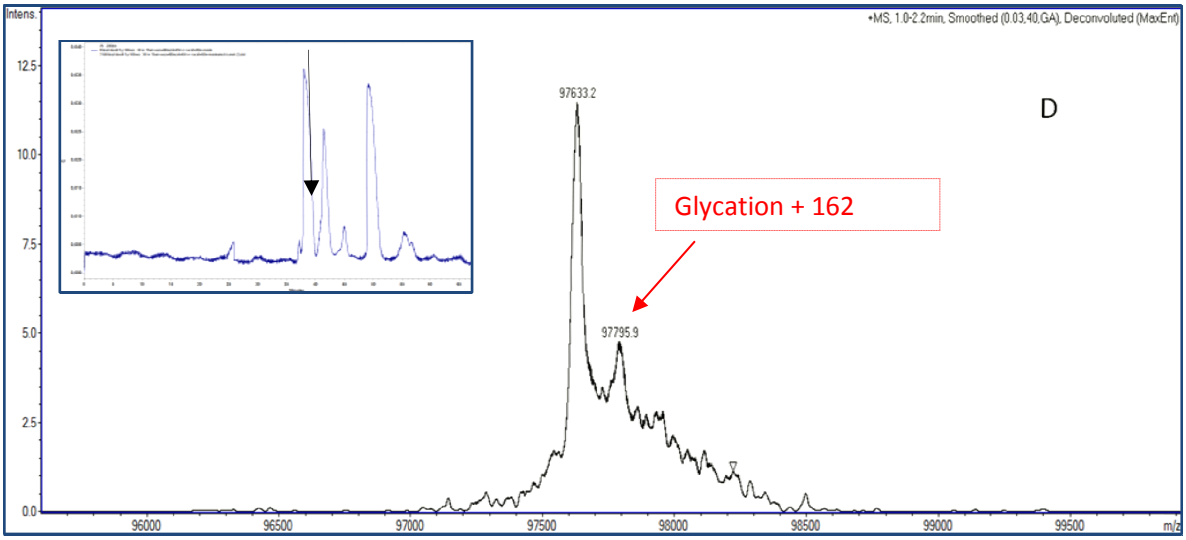


Figure 14. *Spectre Déconvolué de la fraction D de la séparation d'IdeS de Trastuzumab.*

Les figures 12, 13 et 14 montrent les spectres CESI-MS des fractions comportant le premier pic important de la séparation.

La figure 12 correspondant à la fraction B contient le premier pic principal juste avant le maximum d'absorption UV. Elle présente deux pics de masse de 97632 Da et 97760 Da correspondants au groupement F(ab')2 (97 kDa) de Trastuzumab et un isoforme présentant une différence de masse de 124 Da qui n'a pas pu être identifiée.

La figure 13 présentant la fraction C montre un spectre correspondant à la même portion F(ab')2 mais avec des isoformes différents. Sur ce spectre, nous pouvons voir qu'au moins quatre isoformes sont présents dans la fraction, avec notamment une masse correspondant à la présence d'une glycation (flèche rouge) caractéristique d'un + 162 Da.

Enfin la figure 14 présente le spectre de masse de la fraction D contenant la fin du premier pic de la séparation. Ce spectre présente deux pics de masse séparés de 162 Da correspondant à une glycation. L'analyse de ces trois premiers spectres correspondant au premier pic majoritaire de la séparation du digest IdeS de Trastuzumab montre clairement l'isolement d'une partie des fragment Fab du Trastuzumab et la présence de plusieurs isoformes de ce fragment F(ab')2.

Le deuxième pic principal de la séparation de digestat IdeS du Trastuzumab a été collecté dans la fraction E présentée ci-dessous dans la figure 15.

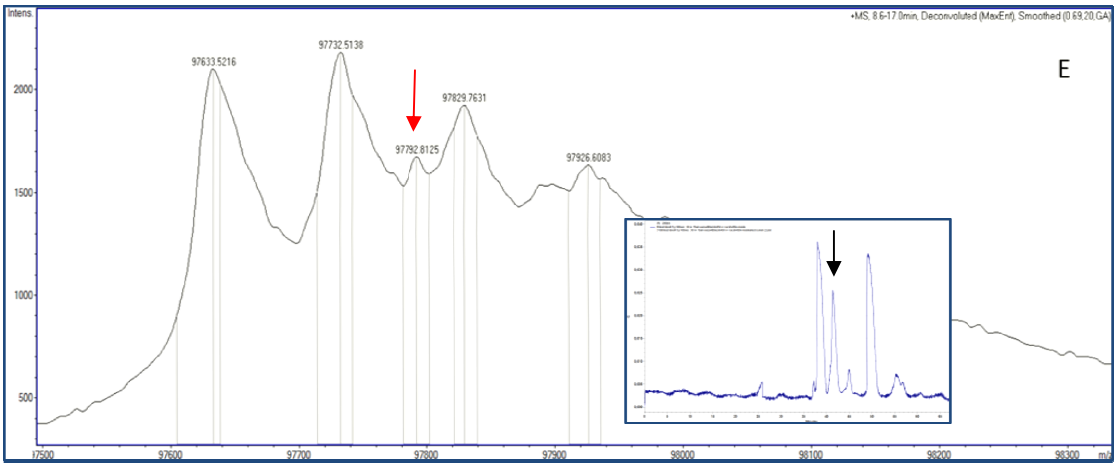


***Figure 15**. Spectre Déconvolué de la fraction E de la séparation d'IdeS de Trastuzumab.*

La déconvolution montre cinq masses de 97633, 97732, 97792, 97829 et 97926 Da respectivement. Ces masses correspondent toujours au groupement F(ab')2 (97 kDa) de Trastuzumab. Des différences de masses de 99, 159, 196 et 293 Da par rapport au pic principal à 97633 Da sont nettement visibles. Cependant, il est très compliqué dans cette expérience de pouvoir identifier avec certitude la nature propre des isoformes. Nous pouvons néanmoins noter que le pic correspondant à la différence de masse de 159 Da peut potentiellement représenter une glycation (162Da) et que la différence de 99 Da peut correspondre à l'oxydation d'une cystéine (98 Da).

Le troisième pic principal de la séparation de digestat IdeS du Trastuzumab a été collecté dans la fraction F présentée ci-dessous sur la figure 16.

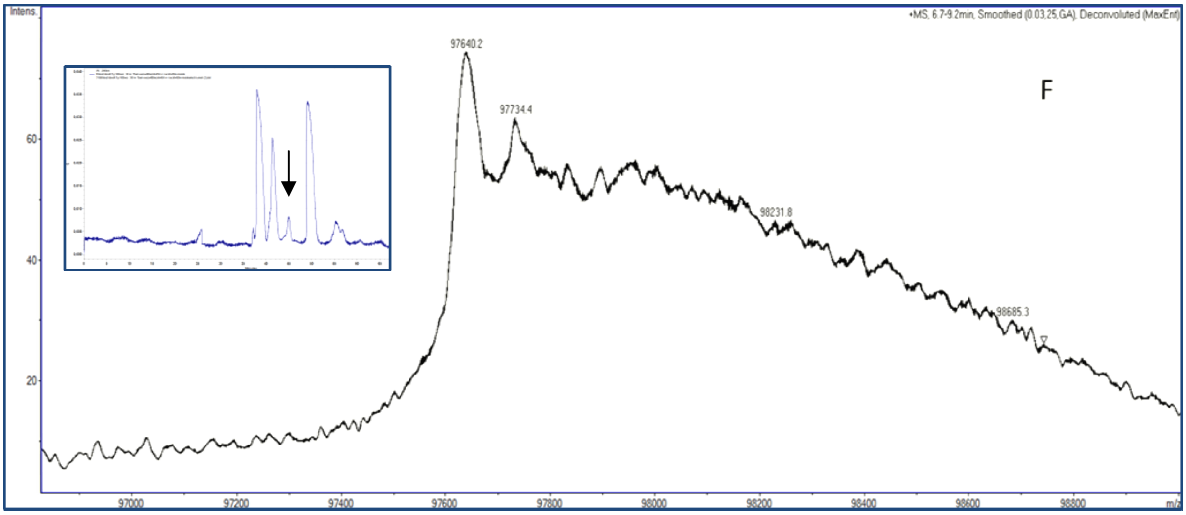


***Figure 17**. Spectre déconvolué de la fraction F de la séparation d'IdeS de Trastuzumab.*

La première remarque concerne la bonne corrélation entre l'intensité du pic électrophorétique et l'intensité du spectre de masse. En effet, le troisième pic est peu intense en comparaison avec les pics 1, 2 et 4 ce qui se retrouve dans l'étude de l'infusion CESI-MS. La fraction G montre un spectre correspondant encore une fois à la même portion F(ab')2 contenant deux analytes à 96640 et 97734 Da. La différence de masse de 94 Da peut, avec l'incertitude de la déconvolution correspondre à l'oxydation d'une cystéine (98 Da), mais cela reste très hypothétique. Cependant, il est à noter que les trois premiers pics de la séparation correspondent à la séparation d'isoformes de F(ab')2 du Trastuzumab. Ceci prouve que la séparation et la purification de ce fragment par CE est effective. De plus, la différence de masse très faible entre les différents pics majoritaires des fractions B à F permet d'éliminer l'hypothèse d'une séparation des isoformes du fragment F(ab')2 en fonction de la cyclisation de l'acide Glutamique en N-Term de la HC (-18 Da). Cette séparation peut éventuellement être expliquée par les deux sites de déamidations des Asparagine provoquant une perte de 0,98 Da et une perte d'une charge. Cela représente un résultat important, mais cela doit être confirmé par une méthode de caractérisation fine comme le Top Down par exemple à l'aide d'une cellule ETD.

Le quatrième pic principal de la séparation de digestat IdeS du Trastuzumab a été collecté dans la fraction G et est représenté figure 17.

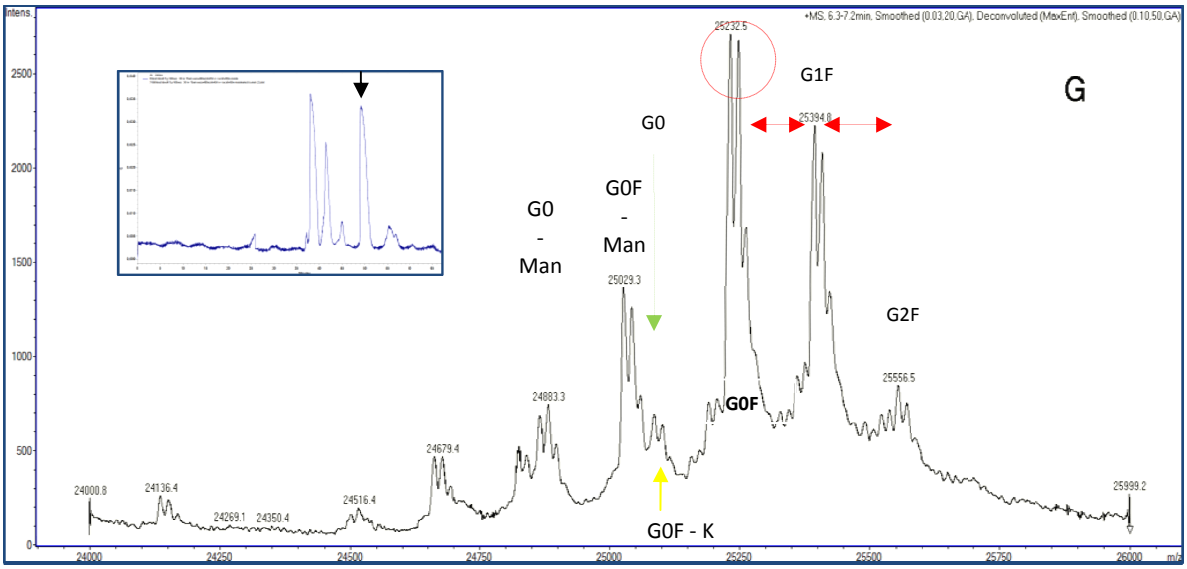


Figure 17. Spectre Déconvolué de la fraction E de la séparation d'IdeS de Trastuzumab.

La figure 17 montre le spectre ESI-MS déconvolué de la fraction G. Le spectre de masse montre une multitude de pics de masse d'environ 25000 Da et correspondant à différents isoformes de la partie FC/2. Nous notons un pic principal de masse 25232 Da autour duquel se distribue un massif de pics correspondant à de nombreux variants de masse. Ce pic de masse à 25232 Da correspond au fragment FC/2 portant la glycosylation noté G0F (figure 8). G0F est connue pour être la glycosylation majoritaire porté par le Trastuzumab. Les flèches rouges représentent des différences de masses de 162 Da correspondant à la perte ou à l'addition d'un hexose dans la glycosylation. L'identification des pics majoritaires est ensuite assez simple car elle consiste à rajouter ou à enlever un sucre à l'édifice principal G0F. En effet, le pic de masse à 25394 Da correspond au deuxième isoforme de Fc/2 portant cette fois-ci la glycosylation notée G1F (G0F + 1 mannose). Le pic de masse 25556 Da correspond à G2F (G1F + 1mannose). Enfin les isoformes correspondant à G0F defucosylé (G0) sont représentés par le massif de pic (flèche verte) à 25085 Da. Il est aussi possible d'identifier d'autres isoformes minoritaires. En effet, les masses 25029 Da et 24883 Da correspondent respectivement à G0F et G0 clivés d'un GlucNac. Enfin, les pics de masse 24866 Da et 24664 Da correspondent à G0F et G0 clivés d'un GlucNac et d'un Mannose. Concernant les pics principaux du spectre (G0F, G1F et G2F), nous pouvons remarquer leur profil répétitif et quasi-identique dans le rapport d'abondance (cercle rouge).Chaque

groupement se compose d'un pic principal et de deux pics ayant une différence de masse de 16 Da chacun. Cette différence de masse peut correspondre aux deux sites d'oxydation d'une méthionine de la chaine Fc/2.Enfin la flèche jaune indique un pic à 25105 Da. Cette masse peut correspondre à G0F (25232 Da) clivé de la lysine en N-Terminal (-128 Da). En effet, cette modification est souvent décrite lors d'étude de Trastuzumab[15].

Enfin, le cinquième pic principal de la séparation de digestat IdeS du Trastuzumab a été collecté dans la fraction H présentée figure 18.

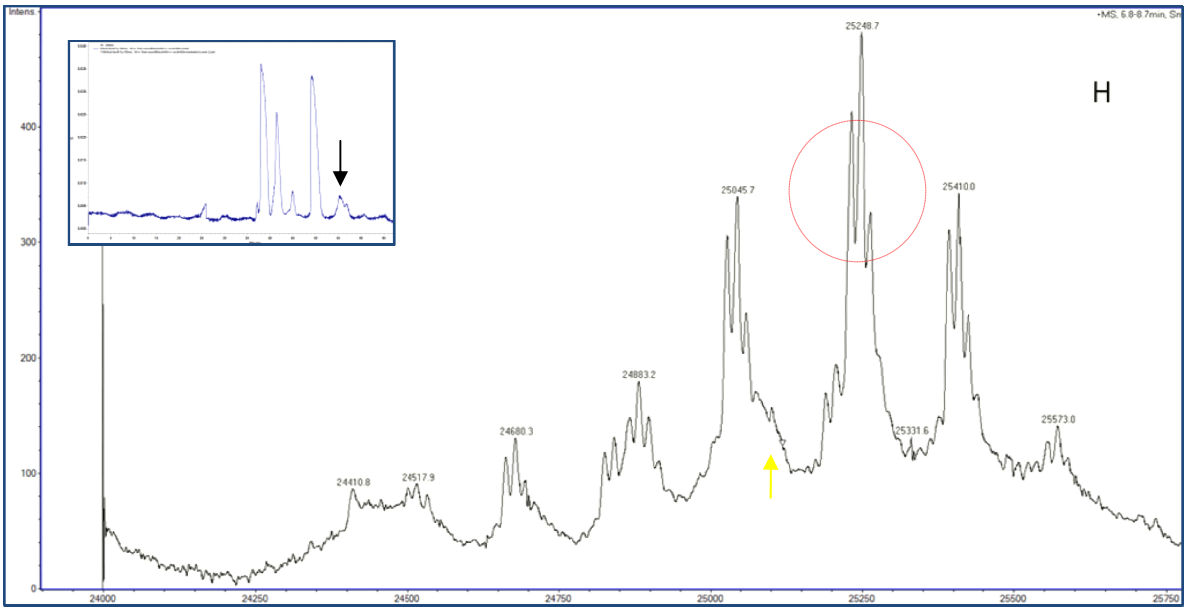


***Figure 18**. Spectre Déconvolué de la fraction E de la séparation d'IdeS de Trastuzumab.*

Le spectre ESI montre une multitude de pics de masse d'environ 25000 Da correspondant une nouvelle fois au fragment Fc/2. La liste de masses semble identique à celle retrouvée dans la fraction G. Néanmoins, les imprécisions de masse pendant la déconvolution peuvent être supérieures de 1Da. Ceci pourrait correspondre à une déamidation. En effet cette PTMs apporte une différence de masse très faible mais apporte une différence de charge de 1 qui pourrait expliquer une potentielle séparation des isoformes. Nous pouvons donc envisager que ces deux composés peuvent être différents d'une déamidation. Néanmoins, nous notons une nette différence dans l'abondance des modifications pour chaque isoforme (cercle rouge) par rapport à la fraction précédente. Enfin, la flèche jaune indique la présence éventuelle de Fc/2 - K. Finalement, si l'on considère la séparation des deux derniers pics nous pouvons noter que la CE permet de séparer deux massifs correspondant à différents

isoformes du fragment Fc/2 du Trastuzumab. A l'aide de la caractérisation ESI-MS, nous pouvons affirmer que la différence de masse entre les deux massifs est très faible éliminant la séparation du à la perte de lysine (-128 Da) ou à l'oxydation des méthionines (-16 Da).De plus, le caractère identique des deux massifs de pics en termes de distribution des glycosylation permet d'éliminer l'hypothèse d'une séparation des glycoformes.

2.3.2. Comparaison méthode de référence HPLC-MS

Dans le but d'évaluer les performances de notre stratégie de collecte de fractions suivie d'une infusion CESI-MS, nous avons eu l'opportunité de comparer nos résultats aux travaux habituellement effectués dans le département Qualité du laboratoire pharmaceutique Pierre Fabre (Saint-Julien-en –Genevois, France). Pour des raisons de confidentialité, nous ne sommes pas autorisés à donner les conditions analytiques de ces données. Cependant, cela nous permet d'avoir une référence par rapport à notre étude. La séparation de digestat de Trastuzumab à 3 µg/L a été effectuée par LC-MS (figure 19.)

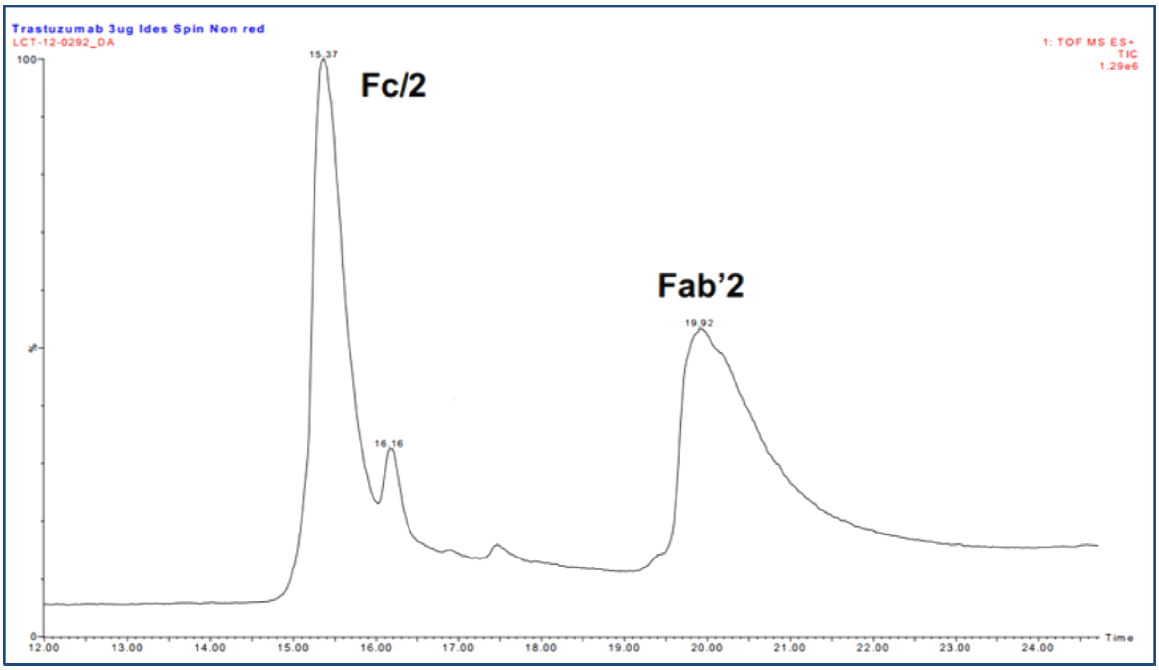


***Figure 19**. Séparation d'un digestat IdeS de Trastuzumab (3µg) par LC-ESI-MS*

Le chromatogramme représenté figure 19, présente une succession de 2 pics majoritaires identifiés par le laboratoire comme Fc/2 et F(ab')2. Les spectres ESI-MS des deux principaux pics sont présentés figure 20 et figure 21.

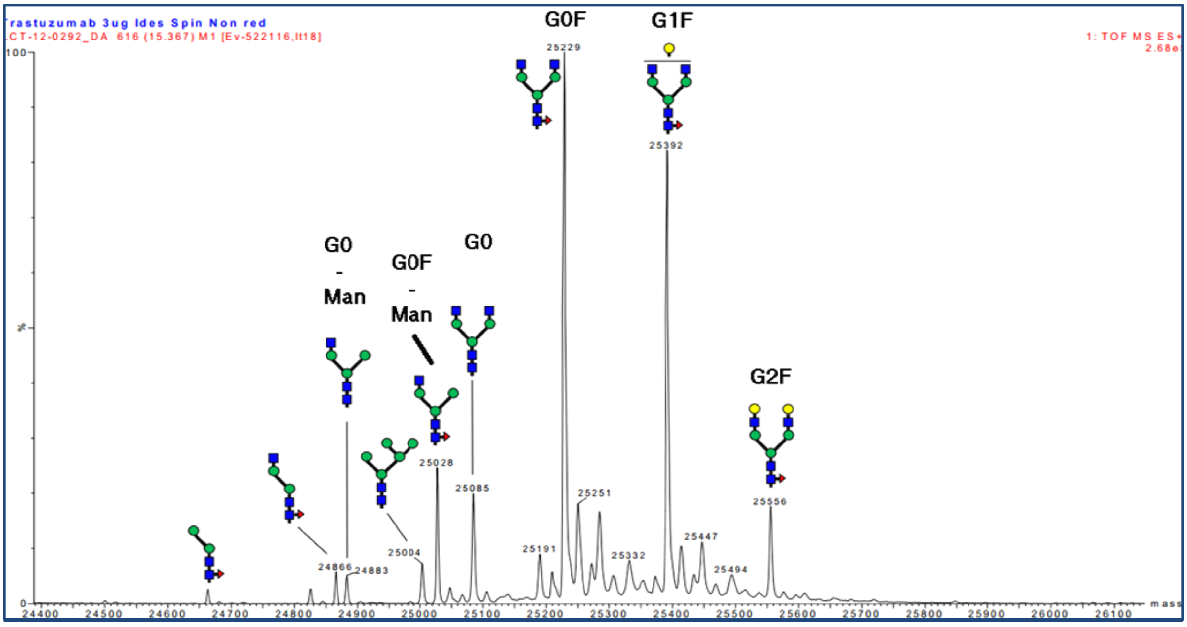


Figure 20. Spectre ESI de la fraction Fc/2 de Trastuzumab (3µg)

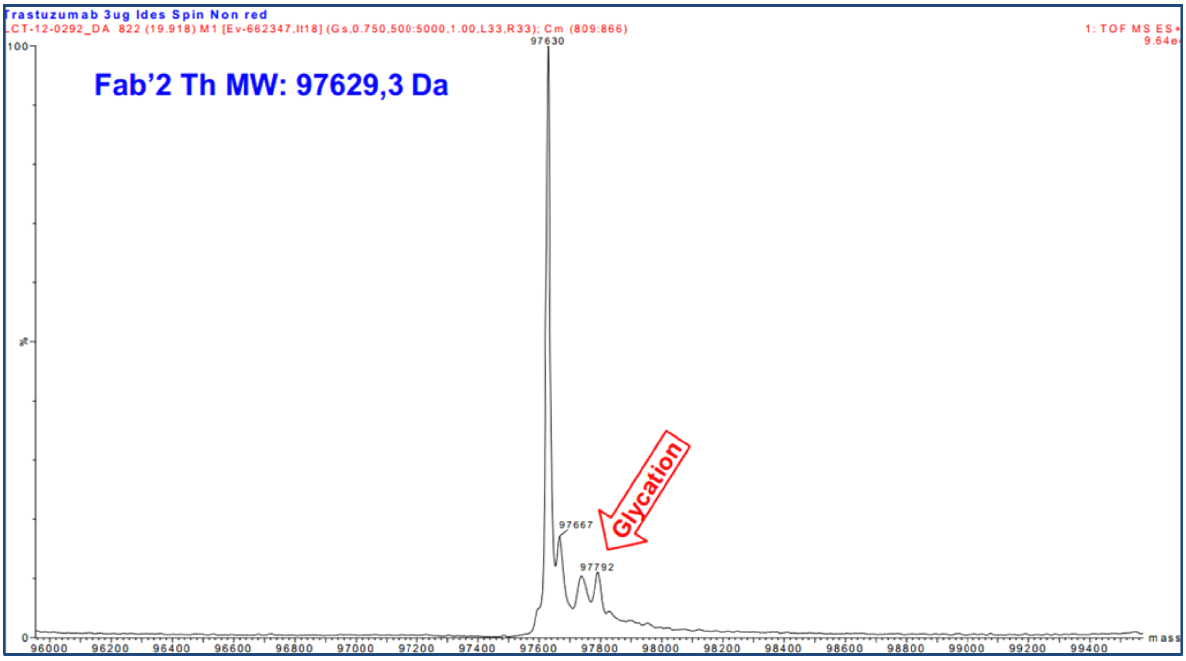


Figure 21. Spectre ESI de la fraction F(ab')2 de Trastuzumab (3µg)

Tout d'abord, nous pouvons remarquer la simplicité du chromatogramme de digestat Ides de Trastuzumab comparé à l'électrophérogramme que nous avons obtenu. Ceci démontre bien le meilleur pouvoir séparateur de la CE pour ce type d'échantillon. Concernant la détection MS, La figure 20 présente les spectres ESI déconvolués du premier pic de la séparation. Les différents pics correspondent à certains isoformes majoritaires du fragment Fc/2.De la même manière, la figure 21 représente le spectre ESI du pic identifié F(ab')2. Nous pouvons noter la grande cohérence entre nos résultats et ceux obtenus en LC-MS. Nous avons retrouvé la totalité des glycoformes pour le fragment Fc/2 et la glycation pour le fragment F(ab')2. De plus, comparés à ces résultats de référence, nous avons amélioré la caractérisation de ce type d'échantillons en séparant trois groupes d'isoformes de F(ab')2 et deux groupes d'isoformes de Fc/2. Cela confirme le bien fondé de notre stratégie permettant d'utiliser le pouvoir résolutif de la CE et de pouvoir infuser un très faible volume d'échantillon (2µL) en nanoESI-MS. Cela ouvre donc la voie à une caractérisation fine à l'aide d'une stratégie Top Down.

2.4. CETUXIMAB entier.

2.4.1. Infusion par CESI-MS

L'étude de Cetuximab a été effectuée dans le but de prouver la faisabilité de notre stratégie à deux dimensions comprenant la séparation et la collecte par la nouvelle interface CE/MALDI et l'infusion et la détection par le nouveau système CESI-MS sur un mélange d'isoformes de masse moléculaire proche de 150 kDa. Les résultats présentés dans la suite de cette partie sont les résultats préliminaires d'une séparation résolutive d'un mAb entier. Nous savons que les conditions de concentration de fraction et de résolution du microQTOF ne sont pas optimum pour obtenir des masses précises et donc la caractérisation des isoformes potentiellement séparés. Néanmoins, ces résultats sont présentés dans le but de discerner des différences notables de masses dans les fractions. De ce fait, toutes les conclusions en termes d'identification des possibles PTM restent des hypothèses. Cetuximab est une IgG2 caractérisée par 18 ponts disulfures. Tout comme Trastuzumab, parmi les PTMs rentrant en jeu dans le processus de reconnaissance avec l'antigène, on peut noter une cyclisation de l'acide glutamique en N-terminal de la HC et quatre déamidations d'asparagine. Par ailleurs, la principale

différence entre ces deux mAbs est que Cetuximab possède deux sites de glycosylation, une sur HC et l'autre sur LC.

L'échantillon Cetuximab de 1 g/L a été injecté et séparé sur un capillaire greffé HPC de 70 cm de longueur et 50 µm de diamètre interne grâce à un BGE d'entrée composés de EACA / $AcNH_4$ 200/25mM à ph 5.7 et un BGE de sortie servant de liquide additionnel composé $AcNH_4$ 25 mM. La détection UV déportée à 200 nm a donné l'électrophérogramme représenté figure 22. La quantité injectée de Cetuximab est de 2pmol.

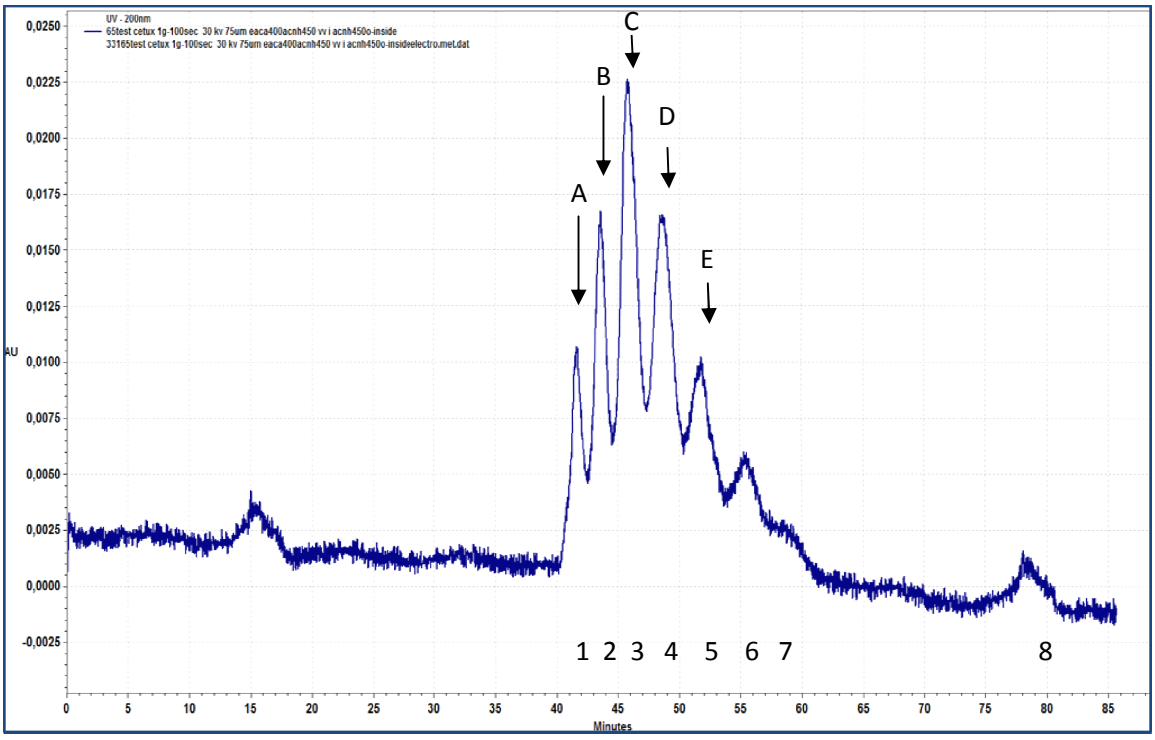


***Figure 22**. Electrophérogramme de Cetuximab 1 g/L Capillaire greffé HPC 75x50 BGE In EACA 200mM/AcNH4 25mM, BGE Out AcNH4 50mM, 30 kV, 40 µA, 200 nm, Couplé, Collecté. Condition « Mix ». Les flèches noires représentent les différentes fractions collectées*

Le profil électrophorétique obtenu pendant la séparation et la collecte présente huit pics distincts dont les apex sont séparés de plus 2 minutes chacun. Ce délai s'allonge au fur et mesure des temps de migrations des pics. La résolution de la séparation et la robustesse de la nouvelle interface a autorisé une collection de fractions. La collection a été effectuée dans les puits d'une plaque PCR contenant 5 µL de liquide additionnel composé d'acétate d'ammonium à 50 mM. Les fractions ont été évaporées

sous vide d'air et reprises à l'aide de 2 µL d'un mélange 50/50 acide formique 10% / ACN. Les fractions ont été infusées une après une par le système CESI MS. Les résultats suivants présentent les spectres de masses déconvolués dans l'ordre d'apparition sur l'électrophérogramme UV. Les cinq principaux pics sont collectés respectivement dans les fractions A, B, C, D et E. Elles sont présentées respectivement en figures 23 à 27. Sur chaque figure, un encart représente la séparation CE/UV de Cetuximab. La flèche noire indique la position de la fraction sur l'électrophérogramme.

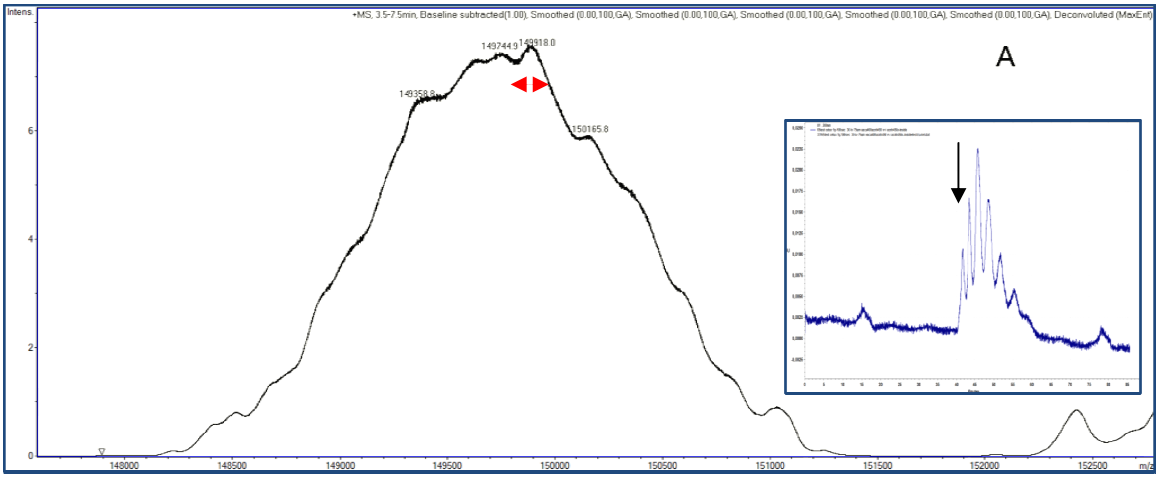


Figure 23. *Spectre Déconvolué de la fraction A de la séparation de Cetuximab*

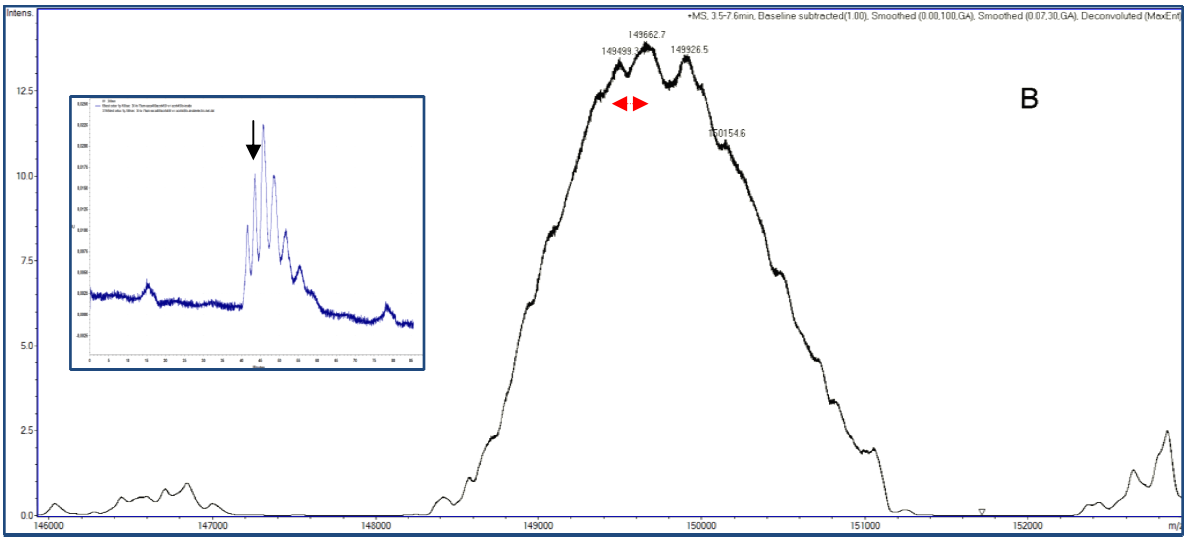


Figure 24*. Spectre Déconvolué de la fraction B de la séparation de Cetuximab*

Les figures 23 et 24 représentent les spectres de masse pour les fractions A et B. La figure 23 présente un spectre de masse déconvolué permettant de mettre en évidence de nombreuses masses représentant potentiellement des isoformes de Cetuximab. Nous remarquons une masse majoritaire (149918 Da) autour de laquelle se distribue divers épaulements de masse 150165, 149745, 149359 Da pouvant correspondre à des isoformes de Cetuximab. La flèche rouge indique une différence de masse 173 Da pouvant correspondre avec la faible résolution à la perte d'un hexose sur une glycosylation (-162 Da.) La figure 24 correspondant à la fraction B présente un spectre de masse déconvolué permettant de mettre en évidence de nombreuses masses représentant potentiellement des isoformes de Cetuximab. Nous remarquons une masse majoritaire (149662 Da) autour de laquelle se distribue divers épaulements de masse 149499, 149926, 150154 Da pouvant correspondre à des isoformes de Cetuximab. Cependant, les flèches rouges indiquent des différences de masse (163 Da) pouvant être apparentées à la perte d'un hexose sur une glycosylation (-162 Da). Malgré la faible résolution ne permettant pas de distinguer avec précision des isoformes de Cetuximab, nous notons toutefois la différence des profils de masse des deux fractions. Ces profils confirment la présence de composés différents et le bon déroulement de la séparation et de la collecte.

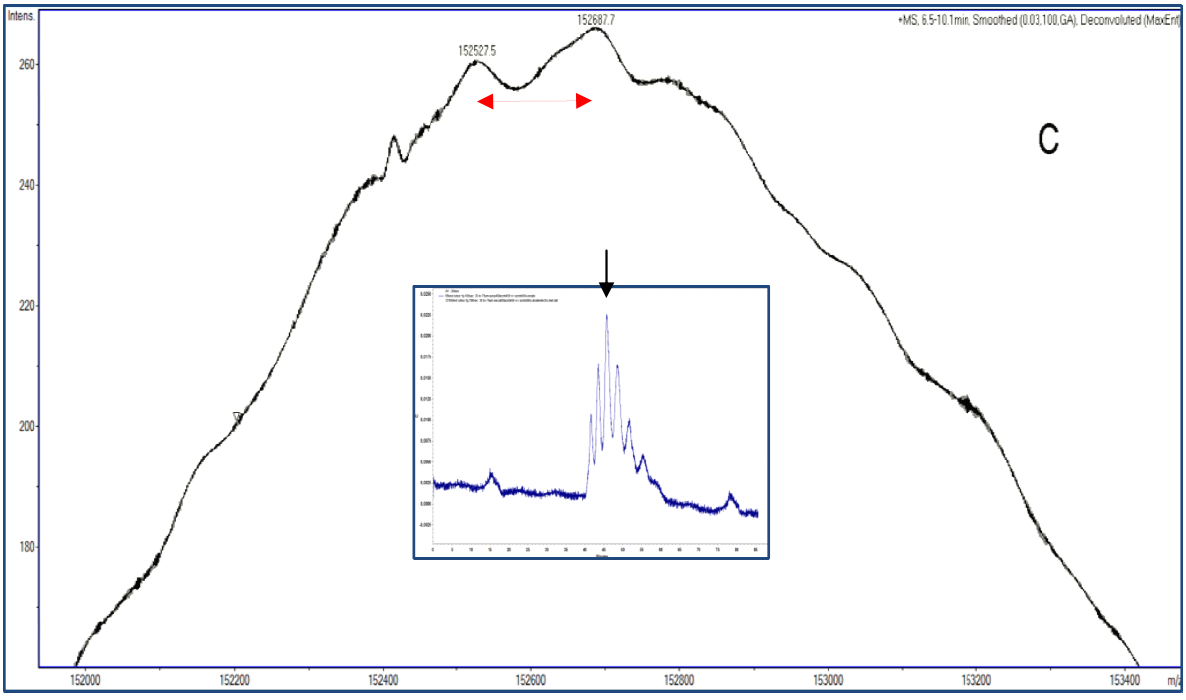


Figure 25. *Spectre Déconvolué de la fraction C de la séparation de Cetuximab.*

La figure 25 représente le spectre déconvolué de la fraction C. Cette fraction contient le pic majoritaire de la séparation électrophorétique. Nous remarquons une masse majoritaire (152687 Da) autour de laquelle se distribue divers épaulements de masse et notamment un pic de masse 152527 Da. La flèche rouge représente une différence de masse de 160 pouvant s'apparenter à la perte d'un hexose au niveau d'une des deux glycosylations (-162 Da.)

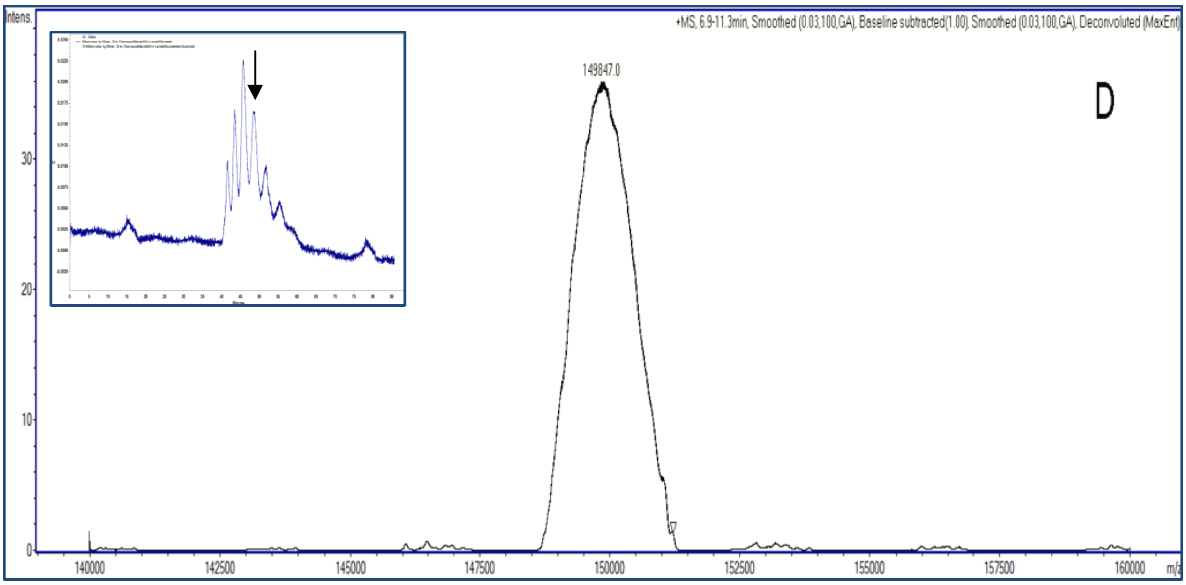


***Figure 26**. Spectre Déconvolué de la fraction D de la séparation de Cetuximab.*

La figure 26 présente le spectre déconvolué de la fraction D. Comme pour les figures précédentes, nous notons une différence notable de composition. Nous distinguons un pic de masse 194847 Da totalement différent de la fraction précédente. En effet, le spectre déconvolué ne présente pas les mêmes masses d'une fraction à l'autre. Ceci confirme la présence d'isoformes différents. Il est à noter que sur cette fraction, aucune glycosylation n'a été potentiellement observée, mais nous pensons que la faible intensité de signal et la déconvolution de cette fraction ne permet pas d'obtenir ce type d'informations.

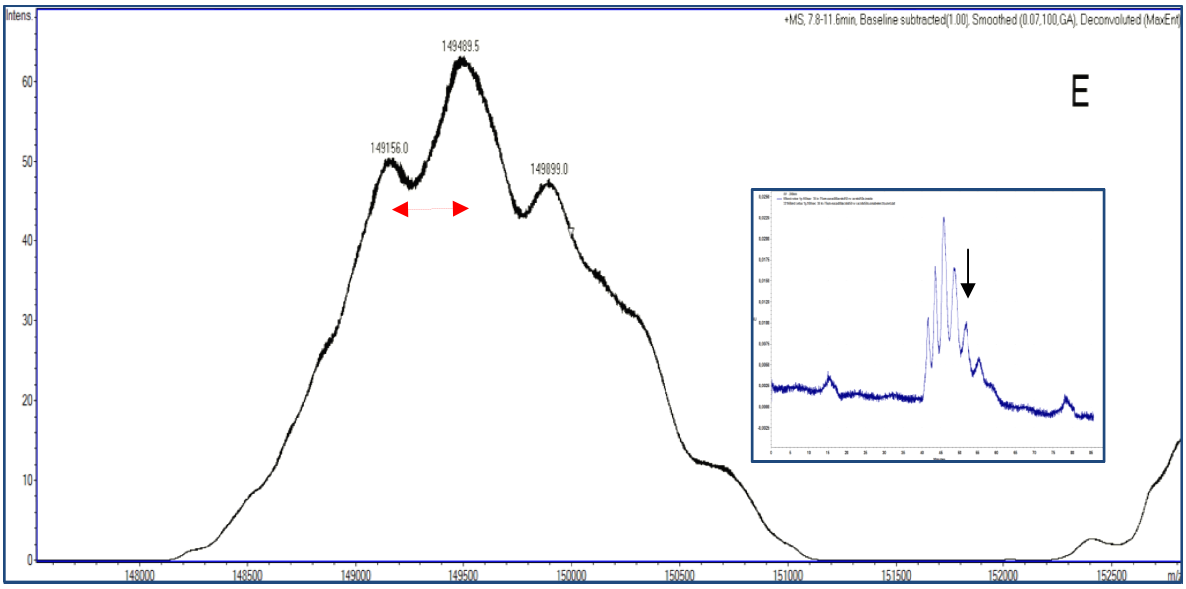


***Figure 27**. Spectre Déconvolué de la fraction E de la séparation de Cetuximab*

La figure 27 présente le spectre déconvolué de la fraction E. Nous notons trois pics principaux. Le profil de masse (149156, 149489 et 149899 Da) est complètement différent de celui retrouvé dans les autres fractions. La flèche rouge représente une différence de masse pouvant s'apparenter à la perte d'un acide N-Acetylneuraminique (-291 Da). De plus, le changement de profil s'accompagne d'un changement d'allure du pic sur l'électrophérogramme. En effet le pic UV correspondant à la fraction E semble moins symétrique et moins efficace.

Pour Cetuximab, le manque de résolution ne nous permet pas d'identifier des masses avec certitudes, néanmoins la différence de profil entre les fractions prouve que chaque pic électrophorétique contient un ou des isoformes différents. De plus, la présence dans la quasi-totalité des fractions d'un profil laissant penser à la présence de plusieurs formes glycosylées permet d'affirmer avec quasi-certitude que la séparation n'est pas due aux glycoformes.

2.4.2. Comparaison méthode de référence HPLC-MS

Tout comme l'étude du digestat IdeS de Trastuzumab, nous avons eu l'opportunité de comparer nos résultats aux travaux effectués dans le département Qualité du laboratoire pharmaceutique Pierre Fabre (Saint-Julien-en-Genevois, France). De la même manière, pour des raisons de confidentialité, nous ne sommes pas autorisés à donner les conditions analytiques de ces données. Cependant, cela nous permet d'avoir une référence par rapport à notre étude. La séparation de Cetuximab intact à 3 µg/L a été effectuée par LC-MS et n'a donné qu'un seul pic très peu efficace. Le spectre déconvolué de l'unique pic est représenté figure 28.

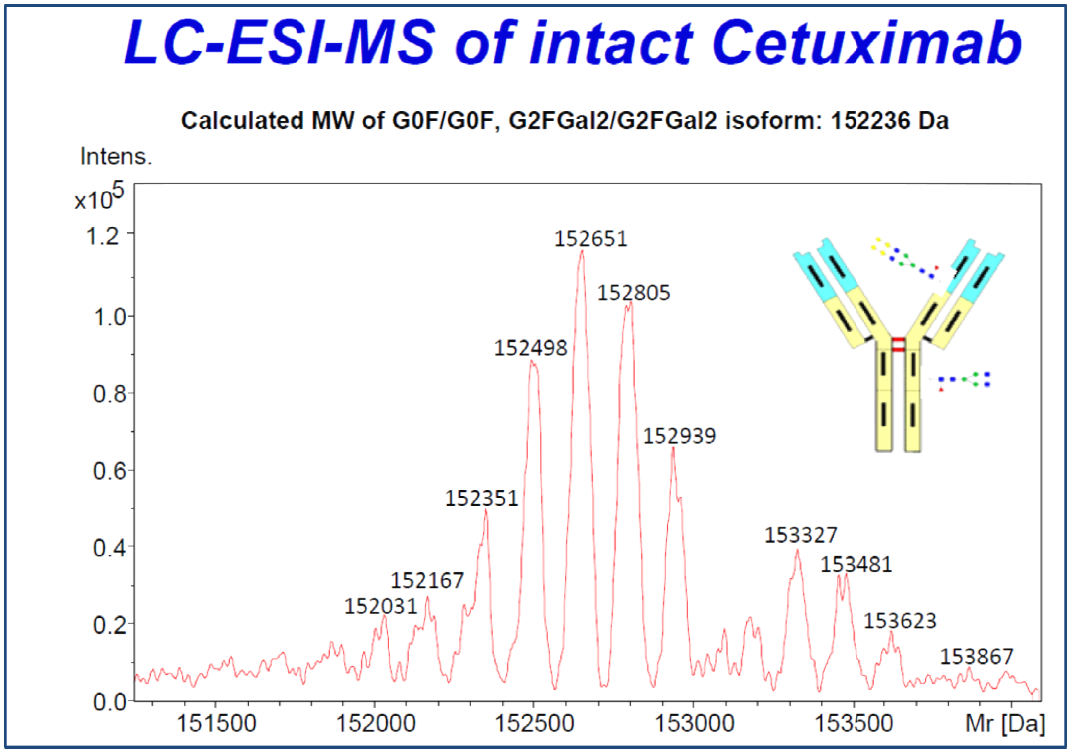


***Figure 28**. Spectre Déconvolué d'une séparation par LC-ESI-MS de Cetuximab entier*

Dans un premier temps, nous pouvons remarquer le manque de pouvoir résolutif de l'HPLC pour des isoformes de haut poids moléculaire. Ce résultat attendu est principalement du au phénomène de rétention très fort de ces composés sur la phase stationnaire. Tout comme l'étude du digestat IdeS de Trastuzumab, l'électrophérogramme que nous avons obtenu démontre bien le meilleur pouvoir

séparateur de la CE pour ce type d'échantillon. Concernant la détection MS, le spectre de masse présenté figure 28 a été obtenu sur un spectromètre de masse de dernière génération ce qui explique la meilleure résolution par rapport à nos résultats. Cependant, ceci n'indique pas de séparation des différents isoformes du Cetuximab et donc ce résultat pourrait théoriquement être obtenu par simple infusion de l'échantillon. Donc, comparé à ces résultats de référence, nous avons amélioré la caractérisation de ce type d'échantillons en séparant au moins cinq groupes d'isoformes de mAbs intacts. Cela confirme encore une fois le bien fondé de notre stratégie permettant d'utiliser le pouvoir résolutif de la CE et de pouvoir infuser un très faible volume d'échantillon (2µL) en nanoESI-MS. Cela ouvre donc la voie à une caractérisation fine à l'aide d'une stratégie Top Down.

3. Conclusion

Lors de ce travail, nous avons développé la première stratégie à deux dimensions, mettant en jeu la séparation et la collection de fractions grâce à couplage CE-UV/MALDI-MS/MS et l'infusion à l'aide de la nouvelle interface nanospray CESI-MS. Plusieurs optimisations ont été réalisées pour rendre une séparation de mAbs résolutive et compatible avec les exigences des analyses CESI-MS. En effet, l'ionisation par electrospray necessite des conditions en sels et en détergeants très contrôlées et très peu concentrées afin d'éviter les phénomènes de suppression d'ions. Or les différentes séparations résolutives connues de mAbs nécessitent des conditions électrophorétiques riches et complexes. Parti de ce constat, nous avons modifié et optimisé sur des séparations de mAbs entiers ces conditions et ce, de manière complètement inédite et originale. Pour cela, nous nous sommes basés sur le principe même des interfaces electrospray et de l'utilisation de liquide aditionnel pour les couplages CE-ESI-MS. En effet, la nature volatile et compatible à l'ESI du liquide aditionnel modifie les conditions électrophériques avec la dilution inévitable du BGE de sortie (BO). Ainsi nous avons élaboré les conditions « asymètriques » et « mixtes » avec des natures différentes de BGE en entrée et sortie de capillaire dans le but de réduire au maximum l'impact de l'EACA sur l'analyse CESI-MS. Dans un premier temps , nous avons décidé de diluer le BGE de sortie. L'utilisation de BGE dilué a montrer une augmentation de la mobilité entrainant une légère baisse de résolution. Ces nouvelles conditions « asymétriques » utilisant un BGE d'entrée à 400 mM d'EACA ph 5.7 et un BGE à 100 mM d'EACA pH 5.7 ont montré une conservation du profil électrphorétique global avec une résolution autorisant une

collecte de fractions efficace. Néanmoins, l'analyse des fractions a confirmé que l'EACA, restant dans le BGE de sortie et donc présent dans les fractions, empechait toute analyse ESI-MS. Paralèlement, la publication de nouvelles conditions de BGE compatibles avec la MS contenant exclusivement du $AcNH_4$ à 100 mM pH 5.7 montre des profils électrophorétiques similaires à ceux utilisant l' EACA. Cependant, le fort courant électrophorétique engendré par ces nouvelles conditions détériorent irrémédiablement l'intégrité physique du capillaire. Partis des avantages et des inconvénients des deux BGE électrophorétiques (EACA et $AcNH_4$), les conditions « mixtes » ont été mises au point en mélangeant, tout d'abord les deux BGE dans les mêmes proportions, afin de bénéficier dans le BGE d'entrée de l'effet de dilution de la solution l'$AcNH_4$ sur celle d'EACA diminuant ainsi la quantité de sels, mais aussi de l'effet de dilution de la solution de EACA sur l'$AcNH_4$ diminuant ainsi la force ionique et donc l'intensité de courant. Ces conditions ont montré comme prévu une conservation des profils résolutifs des séparations de mAbs. Enfin la dernière étape de l'optimisation a consisté en l'élimination complète de EACA du BGE de sortie pour la comptabilité du $ACNH_4$ avec l'ESI, un criblage de BGE a montré que les conditions de séparation à 200mM d'EACA et 25 mM d'AcNH4 à pH 5.7 en BGE d'entrée et 50 mM d'$AcNH_4$ pH 5.7 en BGE de sortie etaient le meilleur compromis entre résolution, temps d'analyse et intensité de courant. Grâce à ces nouvelles conditions inédites et compatibles avec l'ESI, nous avons utilisé la nouvelle interface pour l'analyse CE-UV/MALDI-MS/MS dans le but de collecter les variants de formes des mAbs dans de trés petits volumes (2µl) et de les infuser et les analyser par le CESI-MS. Cette statégie a été appliquée deux types d'échantillons de mAbs, d'une part Cetuximab entier pour sa complexité de structure et Trastuzumab partiellement digéré afin de confirmer les résultats du chapitre III sur la séparation des fragments FC/2 et F(ab)2. Les premiers résultats ont montré que la première dimension à permis de séparer et de collecter 3pmol de mabs entier ou digéré en donnant des profils tres caractéristiques. Ces profils ont une résolution permettant la collection fiable des différents pics électrophorétiques. Puis la deuxième dimension d'analyse par infusion CESI-MS a permis d'identifer la nature des espèces présentes sur l'électrophrégramme. Pour Trastuzumab, nous avons attribué aux 3 premiers pics de l'électrophorégramme, les natures Fc/2 et les deux derniers pics F(ab')2 aux pics. Cela a confirmé les différences de profils de masse des fractions traduisant la presénce de plusieurs variants issu des parties Fc/2 ou F(ab')2. De plus, la sensibilité du nanosprayeur CESI MS à permis de retrouver les différentes isoformes glycosylées connues. La présence d'isoforme glycosylée identique et Fc/2 - K (PTM « lysin truncation ») dans deux fractions différentes montrent leur non -implication dans la séparation électrophorétique. La comparasion avec une technique de

référence LC-ESI-MS a montré la concordence des résulatts sur l'identification des isoformes glycosylées et surtout confirmé le meilleur pouvoir résolutif de la CE pour la séparation d'isoformes de haut poids moléculaire sur une séparation de 3 µg de Trastuzumab digéré. Enfin pour Cetuximab, l'analyse de fraction a montré, comme pour Trastuzumab, une hétérogénéité en terme de profil de spectre ESI et de masses retrouvées.En effet, les différences entre les profils et les masses à l'intérieur et entre les fractions confirment la présence d'isoformes de mAbs entiers. Enfin, les profils de glycosylation présent dans chaque fraction confirme là encore la non-implication de celle-ci lors de la séparation électrophorétique. Néanmoins, le manque de résolution MS dans ses gammes de masses (150kDa) rend difficile leur identification précise. Enfin, la comparasion avec une technique de référence LC-MS a montré l'impossibilité de séparation des isoformes de masse de 150 kDa confirmant le potentiel indéniable de notre séparation électrophorétique.

Enfin, la totalité de ces résultats démontrent d'une part, les possibilités qu'offrent les nouvelles conditions de séparations « asymétriques » et « mixtes », et d'autre part la puissance de la stratégie à deux dimensions séparation/collecte puis infusion de très petit volume (2µl) par CESI-MS. L'addition de ces deux concepts novateurs procure à cette stratégie, robustesse, sensibilité pour la caractérisation de mAbs et autres biomolécules.

---

[1]Yelena LYUBARSKAYA, Damian HOUDE, James WOODARD, David MURPHY et Rohin MHATRE, « Analysis of recombinant monoclonal antibody isoforms by electrospray ionization mass spectrometry as a strategy for streamlining characterization of recombinant monoclonal antibody charge heterogeneity », *Analytical Biochemistry*, 1 janvier 2006, vol. 348, n° 1, pp. 24‑39.

[2]Ting SONG, Sureyya OZCAN, Alicia BECKER et Carlito B. LEBRILLA, « In-Depth Method for the Characterization of Glycosylation in Manufactured Recombinant Monoclonal Antibody Drugs », *Analytical Chemistry*, 17 juin 2014, vol. 86, n° 12, pp. 5661‑5666.

[3]Sara ROSATI, Yang YANG, Arjan BARENDREGT et Albert J R HECK, « Detailed mass analysis of structural heterogeneity in monoclonal antibodies using native mass spectrometry », *Nature Protocols*, 27 mars 2014, vol. 9, n° 4, pp. 967‑976.

[4]Rabah GAHOUAL, Jean-Marc BUSNEL, Philippe WOLFF, Yannis Nicolas FRANÇOIS et Emmanuelle LEIZE-WAGNER, « Novel sheathless CE-MS interface as an original and powerful infusion platform for nanoESI study: from intact proteins to high molecular mass noncovalent complexes », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, février 2014, vol. 406, n° 4, pp. 1029‑1038.

[5]Matthias WILM et Matthias MANN, « Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source », *Analytical Chemistry*, janvier 1996, vol. 68, n° 1, pp. 1‑8.

[6]Yan HE, Colleen ISELE, Weiying HOU et Margaret RUESCH, « Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary », *Journal of Separation Science*, 1 mars 2011, vol. 34, n° 5, pp. 548‑555.

[7]Yan HE, Nathan A LACHER, Weiying HOU, Qian WANG, Colleen ISELE, Jason STARKEY et Margaret RUESCH, « Analysis of identity, charge variants, and disulfide isomers of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in an uncoated capillary column », *Analytical chemistry*, 15 avril 2010, vol. 82, n° 8, pp. 3222‑3230.

[8]Yufeng SHEN et Richard D. SMITH, « High-resolution capillary isoelectric focusing of proteins using highly hydrophilic-substituted cellulose-coated capillaries », *Journal of Microcolumn Separations*, 1 janvier 2000, vol. 12, n° 3, pp. 135‑141.

[9]A. M. VANWIJK, P. G. MUIJSELAAR, K. STEGMAN et G. J. DEJONG, « Capillary electrophoresis-mass spectrometry for impurity profiling of basic pharmaceuticals using non-volatile background electrolytes », *Journal of Chromatography. A*, 3 août 2007, vol. 1159, n° 1-2, pp. 175‑184.

[10]Cevdet AKBAY, Syed A. A. RIZVI et Shahab A. SHAMSI, « Simultaneous Enantioseparation and Tandem UV–MS Detection of Eight β-Blockers in Micellar Electrokinetic Chromatography Using a Chiral Molecular Micelle », *Analytical Chemistry*, mars 2005, vol. 77, n° 6, pp. 1672‑1683.

[11]Anne-Laure GASSNER, Serge RUDAZet Julie SCHAPPLER, « Static coatings for the analysis of intact monoclonal antibody drugs by capillary zone electrophoresis », *Electrophoresis*, septembre 2013, vol. 34, n° 18, pp. 2718‑2724.

[12]Pierre SEGALEN et JN LEAL SILVA, « Le fer, le manganèse, l'aluminium et la silice facilement extractibles dans les sols tropicaux à sesquioxydes », *France Office Rech Sci Tech Outre mer Cah Orstom Pedol*, 1969.

[13]« Structural Characterization and Physicochemical Testing of Herceptin (Trastuzumab) | Biopharmaspec » (URL complète en bibliographie, consulté le 3 août 2014).

[14]« Structural Characterization and Physicochemical Testing of Erbitux (Cetuximab) | Biopharmaspec » (URL complète en bibliographie, consulté le 3 août 2014).

[15]Dashnor NEBIJA, Christian NOE, Ernst URBAN et Bodo LACHMANN, « Quality Control and Stability Studies with the Monoclonal Antibody, Trastuzumab: Application of 1D- vs. 2D-Gel Electrophoresis », *International Journal of Molecular Sciences*, 15 avril 2014, vol. 15, n° 4, pp. 6399‑6411.

CHAPITRE V : Bioavailability of *myo*-inositol trispyrophosphate (ITPP), a novel allosteric effector of hemoglobin, after oral and parenteral administration in mice assessed by MALDI-TOF mass spectrometry

1. Introduction

L'affinité de l'oxygène avec l'hémoglobine intra-érythrocytaire est largement influencée par des phosphates organiques en très faible concentration le 2,3-bisphospho-*D*-glycerate ou BPG. Ces molécules insèrent par liaison allostérique dans la cavité formée par la conjonction des N terminaux des chaines β.

Cette interaction engendre la stabilisation de la déoxyhémoblobine et par conséquent la diminution de l'affinité à l'oxygène. La conséquence physiologique est la favorisation du relarguage de l'oxygène dans les tissus.

Parmi les polyphosphates capables de diminuer l'affinité de l'hémoglobine humaine à l'oxygène, *myo*-inositol hexakisphosphate ou IHP est le plus puissant régulateur allostérique identifié. La liaison très étroite de l'IHP à la désoxyhémoblobine s'effectue dans la même poche positivement chargée que le BPG, mais avec une constante de dissociation évaluée à $6 \cdot 10^{-8}$ M. S'appuyant sur ce constat, les travaux décrit par Fylaktakidou *et al*. décrivent la synthèse et les propriétes biologiques de *myo*-inositol trispyrophosphate(ITPP) comme un nouveau régulateur allostérique transmembranaire de l'hémoglobine. En effet, l'ITPP est capable d'augmenter le relarguage d'oxygène in vitro que ce soit dans une solution d'hémoglobine ou dans le sang total. Ces propriétés de transfert d'hémoglobine permettent à l'ITPP d'être identifié comme un anti angiogénique et un anti cancer efficace, en empêchant l'hypoxie et la progression tumorale.

La détermination des concentrations du médicament dans les liquides biologiques est essentielle dans les études précliniques. Actuellement les techniques basées sur la

spectrométrie de masse se sont développées pour la recherche et le développement pharmaceutiques. Les méthodes de dosages actuelles sont souvent basées sur des techniques chromatographiques et de nombreuses étapes de préparation d'échantillons. Partis de ce constat, nous avons développé une technique fondée sur la spectrométrie de masse à source désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-MS) pour la détection et la quantification des faibles concentrations d'ITPP dans le plasma de souris.

Cette technique rapide nécessite peu de traitement d'échantillons. En effet, ce traitement a été optimisé pour n'utiliser qu'un passage sur colonne échangeuse de cations afin d'éliminer les adduits de sodium. Par la suite, il a fallu détecter la molécule de faible poids moléculaire. En effet, les faibles masses ont des temps de vol très courts et peuvent être détectés avec les molécules de matrice. Enfin le dosage et la détermination de la limite de détection (LOD) ont été déterminés contre un étalon interne deutérer dans le plasma de souris après différents modes d'administrations. Les concentrations plasmatiques ont été évaluées à 0,59 µM pour l'administration régulière par voie orale alors que les injections intra-parentéral et intraveineuse ont été évaluées respectivement à 0,17 et 0,15 µM. La LOD a été déterminée et fixée à 0,1 µM. Ainsi ces résultats font de l'administration orale la voie de privilégiée pour les études cliniques futures.

2. Article

Bioavailability of myo-inositol trispyrophosphate (ITPP), a novel allosteric effector of hemoglobin, after oral and parenteral administration in mice assessed by MALDI-TOF mass spectrometry

Carolina D. Duarte,[a] Aurélie Même,[b]Michaël Biacchi,[b]Alexandros E. Koumbis,[a,c]Ruth Greferath,[a,d] Emmanuelle Leize-Wagner,[b] Claude Nicolau,[a,d] Jean-Marie Lehn[a]

[a]Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires, Université de Strasbourg, 8 allée Gaspard Monge, 67000 Strasbourg, France

[b]Laboratoire de Dynamique et Structure Moléculaires par Spectrométrie de Masse (LDSM2) CNRS UMR 7177, Institut de Chimie de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

[c]Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 541 24, Greece

[d]NormOxys, Inc., 200 Boston Ave., Medford, MA02155, USA

Introduction

The oxygen affinity of hemoglobin (Hb) in erythrocytes is intensively influenced by the presence of low intracellular concentrations of organic phosphates, *e.g.* 2,3-bisphospho-*D*-glycerate (BPG, Figure 1),[(1)(2)]as a result of allosteric binding to the cavity at the *N*-termini conjunction of the β

chains with a dissociation constant of $1.5 \cdot 10^{-5}$ M.[3][4]. This interaction results in the stabilization of the deoxygenated form of hemoglobin, and the corresponding decrease in the oxygen affinity[5]. The physiological consequence of these phenomena lies on the enhancement of the oxygen perfusion from the blood stream to the tissues.

Among the polyphosphates able to decrease the affinity of human hemoglobin for oxygen, *myo*-inositol hexakisphosphate (IHP, Figure 1) is the most powerful allosteric effector identified so far[1]. The binding of IHP to deoxyhemoglobin, in the same positively-charged allosteric pocket of BPG binding site,[6] results in a very tight complex formation, with a dissociation constant of $6 \cdot 10^{-8}$ M.[7]

Recently, we described the synthesis and biological properties of *myo*-inositol trispyrophosphate(ITPP, Figure 1), a novel membrane-permeant allosteric effector of Hb, which is able to increase oxygen release *in vitro*, both in free Hb and whole blood[8]. In contrast, the lead compound IHP must be introduced into erythrocytes by physical methods, in order to increase their oxygen release, due to its highly charged nature.[9] As a result of this oxygen delivery enhancement, ITPP was identified as novel and highly effective anti-angiogenic and anti-cancer agent, counteracting the effects of hypoxia and therefore reducing cancer progression.[10][11] Furthermore, ITPP was also able to increase exercise capacityin both normal and transgenic mice with severe heart failure.[12]

The quantitative determination of drug candidates in biological samples is of master importance for pre-clinical drug development. The current methodologies available for this purpose are mostly based on liquid chromatography and require several extraction steps for sample preparation. Recently, mass spectrometry-based analytical methods have become standard in pharmaceutical research and product development. In this article, we describe the development of a matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF)-based method to detect and quantify down to femtomole amounts of ITPP in murine plasma.

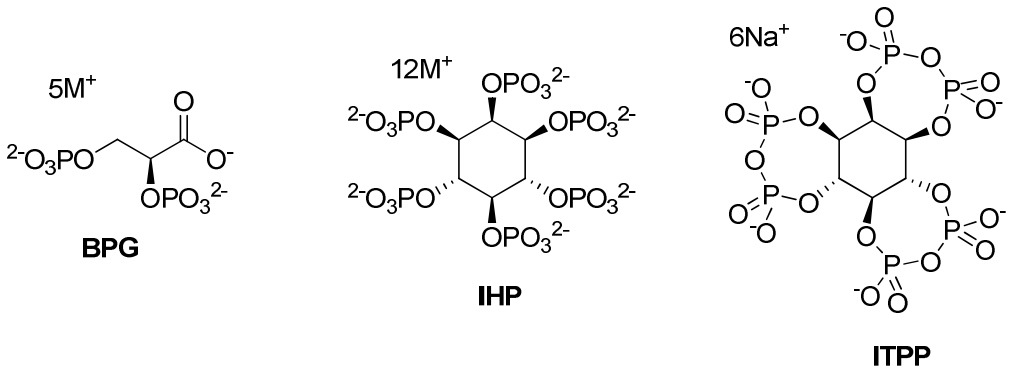


Figure1. Chemical structures of BPG, IHP and ITPP.

Materials and methods

Synthesis of ITPP

This membrane-permeant allosteric effector of Hb was synthesized as reported [8][15], by using an improved procedure. Briefly, IHP dodecasodium salt (Sigma) was converted via its perprotonated form, obtained by passage over Dowex® 50WX-200 (H^+)resin (Sigma-Aldrich), into its triethylammonium salt and then, upon heating with dicyclohexylcarbodiimide (Sigma-Aldrich) in acetonitrile:water 2:1 solution, triply cyclized to give the triethylammonium salt of ITPP. Thereafter, an aqueous solution of the latter was passed over Dowex® Marathon® C (Na^+) resin (Sigma-Aldrich) until cation exchange of triethylammonium against sodium was complete. Evaporation of the aqueous solution gave the sodium salt of ITPP in high purity (90% yield, 99.5% purity by ion chromatography).

Synthesis of ITPP-d_6

All commercially available grade quality reagents were used without further purification. All solvents were purified by standard procedures before use.*myo*-Inositol-d_6 ([1-^{2}H, 2-^{2}H, 3-^{2}H, 4-^{2}H, 5-^{2}H, 6-^{2}H]1,2,3,4,5,6-*myo*-inositol) was purchased from C/D/N Isotopes Inc.Whenever possible reactions were monitoredon commercial available pre-coated TLC plates (layer thickness0.25 mm) of Kieselgel 60 F254 and compounds were visualized by use of a UV lamp and phosphomolybdic acid solution and warming. Flash column chromatography was performed using silica gel (Si 60, 40–63 mm, Merck) on a classical glass column.

^{1}H,^{13}C and ^{31}P NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 400 spectrometer at 400, 100 and 162 MHz, respectively. Chemical shifts are given in ppm. Residual solvent peaks were taken as reference for ^{1}H ($CDCl_3$: 7.26 ppm, D_2O: 4.79 ppm), ^{13}C ($CDCl_3$: 77.0 ppm, methanol in D_2O: 49.50 ppm)(13), and for ^{31}P NMR, 85% phosphoric acid was used as external reference (0 ppm). The coupling constants *J*are given in Hz. Peaks are described as singlet (s), doublet (d), triplet (t), doublet of doublet (dd), multiplet (m) and broad (br). All spectra were recorded at 25°C.

High resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESI-MS) analyses were performed on a Bruker Micro TOF mass spectrometer at the Service de Spectrométrie de Masse,

Université de Strasbourg. The given value represents the main largest peak. The observed isotopical pattern was always conformed to the theoretical pattern.

[1-^{2}H, 2-^{2}H, 3-^{2}H, 4-^{2}H, 5-^{2}H, 6-^{2}H]Dodecabenzyl 1,2,3,4,5,6-myo-inosityl hexakisphosphate ***1***

myo-Inositol-d_6 (112 mg, 0.6 mmol) was dried under high vacuum for 24h. Then, a 0.45 M solution of tetrazole in acetonitrile (24 mL, 10.8 mmol) was added under a N_2 atmosphere at room temperature. Dropwise addition (30 min) of dibenzyl *N*,*N*-diisopropylphosphoramidite (1.95 mL, 5.8 mmol) to the resulting suspension followed. The obtained slurry was vigorously stirred at room temperature for 48h. Then, dichloromethane (10 mL) was added and the mixture was cooled to -50^{o}C. A solution of 70% *m*-chloroperbenzoic acid (1.90 g, 7.7 mmol) in CH_2Cl_2 (15 mL) was dropwise added and the resulting solution was left to stir at 0^{o}C for 5h. Then, the mixture was diluted with dichloromethane (150 mL) and successively washed with a 10% aqueous solution of sodium sulphite (2×100 mL), saturated aqueous solution of sodium bicarbonate (2×75 mL), H_2O (1×75 mL) and saturated brine (1×75 mL). The organic phase was dried ($MgSO_4$) and the solvents were removed under reduced pressure (30^{o}C). The obtained residue was purified by flash column chromatography (25% to 60% ethyl acetate in heptanes) to yield hexakisphosphate **1** (843 mg, 80%) as a thick colorless oil. R_f: 0.34 (65% ethyl acetate in heptanes); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.34-7.30 (m, 4H, ArH), 7.26-7.14 (m, 56H, ArH), 5.25 & 5.14 (dABq, J_{AB} = 12.0 Hz, $^3J_{HP}$ = 5.8 Hz, 4H, 2×CH_2Ph), 5.10-4.94 (m, 20H, 10×CH_2Ph); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 135.75 (d, $^3J_{CP}$ = 5.3 Hz, 2×C-*i*Ar), 135.74 (d, $^3J_{CP}$ = 5.3 Hz, 2×C-*i*Ar), 135.71 (d, $^3J_{CP}$ = 6.1 Hz, 2×C-*i*Ar), 135.58 (d, $^3J_{CP}$ = 8.4 Hz, 2×C-*i*Ar), 135.50 (d, $^3J_{CP}$ = 6.9 Hz, 2×C-*i*Ar), 135.48 (d, $^3J_{CP}$ = 6.9 Hz, 2×C-*i*Ar), 128.6, 128.52, 128.50, 128.43, 128.39, 128.31, 128.26, 128.2, 128.1, 128.0 (C-*o*Ar, C-*m*Ar, C-*p*Ar), 75.2 (br s, C-2), 74.6 (br s, C-4 & C-5 & C-6), 73.5 (C-1 & C-3), 69.9 (d, $^2J_{CP}$ = 5.3 Hz, 2×*C*H$_2$Ph), 69.7-69.5 (m, 10×*C*H$_2$Ph); ^{31}P NMR ($CDCl_3$, 162 MHz, ^{31}P-^{1}H decoupled): δ -0.62 (2P), -0.72 (1P), -1.31 (2P), -2.30 (1P); HRMS (ESI): m/e Calcd for $C_{90}H_{84}D_6NaO_{24}P_6$ [(M+Na)$^+$]: 1769.4517, Found: 1769.4413.

[1-^{2}H, 2-^{2}H, 3-^{2}H, 4-^{2}H, 5-^{2}H, 6-^{2}H]Hexa(triethylammonium) 1,2,3,4,5,6-myo-inosityl hexakisphosphate ***2***

Dodecabenzyl derivative **1** (1.60 g, 0.92 mmol) was dissolved in a 1:1 mixture of ethanol and deionized water (60 mL). Triethylamine (1.55 mg, 11.1 mmol) was added to the resulting emulsion,

followed by 10% Pd/C (1.38 g). This mixture was shaken under a H_2 atmosphere (3 atm) at room temperature for 36h. At that time a ^{1}H NMR spectra of a sample showed completion of the reaction. Then, the catalyst was removed by filtration through an LCR/PTFE hydrophillic membrane (0.5 µm), the latter was washed with a 1:1 mixture of ethanol and deionized H_2O (2×30 mL). The combined filtrates were evaporated under reduced pressure (50°C) and the obtained residue was dried under high vacuum for 24h to give hexa(triethylammonium) salt **2** as a pale brown oil (1.16 g, 100%). ^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz): δ 2.98 (q, *J* = 7.3 Hz, 36H, 18×CH_2), 1.07 (t, *J* = 7.3 Hz, 54H, 18×CH_3); ^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz): δ 77.0-76.7 (m, C-5), 75.7-75.2 (m, C-4 & C-6), 75.0-74.6 (m, C-2), 73.0-72.5 (m, C-1 & C-3), 46.4 (18×CH_2), 8.2 (18×CH_3); ^{31}P NMR (D_2O, 162 MHz, ^{31}P-^{1}H decoupled): δ 1.04 (1P), 0.53 (2P), 0.05 (2P), -0.46 (1P).

*(±)-[1-^{2}H, 2-^{2}H, 3-^{2}H, 4-^{2}H, 5-^{2}H, 6-^{2}H]Hexa(triethylammonium) 1,2,3,4,5,6-myo-inositol-[1,2:3,4:5,6]-trispyrophosphate **3***

Triethylammonium salt **2** (490 mg, 0.39 mmol) was dissolved in deionized H_2O (3.5 mL) and a solution of *N,N*'-dicyclohexylcarbodiimide (670 mg, 3.3 mmol) in acetonitrile (7 mL) was added. The mixture was heated at 90°C for 40h. At that time a ^{31}P NMR spectra of a sample showed complete consumption of starting material. The mixture was left to cool to room temperature and filtered. The filtrate was evaporated at 50°C. The obtained residue was found to be 98% pure triethylammonium pyrophosphate salt**3** (470mg, 97%) as a colorless thick oil. ^{1}H NMR (D_2O, 400 MHz): δ 3.05 (q, *J* = 7.2 Hz, 36H, 18×CH_2), 1.15 (t, *J* = 7.2 Hz, 54H, 18×CH_3); ^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz): δ 77.0-76.7 (m), 75.9-75.7 (m), 74.7-74.4 (m), 73.4-73.0 (m), 72.9-72.6 (m), 72.2-71.9 (m), 46.5 (18×CH_2), 8.3 (18×CH_3); ^{31}P NMR (D_2O, 162 MHz, ^{31}P-^{1}H decoupled): δ -10.35 & -15.02 (ABq, $^2J_{PP}$ = 23.8 Hz, 2P, P-1 & P-2), -11.38 (br s, 2P, P-5 & P-6), (br s, 2P, P-3 & P-4).

*(±)-[1-^{2}H, 2-^{2}H, 3-^{2}H, 4-^{2}H, 5-^{2}H, 6-^{2}H]Hexasodium 1,2,3,4,5,6-myo-inositol-[1,2:3,4:5,6]-trispyrophosphate **4**(ITPP-d_6)*

Triethylammonium pyrophosphate salt**3** (470 mg, 0.39 mmol) was diluted with deionized water (10 mL) and passed through a column loaded with Dowex® 50WX-200 (H^+) resin (20 g). The resin was further washed with deionized water (3×10 mL). The acidic collected fractions were transferred in a flask containing Dowex® Marathon® C (Na^+) resin (45 g). This mixture was stirred

vigorously at room temperature for 3h. Then the resin was filtered and water was removed by evaporation at reduced pressure (50°C). The residue was found to be the pure desired pyrophosphate **4**(ITPP-d_6), as a white solid (284 mg, 99%). ^{13}C NMR (D_2O, 100 MHz): δ 76.7-75.5 (m, 2C), 75.3-74.6 (m, 1C), 73.9-73.2 (m, 1C), 73.1-72.4 (m, 2C); ^{31}P NMR (D_2O, 162 MHz, ^{31}P-^{1}H decoupled): δ -9.41 & -14.18 (ABq, $^{2}J_{PP}$ = 21.8 Hz, 2P, P-1 & P-2), -10.59 & 10.78 (ABq, $^{2}J_{PP}$ = 17.8 Hz, 2P, P-5 & P-6), (br s, 2P, P-3 & P-4); HRMS (ESI): m/e Calcd for $C_6D_6Na_5O_{21}P_6$ [$(M-Na)^-$]: 720.7687, Found: 720.7730.

Sample preparation and application

The matrix was freshly prepared before use, as follows:8 mg of 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA, from Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was dissolved in 100 µL of a 1:1 (v/v) fresh mixture of ammonium hydrogen citrate (Fluka,Buchs, Switzerland) solution (50 mg/mL)and HPLC grade acetonitrile (Sigma,St Louis, MO, USA).

Three distinct groups of mice (n=3) were treated with ITPP and one group (n=3) was kept as control. ITPP was administered per oral (p.o.) in one group, where the animals had free access to drink a 20 g/mL ITPP hexasodium salt instead of water. The other ITPP-treated mice groups received either a unique intraperitonial (i.p.) or intravenous (i.v.) dose of 1g/Kg. Whole blood was freshly withdrawn from ITPP-treated (p.o. after 8 weeks, i.p. after 24h and i.v. after 6h) and untreated mice in heparinized microtubes, kept under refrigeration (4°C) and fractioned according to the procedure described as follows. Whole blood was centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes (4°C) and supernatant was siphoned off and reserved in a separated microtube for further analysis, giving the plasma fraction.

The internal standard (ITPP-d_6) stock solution was freshly prepared with a concentration of 743 µg/mL (1mM) in HPLC grade water (Milli-Q system, Millipore). The stock solution was used to prepare the standard solution of ITPP-d_6 at 10 µM. 20 µL of the latter were spiked to 20 µL of plasma.Each spiked sample was diluted in 160 µL of 20 mM ammonium acetate (Sigma,St Louis, MO, USA)solution, with a dilution factor of 10 for the blood fraction-ITPP-d_6 mixture.The diluted solutions were passed through strong cation-exchange resin cartridges(Discovery DSC-SCX, 1 mL tubes, 50 mg, from Supelco,Bellefonte, USA) before being mixed 1:1 (v/v) with the matrix solution.

The resulting samples were immediately applied on a stainless steel MALDI plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) by sucking 1 µL of the samples into the pipette and carefully pushing the liquid out of the pipette tip without touching the plate. The spots were dried in air and the matrix was quickly crystallized. After crystallization, the sample was washed by pipetting a drop of 1 µL of cold 5% formic acid solution on the top of the sample spots that was carefully removed. The laser shots were performed randomly on the spot.

Construction of ITPP standard curves in mouse plasma

The standard curves were constructed by analyzing samples containing a predetermined amount of ITPP and a constant amount of the internal standard (ITPP-d_6, 10µM). The mass spectrometry (MS) spectrum of ITPP in its free acid form presents a characteristic peak at a mass-to-charge ratio of 604 Da, corresponding to $[ITPP^{6-}+5H^{+}]^{-}$, whereas the corresponding hexadeuterated analog ITPP-d_6 gives a distinct peak at a mass-to-charge ratio of 610 Da (Figure2). The ratios between the intensity of the peaks in the MS spectrum corresponding to ITPP and ITPP-d_6 were determined and plotted against ITPP concentrations, resulting in linear curves.

Because plasma samples constitute a complex medium, it contains other molecules apart from ITPP or ITPP-d_6, which absorb energy during the ion extraction and may influence the spectra of a given sample. To mimic the conditions of plasma, the samples for the standard curve were prepared by spiking them (20µL of plasma) with variable concentrations of ITPP (20 µL of 1000-0.1µM or 732-0.0732 µg/mL solutions) and the internal standard ITPP-d_6 was added (20 µL) at a fixed concentration of 10 µM. The spiked samples were then diluted in 20 mM ammonium acetate (140 µL) and treated as described above for the sample preparation and application.

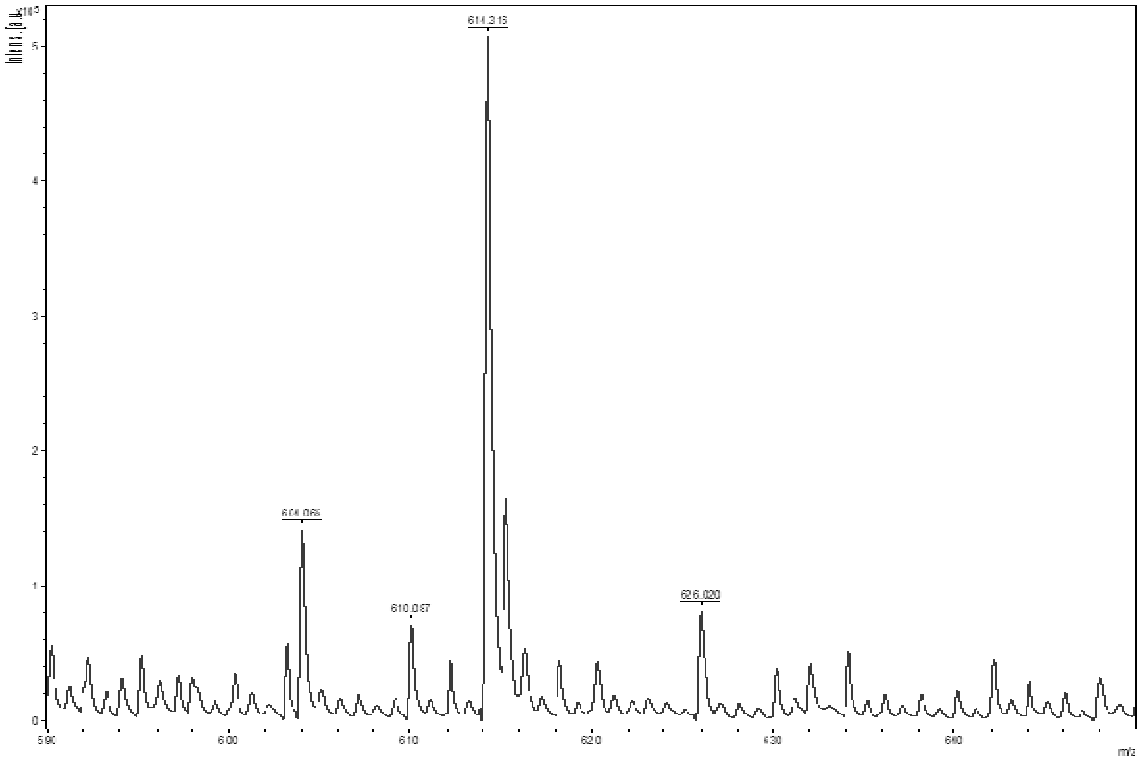


Figure2. MALDI spectrashowing ITPP and ITPP-d_6 peaks,in a sample of both compounds spiked in plasma. Peaks at *m/z* 604.8 and 610.4 correspond to $[ITPP^{6-} + 5H^+]^-$ and $[ITPP\text{-}d_6^{6-} + 5H^+]^-$.The mass spectrum was retrieved from a sample containing 10 µM of the analyte (ITPP) and 10 µM of the internal reference (ITPP-d_6).

Sample analysis by MALDI-TOF

MALDI mass spectra were acquired on a time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF-TOF Autoflex II, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a nitrogen laser (λ = 337 nm) operating at a pulse rate of 200 Hz. Pressures in the source and reflector region were required to be less than $3 \cdot 10^{-7}$ and 10^{-7} mbar, respectively, for appropriate sensitivity and reproducibility. For spectrum acquisition, the instrument was operated in reflector mode and the polarity was set to the detection of negative ions. Full scan were acquired under the following experimental parameters: IS1, 15 kV; IS2, 13.28 kV; lens, 5.58 kV; pulsed ion extraction, 0 ns; reflector, 15.78 kV; reflector 2, 8.25 kV; gain, 16. Scanning was performed on an *m/z* range from 560 to 700; the low-mass cut-off was set in all cases to *m/z* 600. The laser irradiance was generally slightly above threshold.

A first shot phenomenon was observed. Consequently, a total of 20000 shots were accumulated for each spectrum, with a maximum of 20 shots on the same position. The shots were performed randomly on the spot. Spectra were smoothed using the Savitzky Golay algorithm. An external mass calibration covering a *m/z* 400 to 3000 mass range was carried out before each

measurement using the singly charged peaks of a standard protein mixture (0.4 μM, in 1% formic acid solution).

Results and Discussion

MALDI-TOF analysis is based on the ionization of crystallized molecules on a plate by laser desorption. The molecular weight of the analyte is detected by its time of flight in an electric field. As a consequence, MALDI-TOF analysis is used mainly to determine the molecular identity of a substance, by means of its molecular weight. As small molecules are able to present a faster time-of-flight than larger ones, the lower limit of detection is determined by the noise created by the molecules from the matrix that co-crystallize with the sample on the plate. With ITPP being a relatively small molecule, our objective was to set up a quantitative assay for the measurement of ITPP in murine plasma samples.

As a result of the polyanionic nature of ITPP, the mass spectrum of the corresponding salts presents cation adducts (Figure3A). This behaviour represents a drawback in terms of selectivity and sensitivity of the MALDI-TOF analysis. Besides, the complexity of the plasma samples, in terms of the presence of inorganic salts and other charged biomolecules, is not supportive. In order to overcome this problem, we provided sequential desalination steps, by inclusion of an ion-exchange resin treatment step in our sample preparation protocol, in addition to 1:10 dilution in ammonium acetate and a spot washing step with diluted weak acid solution.

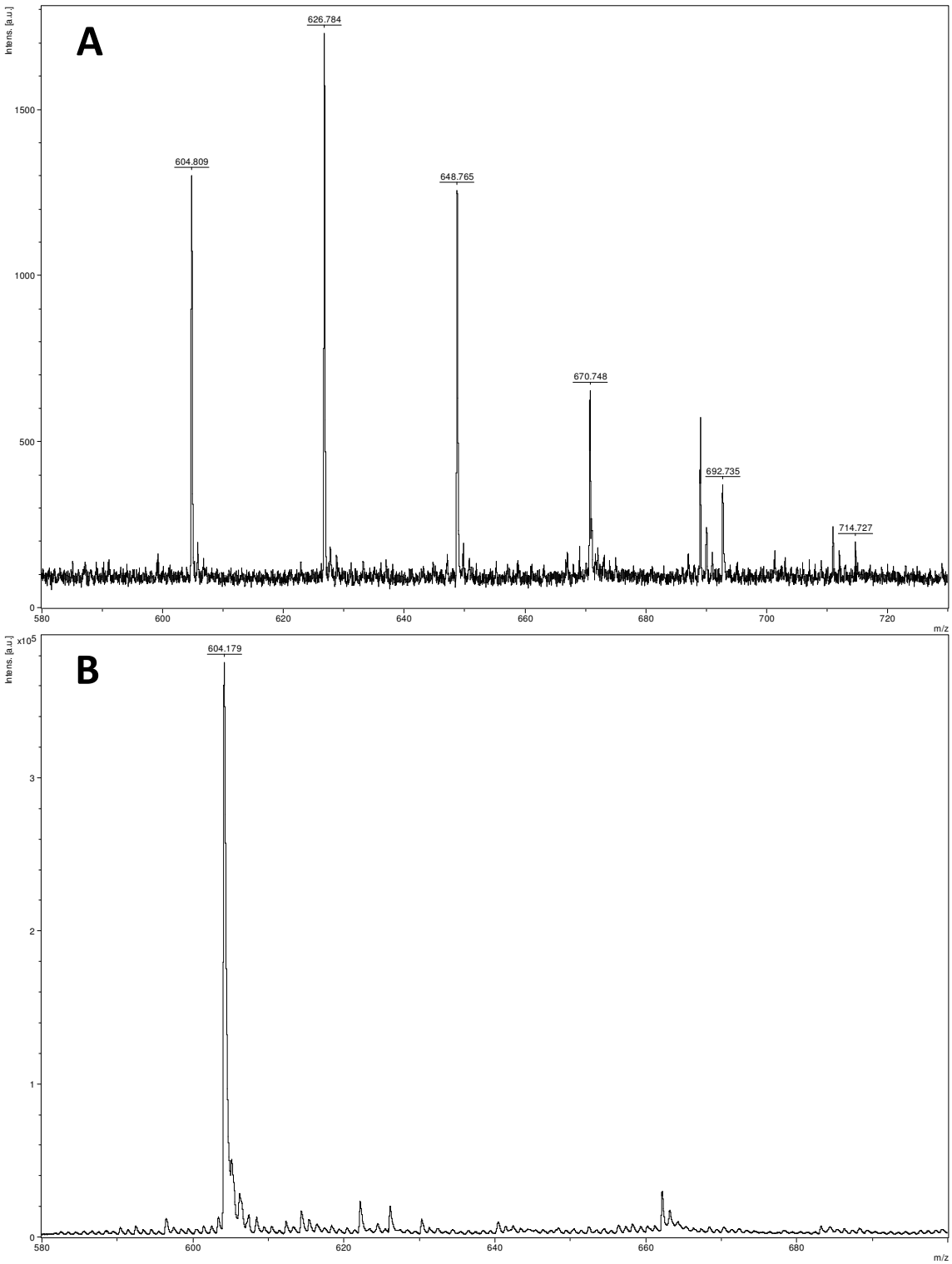


Figure3.MALDI spectra showing ITPP peaks. **A.**The ITPP hexasodium salt mass spectrum displays the characteristic patterns of ITPP sodium adducts in negative ionization mode. Peaks at *m/z*604.8, 626.8, 648.8, 670.8, 692.7, and 714.7 correspond to $[ITPP^{6-}+5H^{+}]^{-}$, $[ITPP^{6-}+Na^{+}+4H^{+}]^{-}$, $[ITPP^{6-}+2Na^{+}+3H^{+}]^{-}$, $[ITPP^{6-}+3Na^{+}+2H^{+}]^{-}$, $[ITPP^{6-}+4Na^{+}+H^{+}]^{-}$ and $[ITPP^{6-}+5Na^{+}]^{-}$, respectively.The mass spectrum was retrieved from a sample containing 1mM of the analyte (ITPP hexasodium salt form).**B.** The ion-exchanged ITPP acid form mass spectrum displays one only peak in the negative ionization mode, at *m/z* 604.2, corresponding to $[ITPP^{6-}+5H^{+}]^{-}$. The mass spectrum was retrieved from a sample containing 1mM of the analyte (ITPP acid form).

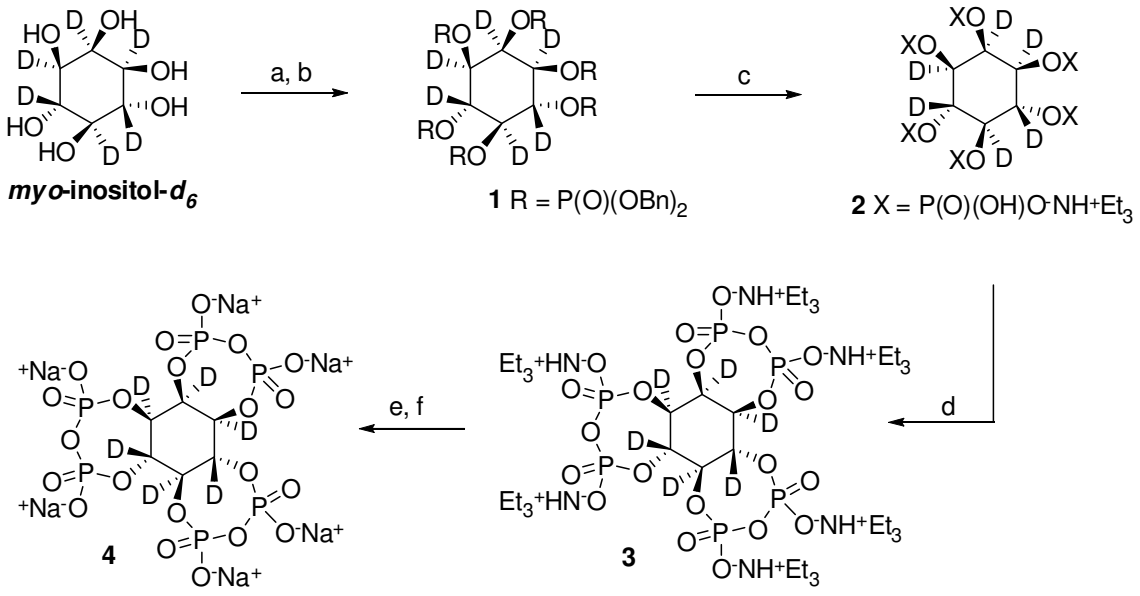
Detection limit for ITPP by MALDI-TOF

First, we determined the detection limit for ITPP in the presence of plasma. We consistently detected 0.5 fmol of ITPP in the applied sample, corresponding to 0.1 µM of sample concentration in plasma before dilution with ammonium acetate (data not shown). The detection limit was defined as the ITPP concentration with a signal-to-noise ratio of at least 2.5 in the mass spectrum. In this context, the sample preparation was optimized, by the introduction of desalinization steps, as described above, improving signal-to-noise ratio and yielding reproducible results with high sensitivity.

Standard curve for ITPP and synthesis of the internal standard ITPP-d_6

The intensity of the signal obtained by MALDI-TOF analysis is relative and depends, for instance, on the purity of the sample. Therefore, a standard curve for ITPP was constructed using ITPP-d_6 as internal standard. Both ITPP and ITPP-d_6 were submitted to purity analysis by ion chromatography, which was taken into account for sample preparation.

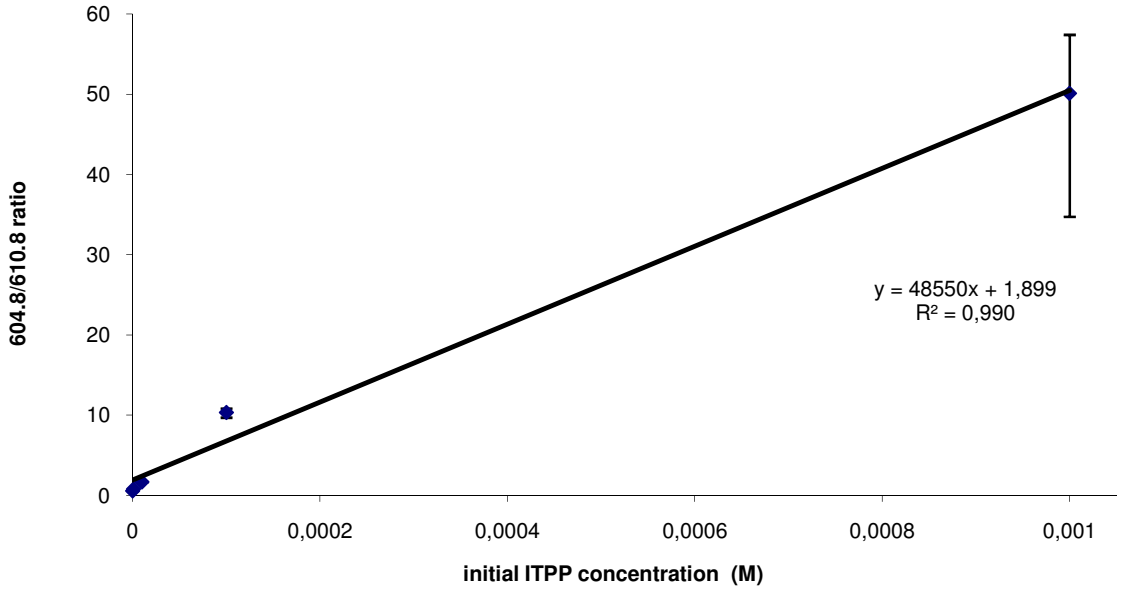
The election of ITPP-d_6 as internal standard was based on the fact that it is practically identical to ITPP in terms of physicochemical behaviour and is expected to have similar desorption and ionization characteristics as ITPP. Considering these particularities, ITPP-d_6 was synthesized from *myo*-inositol-d_6, as depicted in Scheme 1.



Scheme 1. Synthesis of ITPP-d_6 (**4**) from *myo*-inositol-d_6. Reagents and conditions: (a) $(i\text{Pr})_2\text{NP}(\text{OBn})_2$, tetrazole, MeCN, room temperature, 48h; (b) *m*CPBA, CH_2Cl_2, -50°C to 0°C, 5h, 80% (2 steps); (c) H_2 (3 atm), Pd/C, Et_3N, EtOH:H_2O (1:1), room temperature, 36h, quant.; (d) DCC, MeCN:H_2O (2:1), 90°C, 40h, 97%; (e) Dowex-H^+ column, H_2O; (f) Dowex-Na^+, H_2O, room temperature, 3h, 99% (2 steps).

myo-Inositol-d_6 was first reacted with dibenzyl *N*,*N*-diisopropylphosphoramidite, in order to introduce the protected phosphate groups in each hydroxyl group, after oxidation with *m*-chloroperbenzoic acid, furnishing compound **1** in 80% yield. After hydrogenation in the presence of triethylamine, the salt **2** was subjected to pyrophosphate formation using *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) in acetonitrile/water. The resulting trispyrophosphate triethylammonium salt **3** had its counter-ions exchanged to give the compound [1-^{2}H, 2-^{2}H, 3-^{2}H, 4-^{2}H, 5-^{2}H, 6-^{2}H] hexasodium 1,2,3,4,5,6-*myo*-inositol-[1,2:3,4:5,6]-trispyrophosphate (**4**, ITPP-d_6) in 77% overall yield. The target compound, as well as the corresponding intermediates, were fully characterized by usual spectroscopic methods, *e.g.* ^{13}C and ^{31}P NMR and HRMS, based on previous results for the synthesis of ITPP.[8] Figure2 shows the MALDI spectra for ITPP and ITPP-d_6 in the same sample, in the presence of plasma. The spectra for ITPP and ITPP-d_6 do not overlap, as the main peaks are differentiated from each other by 6 a.m.u.

The presence of other compounds absorbs energy during ion extraction and, consequently, influences the intensity of the ITPP signal. We found that the ITPP/ITPP-d_6 signal ratio with a given ITPP-d_6 concentration is linear, with ITPP varying in concentrations from 0.1 to 1000 µM. Therefore, standard curves were produced for one only ITPP-d_6 concentration, 10 µM (Figure4). The lower limits of quantification were defined by the linear range of the standard curves. Accordingly, considering the standard curve from plasma-spiked environment, the lower limit of quantification (LLOQ) was 0.10 µM. This is considered a high value, due to the presence of complex and charged biomolecules, such as albumin, carbohydrates and electrolytes, which represents a more complex chemical environment in comparison to plain aqueous solutions. Nevertheless, given the high doses of ITPP administered in animals, [12] i.e. 0.5-3 g/Kg, the obtained LLOQ should be suitable for our studies.



Initial ITPP concentration (M)	1.00E-07	1.00E-06	1.00E-05	1.00E-04	1.00E-03
604.8/610.8 ratio RSD (Cv %)	0.5695 (±1.6)	0,7790 (±1.7)	1.6566 (±1.2)	10.3382 (±4.6)	50.1003 (±13.3)

Figure4. Table and calibration curve used for ITPP quantification by MALDI-TOF MS in plasma samples. Calibration curves were constructed by using an internal standard (ITPP-d_6) at a fixed concentration (10 µM), whereas the ITPP concentration was varied. The ratio between the peak intensities for the *m/z* 604.8 (ITPP) and 610.8 (ITPP-d_6) peaks was determined for each sample.R^2 value was greater than 0.99 and $p<0.0001$.

Statistical analysis

The equation describing the ratio of ITPP over ITPP-d_6 as a function of ITPP concentration using 10 µM internal standard in the presence of plasma, $y = 48550x + 1.0899$, has a correlation coefficient $r = 0.9908$. These values indicates that the relationship between x and y is statistically significant ($P < 0.0001$).

Determination of ITPP concentrations in plasma

After withdraw from ITPP-treated mice, whole blood was worked up to give the plasma fraction. The concentration of ITPP was determined for each fraction by MALDI-TOF analysis. For this analysis, 20 µl of murine blood plasma was spiked with 20 µl of the internal standard solution and the final volume was adjusted to 200µl with ammonium acetate. The ratio between ITPP and ITPP-d_6 peaks was determined from the corresponding MALDI-TOF spectra. By introducing the resulting values into the equation for the standard curve, the concentration of the sample was determined (in µM). The amounts of ITPP in micrograms per milliliter of plasma were determined by $C = (737.88*M)/1000$, where C is the concentration in µg/ml and M is the concentration in µM.

To establish the recovery rate, plasma samples from untreated mice were spiked with 0.10 µM of ITPP, which corresponds to the LLOQ. The recovery rate was determined to be 88 ± 9%.

Plasma concentrations of ITPP in treated mice

It was previously demonstrated that a significant effect on Hb-oxygen affinity decrease occurs after both parenteral and oral administration of ITPP in mice. [12]In order to demonstrate in which extent the observed effect is a result of the bioavailability of ITPP, we determined the amount of ITPP in mice blood plasma after intravenous (i.v.), intraperitoneal (i.p.) and oral (p.o.) administration (Figure5).

Although the time frame in between administration and blood sampling was considerably distinct, both i.p. and i.v. routes resulted in the same ITPP plasma concentration, *i.e.*0.17µM (0.13 µg/mL) and 0.15µM (0.11µg/mL) respectively. Nevertheless, due to particular physico-chemical characteristics, ITPP is both membrane permeant and readily soluble in water,[8],[10]which would favor the oral bioavailability of this compound. Indeed, after drinking *ad libitum* water containing dissolved

ITPP (20 g/L), murine plasma contained0.59µM (0.44 µg/mL). As a result of the chronic nature of the p.o. administration, bioavailability was increased in 4-fold when compared to one-shot parenteral administration.

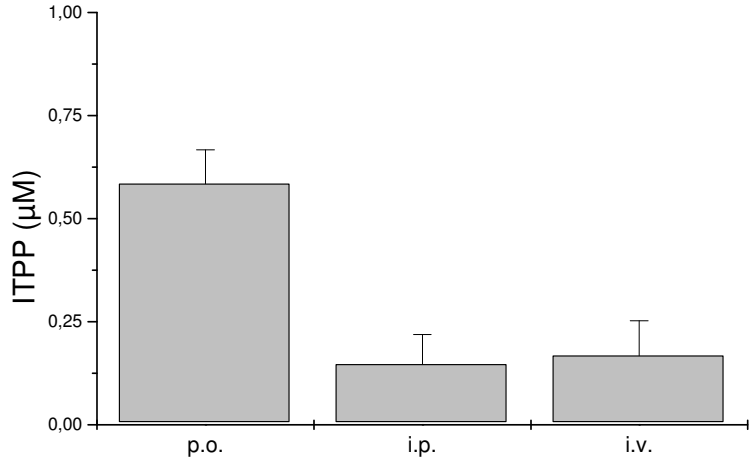


Figure5. Quantification of ITPP in murine blood plasma after different routes of administration in normal mice. Oral (p.o.) administration was performed by allowing mice to drink *ad libitum* water containing dissolved ITPP (20 g/L) and blood sample was collected after 8 weeks;intraperitoneal (i.p.) and intravenous (i.v.) administrations were done in a single dose of 1 g/Kg and blood sample was collected after 24h and 6h, respectively. Error bars represent the standard deviation.

In summary, the assessment of oral and parenteral bioavailability of ITPP was successful and will give novel insights into the pharmacokinetic studies for this drug candidate in near future.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES-BR (C.D.D. fellowship) and a grant from NormOxys, Inc.Prof. A. E. K. would like to thank Aristotle University of Thessaloniki for financial support of his sabbatical leave.

References:

1. *The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin.* **Benesch, R. and Benesch, R.E.** 1967, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 26, pp. 162-167.

2. *Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin.* **Benesch, R., Benesch, R.E. and Yu, C.I.** 1968, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 59, pp. 526-532.

3. *Three-dimensional fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: The atomic model.* **Perutz, M.F., et al.** 1968, Nature, Vol. 219, pp. 131-139.

4. *Cofactor binding and oxygen equilibria in haemoglobin.* **Benesch, R.E., et al.** 1971, Nature, Vol. 234, pp. 174-176.

5. *The mechanism of interaction of red cell organic phosphates with hemoglobin.* **Benesch, R.E. and Benesch, R.** 1974, Adv. Protein Chem., Vol. 28, pp. 211-237.

6. *Structure of inositol hexaphosphate human deoxyhaemoglobin complex.* **Arnone, A. and Perutz, M.F.** 1974, Nature, Vol. 249, pp. 34-36.

7. *Binding of inositol hexaphosphate to deoxyhemoglobin.* **Edalji, R., Benesch, R.E. and Benesch, R.** 1976, J. Biol. Chem., Vol. 251, pp. 7720-7721.

8. *Inositol tripyrophosphate: a new membrane permeant allosteric effector of haemoglobin.* **Fylaktakidou, K.C., et al.** 2005, Bioorg. Med. Chem. Lett., Vol. 15, pp. 1605-1608.

9. *Physiological effects of high-P50 erythrocyte transfusion on piglets.* **Teisseire, B., et al.** 1985, J. Appl. Physiol., pp. 1810-1817.

10. *Suppression of hypoxia-induced HIF-1α and of angiogenesis in endothelial cells by myo-inositol trispyrophosphate-treated erythrocytes.* **Kieda, C., et al.** 2006, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 103, pp. 15576-15581.

11. *Anti-angiogenic properties of myo-inositol trispyrophosphate in ovo and growth reduction of implanted glioma.* **Sihn, G., et al.** 2007, FEBS Lett., Vol. 581, pp. 962-966.

12. *Enhanced exercise capacity in mice with severe heart failure treated with a novel allosteric effector of hemoglobin, ITPP.* **Biolo, A., et al.** 2009, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 106, pp. 1926-1929.

13. *NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities.* **Gottlieb, H. E., Kotlyar, V and Nudelman, A.** 1997, J. Org. Chem., Vol. 62, pp. 7512-7515.

3. Conclusion

Lors ce travail, nous avons développé le premier dosage plasmatique rapide de l'ITPP par MALDI-TOF. En effet, la résolution et la sensibilité de l'analyseur de masse MALDI TOF nous a permis de détecter le pic d'ITPP (604,8 Da) ainsi que l'étalon interne ITPP d6 (610,4 Da) et ceci malgré sa faible masse molaire et la présence des pics de matrice. Tout d'abord, nous avons établit un protocole rapide de traitement d'échantillon afin d'éliminer les adduits de cations pouvant surchargeant le spectre de masse. La détermination précise des concentrations a été effectuée en réalisant une gamme de calibration allant de 0 à 1000 µM. La proportionalité entre les rapports d'intensité des pics d' ITPP et d'étalon interne en fonction la concentration dans l'echantillon est régit par l'équation y = 48550 *x* + 1,0899. Cette équation est du type linaire avec un coefficient de corrélation de *r* = 0,9908. Ensuite, nous avons déterminé la limite de détection dans le plasma (LOD) à 0,1µM. Enfin grâce à la sensibilité de la détection par MALDI-TOF-MS, nous avons pu déterminer les concentrations plasmatiques dans le sang de souris traité à l'ITPP. Ces dosages ont permis d'évaluer les concentrations plasmatiques en fonction du mode d'administration. Ces résultats ont montré qu'une exposition chronique par voie orale permettait d'augmenter jusqu'à 4 fois la concentration par rapport à des injections. Enfin, la comparaison des concentrations retrouvées ont mis en exergue que la voie d'administration per os était la voie privilégiée en vue d'étude clinique.

CHAPITRE VI : CEToolbox: Calculateur Spécialisé Pour les Utilisateurs d'Electrophorèse Capillaire sous la Forme d'une Application Androïd

1. Introduction

La CE est une méthode séparative puissante pour la caractérisation d'espèce chargée ou neutre. Le mécanisme de la CE est basé sur la séparation d'analytes sous champ électrique. Cette technique permet d'obtenir des séparations de très haute efficacité en utilisant un minimum d'échantillon. Dans le but d'augmenter le champ d'applications de la CE, notamment pour la séparation des molécules neutres ou chargées, de nombreuses méthodes ont été développées, telle que l'électrophorèse de zone (CZE), l'électrochromatographie en phase micellaire (MEKC), l'isoélectrofocalisation capillaire (CIEF), l'électrochromatographie (CEC) et l'électrophorèse capillaire en gel (CGE).

Le tout premier système de CE a été commercialisé au début des années 1980. Depuis une trentaine d'années, l'utilisation de la CE dans le monde industriel et académique n'a cessé de croitre impliquant inexorablement l'augmentation d'utilisateurs de cette méthode séparative. Quel que soit le domaine d'applications, chaque utilisateur de CE est confronté aux mêmes problématiques de base. En effet, la géométrie de la CE, l'instrumentation, les propriétés du BGE ou la détermination de mobilité impliquent un grand nombre de calculs souvent fastidieux que les utilisateurs de CE doivent réaliser de manière journalière.

Aujourd'hui, un seul logiciel a été développé dans le but d'aider les utilisateurs de CE. CE Expert, réalisé par la société Beckman Coulter (Brea, CA, US), a été introduit en 1997. Ce logiciel permet d'obtenir des informations concernant l'injection CE simplement en entrant les paramètres tels que les dimensions du capillaire, le temps et la pression d'injection et la viscosité du milieu. Cependant, ce logiciel ne permet d'obtenir qu'un nombre limité d'informations et surtout n'a subi aucune mise à jour permettant de fonctionner sur les systèmes d'exploitation récents.

Dans le but de fournir un nouvel outil de calcul plus complet en termes d'informations de séparation et surtout fonctionnant sur des systèmes d'exploitations récents tel que les plateformes mobiles, nous avons développé l'application CEToolbox. En effet, aujourd'hui, directeurs de laboratoire, chercheurs, enseignants, ingénieurs, techniciens et étudiants disposent d'outils communs et standardisés : un « Groupe Spécial Mobile » (GSM) ou une tablette tactile. En quelques clics sur un smarphone ou sur une tablette, CEToolbox fournit de nombreuses informations de séparation telles que le volume injecté, le volume total du capillaire, la quantité d'échantillon injecté, le temps de rinçage et le champ électrique. De plus, l'interface a été optimisée avec l'addition de quatre onglets supplémentaires pour calculer la viscosité et la conductivité du BGE, le débit de séparation ainsi que la valeur du flux électro-osmotique et le calcul de mobilité électrophorétique. CEToolbox est une application gratuite fonctionnant sur le système Androïd. Codée en Java et distribuée avec une licence libre, le code, développé en collaboration avec le Dr Jérôme Pansanel, est accessible sur le site internet GitHhub. Cette application, téléchargeable gratuitement sur Google Play, a été développée dans le but de simplifier le quotidien de tous les utilisateurs de CE quel que soit l'appareil de CE utilisé.

2. Article

CEToolbox: Specialized Calculator for Capillary Electrophoresis Users as an Android application

Jérôme Pansanel[1],MichaelBiacchi[2],Rabah Gahoual[2], Emmanuelle Leize-Wagner[2], Yannis Nicolas François[2]

*Electrophoresis***2014**, soumis

[1] Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, CNRS-UMR 7178, University of Strasbourg, Strasbourg, France.

[2]Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes (LSMIS), CNRS – UMR 7140, University de Strasbourg, Strasbourg, France.

ABSTRACT

CE has been demonstrated to be a useful and powerful separation method for the characterization of charged and neutral molecules. Since the end of the 80s and the development of the first commercialized CE device, the use of this separation method has continued to grow for academic and industrial research involving inexorably increasing of the number of CE users. Whatever the application domain, each CE user is daily confronted to the same problems often based on basic calculations of separation properties. In order to help the community of CE users to get quickly and easily a lot of information, and desiring to provide a tool running on mobile platforms, CEToolbox has been developed as a free Androïd application. Within few clicks, CEToolbox offers extensive injection information as injected volume, total capillary volume, proportion and amount of injected sample, rinsing time and electrical field. Moreover, three additional tabs allow to obtain the calculation of the viscosity and the conductivity of background electrolyte (BGE), and the separation flow rates. Finally, a last tab is dedicated to the calculation of electroosmotic mobility andeffectivemobilitiesforamaximumof20compounds. CEToolbox which can be downloaded for free on Google Play, was developed to simplify the daily of CE users regardless of the CE devices.

Capillary Electrophoresis (CE) has been commercially introduced as a separating technique during the early 1980's [1-2].Last two decades have witnessed the emergence of CE as one of the most important tools in analytical science. CE has been demonstrated to be a useful and powerful separation method for the characterization of charged and neutral molecules [3-4]. CE mechanisms are based on analyte separation under an electrical field. This technique provides fast highly efficient separation with minimum sample volume requirement, which is essential for analytes that are only available in scarce amount. CE has, with different modifications such as capillary zone electrophoresis (CZE) [5], capillary isolectric focusing (CIEF) [6],electrochromatography (CEC) [7], micellarelectrokineticchromatography (MEKC) [8], Isotachophoresis (ITP) [9] and capillary gel electrophoresis (CGE) [10], proved a steady growth of interest in a large number of research fields such as biology [11], chemistry [12], pharmaceutical [13] and biopharmaceutical [14], environment [15] or food [16]. Due to this interest, CE is significantly established in industrial and in academic laboratories which represents a huge number of CE users.

Regardless of the research field, every CE user have in common a large number of basic problematic. Indeed, CE geometry, instrumentation, background electrolyte (BGE) properties or mobilities determination involves lot of fastidious calculation that CE users perform on a daily basis, such as for example, injected volume computation, viscosity and conductivity of the BGE or electroosmotic mobility (μ_{eof}) value.

Softwares are available to obtain information on CE injection. This is the case of CE Expert (Beckman Coulter, Brea, CA, US) introduced in 1997. By entering known parameters such as capillary dimensions, hydrodynamic injection pressure and injection time, several parameters including injection volume can be automatically calculated. However existing softwares provide calculations for a limited numbers of parameters and moreover have not been updated to run on recent operating systems.

We have developed CEToolbox application (Figure 1), desiring to provide a tool running on new media platforms, especially mobile platforms, and to increase the level of information in terms of separation characteristics. With a few clicks on your smartphone or your tablet, CEToolbox provides extensive CE separation information as injected volume, total capillary volume, proportion and amount of injected sample, rinsing calculation and electrical field. Moreover, using an optimized interface, four additional tabs allow to calculate viscosity and conductivity of BGE, separation flow rate and values of μ_{eof} and effective mobilities (μ_{eff}). CEtoolbox provides CE information regardless the CE system used.

CEToolbox is a Free Software running on Android platform. Developed in Java and distributed under an open source license, the code is available on GitHhub website. The application can be

downloaded freely either on Google Play or from the project web page: http//pansanel.github.io/cetoolbox.



Figure 1. Logo of CEToolbox application

All values provided by CEToolbox were calculated from equations detailed in Figure 2

Equation (1)
Hydrodynamic Injection (nL)

$$V_{inj} = \frac{\pi . d_c^4 . \Delta P . t}{128 . \eta . L} . 10^{12}$$

Equation (2)
Capillary Volume (nL)

$$V_{tot} = \frac{\pi . d_c^2 . L}{4} . 10^{12}$$

Equation (3)
Capillary Volume to Window (nL)

$$V_d = \frac{\pi . d_c^2 . l}{4} . 10^{12}$$

Equation (4)
Injection plug length (mm)

$$l_{inj} = \frac{4 V_{inj}}{\pi . d_c^2} . 10^3$$

Equation (5)
Plug (% of total length)

$$\%_{tot} = \frac{V_{inj}}{V_{tot}} . 100$$

Equation (6)
Plug (% of length to window)

$$\%_d = \frac{V_{inj}}{V_d} . 100$$

Equation (7)
Minutes to replace 1 Volume (min)

$$t_{min} = \frac{32 . \eta . L^2}{d_c^2 . \Delta P . 60}$$

Equation (8)
Injection Flow rate (nL/min)

$$Q_{inj} = \frac{V_{tot}}{t_{min}}$$

Equation (9)
Electrical Field

$$E = \frac{U}{L} . 10^2$$

Equation (10)
Analyte injected (ng)

$$m = C_{(g/L)} . V_{inj}$$

Equation (11)
Analyte injected (pmol)

$$n = \frac{C_{(g/L)} . V_{inj}}{M_w} . 10^3$$

Equation (12)
Electoosmotic mobility (cm²/V/s)

$$\mu_{eof} = \frac{l . L}{t_{eof} . U}$$

Equation (13)
Separation Flow Rate (nL/min)

$$Q_{sep} = \frac{\pi . d_c^2 . \mu_{eof} . E}{4.} \times 60 . 10^{10}$$

Equation (14)
Viscosity (cp)

$$\eta = \frac{d_c^2 . \Delta P . t_d}{32 . l . L}$$

Equation (15)
Conductivity (S/m)

$$\kappa = \frac{4 . L . l}{\pi . d_c^2 . U}$$

Equation (16)
Effective mobility (cm²/V/s)

$$\mu_{eff} = \frac{l . L}{t_m . U} - \mu_{eof}$$

Figure 2. Theoretical equations used to develop CEToolbox.

V_{inj}: Injected volume (nL); V_{tot}: Total capillary volume (nL); V_d: Volume to detection window (nL); l_{inj}: Injection length (mm); t_{min}: Time to replace 1 volume (min); L: Full length (m); l: Length to detection

(m); t: Time of injection (s); d_c : Inner diameter (m); η: Viscosity (Pa.s); κ: Conductivity (S/m); ΔP: Applied pressure (Pa); Q_{inj}: Injected flow rate (nL/min); Q_{sep}: Separation flow rate (nL/min); E: Electrical Field (V/cm); U: Voltage (V) ; I: Electric current (A); $C_{(g/L)}$: Concentration (g/L);$C_{(mol/L)}$: Concentration (mol/L); M_w: Molecular weight (g/mol); t_{eof}: Electroosmosis time; t_m: migration time; μ_{eof}: Electroosmosis mobility; μ_{eff}: Effective mobility

CE is a miniaturized technique which makes it difficult to visualize volumes of rinsing, BGE or sample injected. User is always confronted with several questions concerning total capillary volume, injected volume, time of rinsing, sample concentration. The first tab of CEToolbox is dedicated to obtain injection information. With a simple click on the "Injection" tab of the interface(Figure 3), CE user can enter all known separation parameters such as capillary length (L), length to window (l), inside diameter (d_c), pressure (ΔP), time (t), BGE viscosity (η) and voltage (U), and known sample parameters as concentration (C) and molecular weight (M_w). In order to be compatible with all the existing CE systems, pressure can be expressed in two different units, millibar(mbar) or pound per square inch (psi). Moreover, in order to be universal in terms of amount calculation, concentration can also be expressed in two different units, gram per liter (g/L) or millimole per liter (mmol/L). After clicking on the "Calculate" button, a window appears with total view of all injection information (Figure 3). About separation properties, CEToolbox provides hydrodynamic injection volume (Equation 1), capillary volume (Equation 2), capillary volume to window (Equation 3), injection plug length (Equation 4), plug (% of total length) (Equation 5), plug (% of length to window) (Equation 6), time to replace 1 volume (Equation 7),injection flow rate (Equation 8) and electrical field (Equation 9). Concerning sample properties, amount of analyte is calculated following Equation 10 and Equation 11, and is given in the two different units (nanogram of picomole). It will be impossible for the authors to refer all the bibliographic references which notice these sorts of information because almost all the literature using CE refer at least one of these properties. This shows the essential nature of such information to CE Users. The second tab of CEToolbox is dedicated to obtain the flow rate of the separation generated by the μ_{eof}. This is probably the least information reported in the literature, however it gives a very important idea about the speed and the behavior of the separation [17]. CE users need this information to predict and to optimize the efficiency of the separation. With a simple click on the "Flow rate" tab of the interface (Figure 4A), CE user can enter known separation parameters like capillary properties(L, l, dc), tension and electroosmosis time (t_{eof}) expressed either in minutes or in seconds. After clicking on the "Calculate" button, a window appears with the value of μ_{eof} (Equation 12) and the value of the separation flow rate expressed in nL/min (Equation 13).

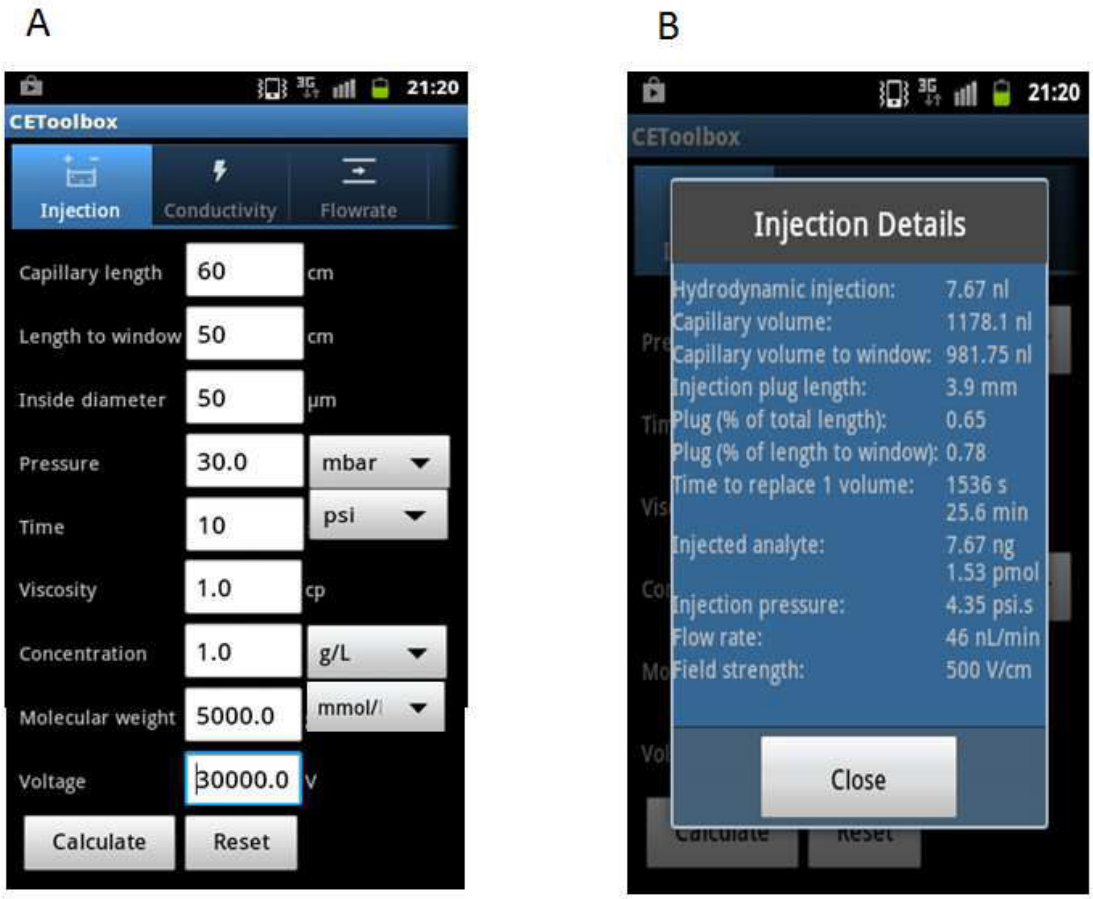


Figure 3. CEToolbox Injection interface. (A) Parameters window (B) Results window

Measure of viscosity and conductivity of BGE is highly significant for CE user especially for CGE [18] and CIEF [19] applications and for separation using BGE with high ionic strength [20]. Indeed, viscosity is involved in several separation parameters as equation of the hydrodynamic injection volume (Equation 1) and time to replace one volume of the capillary (Equation 7). Equation 1 shows that viscosity is a very significant factor in fluid flow. Because volume delivered varies linearly with the viscosity value, a small change in BGE viscosity can cause a large change in fluid delivery. Concerning conductivity, in CE analytes are separated under an electrical field. One of the most important issue can be caused by the Joule effect due to high current generated by the electrical field applied. In that case BGE conductivity value can help CE User to prepare experimental protocols and to avoid some troubles such as analyte degradations. Francois et al. promotes CE instrumentation as an integrated apparatus for measurement of viscosity and conductivity of BGE[21].For viscosity measurements, a short plug of a flow marker in the BGE was injected under a pressure of 50 mbar for a few seconds, according to the estimated viscosity. The marker zone was displaced by

introducing the BGE (free of the marker) under a known pressure until the marker was detected. The measurement of the detection time of the marker(t_d) was used to calculate viscosity according to Hagen-Poiseuille law (Equation 14). For conductivity determinations, a range of voltages was applied to the capillary filled by the BGE. The voltages applied were chosen so that the linearity of Ohm's law was perfectly verified. Conductivity was obtained from the measured current intensity according to Ohm's law after rearrangement described in Equation 15. To obtain these two information, two different tabs are dedicated on CEToolbox. With a simple click on the "Viscosity" tab of the interface (Figure 4B), CE user can enter known separation parameters as capillary properties (L, l, d_c), pressure and detection time (t_d). After clicking on the "Calculate" button, a window appears with the value of the viscosity expressed in nL/min. Concerning "Conductivity" tab (Figure 4C), separation parameters are capillary properties (L, l, d_c), voltage and electric current (I). Window of results gives the value of conductivity expressed in S/m. These four tabs allow CE users to address simple questions for the preparation of experimental setup.

The fifth tab of CEToolbox is dedicated to mobility calculation. In that case, information are not supplied for preliminary study but when the separation is ended. Indeed, electropherogram provides lots of information about the quality of the separation. One of the most important data is migration time (t_m) of each compound. However, due to the presence of an electroosmotic flow, CZE is often criticized for a lack of robustness in terms of t_m. Every CE user are aware that in CZE, a significant parameter for analyte characterization is the effective mobility (μ_{eff}). μ_{eff} represents the mobility of the compound without taking into consideration the electroosmotic flow (Equation 16). Experimental determination of mobility can be achieved by the ratio of the speed and the electrical field. Despite the simplicity of these equations, CE user need a calculator to obtain mobility information. General way consists to use constructor software which obviously gives these information, especially for complex separation. However, for separation not exceeding 20 compounds, no calculation tool is available and CE users tend to set up a homemade calculation file. CEToolbox has been developed to prevent CE Users to search for their own solutions to calculate μ_{eff}. CEToolbox is a solution to determine μ_{eff} using t_m for a separation not exceeding twenty compounds. With a simple click on the "Mobility" tab of the interface (Figure 4D), CE user can enter all the known separation parameters as capillary properties (L, l, d_c), tension, electro-osmosis time and analyte migration time. Concerning the number of analytes, two buttons "plus" and "minus" on the interface allow the addition or the subtraction of a compound for CE user convenience. After clicking on the "Calculate" button, a window appears with the calculated value of μ_{eof} and the different values of μ_{eff}.It is important to note that if μ_{eof} is negligible, the box reserved for t_{eof} value must be empty.

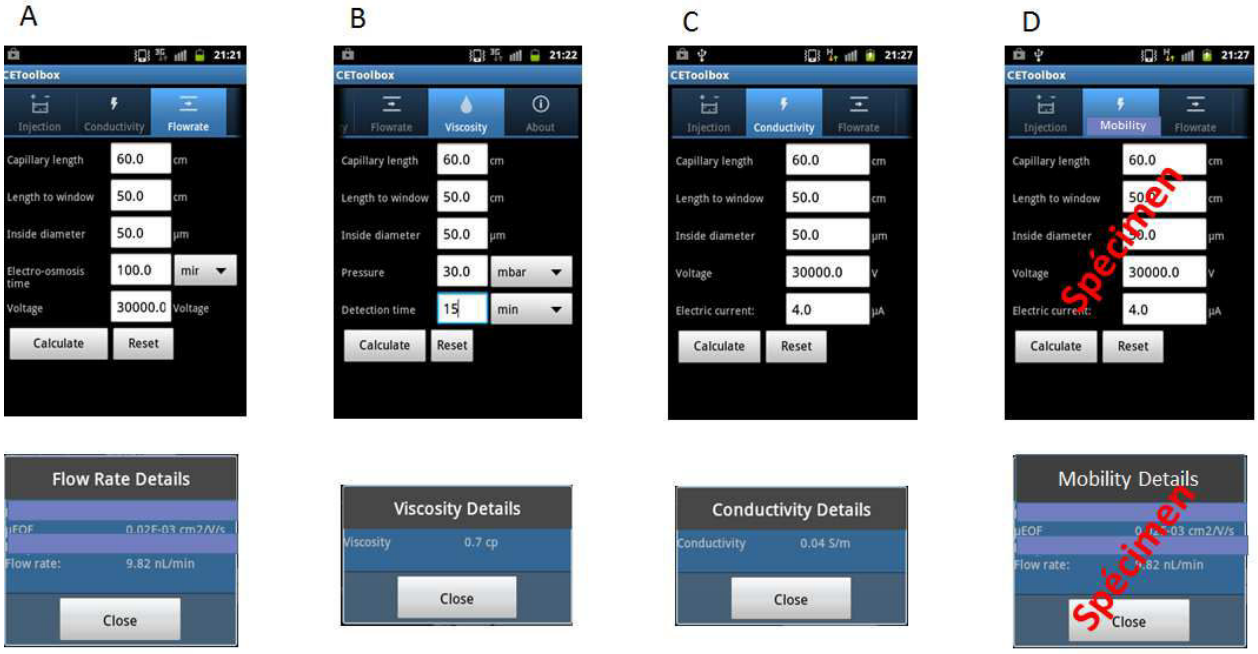


Figure 4. Interface of parameters and results windows for (A) Flow Rate, (B) Viscosity, (C) Conductivity, (D) Mobility calculation.

Finally, CEToolbox remains a theoretical calculator. We exposed in this work all the theoretical principles used to develop this application. Indeed, the results presented should be taken as approximations and not as absolutes.

We have developed CEToolbox application, desiring to provide a useful calculator for CE users in the aim to facilitate their daily experiments in the laboratory. This application is anchored in the use of new media platform that have already integrated the life of the laboratory. Today, CEToolbox appears to be the most comprehensive specialized calculator for CE User. Whatever CE system used, CEToolbox provides extensive CE separation information as injection, viscosity, conductivity, flow rate and mobility properties. CEToolbox is a Free Software running on Android platform and is available freely either on Google Play or from the project web page: http//pansanel.github.io/CEToolbox. In the near future and in order to facilitate the diffusion, it is planned to adapt CEToolbox to other systems (iOS, Mac OS X, Microsoft Windows ...).

- **REFERENCES**

[1]Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D.,*Analytical Chemistry*1981, *53*, 1298-1302.

[2]Jorgenson, J., Lukacs, K.,*Science* 1983, *222*, 266-272.

[3]Hjertén, S.,*Journal of Chromatography A*1983, *270*, 1-6.

[4]Smith, R.D., Udseth, H.R., *Nature* 1988, *331*, 639–40.

[5]V. Kasicka, *Electrophoresis* 2010, **31**, 122-146.

[6]Silvertand, L. H. H., Torano, J. S., van Bennekom, W. P., de Jong, G. J., *Journal of Chromatography* A 2008, *1204*, 157-170.

[7] El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2010, *31*, 174-191.

[8] Silva, M., *Electrophoresis* 2013, *34*, 141-158.

[9]Mala, Z., Gebauer, P., Bocek, P., *Electrophoresis* 2013, *34*, 19-28.

[10]Zhu, Z. F., Lu, J. J., Liu, S. R., *Analytica Chimica Acta* 2012, *709*, 21-31.

[11] Haselberg, R.,de Jong, G. J., Somsen, G. W., *Electrophoresis* 2013, *34*, 99-112.

[12] Pascali, J. P., Bortolotti, F., Tagliaro, F., *Electrophoresis* 2012, *33*, 117-126.

[13]Ali, I., Haque, A., Wani, W. A., Saleem, K., Al Za'abi, M.,*Biomedical Chromatography*2013, *27*, 1287-1303.

[14]Gahoual, R., Burr, A., Busnel, J. M., Kuhn, L., Hammann, P., Beck, A., Francois, Y. N., Leize-Wagner, E., *Mabs* 2013, *5*, 479-490.

[15]Jokerst, J. C, Emory, J. M., Henry, C. S., *Analyst* 2012, *137*, 24-34.

[16] Ibanez, C., Simo, C., Garcia-Canas, V., Cifuentes, A., Castro-Puyana, M., *AnalyticaChimicaActa* 2013, *802*, 1-13.

[17]Faserl, K., Sarg, B., Kremser, L., Lindner, H., *Analytical Chemistry* 2011, *83*, 7297-7305.

[18] Cottet, H., Gareil, P., *Electrophoresis* 2002, *16*, 2788-2793.

[19]Busnel, J.-M., Varenne, A., Descroix, S., Peltre, G., Gohon, Y., Gareil, P, *Electrophoresis* 2005, *26*, 3369-3379.

[20] François, Y., Varenne, A., Sirieix-Plenet, J., Gareil, P., *Journal of Separation Science* 2007, *30*, 751-760.

[21] François, Y., Zhang, K., Varenne, A., Gareil, P., *AnalyticaChimica Acta* 2006, *562*, 164-170

3. Conclusion

Le but de ce travail a été de développer un nouvel outil informatique permettant d'aider au jour le jour la communauté des utilisateurs de CE. Basé sur l'idée que les us et coutumes des expérimentateurs ont énormément évolué ces dernières années avec l'apparition de nouvelles plateformes électroniques (Smartphone, tablette…), nous avons développé une application gratuite, CEToolbox, permettant d'obtenir la quasi-totalité des informations de séparation. En effet, en rentrant dans les cases prévues à cet effet, les paramètres de séparation ainsi que les conditions de concentration, l'application calcule des informations telles que le volume d'injection, le temps de rinçage, la quantité d'échantillons injectés ou le débit de séparation. De plus, l'ajout de trois onglets supplémentaires permet d'obtenir en quelques clics la viscosité et la conductivité du BGE ainsi qu'un calculateur de mobilités. CEToolbox est une application universelle qui fonctionne quel que soit le système CE utilisé. Aujourd'hui, CEToolbox est une application Androïd disponible gratuitement sur Google Play dans sa version 1.0. La version 2.0 sera disponible très bientôt. Une perspective importante de ce projet est évidemment de la développer sur d'autres systèmes d'exploitation tels que iOS, Mac OS X, Microsoft Windows.

Conclusion générale

Depuis quelques années, le couplage CE/MS est de plus en plus utilisé et ce dans divers domaines d'applications. Ces couplages bénéficient d'un mode de détection très sensible et sélectif et qui de surcroît apportent des informations de structure chimique des analytes. Conjointement, deux grands types de couplage ont connu des développements considérables, avec d'un coté les couplages avec des sources ESI, plus aisées à mettre en place, et de l'autre, les couplages CE-MALDI-MS, nécessitant plus de développements instrumentaux. L'intérêt porté à ces deux couplages dépend étroitement des avantages des sources de masses. En effet, le couplage CE-ESI-MS permet de bénéficier des hautes sensibilités et résolutions des sources ESI mais il se trouve désavantagé lors d'analyses de mélanges très complexes nécessitant des conditions électrophorétiques très riches. Ainsi, pour ce type d'analyses, le couplage CE-MALDI permet de bénéficier des avantages de sensibilité et résolution, mais surtout de la comptabilité envers les sels et détergents de la source MALDI. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'élaborer et d'utiliser une nouvelle interface pour le couplage CE/MALDI-MS pour la séparation et la caractérisation des biomolécules complexes.

Dans un premier temps, nous avons développé le premier couplage CE-UV/MALDI-MS/MS avec un système de dépôt de matrice totalement automatisé. En effet, plusieurs évolutions ont été réalisées pour rendre ce couplage robuste, autonome et polyvalent. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur la modification de deux systèmes commerciaux. Afin de contrôler la séparation électrophorétique, la cellule UV originelle de l'appareil de CE a été déportée pour permettre simultanément la détection UV et la collection de fractions. Ceci permet d'éviter l'ajout d'un spectrophotomètre UV externe. De plus, basé sur la propriété de l'appareil de CE à permettre l'application simultanée d'une différence de potentiel et de pression, et, dans le but de développer un système permettant de déposer la matrice directement après le dépôt de l'échantillon, une modification de la cartouche CE a été optimisée afin de rendre le couplage universel en termes de mode de dépôt MALDI. Ainsi, la séparation, le suivi UV, la collecte de fractions et l'adjonction de matrice sont automatisés et pilotés par seulement deux logiciels. Le caractère polyvalent du système est conféré par la

possibilité de déposer sur tout type de support et d'élaborer tout type de dépôt quelle que soit la stratégie analytique. Nous avons évalué la nouvelle interface avec une séparation de cinq protéines modèles. Cette première étude a montré la grande robustesse du système et la bonne répétabilité aussi bien en termes de séparation que dans les phases d'injection jusqu'à la collection de fractions. Afin de montrer la polyvalence du système quelle que soit la stratégie analytique utilisée, nous avons testé le système sur un digestat trypsique de 9 protéines. Le système a permis de caractériser la totalité des 9 protéines avec une couverture de séquence supérieure à 60 %. Ces résultats ont été comparés aux techniques de références et ont montré la très grande complémentarité des deux approches. Enfin les performances du système ont été confirmées sur une application pharmaceutique. En effet, nous avons utilisé les caractéristiques de collection de fractions précises et automatisables pour la séparation de mAbs entiers et digérés. Les résultats ont permis de montrer l'obtention de la quasi-totalité de la séquence (> 97%) avec l'identification de plusieurs peptides glycosylés. De plus, ce système a permis de réaliser la première analyse d'une séparation de mAbs entiers à l'aide d'un couplage CE- MALDI-MS en montrant une corrélation parfaite entre l'électrophérogramme UV de la séparation et les spectres MALDI des fractions collectées. Tous ces résultats ont d'ailleurs fait l'objet d'une publication scientifique.

Au vu de ces bons résultats, notre deuxième étude a porté sur l'utilisation de notre nouvelle interface dans le but d'analyser les protéines entières avec une stratégie analytique différente : l'analyse Top Down. En effet, la haute résolution de la CE, associée à la très bonne répétabilité du processus de séparation et de collection de fractions, nous a permis de collecter et d'enrichir les fractions d'une séparation de protéines entières. Ce protocole original entièrement automatisé donne la possibilité de collecter les protéines d'un mélange complexe et des les enrichir de manière individuelle. L'enrichissement a permis de concentrer les protéines d'intérêts jusqu'à atteindre une quantité d'analytes suffisante permettant l'ISD dans la source MALDI. Cette stratégie a été testée sur l'analyse de deux mélanges de protéines modèles différents, dans des conditions électrophorétiques différentes et surtout de les collecter et de les enrichir sur deux supports de collectes différents. Ce processus a été confirmé par l'analyse MALDI-MS et montre une augmentation significative du signal MS en fonction du nombre de collectes successives

permettant d'obtenir la quantité de protéines requises pour l'ISD. Ces résultats ont montré d'une part, que l'enrichissement direct sur plaque MALDI permettait d'atteindre rapidement des concentrations d'analytes suffisantes et d'éviter les étapes chronophages et potentiellement contaminants, et d'autre part, d'effectuer une analyse Top Down des protéines avec l'identification sans ambiguïté de 20-40 résidus de leur séquence peptidique. Ensuite, ce protocole novateur a été appliqué à l'étude de mAbs partiellement digérés. La séparation résolutive et la collecte précise ont permis d'enrichir les différents variants de charges du digestat de mAbs jusqu'à 10 pmol, donnant la possibilité d'identifier avec certitude, la nature FC/2 et F(ab)' des pics électrophorétiques. Cependant, la résolution du MALDI, dans les gammes de masses 25 kDa à 100 kDa et les concentrations de sels des conditions électrophorétiques, empêchent d'obtenir des spectres Top Down exploitables. Néanmoins, ce protocole inédit et original ouvre la voie pour la caractérisation par Top Down de protéines d'intérêts dans des mélanges complexes et ou en faibles concentrations.

Parti du constat que le manque de résolution du MALDI peut être un frein à la caractérisation de modification de faible masse sur des édifices de haut poids moléculaire, nous nous sommes dirigés vers un système analytique plus résolutif comme l'ESI-TOF MS.

La troisième partie de mon travail de thèse a consisté à élaborer une nouvelle stratégie pour la caractérisation précise des variants de mAbs. Ainsi, nous avons établi une stratégie originale à deux dimensions constituées d'une phase de séparation et de collecte avec notre nouvelle interface CE-UV/MALDI-MS et d'une phase d'analyse des fractions par CESI-MS. L'utilisation du nanosprayeur CESI-MS nous a donné la possibilité d'infuser les faibles volumes de fractions (2 µl) afin de bénéficier de la très grande sensibilité et résolution de l'interface sheathless CESI couplée au microQTOF. Pour cela, nous sommes parti de publications scientifiques exclusivement réservées à l'analyse CE-UV, car trop riches en sels (400 mM d'EACA), puis nous avons optimisé ces conditions afin d'éliminer sa présence dans le BGE de sortie. Cette optimisation a conduit à des conditions électrophorétiques inédites appelées « mixtes » constituées d'un BGE d'entrée très riche en sels (200 mM d'EACA et 25 mM d'$AcNH_4$) nécessaires à la séparation des variants de mAbs et un BGE de sortie compatible à l'ESI (50 mM d'$AcNH_4$). Ce protocole original a permis de conserver une très bonne résolution et une compatibilité analytique avec la CESI-MS. Enfin, les fractions ont été

infusées et analysées par le CESI-QTOF. Cette stratégie originale à deux dimensions a permis de séparer de manière résolutive et d'analyser les collectes de fractions de Trastuzumab partiellement digérées et de Cetuximab entiers. Les bons résultats obtenus ont donné plusieurs niveaux d'identification avec, pour Trastuzumab, la désignation des natures Fc/2 et F(ab')2 des pics électrophorétiques et la reconnaissance de PTMS et des principaux isoformes de glycosylations. Pour Cetuximab entier, l'identification de différences majeures de masse et de compositions en isoformes entre les fractions collectées. Pour les 2 mAbs, cette stratégie a confirmé que la séparation des variants de charges par UV n'était due ni aux glycosylations ni à une perte de lysine (PTM « Lysine truncation » couramment décrite en littérature). Enfin, ces résultats très encourageants, confirment que la stratégie originale à deux dimensions est la première méthodologie permettant de séparer et d'analyser des biomolécules (notamment des mAbs allant des fragments de 25 kDa à la structure entière à 150 kDa) de manière résolutive et d'en identifier les isoformes.

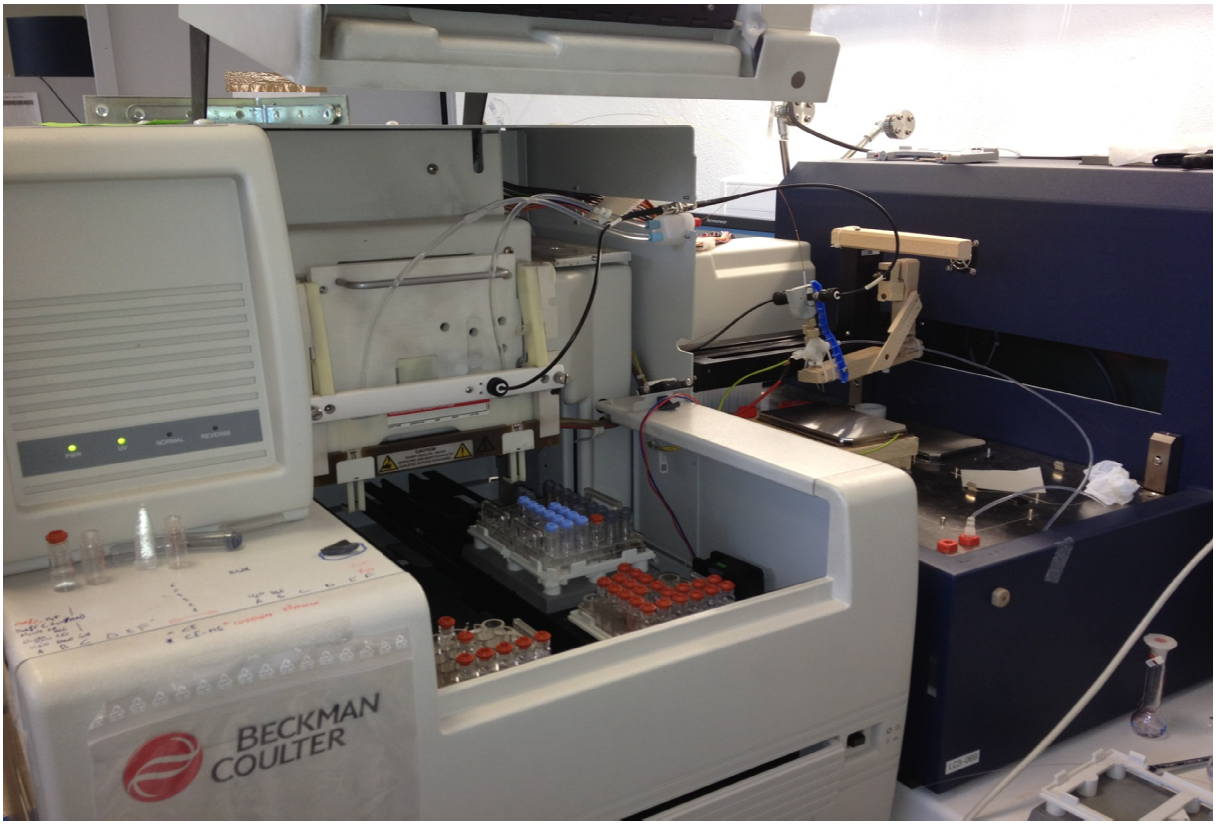
Enfin parallèlement à ces travaux, nous avons ressenti le réel besoin d'avoir à portée de main des outils mathématiques pour le calcul des paramètres de description et d'optimisation pour la CE. Pour cela, nous avons créé une application mobile CETOOLBOX reprenant les équations fondamentales de l'électrophorèse capillaire comme les calculs de volume d'injection, de volume de capillaire, de concentration d'échantillons et de mobilités. Cette application Androïd disponible gratuitement sur Google Play est évolutive et apporte aux scientifiques un outil fiable, utile, ergonomique et simple d'utilisation.

Enfin, nous avons eu la possibilité de terminer une étude commencée durant mon MASTER 2. Cette étude consiste en l'élaboration d'un protocole de dosage plasmatique par MALDI-MS d'un ligant allostérique de l'hémoglobine (Hb) : l'ITPP. De part ses propriétés, l'ITPP stabilise la desoxyhemoblobine et permet en relarguage tissulaire de l'O_2 lié à l'Hb. De ce fait, il est devenu un acteur potentiel dans la lutte contre la survie des cellules. L'étude a consisté à analyser la concentration d'ITPP plasmatique chez la souris en fonction du mode d'administration. Pour cela, un protocole d'extraction basé sur un simple traitement d'échantillons a été élaboré afin d'éliminer les adduits de cations. Le dosage a été effectué en déterminant une droite d'étalonnage de 0.1 µM à 1000 µM permettant de calculer avec précision les concentrations plasmatiques. Les résultats ont établi que la plus grande

biodisponibilité (0.59 µM) était retrouvée lors de l'administration orale, confirmant que cette voie était la plus appropriée pour des études cliniques.

Les très bons résultats obtenus dans les diverses études CE-MS ont montré le potentiel robuste et polyvalent de notre nouvelle interface CE/MALDI-MS. L'adaptabilité et l'ergonomie du système laissent envisager son utilisation dans diverses stratégies analytiques que ce soit pour les protéines entières ou digérés ou pour les petites molécules. Les résultats de recouvrement de séquences sur divers digestats permettent d'envisager la CE/MALDI-MS comme une technique complémentaire ou une alternative aux techniques analytiques classiques. Les caractères innovants et originaux des stratégies à deux dimensions avec la CESI-MS ou d'enrichissement de fractions et analyse Top Down offrent des possibilités supplémentaires pour l'identification et la caractérisation des protéines d'intérêts. Le fait de pouvoir isoler et enrichir une protéine ou peptide d'intérêt dans un mélange complexe laisse entrevoir des avancées dans l'identification et la caractérisation des biomarqueurs. Les premières analyses séparations de mAbs entiers ou partiellement digérés par CE-MS apportent des résultats très intéressants pour l'identification des isoformes et ou variants d'intérêts. Enfin d'un point de vue purement technique, le caractère indirect et automatisé confère à la nouvelle interface CE/MALDI-MS la possibilité d'une utilisation flexible et fiable pouvant évoluer en s'adaptant à des analyseurs de masses de plus en plus puissants et résolutifs.

ANNEXE 1



Photographie de la nouvelle interface CE-UV/MALDI-MS

Résumé

Au cours de ce travail, nous avons mis au point une nouvelle interface CE/MALDI-MS automatisée, équipée d'une cellule UV/visible déportée, et d'une distribution automatique de matrice intégrée. Ce nouveau système a été évalué sur des mélanges différents de protéines entières, de digestats de protéines et d'anticorps monoclonaux (mAbs). Les résultats obtenus lors de cette évaluation ont montré la complémentarité de la nouvelle interface avec les systèmes analytiques classiques. De plus, nous avons montré la première séparation et analyse de mAbs entier par CE/MALDI-MS. Dans un second travail, la nouvelle interface a été utilisée pour effectuer la première analyse Top Down de proteine entière et de mAbs par collecte et enrichissement de fraction. Cette stratégie a montré la répétabilité du système permettant de séparer des analytes d'intérêt et d'enrichir les dépôts MALDI jusqu'à de très hautes quantités d'analytes permettant l'obtention de spectre Top Down. Au cours du troisième travail, le nouveau système CE/MALDI-MS a été utilisé dans une stratégie originale à 2 dimensions de séparation et de collecte d'isoformes de mAbs entiers ou partiellement digérés suivi d'infusions et analyses à l'aide du nanosprayer CESI. Pour cela, nous avons mis au point des conditions électrophorétiques dit « asymétriques » séparant les mAbs dans des conditions très salées mais collectés dans un milieu compatible avec l'ESI-MS. Cette stratégie inédite a permis d'effectuer la première séparation et caractérisation de mAbs par CE-MS. Parallèlement, nous avons mis au point le premier dosage plasmatique d'ITPP par MALDI-TOF MS et surtout la création de CEToolbox, une application Androïd gratuite pour smartphone et tablette permettant le calcul des principales grandeurs mathématiques pour la caractérisation et l'optimisation des séparations par électrophorèse capillaire.

Summary

In this work, we developed a new interface CE/MALDI-MS automated, equipped with a UV/visible cell remote, and integrated automatic distribution of matrix. This new system has been evaluated on different mixtures of intact protein, digested protein and monoclonal antibodies (mAbs). The results obtained during this evaluation showed the complementarity of the new interface with conventional analytical systems. Furthermore, we have shown the first separation and analysis of mAbs by CE/MALDI-MS. In a second work, the new interface was used to perform the first Top Down analysis for intact protein and mAbs by fraction collection and enrichment. This strategy has shown the repeatability of the system for separating analytes and the enrichissment the MALDI deposits up to very high amounts compatible for Top Down approach. In the third work, the new system CE/MALDI-MS has been used in an original 2-dimensional strategy of separating and collecting intact mAbs isoforms or partially digested followed by infusions and analyzes with CESI nanosprayer. For this, we have developed electrophoretic condition so-called "asymmetric" allowing the separation of mAbs under very salty conditions but collected in a totally compatible solution with ESI-MS. This novel strategy allowed for the first separation and characterization of mAbs by CE-MS. Meanwhile, we have developed the first plasma level of ITPP by MALDI-TOF-MS and particularly the creation of CEToolbox as a Free Android application for smartphone and tablet enabling the calculation of the main mathematical quantities for characterization and optimization of CE separations.