AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE (UL)**

**É**cole **N**ationale **S**upérieure d'**A**gronomie et des **I**ndustries **A**limentaires **(ENSAIA)**

**S**ciences et **I**ngénierie des **Re**ssources **Na**turelles **(SIReNa)**

**L**aboratoire d'**I**ngénierie des **Bio**molécules **(LIBio)**

---

**THÈSE**

Présentée à l'Université de Lorraine par

**Cédric PARIS**

*En vue d'obtenir le grade de*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE**

Spécialité : Génie Biotechnologique et Alimentaire

---

# Développement de nouvelles approches analytiques pour le criblage de peptides chélateurs de fer

---

Soutenue publiquement le 20 avril 2021 devant la commission d'examen

***Membres du jury***

**Rapporteurs**

| | |
|---|---|
| Émilie Destandau | Professeure à l'Université d'Orléans |
| Peter Faller | Professeur à l'Université de Strasbourg |

**Examinateurs**

| | |
|---|---|
| Patrick Chaimbault | Professeur à l'Université de Lorraine (Président du jury) |
| Loïc Quinton | Professeur assistant à l'Université de Liège |
| Thierry Maugard | Professeur à l'Université de la Rochelle |
| Katalin Selmeczi | Maître de conférences à l'Université de Lorraine |
| Laetitia Canabady-Rochelle | CR CNRS à l'Université de Lorraine (Co-directrice de thèse) |
| Stéphane Desobry | Professeur à l'Université de Lorraine (Directeur de thèse) |

*A mon père,*

# Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), unité dont je suis membre depuis bientôt 16 ans en tant qu'ingénieur de recherche. Je tiens à remercier Anne-Marie REVOL, directrice du LIBio, de m'avoir permis d'employer une partie de mon temps pour mener à bien cette thèse. Une part importante de mon activité professionnelle étant réalisée en interaction étroite avec le Plateau commun d'Analyse Structurale et Métabolomique (PASM), je remercie aussi Christophe ROBIN, directeur du PASM, pour avoir pris en considération les impératifs liés à la réalisation de cette thèse.

Je remercie Madame Emilie DESTANDAU, professeure à l'Université d'Orléans, et Monsieur Peter FALLER, professeur à l'Université de Strasbourg, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je remercie également Monsieur Loïc QUINTON, professeur assistant à l'Université de Liège, ainsi que Monsieur Thierry MAUGARD, professeur à l'Université de la Rochelle, d'avoir accepté d'examiner la conduite et les résultats de mes travaux.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Stéphane DESOBRY, professeur au LIBio et directeur de thèse, pour avoir répondu avec bienveillance à toutes mes sollicitations et pour m'avoir aiguillé à travers les nombreux méandres qui caractérisent cet exercice particulier (exercice que je connaissais « en surface » grâce aux échanges avec les doctorants avec qui j'ai eu l'occasion de travailler mais pas de l'intérieur…).

J'adresse mes sincères remerciements à Laetitia CANABADY-ROCHELLE, chargée de recherche au CNRS et codirectrice de thèse, avec qui j'ai eu grand plaisir à échanger durant ces trois années. Grâce à sa disponibilité, son support constant et ses nombreux conseils, j'ai pu travailler dans une ambiance motivante. J'en profite pour remercier le laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP) pour cette collaboration étroite sur la thématique des peptides chélateurs de métaux.

Durant cette thèse, j'ai profité de l'aide précieuse de Katalin SELMECZI, maître de conférences spécialisée en chimie de coordination, et Patrick CHAIMBAULT, professeur spécialisé en chimie analytique. Je les remercie de concert car tous deux ont su me faire profiter de leur expertise et de leur rigueur scientifique, ce qui m'a permis je l'espère, de progresser dans des domaines qui me tiennent à cœur. Je ne suis pas prêt d'oublier ces longues discussions lors du confinement, en soirée ou en week-end, grâce auxquelles les points bloquants finissaient par se débloquer et l'horizon par s'éclaircir. Enfin, au-delà des discussions scientifiques, nous avons pu nouer (Katalin) ou poursuivre (Patrick) des relations amicales, qui ont énormément compté dans la réussite de ce travail.

Je tiens également à remercier l'ensemble du personnel technique du LIBio, sans lequel les conditions de travail ne seraient pas ce qu'elles sont. J'adresse des remerciements tout particuliers à Blandine SIMARD qui a indirectement fortement contribué à l'aboutissement de cette thèse, en prenant pendant la période une part importante de la gestion du parc HPLC et de la partie hygiène et sécurité.

Je remercie aussi Romain LARBAT, chargé de recherche au laboratoire LAE, pour m'avoir initié aux rudiments du logiciel de métabolomique XCMS.

Je suis également reconnaissant envers Patrick AUBRY, personnel de la BU ingénieurs de Brabois, pour sa relecture attentive du manuscrit.

À titre personnel, je n'oublie pas Redge et Will (compagnon de Pittcon) qui ont suivi de près le déroulement de cette thèse et m'ont apporté leur soutien autour de quelques bières.

Je remercie bien évidemment ma maman, ma sœur et mon frère pour leur présence.

Enfin, rien n'aurait été possible sans les encouragements et l'investissement de ma compagne Angéline, qui a pallié mon manque de disponibilité auprès de nos deux enfants lors des (longues) journées de rédaction. Je les embrasse tous les trois.

**INTRODUCTION** ..... 21

**PARTIE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE** ..... 23

**Chapitre I : l'élément fer dans l'organisme** ..... 23

1. Généralités sur la chimie fer ..... 23
   1.1. Données atomiques ..... 23
   1.2. Solubilité ..... 24
   1.3. Les formes complexées ..... 24
      1.3.1. Complexes modèles ..... 25
      1.3.2. Complexes biologiques forts ..... 27
      1.3.3. Complexes biologiques faibles ..... 28
2. Le métabolisme du fer ..... 30
   2.1. Généralités ..... 31
   2.2. Répartition du fer dans l'organisme ..... 32
      2.2.1. Pool de fer(II) fonctionnel ..... 32
      2.2.2. Pool de fer(III) de stockage ..... 32
      2.2.3. Pool de fer fonctionnel fer(II) ↔ fer(III) ..... 33
      2.2.4. Pool de fer labile fer(II) + fer(III) ..... 33
   2.3. Les acteurs du métabolisme martial ..... 34
   2.4. Mécanismes de régulation ..... 35
      2.4.1. Mécanisme de régulation de la crypte (HFE) ..... 36
      2.4.2. Mécanisme de régulation par l'hepcidine ..... 36
      2.4.3. Mécanisme de régulation IRP-IRE ..... 36
      2.4.4. Mécanisme par hypoxie (dioxygène) ..... 37
   2.5. Anomalies du métabolisme martial ..... 37
      2.5.1. Carence en fer ..... 37
      2.5.2. Surcharge en fer ..... 37
3. Conclusion ..... 39

**Chapitre II : les peptides chélateurs de métaux** ..... 41

1. Propriétés chélatrices des peptides ..... 41
   1.1. Nature de l'interaction métal-peptide ..... 41
      1.1.1. Théorie "Hard and Soft Acid Base" ..... 41
      1.1.2. Acides aminés ..... 43
      1.1.3. Motifs complexants ..... 45
   1.2. Étude des complexes en solution ..... 47
      1.2.1. pH-potentiométrie ..... 47
      1.2.2. Spectroscopie UV-Vis ..... 48
      1.2.3. Electrospray-Spectrométrie de Masse (ESI-MS) ..... 48
      1.2.4. Analyse critique des techniques ..... 50
2. Potentielles applications « santé » des peptides chélateurs de métaux ..... 51
   2.1. Absorption digestive des minéraux ..... 51
      2.1.1. Ingrédients fonctionnels ..... 51
      2.1.2. Supplémentation ..... 51
   2.2. Capacité antioxydante ..... 52
3. Les peptides chélateurs de fer ..... 54
   3.1. Chélateurs du fer(III) ..... 54
   3.2. Chélateurs du fer(II) ..... 57
4. Conclusion ..... 60

**Chapitre III : criblage des peptides chélateurs de métaux ..... 61**
**1. Protocole de criblage empirique** ..... 61
**1.1. Principe** ..... 62
**1.2. Mise en œuvre** ..... 62
**1.2.1. Fractionnement** ..... 62
**1.2.2. Test de chélation** ..... 65
**1.2.3. Test de pureté** ..... 66
**1.2.4. Identification** ..... 67
**1.3. Analyse critique du protocole de criblage empirique** ..... 71
**1.3.1. Points forts et opportunités** ..... 71
**1.3.2. Points faibles** ..... 72
**2. Protocole de criblage IMAC** ..... 72
**2.1. Principe** ..... 72
**2.2. Mise en œuvre** ..... 73
**2.2.1 Présentation de la technique IMAC** ..... 73
**2.2.2. Fractionnement** ..... 75
**2.2.3. Dessalage** ..... 78
**2.2.4. Identification** ..... 79
**2.2.5. Cas pratiques** ..... 79
**2.3. Analyse critique du protocole de criblage IMAC** ..... 80
**2.3.1. Points forts et opportunités** ..... 80
**2.3.2. Points faibles** ..... 81
**3. Criblage des peptides chélateurs de fer** ..... 82
**3.1. IMAC-$Fe^{III}$** ..... 82
**3.2. IMAC-$Fe^{II}$** ..... 82
**4. Conclusion** ..... 84

**PARTIE 2 : OBJECTIF DE LA THÈSE ..... 85**

**PARTIE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES ..... 87**
**1. Produits chimiques et réactifs** ..... 87
**1.1. Ligands de référence** ..... 87
**1.2. Peptides standards** ..... 87
**1.2.1. Liste des peptides standards** ..... 87
**1.2.2. Critères de choix** ..... 87
**1.3. Hydrolysats** ..... 89
**1.3.1. Hydrolysat synthétique** ..... 89
**1.3.2. Hydrolysat trypsique de caséines** ..... 89
**1.4. Produits pour la chromatographie** ..... 89
**1.4.1. Analyses IMAC** ..... 89
**1.4.2. Analyses IP-RPLC** ..... 90
**1.5. Préparation des solutions IMAC** ..... 90
**1.5.1. Solutions de greffage** ..... 90
**1.5.2. Solution de lavage** ..... 91
**1.5.3. Solution de stripping** ..... 91
**1.5.4. Phases mobiles** ..... 91
**2. Système LC-MS** ..... 91
**3. Caractérisation de l'hydrolysat caséique** ..... 91
**4. Protocole IMAC-MS** ..... 92
**4.1. Colonne IMAC** ..... 92

**4.2. Préparation et régénération du support greffé, contrôle du greffage** ..... 92
**4.2.1. Préparation du support greffé (chargement)** ..... 93
**4.2.2. Régénération du support greffé (stripping et rechargement)** ..... 93
**4.2.3. Contrôle du greffage en fer** ..... 94
**4.3. Analyses IMAC-MS** ..... 98
**5. Protocole IP-RPLC-HRMS** ..... 99
**5.1. Formation des complexes fer-peptide** ..... 99
**5.1.1. Complexation avec un peptide pur** ..... 99
**5.1.2. Complexation avec un hydrolysat** ..... 100
**5.2. Analyses en mode flow-injection ESI-MS** ..... 101
**5.3. Analyses IP-RPLC-HRMS** ..... 102
**5.4. Traitement de données** ..... 102

**PARTIE 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSION ..... 103**

**Chapitre I : stratégie de criblage IMAC-MS ..... 103**

**1. Mise en œuvre du protocole** ..... 103
**1.1. Objectif** ..... 103
**1.2. Analyse préalable des freins à la mise en place du protocole IMAC-MS et identification des leviers** ..... 104
**1.2.1. Volatilité de l'éluant** ..... 104
**1.2.2. Mode d'élution** ..... 104
**1.2.3. Qualité du greffage en ions « fer »** ..... 104
**1.3. Méthodologie appliquée** ..... 105
**2. Étude du greffage en fer** ..... 106
**2.1. Évaluation des procédures de stripping et de chargement** ..... 106
**2.1.1. Stripping à l'EDTA (50 mM)** ..... 107
**2.1.2. Chargement par le chlorure de fer (25 mM)** ..... 108
**2.1.3. Synthèse** ..... 109
**2.2. Évaluation du niveau de greffage en fer** ..... 109
**2.2.1. Greffage des ions $Fe^{3+}$** ..... 109
**2.2.2. Greffage des ions $Fe^{2+}$** ..... 110
**2.2.3. Synthèse** ..... 111
**2.3. Étude de spéciation du fer** ..... 111
**2.3.1. Chargement** ..... 111
**2.3.2. Stripping** ..... 112
**2.3.3. Synthèse** ..... 112
**3. Analyses IMAC-ESI-MS** ..... 113
**3.1. Ligands de référence** ..... 113
**3.1.1. Analyse de la desferrioxamine** ..... 114
**3.1.2. Analyse de la terpyridine** ..... 115
**3.1.3. Synthèse** ..... 116
**3.2. Peptides standards non phosphorylés** ..... 117
**3.2.1. Peptides potentiellement complexants du fer(II)** ..... 117
**3.2.2. Peptides potentiellement complexants du fer(III)** ..... 119
**3.2.3. Synthèse** ..... 119
**3.3. Hydrolysat caséique** ..... 120
**3.3.1. Analyse IMAC des phosphopeptides et peptides « acides »** ..... 120
**3.3.2. Analyse IMAC des peptides non phosphorylés (et non « acides »)** ..... 123
**3.3.3. Synthèse** ..... 124

**4. Faisabilité d'un criblage IMAC-MS des peptides chélateurs de fer au sein d'un hydrolysat** ..... 125
**4.1. Test de criblage manuel des peptides chélateurs du fer(III)** ..... 126
**4.2. Test de criblage manuel des peptides chélateurs du fer(II)** ..... 131
**4.3. Synthèse** ..... 132
**5. Conclusion** ..... 134

**Chapitre II : stratégie de criblage IP-RPLC-HRMS ..... 137**
**1. Mise en œuvre du protocole** ..... 137
**1.1. Objectif** ..... 137
**1.2. Analyse préalable des freins à la mise en place du protocole MS et identification des leviers** ..... 138
**1.2.1. Formation des complexes en solution** ..... 138
**1.2.2. Stabilité des complexes fer-peptide par MS** ..... 138
**1.2.3. Contrôle du degré d'oxydation du fer** ..... 138
**1.2.4. Travail sur des hydrolysats complexes** ..... 139
**1.2.5. Mise en œuvre du criblage** ..... 139
**1.3. Méthodologie appliquée** ..... 140
**2. Étude des complexes fer-ligand de référence** ..... 141
**2.1. Détection ESI-MS** ..... 141
**2.1.1. Complexe fer(III)-DFO** ..... 141
**2.1.2. Complexe fer(II)-TERPY** ..... 142
**2.1.3. Synthèse** ..... 143
**2.2. Détection LC-ESI-MS** ..... 143
**2.2.1. Complexe fer(III)-DFO** ..... 143
**2.2.2. Complexe fer(II)-TERPY** ..... 144
**2.2.3. Synthèse** ..... 145
**3. Étude des complexes fer-peptide** ..... 146
**3.1. Détection ESI-HRMS** ..... 146
**3.1.1. Complexes fer(II)-peptide** ..... 146
**3.1.2. Complexes fer(III)-peptide** ..... 150
**3.1.3. Synthèse** ..... 153
**3.2. Détection IP-RPLC-ESI-HRMS** ..... 153
**3.2.1. Complexes fer(II)-peptide** ..... 154
**3.2.2. Complexes fer(III)-peptide** ..... 157
**3.2.3. Synthèse** ..... 158
**4. Mise au point d'un criblage des peptides chélateurs du fer(II)** ..... 159
**4.1. Effet du ratio [fer(II)]/[peptide] sur le RAC** ..... 159
**4.2. Effet matrice** ..... 160
**4.3. Combinaison des facteurs ascendants et descendants** ..... 162
**4.4. Traitement de données *via* une stratégie de type métabolomique** ..... 163
**5. Application du criblage des peptides chélateurs de fer(II) à un hydrolysat trypsique de caséines** 166
**6. Conclusion** ..... 169

**PARTIE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... 171**
**1. Conclusion** ..... 171
**2. Perspectives** ..... 173

**LISTE DES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 177**

**LISTE DES ANNEXES ..... 193**

**ANNEXE 1 : anomalie du métabolisme martial ..... 195**

**1. Carence en fer** ... 195
**1.1. Anémie ferriprive** ... 195
**1.1.1. Cause alimentaire** ... 195
**1.1.2. Grossesse et hémorragies** ... 195
**1.1.3. Cause inflammatoire et hyperthyroïdie** ... 195
**1.1.4. Cause génétique** ... 196
**1.2. Traitements de l'anémie ferriprive** ... 196
**1.2.1. Traitement par transfusion sanguine** ... 196
**1.2.2. Traitement par supplémentation en fer** ... 196
**1.2.3. Perspectives thérapeutiques** ... 197
**2. Surcharge en fer** ... 197
**2.1. Hémochromatose** ... 197
**2.1.1. Hémochromatose primitive** ... 197
**2.1.2. Hémochromatose secondaire ou hémosidérose** ... 198
**2.2. Effet prooxydant du fer in vivo** ... 198
**2.2.1. Fonctionnement cellulaire normal** ... 199
**2.2.2. Fonctionnement cellulaire en cas d'excès de fer** ... 199
**2.3. Traitement de la surcharge en fer** ... 200
**2.3.1. Traitement par saignée** ... 200
**2.3.2. Traitement par chélation** ... 200
**2.3.3. Perspectives thérapeutiques** ... 201

**ANNEXE 2 : généralités sur les peptides actifs ... 203**
**1. Structure** ... 203
**1.1. Taille et diversité** ... 205
**1.2. Activité et comportement in vivo** ... 205
**1.2.1. Points forts** ... 205
**1.2.2. Points faibles** ... 206
**2. Modes de production** ... 206
**2.1. Peptides naturels** ... 206
**2.1.1. Peptides extraits** ... 207
**2.1.2. Peptides de protéolyse enzymatique** ... 207
**2.2. Peptides de synthèse** ... 208
**2.2.1. Synthèse de peptides naturels** ... 209
**2.2.2. Synthèse de peptides modifiés et peptidomimétiques** ... 209

**ANNEXE 3-1 : étude bibliographique IMAC (peptides) ... 211**

**ANNEXE 3-2 : étude bibliographique IMAC (protéines) ... 212**

**ANNEXE 3-3 : étude bibliographique IMAC (autres composés) ... 213**

**ANNEXE 4-1 : identification MS de peptides d'intérêt dans l'hydrolysat trypsique de caséines ... 215**

**ANNEXE 4-2 : identification MS de peptides d'intérêt dans l'hydrolysat trypsique de caséines ... 216**

**ANNEXE 5 : extrait fiche technique colonne ProPac IMAC-10 ... 217**

**ANNEXE 6 : suivi des collectes et injections en IMAC ... 219**

**ANNEXE 7 : table des temps de rétention obtenus par IMAC-MS sur les peptides standards non phosphorylés ..... 221**

**ANNEXE 8 : séquences des quatre protéines caséiques (source UniProtKB) ..... 223**

**ANNEXE 9 : publication protocole de criblage IP-RPLC-HRMS ..... 225**

**ANNEXE 10 : publication identification de sidérophores bactériens ..... 241**

## Valorisation du travail

### Publication scientifique valorisant une partie du travail de thèse (Annexe 9)

Cette publication porte sur le développement d'un protocole de criblage (non ciblé) des peptides chélateurs du fer(II), par la technique LC-MS (haute résolution) et en mettant en œuvre une approche de type métabolomique.

**C. Paris**, K. Selmeczi, B. Ebel, L. Stefan, G. Csire, C. Cakir-Kiefer, S. Desobry, L. Canabady-Rochelle et P. Chaimbault, « Metabolomics approach based on LC-HRMS for the fast screening of iron(II)-chelating peptides in protein hydrolysates », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, p. 315-329, vol. 413, janv. 2021, doi: 10.1007/s00216-020-03037-1. (**Publiée**)

### Publication scientifique portant sur l'identification de sidérophores bactériens (Annexe 10)

Pour ce travail, j'ai réalisé (i) l'identification par spectrométrie de masse (MS) des sidérophores bactériens, en mettant à profit l'approche expérimentale développée dans le cadre de mon travail de thèse, (ii) la co-rédaction des parties ayant attrait à l'analyse MS et (iii) la relecture critique de l'ensemble de la publication.

L. Picard, **C. Paris**, T. Dhalleine, Emmanuelle Morin, P. Oger, M.P. Turpault, S. Uroz, « Identification and functional characterization of the siderophore produced by Collimonas pratensis PMB3(1) and role in mineral weathering ». (**Soumise**)

### Publication scientifique portant sur la simulation de séparation par chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC) à partir de la technique de résonance plasmonique de surface (SPR) (contribution transversale)

Des analyses MS réalisées durant mes travaux de thèse ont permis de montrer la formation de ponts disulfure au sein de certaines séquences peptidiques standards (contenant des résidus cystéine). Ce résultat a été valorisé dans la partie « Discussion » de la publication ci-dessous.

L. Muhr, S. Pontvianne, K. Selmeczi, **C. Paris**, S. Boschi-Muller, et L. Canabady-Rochelle, « Chromatographic Separation Simulation of Metal-Chelating Peptides from Surface Plasmon Resonance Binding Parameters », *Journal of Separation Science*, p. 2031-2041, vol. 43, n° 11, mars 2020, doi: 10.1002/jssc.201900882. (**Publiée**)

### Chapitre de livre

Dans le cadre de ce travail, j'ai rédigé la partie concernant le criblage des peptides chélateurs de métaux par la technique MS associée à une ionisation par électronébulisation (ESI-MS) (2 pages).

« Biologically Active Peptides: from basic science to applications for human health » (F. Toldrá and J. Wu, *Elsevier*): « Application in Nutrition: Mineral-Binding » (chapitre 19), rédigé par S. El Hajj, T. Sepulveda-Rincon, **C. Paris**, T. Giraud, G. Csire, L. Stefan, K. Selmeczi, J-M. Girardet, S. Desobry, S. Bouhallab, L. Muhr, C. Gaucher, et L. Canabady-Rochelle. https://www.elsevier.com/books/biologically-active-peptides/toldra/978-0-12-821389-6 (**Sous presse**: publication prévue en juin 2021)

## Conférences orales

Conférence nationale de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP), Nantes, 15-17 octobre, 2019 : **C. Paris,** K. Selmeczi, P. Chaimbault, S. Desobry et L. Canabady-Rochelle, « Criblage IP-RPLC-MS de Peptides Chélateurs de Fer par Analyse Différentielle de Spectres de Masse » (20 min)

Conférence internationale Pittsburgh Conference & Exposition on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (PITTCON), Chicago, 1-5 mars, 2020: **C. Paris**, K. Selmeczi, P. Chaimbault, S. Desobry et L. Canabady-Rochelle, « Liquid chromatography-mass spectrometry screening of iron chelating peptides by differential analysis of mass spectra » (20 min)

## Posters

17e conférence internationale « Oxidative Stress, Reduction and Redox Homeostasis », Paris, 13-15 juin, 2016: L. Canabady-Rochelle, **C. Paris**, K. Selmeczi, C. Gaucher, I. Clarot, P. Leroy, H. Alem, R. Schneider, P. Chaimbault, L. Muhr and S. Boschi-Muller, « Screening and Purification of Metal Chelating Peptides in Hydrolysates for their Antioxidant Properties »

16e conférence nationale de la Société Française de Génie des Procédés (SFGP), Nancy, 11-13 juillet, 2017 : **C. Paris**, K. Selmeczi, S. Boschi-Muller, S. Pontvianne, L. Muhr, S. Desobry, P. Chaimbault et Canabady-Rochelle, « Criblage Rapide par IMAC-MS de Peptides Chélateurs de Métaux pour leurs Propriétés Antioxydantes au sein d'Hydrolysats »

Séminaire « IMPACT Biomolécules (UL) », Palma de Majorque, 24-25 octobre, 2019 : C. Paris, K. Selmeczi, P. Chaimbault, S. Desobry et L. Canabady-Rochelle, « IP-RPLC-MS Screening of Iron(II) Chelating Peptides by Differential Analysis of Mass Spectra »

## Cours-conférence valorisant une partie de mes résultats de thèse (sur le criblage par analyse différentielle)

Ce cours-conférence a été réalisé le 16 novembre 2020 par Laetitia Canabady-Rochelle (co-directrice de thèse) pour des étudiants M2 de l'Université de Lorraine (Master Microbiologie : M2 MIC, Faculté des sciences et technologies ; Master Aliment, Nutrition, Cosmétique : M2 ANC, ENSAIA, durée 3 h).

El Hajj, S., Csire, G., **Paris, C.**, Irankunda, R., Girardet, J.M., Alem H., Desobry, S., Schneider, R., Boschi-Muller, S., Stefan, L., Selmeczi, K., Muhr, L., Gaucher, C. and Canabady-Rochelle, L. Metal-Binding Peptides: Production, Screening and Separation for various Applications. U.E. Biomolecules.

# Abréviations

**AAS : Atomic Absorption Spectrophotometry** (spectrométrie d'absorption atomique**)**

**ABTS : 2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzoThiazoline-6-Sulfonic acid)**

**ATCUN : Amino Terminal CU(II)- and Ni(II)-binding motif**

**BP: peptides bioactifs**

**CID : Collision Induced Dissociation** (dissociation induite par collision)

**CM-Asp : N-(CarboxyMethyl)Aspartate**

**CPC : Centrifugal Partition Chromatography** (chromatographie de partage centrifuge)

**DFO : DesFerriOxamine** (desferrioxamine)

**ECD : Electron Capture Dissociation** (dissociation induite par capture d'électron)

**EDTA : EthyleneDiamineTetraacetic Acid** (acide éthylènediaminetétracétique)

**en : ethylenediamine** (éthylènediamine)

**ESI : ElectroSpray Ionisation** (ionisation par électronébulisation)

**ETD : Electron Transfer Dissociation** (dissociation induite par transfert d'électron)

**FAAS : Flame Atomic Absorption Spectrophotometry** (spectrométrie d'absorption atomique flamme)

**FTIR : Fourier Transform InfraRed spectroscopy** (infra-rouge à transformée de Fourier)

**HCD : Higher Collisional Dissociation** (dissociation induite par collision haute énergie)

**HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid**

**HILIC : Hydrophilic Interaction Chromatography** (chromatographie d'interaction hydrophile)

**HILIC-CEC : HILIC-Cation-Exchange Chromatography** (chromatographie d'interaction hydrophile-échange de cation)

**HPCIC : High Performance Chelation Ion Chromatography** (chromatographie haute performance par chélation d'ions)

**HPLC : High-Performance Liquid Chromatography** (chromatographie liquide haute-performance)

**HSAB : Hard and Soft Acid Base theory** (principe HSAB)

**ICP-OES : Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy** (spectroscopie d'émission optique à plasma à couplage inductif)

**IDA : IminoDiacetic Acid** (acide iminodiacétique)

**IMAC : Immobilized Metal Affinity Chromatography** (chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés)

**IP-RP-LC : Ion-Paired Reversed-Phase LC** (chromatographie liquide en phase inverse par paires d'ions)

**IR : InfraRed** (infra-rouge)

**IRP/IRE : Iron Regulatory Protein/Iron Responsive Element** (protéine de régulation du fer/élément de réponse au fer)

**IT : Ion Trap** (analyseur MS de type trappe ionique à 3 dimensions)

**LC-MS/MS : Liquid Chromatography coupled to MS/MS** (chromatographie liquide couplée avec la spectrométrie de masse en tandem)

**LIP : Labile Iron Pool** (pool de fer labile intracellulaire)

**LIT : Linear Ion Trap** (analyseur MS de type trappe ionique linéaire)

**LMCT : Ligand to Metal Charge Transfer** (transfert de charge du ligand vers le métal)

**LPI : Labile Plasma Iron** (fer plasmatique labile)

**MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation** (désorption-ionisation laser assistée par matrice)

**Maldi-ToF/ToFMS : MALDI source coupled with a time-of-flight MS analyzer** (source MALDI couplée avec un analyseur MS à temps de vol)

**MES : 2-(N-Morpholino)EthaneSulfonic acid**

**MIC : Metal Ion Chromatography** (chromatographie d'ions métalliques)

**MIT : Metal Ion Transfer** (phénomène de transfert d'ion métallique rencontré en IMAC)

**MLCT : Metal to Ligand Charge Transfer** (transfert de charge du métal vers le ligand)

**MOPS : 3-(N-MOrpholino)PropaneSulfonic acid**

**MS : Mass Spectrometry** (spectrométrie de masse)

**MS/MS : Tandem Mass Spectrometry** (spectrométrie de masse en tandem)

**NAD : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (in oxidized form)**

**NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (in reduced form)**

**NFPA : NonaFluororoPentanoic Acid** (acide nonafluoropentanoique)

**NMR : Nuclear Magnetic Resonance (**résonance magnétique nucléaire)

**NTA : NitriloTriacetic Acid** (acide nitrilotriacétique)

**NTBI : Non Transferrin Bound Iron** (fer non lié à la transferrine)

**OAc : acetate** (acétate)

**BP : Bioactive Peptides** (peptides bioactifs)

**MCP : Metal Chelating Peptides** (peptides chélateurs de métaux)

**Q : Quadrupole mass analyzer (**analyseur MS quadripolaire)

**QqQ : triple quadrupole mass spectrometer** (spectromètre de masse triple quadripolaire)

**Q/ToF : Q/ToF tandem mass spectrometer** (spectromètre de masse en tandem quadripôle/temps de vol)

**RAC : Relative abundance of complex** (abondance relative du complexe fer-peptide par rapport au peptide libre)

**ROS : Reactive Oxygen Species** (espèce réactive de l'oxygène)

**RP ou RPLC : Reversed Phase Liquid Chromatography** (chromatographie à polarité de phases inversée)

**RPE : Electron Paramagnetic Resonance** (résonance paramagnétique électronique)

**SCX : Strong Cation Exchange** (chromatographie d'échange de cations forts)

**SEC : Size Exclusion Chromatography** (chromatographie d'exclusion de taille)

**SPS : Solid Phase Synthesis** (synthèse en phase solide)

**TED : Tris(carboxymethyl)EthyleneDiamine**

**TERPY : terpyridine** (terpyridine)

**TFA : TriFluoroacetic Acid** (acide trifluoroacétique)

**TIC-MS** : **Total Ion Current chromatogram** (courant ionique total obtenu par spectrométrie de masse)

**ToF : Time-of-Flight** (analyseur MS à temps de vol)

**TREN : TRis(2-aminoEthyl)amiNe**

**UF : UltraFiltration** (ultrafiltration)

**UHPLC-MS : Ultra-High Performance Liquid Chromatography** (chromatographie liquide ultra-haute pression)

**ZIC-HILIC : Zwitter Ion Chromatography–HILIC** (chromatographie zwitterionique-interaction hydrophile)

# Définitions

**Apoprotéine :** partie protéique d'une molécule qui comporte une partie non protéique (exemple : globine dans le cas de l'hémoglobine).

**Collagène :** type de protéine appartenant à la famille des protéines dites structurales, le plus souvent présente sous forme fibrillaire.

**Constante de formation successive (*Kf*) :** constante de formation associée à la réaction de complexation MpL(i-1) + L = MpLi ($K_i$), avec M = métal, L = ligand et i = 1, 2, …, q

**Constante de formation globale (β) :** constante de formation associée à la réaction de complexation pM + qL = MpLq ($\beta = K_1 \times K_2 \times \ldots \times K_q$), avec M = métal et L = ligand.

**Cytbrd1 :** enzyme chargée de réduire le fer ferrique extracellulaire en fer ferreux, dans le cas du fer plasmatique (lié à la transferrine).

**Cytokine :** protéine signal participant à la régulation entre cellules à distance.

**Dcytb :** enzyme chargée de réduire le fer ferrique extracellulaire en fer ferreux, dans le cas du fer minéral ingéré.

**Denticité :** nombre d'atomes d'un ligand (ou coordinat) pouvant se lier à un atome central (en général un métal) dans un complexe.

**DMT1 :** récepteur membranaire du fer minéral (forme ferrique) situé au niveau de l'entérocyte.

**Down factor :** facteur exprimant la diminution du peptide entre l'échantillon contrôle sans fer et le même échantillon incubé avec du fer.

**Entérocytes :** cellules du duodénum impliquées dans l'absorption intestinale.

**Érythroblastes :** cellules sanguines impliquées dans la synthèse de l'hémoglobine.

**Ferroportine :** transporteur transmembranaire du fer, situé au niveau de l'entérocyte et du macrophage.

**Flow-injection :** terme anglais pour désigner une perfusion dans le flux de la phase mobile HPLC.

**HCP1 :** récepteur membranaire du fer héminique (forme ferreuse) situé au niveau de l'entérocyte.

**Hépatocytes** : cellules du foie impliquées dans le stockage.

**HFE (« High Fe ») :** protéine de l'hémochromatose humaine codée par le gène HFE situé sur le chromosome 6 humain.

**Macrophage du système réticulo-endothélial (ou système phagocytaire mononucléé) :** ensemble de cellules immunitaires mononucléées se trouvant au niveau des tissus réticulaires et dont le mécanisme immunitaire implique la phagocytose (ces cellules sont impliquées dans le stockage et le recyclage du fer).

**Parentéral :** administration d'un médicament par une voie autre que l'ingestion orale.

***Per os* :** administration d'un médicament par voie orale.

**Stripping :** terme anglais pour désigner le décrochage des ions métalliques en IMAC.

**TfR1 :** récepteur membranaire de la transferrine (qui transporte le fer sous forme ferrique).

**Tissu réticulaire (ou réticulé) :** tissu conjonctif qui constitue le stroma (espace entre les organes) des organes hématopoïétiques et lymphoïdes (ganglions lymphatiques, rate, moelle osseuse), du foie et du rein.

**Up factor :** facteur exprimant l'augmentation du complexe entre l'échantillon contrôle sans fer et le même échantillon incubé avec du fer.

# INTRODUCTION

L'excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'organisme induit des dommages oxydatifs conduisant à de nombreuses pathologies telles que des cancers ou des maladies neurodégénératives. Le fer, au même titre que le cuivre, est un métal de transition connu pour catalyser leur production intracellulaire, et notamment celle du radical libre hautement réactif $HO^{\bullet}$ *via* la réaction de Fenton. En cas de surcharge martiale, un déséquilibre de la balance "antioxydants"/"prooxydants" se produit en faveur de ces derniers, occasionnant une surproduction de ROS et un état de stress oxydant. Dans ce contexte, la séquestration du fer par des molécules chélatrices permettrait d'inhiber son activité redox et par suite de limiter la prolifération des ROS.

Les hydrolysats protéiques générés par voie enzymatique constituent une banque de peptides à explorer et une ressource importante de peptides bioactifs avec un large spectre de propriétés fonctionnelles, dont l'activité antioxydante par chélation du fer. La grande complexité de ces mélanges – contenant généralement plus d'une centaine de molécules – représente un défi pour l'identification et la purification de peptides d'intérêt. Ainsi, leur séquençage par spectrométrie de masse (MS) est habituellement réalisé au terme d'un processus empirique fastidieux et chronophage (de l'ordre du mois).

Le criblage des peptides chélateurs de métaux est toutefois facilité en mettant à profit leur capacité intrinsèque à complexer les ions métalliques. Ainsi, la chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC), basée sur l'interaction entre des ligands élués dans la phase mobile et des ions métalliques immobilisés sur la phase chromatographique, est couramment utilisée pour fractionner des peptides recherchés pour leur aptitude à chélater des minéraux. Cependant, les phases mobiles utilisées en IMAC contenant généralement des sels non volatiles, un dessalage est indispensable avant l'identification MS. Cette étape supplémentaire repose le plus souvent sur une démarche empirique, ce qui rallonge sensiblement le processus d'identification (de l'ordre de la semaine).

Face au besoin de sonder un nombre croissant d'hydrolysats protéiques, il apparait crucial de disposer d'approches à haut débit pour caractériser les peptides chélateurs de métaux. Cette démarche est économique car, dans ce cas de figure, la purification n'est engagée que si un peptide d'intérêt est préalablement détecté lors du criblage. En outre, la séquence en acides aminés du peptide étant accessible par fragmentation $MS^2$, le procédé d'isolement à mettre en œuvre peut être rationalisé, en termes de temps et de performance de séparation.

Le principal objectif de cette thèse est de développer des méthodes directes pour le criblage et l'identification des peptides chélateurs de fer, afin de pouvoir explorer les capacités antioxydantes d'un hydrolysat dans un laps de temps court (de l'ordre de la journée).

Une étude bibliographique, composée de trois chapitres, sera tout d'abord présentée (**PARTIE 1**). Le premier chapitre rappellera quelques généralités sur la chimie du fer avant d'expliciter son rôle dans le corps humain. Les principaux pools de fer seront mis en lumière, ainsi que les

mécanismes de régulation sous-tendant l'homéostasie martiale. Les pathologies associées à la perturbation de cet équilibre seront également évoquées brièvement. Dans le deuxième chapitre, nous exposerons les applications potentielles des peptides chélateurs de métaux pour le traitement de diverses affections, qu'il s'agisse d'un déficit en minéraux (fer, cuivre, zinc, calcium), d'un stress oxydant (fer, cuivre) ou d'un excès de fer plasmatique. En fin de chapitre, une étude portant sur les peptides chélateurs du fer sera présentée, dans le but d'établir un lien entre structure peptidique et capacité de chélation. Enfin, le troisième chapitre fera le point sur les méthodes actuellement mises en œuvre pour cribler les peptides chélateurs de métaux dans des matrices complexes. L'approche traditionnelle empirique et l'approche reposant sur la technique IMAC seront discutées, de façon à faire émerger les avantages et inconvénients propres à chacune d'elles.

Après ces éléments de contexte, l'objectif de ce travail de thèse sera explicité par le biais d'un schéma comparatif des différentes méthodes de criblage (**PARTIE 2**).

La suite de ce manuscrit sera consacrée au développement de deux approches distinctes pour le criblage à haut débit des peptides chélateurs de fer. Après une partie purement technique décrivant le matériel et les méthodes utilisées (**PARTIE 3**), les résultats obtenus seront exposés et discutés dans la partie suivante (**PARTIE 4**).

La première approche propose d'effectuer le criblage en utilisant la technique conventionnelle IMAC. Grâce à la spécificité d'interaction entre le fer immobilisé et des motifs complexants déterminés, il est théoriquement possible de retenir sélectivement les composés chélateurs présents dans un mélange peptidique complexe. Cependant, afin de parvenir à une détection rapide par couplage direct avec la spectrométrie de masse, des phases mobiles exemptes de sels non volatiles ont été mises en œuvre. En plus de cette contrainte à surmonter, l'état d'oxydation du fer immobilisé sur la colonne a aussi fait l'objet de toute notre attention.

La seconde approche envisage un mode de criblage radicalement différent. Au lieu d'une rétention sélective des peptides sur un support chargé en fer, la stratégie consiste à évaluer la formation des complexes fer-peptide en solution. Dans ce cadre, l'outil de criblage est la spectrométrie de masse pour sa capacité à détecter simultanément le peptide et son complexe de fer correspondant. Une vigilance particulière a été portée à la spéciation du fer selon son degré d'oxydation.

Enfin, nous conclurons ce travail de thèse et discuterons des différentes perspectives de ces travaux de recherche (**PARTIE 5**).

# PARTIE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## Chapitre I : l'élément fer dans l'organisme

Le fer, quatrième élément le plus répandu sur la planète avec environ 5 % de la masse de la croûte terrestre [1], joue un rôle fondamental dans la chimie du vivant.

### 1. Généralités sur la chimie fer

#### 1.1. Données atomiques

Le fer possède un noyau atomique composé de 26 protons (Z=26) et il est présent sous forme de quatre isotopes stables caractérisés par leur nombre de masse (A), leur masse atomique (u) et leur abondance naturelle relative (%) (**Tableau 1**). On observe que les deux isotopes majoritaires sont le fer $^{54}$Fe (5.8%) et surtout le fer $^{56}$Fe (91.8%).

**Tableau 1.** Isotopes stables du fer [2].

| Isotope stable | Nombre de masse A | Masse atomique (u) | Abondance naturelle (%) |
|---|---|---|---|
| $^{54}$Fe | 54 | 53.9396 | 5.8 |
| $^{56}$Fe | 56 | 55.9349 | 91.8 |
| $^{57}$Fe | 57 | 56.9354 | 2.1 |
| $^{58}$Fe | 58 | 57.9333 | 0.3 |

De configuration électronique [Ar]3d$^6$4s$^2$ (groupe 8, période 4 du tableau périodique des éléments), il appartient à la catégorie des métaux de transition qui regroupe les éléments dont la sous-couche d, comprenant au plus 10 électrons, est en cours de remplissage. La configuration des 8 électrons de valence du fer est à l'origine de ses propriétés chimiques et de ses degrés d'oxydation préférentiels.

Ainsi, bien que les états d'oxydation potentiels du fer soient compris entre –II (d$^{10}$) et +VIII (d$^0$), les formes ferreuse Fe$^{II}$ (d$^6$) et ferrique Fe$^{III}$ (d$^5$) sont de loin les plus favorables [2]. La configuration optimale de la forme ferrique, avec la sous-couche d à demi-remplie par 5 électrons célibataires, en fait l'état d'oxydation le plus stable.

Pour ces raisons, le fer est à l'état naturel majoritairement rencontré aux états d'oxydation + II et +III, et par ailleurs, assez rarement sous forme de corps simple Fe$^0$ (état réduit).

### 1.2. Solubilité

Le diagramme E-pH (diagramme de Pourbaix) du fer (**Figure 1**) indique que le domaine de stabilité des espèces ioniques $Fe^{2+}$ et $Fe^{3+}$ est très restreint, ce qui impacte fortement la solubilité du fer dans l'eau.

Les cations $Fe^{3+}$ précipitent dès pH 2 sous forme de $Fe(OH)_3$, hydroxyde ferrique de constante de solubilité extrêmement faible ($K_s$ = $2.6\times10^{-40}$). Quant aux ions $Fe^{2+}$, ils s'oxydent « spontanément » en présence de dioxygène dissous et précipitent de ce fait bien avant pH 7.5, également sous forme de $Fe(OH)_3$. Dans des conditions contrôlées (milieu dégazé avec un gaz inerte et atmosphère inerte), les ions $Fe^{2+}$ ne précipitent toutefois qu'à partir de pH 7.5 sous forme de $Fe(OH)_2$, hydroxyde ferreux de constante de solubilité très faible ($K_s$ = $8\times10^{-16}$).

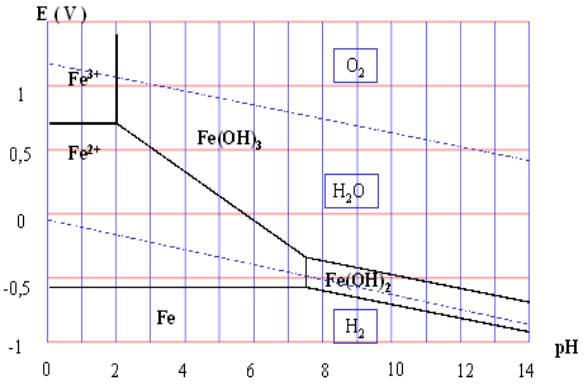



**Figure 1.** Diagramme E-pH du fer superposé à celui de l'eau (C = 0.01 mol·$L^{-1}$ ; P = 1 bar) [3].

Les formes libres $Fe^{2+}$ et $Fe^{3+}$ étant quasiment insolubles aux pH biologiques, les organismes ont dû mettre en place des stratégies pour augmenter la disponibilité du fer, en tant qu'élément essentiel à la vie [4].

### 1.3. Les formes complexées

La solubilité du fer est améliorée par complexation avec des ligands anioniques ou neutres, contenant des atomes dotés d'un doublet électronique libre comme l'oxygène, l'azote ou le soufre. Ces ligands délocalisent une partie de leur charge électronique et créent une sphère de coordination autour du cation métallique. Cet assemblage non covalent doit être suffisamment fort pour éviter la formation des produits d'hydrolyse insolubles.

Plusieurs paramètres influent sur la géométrie des complexes, à savoir le nombre de coordination du cation métallique mais également la taille, la charge et la configuration électronique du métal et des ligands.

Le fer forme des complexes sous ses deux états d'oxydation II et III. Il y présente généralement un nombre de coordination égal à six, ce qui donne lieu à des arrangements moléculaires de

géométrie octaédrique autour du cation central $Fe^{2+}$ ou $Fe^{3+}$. Dans certains cas, le fer n'est coordiné que sur quatre sites et la géométrie du complexe est alors tétraédrique ou plane carrée.

Remarque : par souci de cohérence avec la **PARTIE 4** (**Résultats et discussion**), les complexes de coordination apparaissent dans ce manuscrit sous la forme non conventionnelle $[L+M^{X}]^{Z}$ (L : ligand ; M : métal ; X : degré d'oxydation du métal ; Z : charge nette du complexe).

### 1.3.1. Complexes modèles

À titre d'exemples, je présente ci-dessous les complexes obtenus par interaction de l'ion fer(II) avec trois ligands synthétiques de denticité croissante.

1) Ligand bidenté

Le schéma de complexation ci-dessous permet d'illustrer l'effet stabilisateur du ligand bidenté éthylènediamine (en) sur l'ion $Fe^{2+}$ [2] :

$$[(H_2O)_6{+}Fe^{II}]^{2+} + en = [(en)(H_2O)_4{+}Fe^{II}]^{2+} + 2H_2O \qquad (K_1 = 10^{4.3})$$

$$[(en)(H_2O)_4{+}Fe^{II}]^{2+} + en = [(en)_2(H_2O)_2{+}Fe^{II}]^{2+} + 2H_2O \qquad (K_2 = 10^{3.3})$$

$$[(en)_2(H_2O)_2{+}Fe^{II}]^{2+} + en = [(en)_3{+}Fe^{II}]^{2+} + 2H_2O \qquad (K_3 = 10^{2})$$

Comme représenté en **Figure 2**, la réaction de substitution du cation fer hexaaqua par trois équivalents d'éthylènediamine est quasi-complète, ce qui se traduit par une constante de formation très élevée du complexe hexasubstitué $[(en)_3{+}Fe^{II}]^{2+}$ ($\beta_3 = 10^{9.6}$). La concentration en fer libre $[(H_2O)_6{+}Fe^{II}]^{2+}$ à l'équilibre étant suffisamment basse pour prévenir la formation des produits d'hydrolyse quasi-insolubles $Fe(OH)_2$ et $Fe(OH)_3$, le fer(II) reste parfaitement solubilisé au-delà de pH 7 sous forme du complexe $[(en)_3{+}Fe^{II}]^{2+}$.

On observe que chacune des trois molécules d'éthylènediamine forme un cycle chélate à cinq chainons, pinçant le fer grâce à deux liaisons coordinantes.

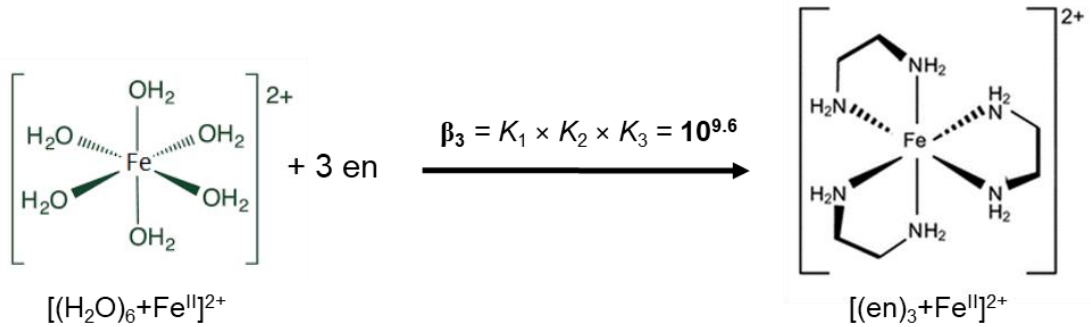



**Figure 2.** Formation du complexe $[(en)_3{+}Fe^{II}]^{2+}$ par complexation de trois molécules d'éthylènediamine (en) avec un ion ferreux $Fe^{2+}$.

2) Ligand tridenté

Dans le cas du ligand terpyridine, on obtient un complexe très stable ($\beta_2 = 10^{20.4}$ [5]) dans lequel le fer est fermement retenu par l'intermédiaire de quatre cycles chélate à cinq chainons (**Figure 3**).

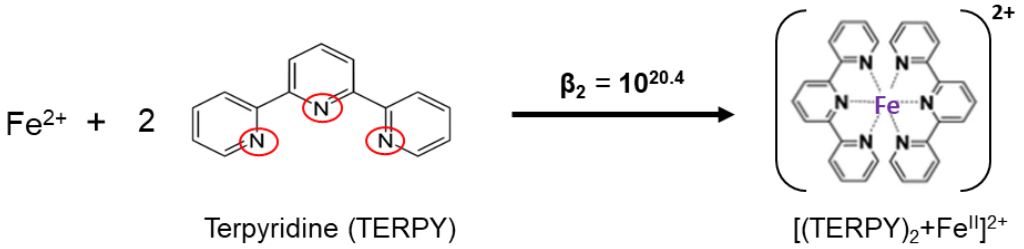



**Figure 3.** Formation du complexe $[(TERPY)_2+Fe^{II}]^{2+}$ par complexation de deux molécules de terpyridine (TERPY) avec un ion ferreux $Fe^{2+}$.

3) Ligand hexadenté

L'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) possède deux amines tertiaires et quatre groupes acide carboxylique, lui permettant de lier fortement les cations métalliques de façon hexadentate. Dans le cas du fer, une molécule d'eau vient compléter la sphère de coordination, ce qui conduit à un complexe heptacoordiné comme montré en **Figure 4**. La grande stabilité du complexe $[(EDTA\text{-}4H)(H_2O)+Fe^{II}]^{2-}$ ($K_f = \beta = 10^{14.3}$) [6] s'explique par la formation de cinq cycles chélate à cinq chainons à partir d'un même ligand. Il est à noter que la complexation de l'EDTA avec l'ion $Fe^{3+}$ conduit à une entité encore plus stable de formule $[(EDTA\text{-}4H)(H_2O)+Fe^{III}]^{-}$ ($K_f = \beta = 10^{25.1}$) [7].

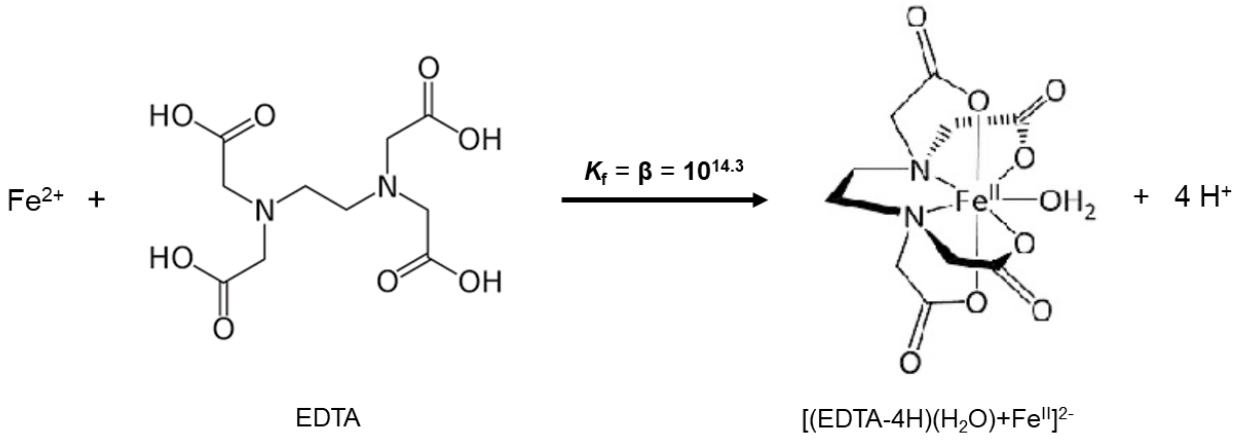



**Figure 4.** Formation du complexe $[(EDTA\text{-}4H)(H_2O)+Fe^{II}]^{2-}$ par complexation d'une molécule d'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) avec un ion ferreux $Fe^{2+}$.

### 1.3.2. Complexes biologiques forts

Nous mentionnons ici trois exemples de complexes de fer extrêmement stables empruntés au monde du vivant. Il peut s'agir de ferroprotéines dont la fonction biologique repose sur la présence de l'élément fer, ou bien encore de composés de petite taille dont le rôle est de piéger le fer à des fins nutritives.

1) Hémoglobine

Le premier exemple concerne l'hémoglobine, une ferroprotéine héminique qui assure le transport de l'oxygène au sein des globules rouges ou érythrocytes. Son site actif est porté par l'hème, structure aromatique constituée d'une protoporphyrine (IX) complexée au fer(II) par quatre atomes d'azote pyrroliques selon une géométrie plane carrée (**Figure 5A**). Comme observé sur la **Figure 5B**, les 2 sites de coordination vacants sur le métal permettent la fixation coaxiale d'un résidu histidine de la protéine et d'une molécule de dioxygène.

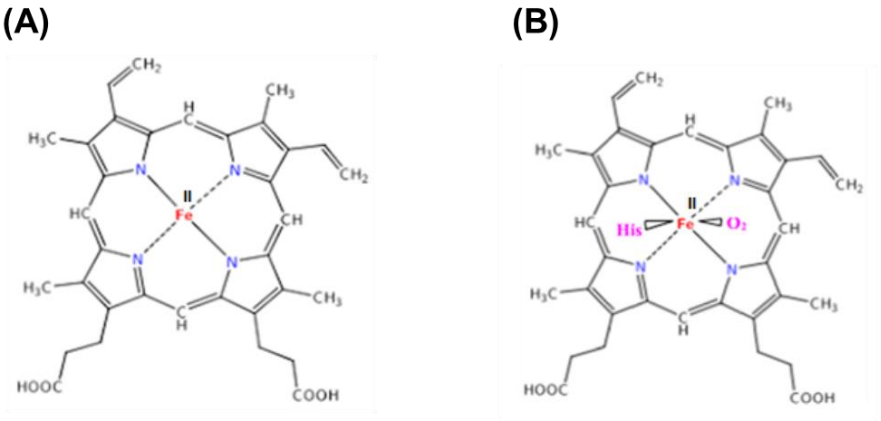



**Figure 5.** Structures **(A)** plane carrée et **(B)** octaédrique de l'hème.

2) Ferrédoxine

La ferrédoxine illustre, quant à elle, le fonctionnement des protéines fer-soufre impliquées dans de nombreuses réactions de transferts d'électrons des métabolismes cellulaires végétaux et bactériens [8]. Comme montré en **Figure 6**, elle contient un groupement [2Fe-2S] composé de deux atomes de fer reliés par deux atomes de soufre inorganique et coordinés chacun à deux résidus cystéine. L'activité oxydo-réductrice de la ferrédoxine provient de ses cations « fer » qui peuvent osciller entre les deux états d'oxydation II et III. Ainsi, elle incorpore deux fer(III) sous sa forme oxydée (**Figure 6B**) et un fer(II) associé à un fer(III) sous ses deux formes réduites (**Figures 6A et 6C**).

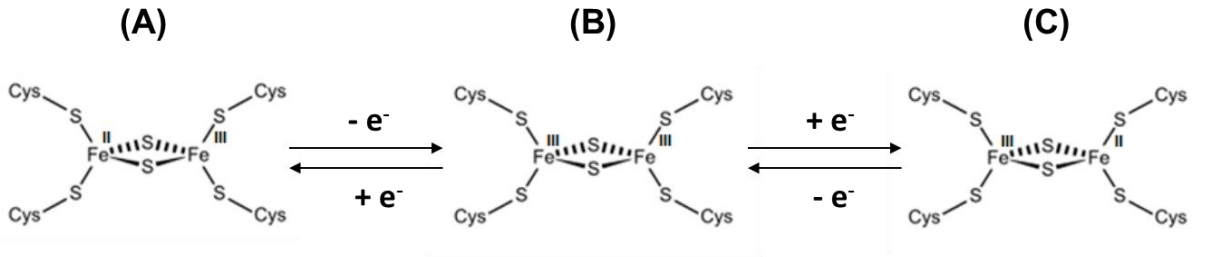



**Figure 6.** Cluster [2Fe-2S] de la ferrédoxine **(A)** sous sa première forme réduite avec un cation $Fe^{2+}$ et un cation $Fe^{3+}$, **(B)** sous sa forme oxydée avec deux cations $Fe^{3+}$et **(C)** sous sa deuxième forme réduite avec un cation $Fe^{3+}$ et un cation $Fe^{2+}$.

3) Complexe fer(III)-desferrioxamine

Dans le cas de la desferrioxamine (DFO), sidérophore dont le rôle est de puiser le fer ferrique dans l'environnement pour alimenter la bactérie, le cation $Fe^{3+}$ est séquestré par l'intermédiaire de trois fonctions hydroxamates (R–CO–NH–OH) impliquant six atomes d'oxygène (**Figure 7**). Le fer est finalement libéré dans le cytoplasme bactérien par des mécanismes spécifiques mettant en jeu, soit une réduction enzymatique du fer(III) en fer(II), soit une compétition avec une espèce fortement chélatrice [9].

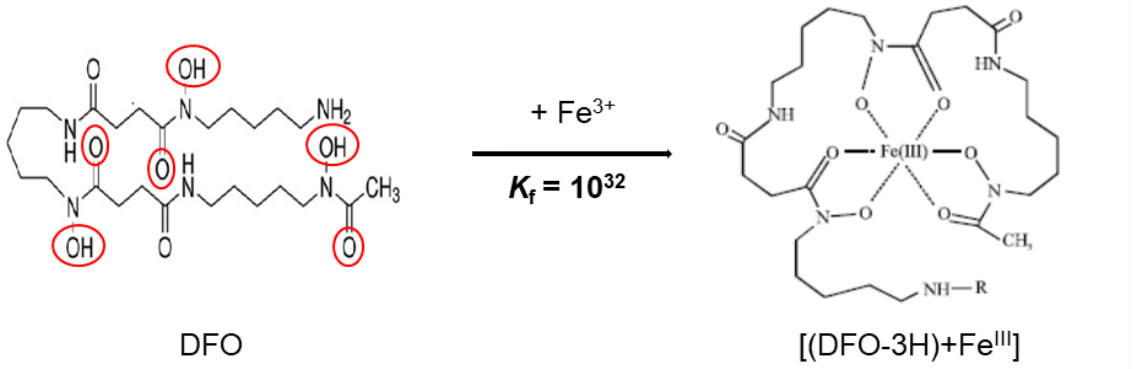



**Figure 7.** Complexation de l'ion ferrique $Fe^{3+}$ par la desferrioxamine (DFO) donnant lieu au complexe [(DFO-3H)+$Fe^{III}$] [10].

### 1.3.3. Complexes biologiques faibles

Des complexes de fer de moindre stabilité par rapport à ceux précédemment cités ont aussi des rôles physiologiques importants. Leur intérêt principal consiste à assurer la solubilité intracellulaire du fer sous une forme faiblement liée, reconnue comme la forme biologique du fer libre. L'aspect fonctionnel de ces espèces sera détaillé dans le paragraphe suivant, consacré au métabolisme du fer.

De manière générale, les composés susceptibles de former un complexe faible sont de petite taille et peuvent comporter un ou plusieurs groupes de type acide carboxylique, phosphate ou amine. Le complexe résultant est soit un simple sel dans le cas d'un ligand monodenté (un seul

groupe coordinant), soit un chélate avec un ou plusieurs cycles stabilisateurs dans le cas d'un ligand multidenté (au moins deux groupes coordinants).

1) Complexe fer(III)-acétate

À titre d'exemple, nous présentons la forme complexée obtenue par ajout du ligand acétate monodenté dans un environnement ferrique (**Figure 8**). Le complexe organique $[(OAc)+Fe^{III}]^{2+}$ présente une stabilité moyenne, comme l'indique sa constante de formation ($K_1 = 10^{3.38}$).

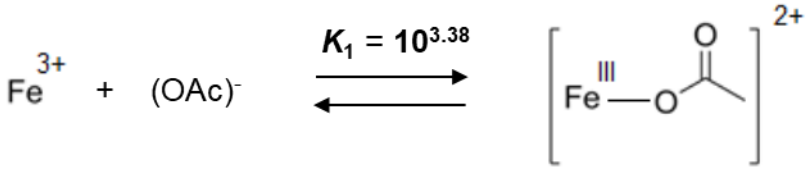



**Figure 8.** Schéma de complexation de l'ion ferrique $Fe^{3+}$ en présence du ligand acétate $(OAc)^-$, avec la formation du complexe de fer trivalent $[(OAc)+Fe^{III}]^{2+}$ [11].

Une simulation de la composition d'une solution ferrique en présence d'un net excès d'acide acétique (**Figure 9**) permet de constater la solubilité du complexe $[(OAc)+Fe^{III}]^{2+}$ jusqu'à pH 6.

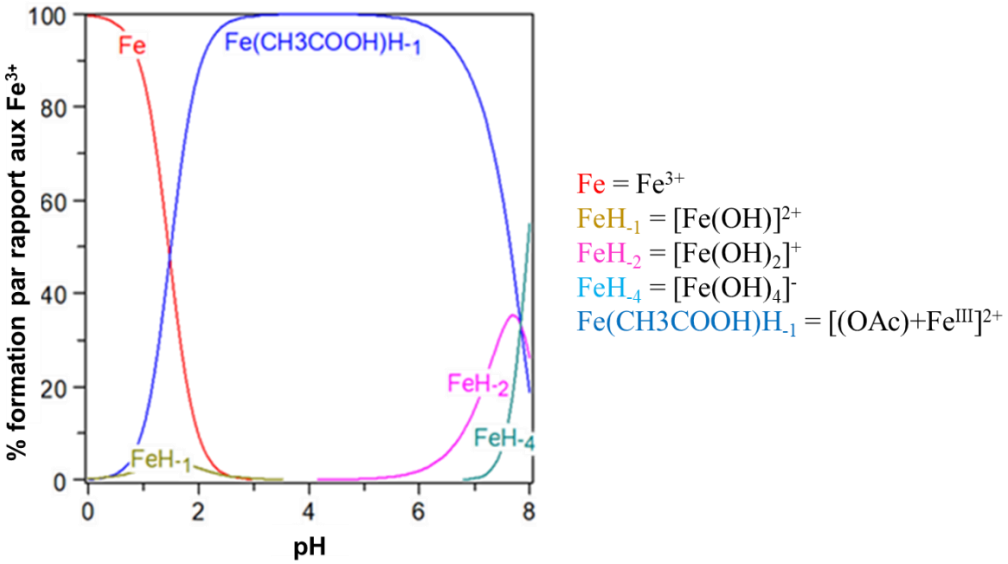



**Figure 9.** Simulation de la composition d'une solution ferrique ($[Fe^{3+}] = 6.7$ mM) en présence de trois équivalents d'acide acétique (20 mM), basée sur les valeurs log$K_f$ du complexe fer-acétate et des hydroxydes de fer (logiciel « HySS2009 »).

Dans certaines conditions, l'acétate ferrique donne lieu en solution à l'acétate de fer basique (**Figure 10A**) qui s'organise selon la structure cristalline $[Fe_3O(OAc)_6(H_2O)_3]^+$ (**Figure 10B**). Au sein de cet arrangement trimétallique, chaque acétate se lie à deux cations de fer, ce qui aboutit à la formation de 6 cycles chélate à six chainons.

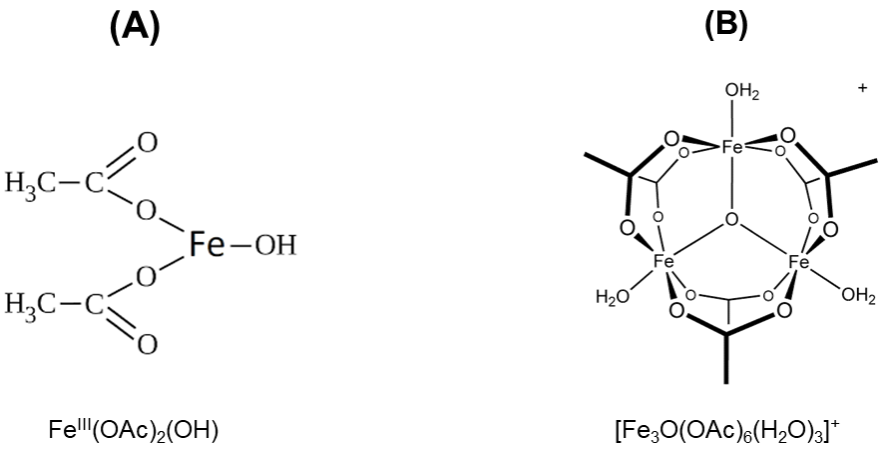



**Figure 10.** Acétate de fer basique **(A)** sous sa forme simple et **(B)** sous sa forme cristalline trimétallique.

2) Complexes fer(II)-acétate

Par analogie à ce qui vient d'être détaillé en milieu ferrique, je présente ci-dessous la forme complexée obtenue par ajout du même ligand acétate dans un environnement ferreux (**Figure 11**). Le complexe monosubstitué $[(OAc)+Fe^{II}]^+$ présente une stabilité faible, d'après sa valeur de constante de formation ($K_1 = 10^{1.4}$).

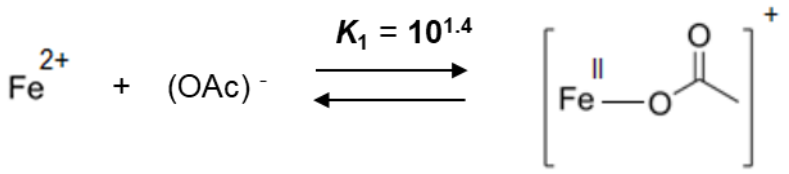



**Figure 11.** Schéma de complexation de l'ion ferreux $Fe^{2+}$ en présence du ligand acétate, avec la formation du complexe de fer divalent $[(OAc)+Fe^{II}]^+$.

Nous pouvons conclure de cette partie que le fer – élément pratiquement insoluble à l'état libre – est utilisé sous forme complexée par les organismes vivants. Par ailleurs, la fonction biologique associée à un complexe de fer est étroitement liée à sa stabilité, au degré d'oxydation du métal (fixe ou fluctuant) ainsi qu'à la nature du (ou des) ligand(s) mis en jeu.

## 2. Le métabolisme du fer

Les fonctions vitales du corps humain, comme la respiration par exemple, reposent sur des systèmes biochimiques complexes. Pour en assurer un déroulement optimal, l'organisme veille à maintenir un certain nombre de grandeurs physiologiques à l'équilibre, selon le principe de l'homéostasie (terme créé par le médecin et physiologiste Claude Bernard vers 1860).

Il se trouve que le fer est impliqué dans de nombreux processus biochimiques majeurs. À ce titre, il est important de comprendre son métabolisme pour espérer prévenir et soigner les troubles liés à un dérèglement de l'homéostasie martiale.

Nous présentons ici les principaux éléments de façon résumée et simplifiée. La revue largement citée *Omar et al.*, 2006 [12] et la thèse de pharmacie réalisée par Moussa en 2013 [13] ont servi de documents de référence sur le sujet.

### 2.1. Généralités

Le fer est un oligoélément essentiel dont la concentration massique chez un individu en bonne santé avoisine 50 mg par kilogramme, ce qui correspond à une quantité totale d'environ 4 g pour un homme de 75 kg.

Cofacteur de nombreuses protéines fonctionnelles, le fer joue un rôle primordial dans le transport d'oxygène, le transfert d'électrons, la catalyse enzymatique, la synthèse d'ADN ainsi que la division et la prolifération cellulaire. À travers ces actions, il est notamment fortement impliqué dans les mécanismes respiratoires et dans la physiologie du système nerveux. Par ailleurs, il intervient dans d'autres domaines importants comme l'élaboration des fonctions cognitives, la réponse immunitaire anti-infectieuse, la régulation de la température interne ou encore la tolérance de l'organisme à l'effort.

Afin de mieux appréhender le métabolisme du fer, des études approfondies ont été menées ces deux dernières décennies sur des modèles animaux et humains. Celles-ci ont montré que l'homéostasie martiale reposait sur un ensemble de mécanismes complexes impliquant différents types d'acteurs moléculaires [12].

Les pertes quotidiennes de fer (1 à 2 mg) liées principalement aux sécrétions et aux desquamations [14] sont directement compensées par l'alimentation avec une absorption préférentielle au niveau du duodénum [15], le premier segment de l'intestin grêle. Le fer héminique ($Fe^{II}$) présent dans les produits carnés est facilement absorbable (10 à 30%), tandis que la forme minérale $Fe^{III}$ non héminique (présente dans les céréales, légumes verts, légumineuses, œufs, produits laitiers) l'est beaucoup moins (1 à 5%) [13].

Comme observé en **Figure 12**, le fer est en circulation permanente entre plusieurs sites identifiés de l'organisme. La grande majorité du fer fonctionnel provient du fer de stockage et il est véhiculé aux différents sites par le plasma. Le métabolisme martial est caractérisé par un recyclage permanent à travers des échanges entre les tissus utilisateurs (moelle osseuse pour la synthèse des érythrocytes) et les organes de réserve (foie, macrophages de la moelle osseuse et de la rate) grâce au fer circulant, ce qui occasionne un turnover quotidien situé entre 20 et 25 mg [12]. Son élimination n'étant pas régulée, l'homéostasie du fer repose sur un contrôle strict de son absorption intestinale et de son recyclage après dégradation des érythrocytes sénescents par les macrophages du système réticulo-endothélial.

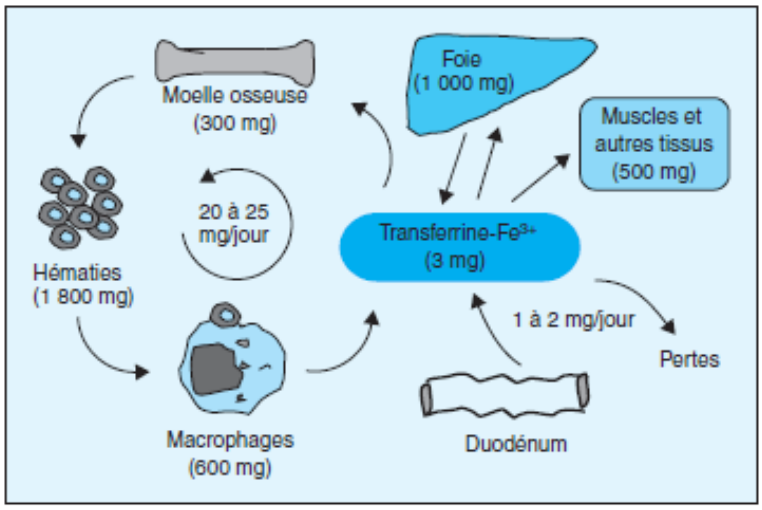



**Figure 12.** Mouvements du fer entre les différents compartiments de l'organisme [12].

## 2.2. Répartition du fer dans l'organisme

Au sein du corps humain, le fer est rencontré aux états d'oxydation II et III, associé à des protéines spécifiques sous forme de complexes stables lui conférant solubilité et disponibilité (cf. **Étude bibliographique, I.1.3.2**). En captant durablement le métal, ces systèmes protéiques préviennent par là-même toute action pro-radicalaire du fer, toxique sous sa forme libre. Dans la suite, j'utiliserai le terme anglais « pool » pour dénommer les différents regroupements de fer identifiés dans l'organisme.

### 2.2.1. Pool de fer(II) fonctionnel

Le fer(II), qui représente 65% du pool de fer total, est majoritairement lié à des protéines héminiques (cf. **Étude bibliographique, I.1.3.2**, **Figure 5**). Il constitue sous cette forme la fraction principale du fer fonctionnel avec l'hémoglobine des érythrocytes jeunes et circulants (60%), la myoglobine des muscles squelettiques (5%) et les enzymes respiratoires (cytochrome-oxydases, oxygénases, peroxydases, etc.). L'hémoglobine et la myoglobine possèdent des structures similaires et emploient le fer pour la fixation du dioxygène. Les enzymes de la chaine respiratoire, quant à elles, l'utilisent pour son activité redox.

### 2.2.2. Pool de fer(III) de stockage

Le fer(III) est associé à des protéines non-héminiques et représente les 35% restants du pool de fer global. Il est surtout utilisé comme fer de réserve au sein de la ferritine et de l'hémosidérine, toutes deux localisées dans les hépatocytes et les macrophages du système réticulo-endothélial. La ferritine cytoplasmique est une protéine multimérique soluble (430-460 kDa) capable de stocker une grande quantité de fer (jusqu'à 4500 atomes) sous une forme minérale facilement mobilisable (cristaux de ferrihydrite métastables $5Fe_2O_3 \cdot 9H_2O$) [16]. En cas de surcharge martiale, les molécules de ferritine sont partiellement dégradées et forment alors un composé amorphe insoluble, l'hémosidérine.

Par ailleurs, une très faible fraction du fer(III) (0.1%) est liée à l'apotransferrine (une glycoprotéine de 80 kDa) pour constituer la forme principale du fer circulant ou plasmatique, la transferrine. Cette dernière peut être monoferrique ou diferrique et seulement un tiers des sites de fixation sont occupés en conditions physiologiques.

### 2.2.3. Pool de fer fonctionnel fer(II) ↔ fer(III)

Si la majeure partie du fer fonctionnel est de nature héminique, diverses protéines contenant un complexe fer-soufre sont également impliquées dans la machinerie cellulaire (cf. **Étude bibliographique, I.1.3.2**). Grâce aux atomes de fer oscillant entre les états d'oxydation II et III, ces protéines interviennent comme transporteurs d'électrons dans la chaine respiratoire mitochondriale (NADH déshydrogénase, succinate déshydrogénase, etc.) ou comme enzymes pour la synthèse de l'ADN et des collagènes.

### 2.2.4. Pool de fer labile fer(II) + fer(III)

En marge des formes précédemment citées, une infime fraction du fer total n'est pas liée à des systèmes protéiques et correspond à la forme biologique du fer libre (cf. **Étude bibliographique, I.1.3.3**).

1) Pool de fer labile intracellulaire (LIP)

Le pool de fer labile dit LIP (Labile Iron Pool) est localisé dans le cytoplasme des cellules non érythroïdes. Il représente 5% du fer intracellulaire (100 nM à 1 µM selon les cellules) et sert de réserve transitoire au carrefour des diverses voies métaboliques (**Figure 13**). Même si sa nature biochimique complexe n'est pas complètement élucidée [17], le LIP serait composé d'un mélange des deux formes ioniques $Fe^{2+}$ et $Fe^{3+}$ faiblement liées à des composés de bas poids moléculaires (anions organiques citrates-phosphates-carboxylates, polypeptides, composés de surface des membranes, nucléotides, acides aminés, oses...) [18] [19] [20] [21]. De par sa nature, ce pool de fer montre une activité redox similaire à celle des cations libres et entraine la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) potentiellement nocives. Dans des conditions de production contrôlée, les ROS jouent toutefois un rôle bénéfique pour la cellule en intervenant comme activateurs/régulateurs dans de nombreuses voies de signalisation [22].

2) Fer labile plasmatique ou fer non lié à la transferrine (LPI ou NTBI)

Une infime proportion du fer circulant dite NTBI (Non Transferrin Bound Iron) ou LPI (Labile Plasma Iron), dont la composition exacte fait toujours débat, serait également constituée des deux formes ioniques $Fe^{2+}$ et $Fe^{3+}$ associées à des anions de type citrate, acétate, ADP [12] [14] [23]. À l'image de la fraction LIP, cette fraction est également susceptible de former des ROS, au niveau plasmatique dans ce cas. Par ailleurs, elle a la particularité de pénétrer dans les cellules sans aucun mécanisme de régulation, contrairement à la majorité du fer plasmatique transporté par la transferrine (**Figure 13**).

Un récapitulatif des différentes formes de fer du corps humain est présenté ci-dessous (**Tableau 2**).

**Tableau 2.** Distribution du fer dans l'organisme et perte physiologique quotidienne [13] [24].

| Formes du fer | Degré d'oxydation | Quantité en mg (pour un homme de 75 kg) | Quantité en mg/kg | % fer total |
|---|---|---|---|---|
| **Fer fonctionnel** | | **2800** | **37** | **74** |
| Hémoglobine | **II** | 2300 | 31 | 62 |
| Myoglobine | **II** | 320 | 4 | 8 |
| Enzymes héminiques | **II** | 80 | 1 | 2 |
| Enzymes non héméniques | **II ↔ III** | 100 | 1 | 2 |
| **Fer de stockage** | | **1000** | **13** | **26** |
| Ferritine | **III** | 700 | 9 | 18 |
| Hémosidérine | **III** | 300 | 4 | 8 |
| **Fer de transport** | | **4** | **0.05** | **0.1** |
| Transferrine | **III** | 4 | 0.05 | 0.1 |
| Fer labile non lié à la transferrine (NTBI/LPI) | **II + III** | Nd | | 0.0 |
| **Pool de fer labile (LIP)** | **II + III** | **Nd** | | **0.0** |
| **TOTAL FER** | | **3800** | **50** | **100** |

| | |
|---|---|
| **Perte quotidienne en fer** | **1-2** * |
| Desquamations intestinale et cutanée | < 1 |
| Pertes urinaires | < 1 |
| Sécrétions biliaires | < 1 |
| Sudation | < 1 |

* perte physiologique équivalent à 0.02-0.05 % du fer total

## 2.3. Les acteurs du métabolisme martial

La **Figure 13** illustre toute la complexité de cette machinerie cellulaire à laquelle contribuent de nombreux effecteurs biologiques [12]. Les entrée et sortie des différentes formes de fer s'effectuent grâce à des récepteurs/transporteurs transmembranaires, des enzymes chargées d'oxyder ou de réduire le fer (si nécessaire) et des facteurs de régulation.

L'absorption digestive de la forme minérale $Fe^{III}$ se fait par le récepteur DMT1 alors que la forme héminique $Fe^{II}$ passe par le récepteur HCP1 (après élimination des parties apoprotéiques de la myoglobine et de l'hémoglobine dans l'estomac).

Par ailleurs, la cellule met tout en œuvre pour que le pool de fer labile intracellulaire se trouve majoritairement sous une forme ferreuse soluble. En effet, hormis pour la forme NTBI non régulée, l'intégralité du fer ferrique importé est réduit en fer ferreux par des enzymes spécifiques (Dcytb pour la forme $Fe^{III}$ ingérée, Cytbrd1 pour la forme $Fe^{III}$ plasmatique).

La mitochondrie est le lieu de synthèse principal du fer fonctionnel avec les hèmes et les groupements fer-soufre 2Fe-2S / 4Fe-4S (pour la synthèse mitochondriale ou cytosolique des protéines Fe-S). Celle-ci comporte également sa propre réserve de fer sous une forme voisine à la ferritine cytosolique, appelée la « m-ferritine ».

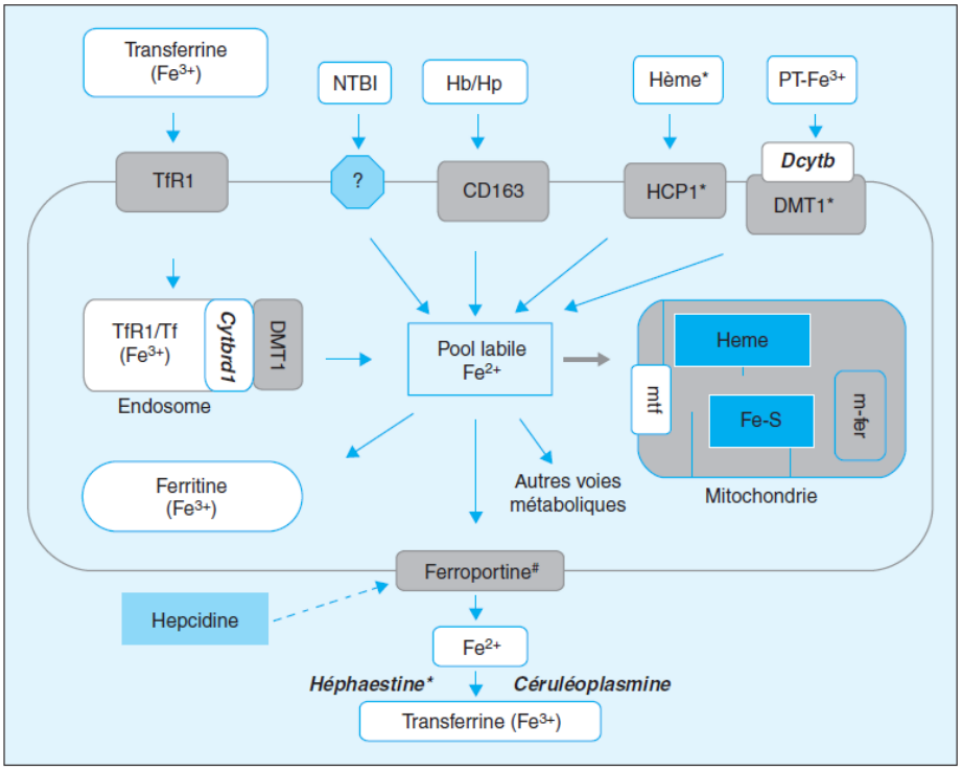



**Figure 13.** Captation, trafic intracellulaire et exportation du fer [12]. Vision composite rendant compte à la fois du fonctionnement des entérocytes (cellules du duodénum impliquées dans l'absorption intestinale), des macrophages (cellules du système réticulo-endothélial impliquées dans le stockage et le recyclage), des hépatocytes (cellules du foie impliquées dans le stockage) et des érythroblastes (cellules sanguines impliquées dans la synthèse de l'hémoglobine). * : au niveau de l'entérocyte ; # : au niveau de l'entérocyte et du macrophage.

### 2.4. Mécanismes de régulation

Le métabolisme du fer ne dispose pas d'un système de régulation intégré pour rééquilibrer le taux de fer à la demande. Par exemple, l'organisme n'est pas à même d'adapter l'élimination physiologique en cas de forte surcharge.

L'homéostasie du fer n'est possible que par une gestion très précise de chacune des étapes de son métabolisme, à savoir son absorption intestinale, son utilisation pour la production des globules rouges (érythropoïèse), son recyclage et son stockage. Le contrôle d'un point clé du métabolisme peut être réalisé par une chaine de transmission comportant (i) l'émission d'un signal renseignant le taux de fer, (ii) l'interprétation de ce signal par un facteur de régulation et enfin (iii) la régulation de la protéine concernée.

De tels mécanismes ont été proposés, agissant aussi bien sur l'absorption digestive, les entrée/sortie cellulaires que le stockage. Ceux-ci sont décrits ci-après :

### 2.4.1. Mécanisme de régulation de la crypte (HFE)

Un premier mécanisme de régulation, appelé modèle de la crypte, met en jeu une glycoprotéine appelée HFE. Au niveau des entérocytes matures de la crypte duodénale, la molécule HFE favorise l'entrée intracellulaire du fer plasmatique par action sur le récepteur à transferrine TfR1 (**Figure 13**). En cas de signal « érythro-dépendant », l'interaction HFE/TfR1 est abaissée, induisant une diminution de l'entrée de fer circulant. En réponse à ce déficit artificiel, l'entérocyte adopte un comportement d'hyperabsorption en stimulant à la fois l'entrée digestive du fer minéral (*via* le transporteur DMT1) et la sortie extracellulaire (*via* la ferroportine). Dans ces conditions, une forte quantité de fer est donc fournie aux cellules utilisatrices de l'organisme. En cas de signal « stock-dépendant », le processus est inversé et conduit à l'augmentation du pool labile et au stockage dans la ferritine. Le temps de maturation des entérocytes étant limitant, le modèle de la crypte ne permet cependant pas d'expliquer les mécanismes de régulation à court terme. Depuis la découverte de l'hepcidine, le rôle de la molécule HFE a été étudié sous un autre jour, remettant en question le modèle de la crypte.

### 2.4.2. Mécanisme de régulation par l'hepcidine

Un deuxième modèle bien plus prometteur est justement basé sur l'hepcidine, une hormone peptidique synthétisée dans le foie [12] [13]. Véhiculée par le plasma, elle diminue l'absorption digestive et la sortie macrophagique par inhibition de la ferroportine, un transporteur membranaire chargé de l'exportation cellulaire (**Figure 13**). En cas d'excès de fer alimentaire, une surexpression de l'hepcidine évite ainsi une surcharge dans l'organisme. Inversement, en déficit d'hepcidine, le nombre de ferroportine augmente afin de faire remonter le taux de fer circulant. De nombreux travaux suggèrent que l'hepcidine est au cœur d'un système complexe impliquant d'autres molécules. Ainsi, son expression et sa libération hépatiques dépendraient notamment de la protéine HFE, laissant supposer un mode d'action synergique des deux molécules hepcidine et HFE.

### 2.4.3. Mécanisme de régulation IRP-IRE

Un troisième mécanisme repose sur une régulation post-transcriptionnelle de type IRP/IRE, *via* des protéines fer-soufre dites IRP (Iron Regulatory Protein) [12] [13]. Lorsque le pool labile intracellulaire est bas, les IRP perdent le fer de leur cluster et se fixent alors sur des séquences nucléotidiques non codantes IRE (Iron Responsive Element) des ARNm de la ferritine et du récepteur membranaire de la transferrine (TfR1). Cela déclenche des effets opposés sur l'expression de ces deux protéines, celle de la ferritine étant inhibée et celle de la TfR1 stimulée. Cette configuration, synonyme de moindre stockage et de rentrée intracellulaire accentuée, permet d'augmenter le niveau de fer dans la cellule. À l'inverse, lorsque le LIP est élevé, les IRP conservent intact leur cluster fer-soufre et ne peuvent donc pas se lier aux deux ARNm. Cette deuxième configuration aboutit par effet inverse à une diminution du fer intracellulaire, permettant d'éviter les effets néfastes d'une surcharge [12]. Le LIP joue donc ici un rôle bénéfique de signalisation permettant de maintenir la concentration de fer cellulaire à un niveau

adéquat. Par ailleurs, ce système de régulation IRP/IRE est assez généralisé puisqu'il intervient sur l'entrée cellulaire (TfR1, DMT1), la sortie cellulaire (ferroportine) et l'incorporation héminique.

#### 2.4.4. Mécanisme par hypoxie (dioxygène)

Enfin, certains acteurs moléculaires sont régulés non pas sur le niveau de fer mais sur le degré d'hypoxie, c'est à dire l'inadéquation entre les besoins et les apports en oxygène. C'est le cas du récepteur HCP1 qui intervient dans l'absorption digestive du fer héminique.

Étant donné la complexité du métabolisme martial, le risque d'anomalies entrainant un dérèglement de l'homéostasie est élevé. Les états de déficit ou de surcharge consécutifs à ces dysfonctionnements sont à l'origine de pathologies plus ou moins graves qui touchent des millions de personnes dans le monde.

### 2.5. Anomalies du métabolisme martial

Les anomalies du métabolisme martial sont abordées de façon détaillée en **Annexe 1**. J'en résume ici les principaux aspects.

#### 2.5.1. Carence en fer

Différentes situations sont susceptibles d'engendrer une carence martiale, aboutissant au final à l'anémie ferriprive.

Les traitements actuels consistent à réaliser des transfusions sanguines (en cas de forte anémie) ou des administrations orales de sels ferreux (dans les autres cas).

Les thérapies d'avenir misent sur la régulation de l'homéostasie martiale à l'aide de molécules clés du métabolisme comme l'hepcidine, mais également sur des supplémentations orales à l'aide de chélates pour améliorer la biodisponibilité du fer (par comparaison au traitement traditionnel par ingestion de sels ferreux).

#### 2.5.2. Surcharge en fer

Une surcharge en fer systémique se produit en cas de maladie génétique (hémochromatose dite primitive) ou de complication consécutive à une anémie (hémochromatose dite secondaire).

Un excès de fer non contrôlé dans l'organisme induit une augmentation du pool de fer labile intracellulaire et *in fine* la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (**Figure 14**). La forme ferreuse – prooxydante – est directement impliquée par son rôle catalytique dans la chaine réactionnelle conduisant au radical hydroxyle HO• (ROS la plus nocive). La forme

ferrique est également impliquée car elle régénère, de manière cyclique, la forme ferreuse (par intervention d'espèces réductrices). Sans prise en charge thérapeutique, cette situation aboutit à un stress oxydant durable responsable de désordres cellulaires graves tels que des cancers ou des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives.

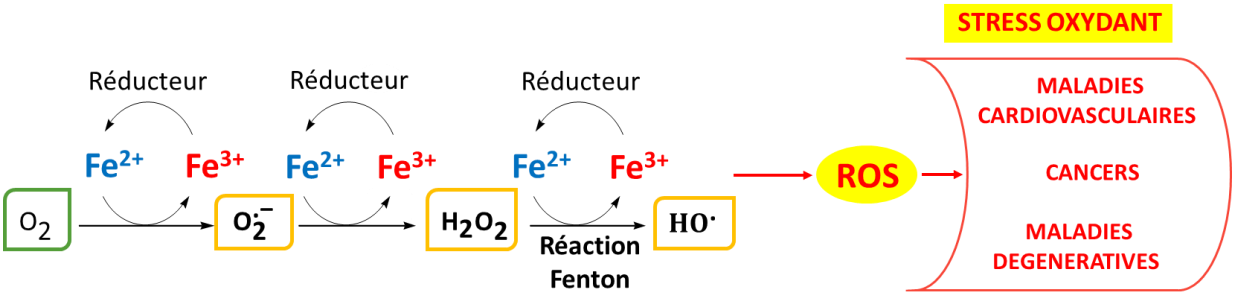



**Figure 14.** Surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en présence d'un excès de fer intracellulaire et conséquences indésirables du stress oxydant.

Les traitements actuels consistent à réaliser des saignées (en cas d'hémochromatose primitive, *i.e.* pour les patients ne souffrant pas d'anémie) ou des injections parentérales de chélateurs afin d'éliminer l'excès de fer ferrique circulant.

Les thérapies d'avenir misent à la fois sur la régulation de l'homéostasie martiale (en lien avec le rôle clé de l'hepcidine) et sur des stratégies innovantes par chélation. Cette seconde approche consisterait à utiliser des chélateurs efficaces par voie orale pour (i) éliminer l'excès ferrique plasmatique et (ii) lutter contre le stress oxydant en séquestrant les formes du fer libre intracellulaire ($Fe^{II}$ et $Fe^{III}$).

## 3. Conclusion

Le métabolisme du fer met en jeu de nombreux processus imbriqués, de son absorption intestinale jusqu'à son incorporation au sein des différents systèmes protéiques fonctionnels. Il fait intervenir de multiples effecteurs chargés de faire transiter le fer entre les différents organes et les différents pools (stockage, transport, fonctionnel) en fonction des besoins de l'organisme.

L'équilibre du fer est très fragile car il repose sur la régulation fine de chacune des étapes de son métabolisme, grâce à des mécanismes complexes qui ne sont pas totalement élucidés à ce jour. En cas d'anomalie, l'homéostasie martiale peut être perturbée et faire basculer l'organisme vers des états de déficience ou de surcharge en fer, occasionnant alors des affections plus ou moins graves (anémie ferriprive et hémochromatose, respectivement).

Face à ces situations, les traitements thérapeutiques actuels sont limités. Dans le cas d'une carence martiale, l'administration de sels ferreux se révèle peu efficace du fait de leur faible biodisponibilité. En cas de surcharge, l'élimination de l'excès de fer circulant avec la desferrioxamine est un traitement éprouvé mais qui reste compliqué dans sa mise en œuvre et contraignant pour le patient.

Afin d'améliorer la prise en charge de ces différentes pathologies, la recherche clinique investit dans deux types de stratégies : (i) la première vise à contrôler le métabolisme martial en ciblant des molécules clés comme l'hepcidine, (ii) la seconde cherche à exploiter les propriétés fonctionnelles de nouvelles molécules chélatrices du fer.

La stratégie par chélation a notamment comme objectifs principaux :

▪ en cas de carence martiale, (i) d'améliorer l'absorption digestive du fer minéral grâce à des composés complexants du fer(III) et (ii) de proposer des supplémentations *per os* de plus grande efficacité que les solutions actuelles grâce à des chélates de fer ;

▪ en cas de surcharge en fer, de lutter contre le stress oxydant en neutralisant les formes ferreuses et ferriques du fer labile intracellulaire, toutes deux impliquées comme couple redox dans la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Dans ce cadre, il apparait donc important de disposer de nouvelles molécules actives, capables de chélater spécifiquement le fer, sous ses états d'oxydation II et/ou III.

# Chapitre II : les peptides chélateurs de métaux

Les secteurs de la santé, de la nutrition et des cosmétiques ont un besoin croissant en nouvelles molécules actives afin de répondre aux grands enjeux scientifiques et sociétaux.

Dans ce contexte, les peptides bioactifs issus des hydrolysats protéiques constituent une source importante d'activités originales, parmi lesquelles la propriété de chélater les métaux.

Dans un premier paragraphe, je décrirai la nature de l'interaction métal-peptide et les techniques d'étude des complexes en solution. Je détaillerai ensuite les applications potentielles des peptides chélateurs de métaux dans le secteur de la santé. Enfin, je ferai le point sur les peptides chélateurs du fer en distinguant la forme ferrique de la forme ferreuse.

## 1. Propriétés chélatrices des peptides

Certains peptides ont la capacité de complexer les métaux de transition tels que le cuivre, le zinc, le nickel ou encore le fer.

Un rappel de la structure générale des peptides, de leur comportement *in vivo* en tant que molécule active et de leurs modes de production est proposé en **Annexe 2**.

### 1.1. Nature de l'interaction métal-peptide

La théorie "Hard and Soft Acid Base" (HSAB), sous-jacente à la complexation métal-peptide, sera brièvement rappelée avant d'évoquer, dans un deuxième temps, les acides aminés et motifs peptidiques préférentiellement impliqués dans cette interaction.

#### 1.1.1. Théorie "Hard and Soft Acid Base"

Pearson propose, en 1968, d'appréhender une grande partie des phénomènes chimiques en leur appliquant le concept acide-base de Lewis (**Équation 1**) [25] :

$$A + : B \rightleftharpoons A : B$$

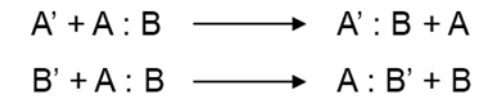
**Équation 1**

A = acide de Lewis (accepteur d'électrons)
B = base de Lewis (donneur d'électrons)

Selon cette vision générale, toute entité chimique – organique ou inorganique – est considérée comme un complexe A : B, résultant de l'interaction entre un acide de Lewis A (espèce ayant une orbitale vacante) et une base de Lewis B (espèce possédant un doublet électronique). Au sein du complexe A : B, l'espèce acide A porte donc une charge partielle négative ($\delta^-$) et l'espèce basique B une charge partielle positive ($\delta^+$).

Si l'on peut affirmer que l'association d'un acide fort et d'une base forte produit un complexe stable (et que, par comparaison, des acide et base plus faibles forment un complexe moins stable), il n'est cependant pas possible de prédire la stabilité d'un complexe quelconque A : B.

Afin d'accéder à ce niveau d'information, Pearson met à profit des réactions de compétition telles que celles indiquées ci-dessous (**Équations 2 et 3**) :




**Équation 2**

**Équation 3**

A = acide de Lewis 1 A' = acide de Lewis 2
B = base de Lewis 1 B' = base de Lewis 2

De ces deux équations, on peut conclure que (i) l'acide A' est plus fort que l'acide A (**Équation 2**), et que (ii) la base B' est plus forte que la base B (**Équation 3**).

En appliquant ce principe à un grand nombre d'espèces (grâce à des acides et bases de référence), Pearson a ainsi pu évaluer de manière expérimentale la force relative des acides de Lewis entre eux et celle des bases de Lewis entre elles.

Les résultats de ces tests – s'ils n'ont pas permis de prévoir la stabilité d'un complexe de façon quantitative – ont néanmoins conduit :

1) Au classement empirique des acides et bases de Lewis selon leur dureté, dans l'une des catégories suivantes : les acides (i) durs, (ii) intermédiaires et (iii) mous, et par analogie, les bases (i) dures, (ii) intermédiaires et (iii) molles (**Tableau 3**) ;

2) Et *in fine* aux principes de base de la théorie HSAB [26], prédisant que :

▪ Les acides durs forment des complexes plus stables avec les bases dures (liaison à fort caractère ionique) ;

▪ Les acides mous forment des complexes plus stables avec les bases molles (liaison à fort caractère covalent) ;

▪ Les acides intermédiaires forment des complexes *a priori* plus stables avec les bases intermédiaires (dans ce dernier cas, la formation de complexes de natures différentes n'est cependant pas exclue).

**Tableau 3.** Classification des acides et bases de Lewis selon la théorie HSAB (acide dur : haute charge positive, petite taille, électrons externes peu polarisables ; acide mou : basse charge positive, grande taille, électrons externes polarisables ; base dure : très électronégative, peu oxydable, peu polarisable, orbitales vides haute énergie ; base molle : peu électronégative, oxydable, polarisable, orbitales vides basse énergie) [27].

| | Acids | Bases |
|---|---|---|
| Hard | $H^+$, $Li^+$, $Na^+$, $K^+$, $Be^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Ca^{2+}$, $Cr^{2+}$, $Cr^{3+}$, $Al^{3+}$, $SO_3$, $BF_3$ | $F^-$, $OH^-$, $H_2O$, $NH_3$, $CO_3^{2-}$, $NO_3^-$, $O^{2-}$, $SO_4^{2-}$, $PO_4^{3-}$, $ClO_4^-$ |
| Borderline | $Fe^{2+}$, $Co^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Pb^{2+}$, $SO_2$, $BBr_3$ | $NO_2^-$, $SO_3^{2-}$, $Br^-$, $N_3^-$, $N_2$, $C_6H_5N$, $SCN^-$ |
| Soft | $Cu^+$, $Au^+$, $Ag^+$, $Tl^+$, $Hg_2^{2+}$, $Pd^{2+}$, $Cd^{2+}$, $Pt^{2+}$, $Hg^{2+}$, $BH_3$ | $H^-$, $R^-$, $CN^-$, CO, $I^-$, $SCN^-$, $R_3P$, $C_6H_5$, $R_2S$ |

### 1.1.2. Acides aminés

La formation d'une liaison de coordination métal-peptide requiert qu'un acide aminé, assimilé à une base de Lewis, partage un doublet électronique libre avec un cation métallique, assimilé à un acide de Lewis. Dans ce cas, le peptide est plus communément appelé un ligand [25].

1) Acides aminés complexants

Les acides aminés (AA) préférentiellement impliqués sont ceux qui possèdent dans leur chaîne latérale soit une fonction acide carboxylique (acide aspartique, acide glutamique), soit une fonction basique (lysine *via* l'amine, arginine *via* la guanidine, histidine *via* l'imidazole, tryptophane *via* l'indole), soit une fonction thiol (cystéine), ou bien encore une fonction hydroxyle (sérine, thréonine, tyrosine) (cf. **Annexe 2**, **Figure 3'**). En outre, les fonctions COOH et $NH_2$ terminales du peptide peuvent également être mobilisées.

2) Paramètres pH et p*K*a

L'efficacité de complexation est influencée par la valeur du pH en regard de la valeur du p*K*a du groupe donneur de l'AA considéré (**Tableau 4**). En effet, ce groupe doit être majoritairement déprotoné pour mobiliser efficacement son doublet électronique, ceci impliquant pH > p*K*a. Ainsi, à pH 2.5-3.0, seul le groupe COOH terminal est *a priori* suffisamment déprotoné pour créer une liaison coordinante. Cependant, en présence d'un métal, la déprotonation a souvent lieu à un pH bien en deçà de la valeur de p*K*a de l'AA, par substitution nucléophile. Dans ces conditions, l'imidazole ($pK_R$ = 6.0) peut ainsi se déprotoner à un pH relativement bas, selon la nature de l'ion métallique [28]. Pour cette même raison, les acides aminés Asp et Glu ($pK_R$ = 3.9 et 4.3, respectivement) (**Tableau 4**) parviennent à complexer le métal par leur fonction COOH dès pH 3.

**Tableau 4.** Valeurs p*K*a des acides aminés les plus impliqués dans la complexation des métaux ($K_{C\text{-term}}$ : constante d'acidité du groupe COOH terminal, $K_{N\text{-term}}$ : constante d'acidité du groupe $NH_2$ terminal, $K_R$ : constante d'acidité du groupe latéral) [29].

| Acide aminé | Code | p$K_{C\text{-term}}$ | p$K_{N\text{-term}}$ | p$K_{R\text{ (groupe latéral)}}$ |
|---|---|---|---|---|
| tyrosine | Tyr | 2.2 | 9.1 | 10.1 |
| sérine | Ser | 2.2 | 9.2 | / |
| thréonine | Thr | 2.6 | 10.4 | / |
| cystéine | Cys | 1.7 | 10.8 | 8.3 |
| lysine | Lys | 2.2 | 9.0 | 10.5 |
| arginine | Arg | 2.2 | 9.0 | 12.5 |
| histidine | His | 1.8 | 9.2 | 6.0 |
| acide aspartique | Asp | 2.2 | 9.8 | 3.9 |
| acide glutamique | Glu | 2.2 | 9.7 | 4.3 |
| tryptophane | Trp | 2.4 | 9.4 | / |

3) Critère HSAB

Par ailleurs, d'après la théorie HSAB appliquée aux groupes chimiques des peptides, il est possible de prévoir quels acides aminés sont les plus à même de complexer tel ou tel cation métallique (**Tableau 5**). Ainsi, un métal présente des affinités différentes selon son degré d'oxydation. Par exemple, le cuivre(I), en tant qu'acide mou, se coordine préférentiellement avec des groupes thiols ou phényles (bases molles) ; quant au cuivre(II), en tant qu'acide intermédiaire, il se coordine plutôt avec le groupe imidazole (base intermédiaire). Pour ce qui est du fer, l'état d'oxydation III préfère les groupes riches en oxygène (carboxylate, phosphate, etc.), alors que l'état d'oxydation II préfère l'histidine (imidazole) ou d'autres bases intermédiaires.

**Tableau 5.** Classement des cations métalliques et des groupes chimiques des acides aminés, selon la théorie HSAB (adapté de R. G. Pearson [25]).

| | DUR * | INTERMEDIAIRE * | DOUX * |
|---|---|---|---|
| **ACIDES** | Cations de classe A tels $Li^+$, $Na^+$, $Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Al^{3+}$, $Ga^{3+}$<br>Cations de classe B de degré d'oxydation élevé tels $V^{3+}$, $Cr^{3+}$, $Co^{3+}$, $Fe^{3+}$<br>Cations lanthanide et actinide | Cations de classe B de degré d'oxydation moyen (presque tous divalents) tels $Mn^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Co^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Cu^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Pd^{2+}$ | Cations de classe B de faible degré d'oxydation (monovalents, les plus lourds) tels $Cu^+$, $Ag^+$, $Cd^{2+}$, $Au^+$, $Hg^+$ |
| **BASES** | Carboxylate (glutamate et aspartate)<br>Groupe hydroxyle (sérine, thréonine, tyrosine)<br>Guanidinium (arginine)<br>Carbonyle, Alcools, Amines, Ether, Eau, Nitrate, Sulfate, Phophate, Carbonate, etc. | Imidazole (histidine), Amides (asparagine, glutamine),<br>Azote de la liaison peptidique, Indole (tryptophane), Pyrrole (porphyrine), Nitrite, Azides, Azote (gaz) Pyridine, Aniline, Chloride, etc. | Thiols (cystéine), Thioéthers (méthionine), Phényl (phénylalanine), Ethylène, Cyanide, etc. |

* Les acides de même charge deviennent plus doux (moins durs) quand le rayon augmente.
Les acides deviennent plus durs (moins doux) quand la charge (degré d'oxydation) augmente.

### 1.1.3. Motifs complexants

La formation d'un complexe stable entre un métal et un ligand requiert la présence d'un motif chélateur comprenant au moins deux sites coordinants.

Parmi les motifs complexants répertoriés chez les peptides, un grand nombre font intervenir l'acide aminé histidine [30]. Selon sa position dans la séquence, des sites de coordination additionnels peuvent être mobilisés et renforcer la stabilité du complexe.

Ci-dessous, je présente trois motifs fortement stabilisateurs comportant une histidine respectivement en position (i) N-terminale, (ii) 3 de la chaine peptidique ($NH_2$-XX-His) et (iii) C-terminale. Ces schémas de complexation impliquent – en plus de l'imidazole de l'histidine – des fonctions COOH et $NH_2$ terminales ainsi que des NH peptidiques.

1) Motif Histaminyl (His en position N-terminale)

Le motif Histaminyl est présent chez les peptides comportant une histidine en position N-terminale. Il mobilise deux groupements donneurs – l'amine terminale et l'imidazole (**Figure 15A**) – et entraine la formation d'un cycle chélate à 6 chainons assurant une grande stabilité thermodynamique. En présence d'un excès de ligand (**Figure 15B**), le complexe de type bis-histamine se forme et reste stable dans une large gamme de pH selon le métal (pH 3-10). Un grand nombre de métaux, et notamment la plupart des métaux divalents, peuvent donner lieu à un complexe de type histamine [30].

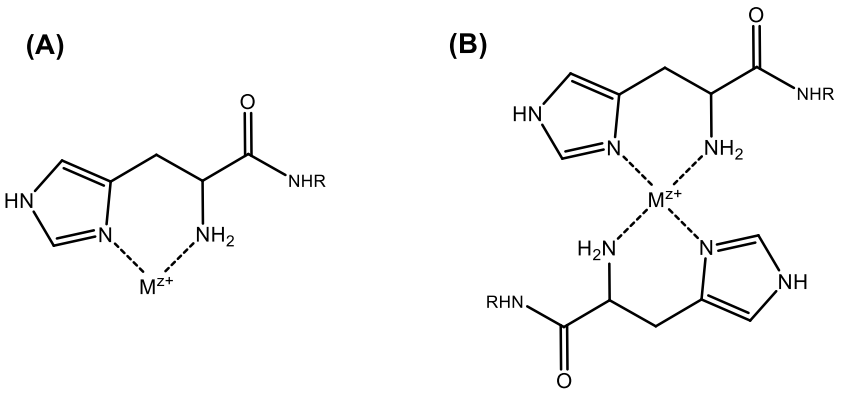



**Figure 15. (A)** Motif histaminyl impliqué dans la complexation d'ions $M^{2+}$ (His en position N-terminale) **(B)** Motif de type bis-histamine.

2) Motif ATCUN (His en 3$^{e}$ position)

Le motif amino-terminal $Cu^{II}/Ni^{II}$ (ATCUN) est spécifique de la complexation avec le cuivre(II) et le nickel(II) [31]. Comme indiqué en **Figure 16**, il mobilise 4 liaisons de coordination et correspond à l'enchainement des groupes suivants le long du squelette peptidique : (i) une amine terminale, (ii) deux azotes amidiques successifs et (iii) un résidu His en troisième position (intervenant par son imidazole). Ce mode de chélation est rendu possible par la propriété de certains cations métalliques – principalement $Cu^{II}$, $Ni^{II}$ – de déprotoner le NH peptidique très faiblement acide (p*K*a ≈ 15) [32]. Ce motif est fortement stabilisateur grâce

à la présence de deux cycles chélates à 5 chainons et d'un troisième à 6 chainons. Il est rencontré dans plusieurs protéines fonctionnelles, telles que les albumines qui l'utilisent pour le transport plasmatique du cuivre [31].

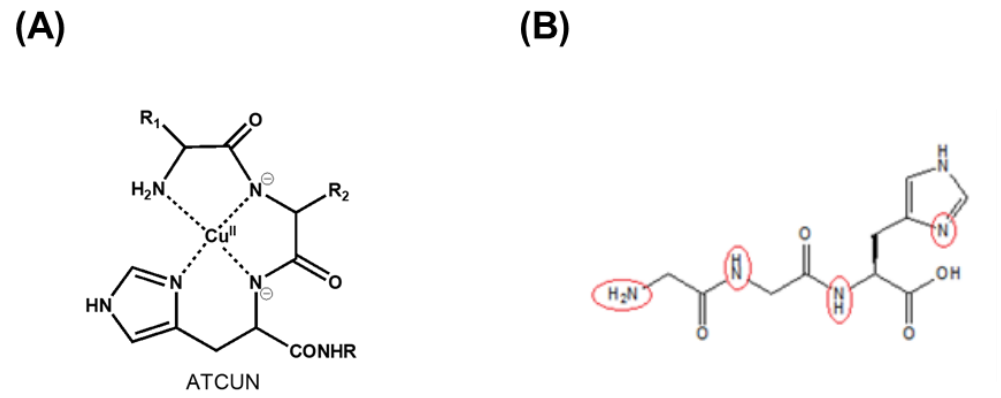



**Figure 16.** **(A)** Mise en œuvre du motif ATCUN pour la complexion du cuivre(II) **(B)** Tripeptide Gly-Gly-His avec détail des groupes chimiques impliqués dans le motif ATCUN.

3) Motif « macrochélate » (His en position C-terminale)

La présence d'un résidu His en position C-terminale augmente la stabilité du complexe par la formation d'un macrochélate à 7 chainons, en complément de la chélation *via* les groupes d'ancrage COOH et $NH_2$ terminaux (**Figure 17**). Pour les métaux ayant la capacité de déprotoner la liaison amide (Cu, Ni et dans certains cas le Zn), l'histidine n'intervient que de manière secondaire à partir de la séquence $NH_2$-X-X-X-His-COOH (X = acide aminé autre que His): l'imidazole (en position axiale) renforce la stabilité du complexe formé selon un motif de type ATCUN (*via* le $NH_2$ terminal et 3 NH amidiques consécutifs).

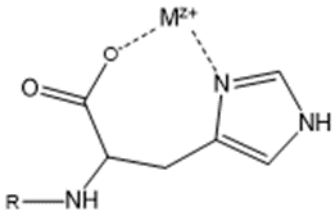


**Figure 17.** Formation d'un macrochélate à 7 chainons impliquant l'imidazole et le COOH terminal de l'histidine ($Fe^{III}$, $Ca^{II}$, $Fe^{II}$).

4) Autres motifs

D'autres arrangements chélateurs ont été reportés dans la littérature avec l'histidine positionnée à des endroits différents dans la séquence ($2^{ème}$ position [30], $4^{ème}$ position [33] et au-delà [30]). Par ailleurs, le vivant regorge de protéines fonctionnelles intégrant des domaines poly-histidine impliqués notamment dans le transport des oligoéléments [34].

D'autres acides aminés peuvent aussi donner lieu à des chélates, tels que :

▪ La cystéine : sa fonction thiol est, après l'imidazole des résidus histidine, le site de coordination le plus répandu chez les protéines (pour les métaux classés comme acides mous ou intermédiaires) ;

▪ Les acides aspartique et glutamique : leur fonction COOH latérale est généralement impliquée dans la formation des complexes avec les métaux classés comme acides durs de Lewis ($Fe^{III}$, $Ca^{II}$, etc.) [35] [36].

En synergie avec l'histidine, ces chaînes latérales coordinantes (Asp, Glu, Cys) peuvent participer à la complexation des métaux classés comme acides intermédiaires de Lewis.

La liaison amide peut également participer à la complexation par le groupe carboxyle CO [32] (en plus du groupe NH comme cela a été précisé dans le cas du motif ATCUN). Enfin, les potentielles interactions entre ligands – liés au même centre métallique – peuvent aussi influer de manière secondaire sur la stabilité du complexe [37].

## 1.2. Étude des complexes en solution

Plusieurs méthodes sont disponibles pour étudier des complexes en solution, chacune d'elles permettant d'accéder à des informations de natures différentes. Dans un premier temps, je présenterai deux techniques dites de référence, à savoir la potentiométrie et la spectroscopie UV-Vis [38] [39]. Dans un deuxième temps, j'évoquerai une technique prometteuse encore émergente dans ce domaine, l'ionisation par électronébulisation (ESI) associée à la spectrométrie de masse (MS) [38]. La troisième partie fera la synthèse des avantages et inconvénients liés à ces méthodes, et mettra en lumière leur complémentarité.

### 1.2.1. pH-potentiométrie

1) Principe

La pH-potentiométrie consiste à mesurer l'évolution du potentiel au cours d'un dosage acide-base. Le potentiel est ensuite converti en pH. Lorsqu'un complexe se forme en solution entre un métal et un ligand, des protons du ligand sont libérés dans le milieu par substitution nucléophile. L'ajustement et la comparaison de la courbe de dosage entre le ligand seul et le ligand en présence du cation métallique permet d'accéder à la formule brute et à la constante de formation des complexes en solution [40].

2) Intérêt

La potentiométrie permet de décrire les équilibres en solution (*K* et β, constantes de formation successive et globale, respectivement) sur la base d'un modèle de distribution des espèces contenant différents complexes définis par leur stœchiométrie métal : ligand (M:L) et leur niveau de protonation (MpLqHr), selon l'équilibre pM + qL + rH = MpLqHr [41]. Les informations potentiométriques obtenues sur les espèces MpLqHr peuvent être confrontées à des informations spectrales (UV-vis, IR, Raman, RMN, RPE) obtenues en fonction du pH, afin d'en déduire la sphère de coordination interne des complexes métal-peptide. Grâce à des calculs

théoriques et à la connaissance de la structure en phase solide, de nombreux paramètres additionnels peuvent être obtenus (interaction inter- et intramoléculaire, gêne stérique, coordination exogène du ligand (contre-anion, solvant) [42].

### 1.2.2. Spectroscopie UV-Vis

1) Principe

Les spectres d'absorbance électronique (UV-Vis) consistent en une série de bandes – correspondant à des transitions d'un état électronique fondamental vers un état excité – suite à l'absorption de lumière isotrope [43]. Chaque bande est caractérisée par sa position ($\lambda_{max}$) et son intensité (fonction de $\varepsilon_{max}$).

2) Intérêt

Chez les peptides, les groupes fonctionnels concernés sont la liaison peptidique elle-même et divers autres chromophores (phényle, phénol, imidazole et indole) présents sur la chaine latérale de quelques acides aminés (Phe, Tyr, His et Trp, respectivement). Lors d'une complexation avec un métal, la configuration électronique de certains atomes – appartenant aux groupes précédemment cités – est perturbée, ce qui impacte la force de liaison et par suite, l'intensité d'absorbance UV. Par ailleurs, la présence de métaux de transition peut engendrer – dans le domaine visible – deux bandes caractéristiques qui correspondent aux phénomènes suivants : la transition liée au transfert de charge (métal→ligand (MLCT) ou ligand→métal (LMCT)) et la transition d-d de l'ion métallique. L'ajout de cations métalliques peut induire des décalages hypo- ou hyper-chromiques (diminution / augmentation de l'intensité de bande) et hypso- ou batho-chromiques (décalage vers le bleu ou le rouge) des bandes spectrales caractéristiques. Les points isobestiques, observés dans les spectres lors de l'addition de cations, indiquent la présence de deux espèces en équilibre et permettent la détermination de la constante d'équilibre.

### 1.2.3. Electrospray-Spectrométrie de Masse (ESI-MS)

La spectrométrie de masse associée à l'ionisation électrospray (ESI-MS) est une méthode performante pour l'analyse structurale des petites et grosses biomolécules de polarité variable [44]. Depuis plusieurs années, l'ESI-MS montre un grand potentiel pour l'étude qualitative des complexes métal-ligand organique [45].

1) Principe

L'ESI est une technique d'ionisation douce à pression atmosphérique permettant le transfert des ions de la phase liquide vers la phase gazeuse, avant leur sélection selon leur rapport masse/charge (m/z) dans un spectromètre de masse (MS). La quasi absence de fragmentation dans la source en ESI permet l'observation préférentielle de l'ion moléculaire, correspondant dans un cas simple à l'analyte sous sa forme protonée $[M+H]^+$ ($ESI^+$) ou déprotonée $[M-H]^-$ ($ESI^-$). De plus, certaines liaisons non covalentes peuvent être préservées, ce qui est d'un intérêt majeur pour l'étude de complexes de coordination.

En pratique [44], un échantillon liquide circule à faible débit dans une électrode capillaire (en acier inoxydable ou en quartz) présentant une différence de potentiel élevée (positive ou négative) par rapport à l'entrée dans le MS (2,5 - 6 kV). Sous l'influence de ce champ électrique et d'un gaz de nébulisation inerte ($N_2$) appliqué coaxialement au capillaire, de fines gouttelettes chargées se forment avec la même polarité que la différence de potentiel appliquée. L'évaporation du solvant est améliorée par application d'un gaz de séchage (N2) et / ou par chauffage doux du tube capillaire (100 à 300 ° C) conduisant à la diminution progressive de la taille des gouttelettes. Lorsque la densité de charge surfacique devient trop grande, une explosion coulombienne se produit. Quand les gouttelettes sont suffisamment petites, le champ électrique en surface atteint une intensité critique permettant l'expulsion des ions en phase gazeuse [46].

2) Intérêt

L'ESI-MS permet de fournir une signature moléculaire directement à partir d'échantillons en solution, et donc d'analyser *in situ* les espèces d'intérêt [47]. Grâce à une sensibilité de détection élevée, cette méthode peut être appliquée à des échantillons biologiques contenant de très faibles concentrations de complexes ($10^{-6}$ M). L'ESI-MS est un outil efficace pour déterminer le nombre d'espèces de coordination formées en solution ainsi que leur stœchiométrie, puisque ces paramètres sont directement obtenus à partir du spectre de masse [47]. En effet, les valeurs des rapports m/z, à basse mais surtout à haute résolution, ainsi que le profil isotopique des ions sont autant d'informations qui permettent d'identifier avec fiabilité la structure d'un complexe (**Figure 18**). De plus, la stœchiométrie des complexes peut être étudiée avec fiabilité en fonction du ratio métal : ligand organique et du pH [45].

En pratique, la technique a déjà été mise en œuvre pour caractériser différents complexes métal-peptide. L'interaction du tripeptide synthétique alanyl-glycyl-histamine (AGHa) avec le nickel(II) – et le cuivre(II) – a été étudiée par ESI-MS, ce qui a permis de valider la formation de quatre complexes différents en solution [47]. Dans un autre travail portant sur des oligopeptides synthétiques contenant une histidine, la technique ESI-MS a été utilisée avec succès pour analyser l'impact des changements conformationnels sur l'affinité de liaison avec le cuivre(II) et le nickel(II) [48]. Une étude récente a également rapporté l'identification de plusieurs complexes fer(II)-peptide à partir de peptides purifiés, grâce à une analyse différentielle ESI-MS réalisée en absence et en présence de fer(II) [49].

Dans le cas d'échantillons complexes, un couplage entre la chromatographie en phase liquide (LC) et l'ESI-MS est plus adapté puisqu'il permet de supprimer les effets de matrice. De cette manière, il est possible d'obtenir des informations structurales sur les espèces non covalentes stables [45]. À titre d'exemple, le couplage HILIC-ESI-MS s'est avéré efficace pour l'analyse ciblée de complexes fer(II)- et fer(III)-phytosidérophore [50].

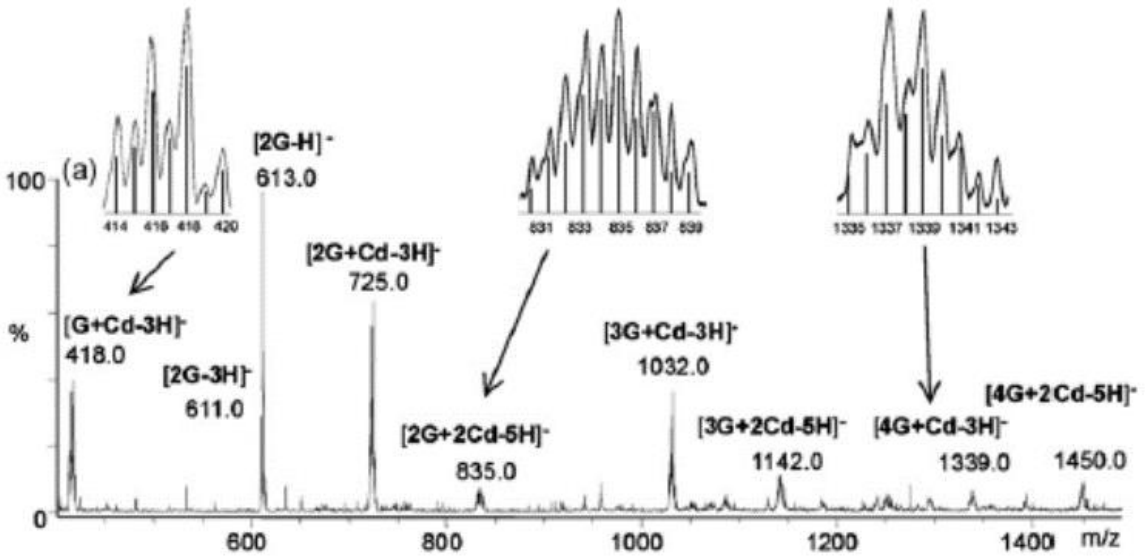



**Figure 18.** Spectre ESI-MS d'une solution de $Cd^{II}$ (2,5 mM) et de glutathion – G (10 mM). Les encarts montrent la comparaison, pour les complexes cadmium sélectionnés, de la signature isotopique expérimentale agrandie (en mode profile) et du modèle théorique (en mode histogramme) [51].

### 1.2.4. Analyse critique des techniques

La description complète d'un équilibre en solution requiert la détermination de la spéciation – c'est-à-dire le nombre de complexes présents et leur stœchiométrie –, ainsi que de la constante de stabilité associée à chaque complexe.

Les techniques de référence – la potentiométrie, la spectrophotométrie et la calorimétrie (éludée dans la première partie) – permettent d'accéder avec précision aux constantes de stabilité. Cependant, celles-ci reposant sur des modèles de spéciation, elles peuvent présenter un biais. En effet, le modèle retenu est celui qui présentera la meilleure adéquation quantitative avec les résultats de l'expérience. Dans le cas d'un modèle simple, la spectrophotométrie peut donner des informations qualitatives correctes. Cependant, lorsque plusieurs espèces de complexes cohabitent en solution, l'interprétation des données potentiométriques, spectrophotométriques et calorimétriques peut amener à une ambiguïté pour le choix du modèle [38].

Comme mentionné plus haut, la technique ESI-MS renseigne de façon directe et *a priori* robuste le nombre des espèces et leur stœchiométrie. En théorie, on pourrait même supposer que l'ESI-MS est capable de fournir les constantes de stabilité des complexes en se basant sur les intensités relatives des espèces ionisées. Cependant, plusieurs problèmes peuvent survenir et perturber l'interprétation des équilibres en solution. Les deux causes principales sont (i) un changement de composition de la solution lors du processus électrospray par rapport aux conditions à l'équilibre, et (ii) des réactions en phase gazeuse se produisant après l'interface [38]. Ces perturbations potentielles conduisent ainsi à des biais qualitatifs et/ou quantitatifs.

Néanmoins, des études comparatives solides ont permis de valider que l'ESI-MS produisait des résultats qualitatifs le plus souvent en accord avec ceux obtenus par les techniques de référence. En revanche, du point de vue quantitatif, la corrélation s'avère généralement mauvaise.

Par conséquent, une utilisation combinée de ces différentes méthodes – techniques de référence et ESI-MS – permettrait de renforcer les résultats, surtout du point de vue qualitatif.

## 2. Potentielles applications « santé » des peptides chélateurs de métaux

Depuis une dizaine d'années, les peptides chélateurs de métaux (MCP) font l'objet d'un vif intérêt pour le traitement de diverses affections. Dans un premier temps, je parlerai de leur mise en œuvre pour améliorer l'absorption intestinale des minéraux. J'expliquerai ensuite de quelle manière les MCP peuvent permettre de lutter contre le stress oxydant. À cette occasion, j'évoquerai leur utilisation potentielle dans le cadre des pathologies neurodégénératives.

### 2.1. Absorption digestive des minéraux

En conditions physiologiques, les oligoéléments essentiels sont présents à une concentration relativement constante, grâce au principe de régulation homéostatique. Cependant, certains d'entre eux – comme le fer et le zinc – montrent un risque accru de carence. En cas de déficience, des anomalies structurelles et physiologiques peuvent apparaitre, telles que l'anémie ferriprive (cf. **Annexe 1**).

Par ailleurs, une ingestion trop faible de calcium – minéral le plus abondant de l'organisme – peut aussi avoir des conséquences néfastes, comme le rachitisme chez l'enfant et l'ostéoporose à l'âge adulte [36].

En cas de déficit minéral, le traitement oral habituel à l'aide de sels métalliques est peu efficace et doublé de nombreux effets secondaires (cf. **Annexe 1**) [52].

#### 2.1.1. Ingrédients fonctionnels

Depuis longtemps, certains aliments – comme le soja fermenté [35] – sont réputés pour améliorer de façon sensible l'absorption digestive du fer. Ce phénomène est dû à la présence de peptides de fermentation, parmi lesquels certains sont capables de chélater les métaux. Les viandes et poissons sont également connus pour favoriser l'assimilation du fer non héminique, d'origine minérale [53]. Dans ce dernier cas, les peptides chélateurs produits lors de la digestion gastro-intestinale ont un impact positif.

#### 2.1.2. Supplémentation

Les peptides chélateurs de métaux issus de la protéolyse enzymatique apparaissent comme une excellente alternative pour la supplémentation par voie orale sous forme de chélates. En effet,

le cation métallique se trouve stabilisé au sein de l'édifice, ce qui améliore considérablement sa solubilité [54] [55].

Dans le cas du fer, plusieurs travaux se sont intéressés à l'activité chélatrice des phosphopeptides issus de l'hydrolyse des protéines laitières, dont la β-caséine [56] [57] [58]. Les tests *in vivo* réalisés chez le rat ont prouvé que l'administration orale de chélates fer-phosphopeptide – ou fer-hydrolysat β-caséique – était plus efficace que les traitements classiques à base de sels ferreux ou de gluconate ferreux.

D'autres études *in vivo* utilisant ce même modèle ont démontré que la supplémentation orale à l'aide de chélates ferreux – préparés à partir de peptides d'hydrolyse de poisson – permettait de réduire significativement l'anémie [59].

Un grand nombre de peptides bioactifs ont ainsi été identifiés, à partir de différentes sources, comme étant capables de chélater les métaux suivants : le fer [35] [49] [52] [53] [54] [55] [59] [60] [61] [62] [63] [64], le zinc [52] [64], le calcium [36] [52] [61] et le cuivre [61].

Même si la structure des peptides chélateurs – issus de l'hydrolyse des protéines – est encore mal appréhendée, les études font ressortir le rôle particulier des groupes phosphate (dans le cas des phosphopeptides issus du lait) et des acides aminés à chaine latérale (His, Ser, Cys, Glu, Asp, Trp, Tyr, Phe, Met) [64] [65].

### 2.2. Capacité antioxydante

Un excès de métal prooxydant dans l'organisme (cuivre et fer [66]) conduit à la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) selon le mécanisme précisé en **I.2.5.2 (Étude bibliographique)**.

Grâce à leur propriété de chélation, certains peptides peuvent agir comme antioxydants et préserver ainsi l'intégrité cellulaire. Sur le schéma de principe ci-contre (**Figure 19**), deux peptides chélateurs coordinent l'ion fer et permettent de stabiliser non seulement la structure du complexe mais également l'état d'oxydation du métal [67] [68]. Cette action indirecte des MCP a pour effet de stopper l'activité redox du fer (ou du cuivre) et donc d'inhiber la réaction de Fenton. La séquestration du métal – aussi bien sous sa forme oxydée ($Fe^{III}$, $Cu^{II}$) que sous sa forme réduite ($Fe^{II}$, $Cu^{I}$) – devrait donc avoir pour effet de ralentir de manière sensible la production des ROS.

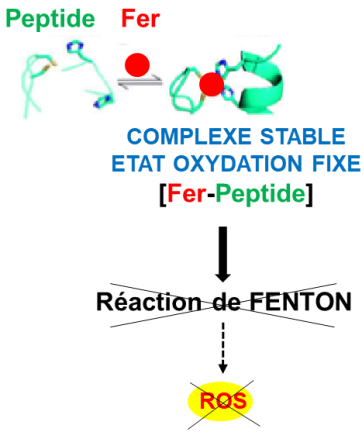



**Figure 19.** Schéma d'action des MCP.

Ces dernières années, divers hydrolysats protéiques ont été criblés pour leur propriété antioxydante basée sur la chélation du fer et/ou du cuivre.

De façon classique, l'évaluation combinée de la capacité de chélation (de $Cu^{II}$ et $Fe^{II}$) et du pouvoir antioxydant est réalisée (i) sur l'hydrolysat global, (ii) sur des fractions de l'hydrolysat étudié, (iii) et sur les peptides d'intérêt (en cas de purification semi-préparative HPLC).

Dans ce cadre, différentes méthodes sont employées pour déterminer le pouvoir antioxydant, à savoir (i) l'inhibition de la dégradation oxydante des b-carotènes [65] [69] [70], (ii) la détermination du pouvoir réducteur [65], (iii) le piégeage du radical $ABTS^{\bullet+}$ [65] et (iv) la mesure *in vitro* des ROS (culture cellulaire) [68].

Afin de déterminer la nature des acides aminés complexants, la composition en acides aminés de l'hydrolysat total est habituellement comparée à celle des fractions protéiques déterminées comme chélatrices à l'aide des différents tests (test à la ferrozine pour le $Fe^{II}$ et tests au pyrocatéchol ou au murexide pour le $Cu^{II}$) [36] [54] [55] [60] [69] [71] [72].

Une bonne corrélation a généralement pu être mise en évidence entre :

▪ d'une part, la capacité chélatrice des hydrolysats (ou des fractions d'hydrolysat) et leur contenu en histidine [54] [55] [70] [73] – résultat en accord avec la théorie HSAB (le $Cu^{II}$ et le $Fe^{II}$, en tant qu'acides de Lewis intermédiaires, forment des complexes stables avec l'imidazole) ;

▪ d'autre part, entre la capacité chélatrice des hydrolysats (ou des fractions d'hydrolysat) et leur pouvoir antioxydant [55] [70] [73]. À titre d'exemple, Kim *et al.* ont découvert deux peptides chélateurs du fer(II) – LEW et YYPYQL – présentant un fort potentiel antioxydant [74].

Après protéolyse, différentes protéines issues de plantes (*J. curcas* [68], *Pyropia columbina* [69], palmier [67], haricot [65], tournesol [70], pois chiche [55] [73]) et de ressources animales (lait de buffle [75]) ont généré des peptides antioxydants agissant *a priori* par chélation des métaux, validant ainsi leur qualité d'aliment fonctionnel.

En outre, les peptides chélateurs identifiés dans ces hydrolysats pourraient servir de modèle pour des agents thérapeutiques – peptides modifiés chimiquement et peptidomimétiques (cf. **Annexe 2**) – afin de lutter de manière ciblée contre le stress oxydant.

Des pentapeptides de synthèse, contenant un motif de 3 résidus acides successifs (D, E), ont également révélé de bonnes capacités antioxydantes par complexation de fer ferrique (ce point sera plus amplement détaillé dans le paragraphe suivant) [76].

Par ailleurs, les peptides chélateurs du fer pourraient être utilisés comme antioxydants dans le cadre des pathologies neurodégénératives. En effet, la maladie d'Alzheimer est caractérisée non seulement par la formation d'agrégats protéiques spécifiques, mais aussi par un stress oxydatif lié à un excès de fer dans certaines régions du cerveau (forte oxydation des protéines, lipides et ADN à ces endroits) [77]. Un traitement efficace requiert la mise en œuvre d'un chélateur modéré [78], de surcroît capable de passer la très sélective barrière hémato-encéphalique. L'octapeptide NAP (séquence complète : NAPVSIPQ), issu de l'hydrolyse enzymatique de la protéine neuroprotectrice ADNP, est ainsi un candidat prometteur sous sa forme modifiée

(modification consistant en l'ajout de trois fonctions hydroxamate pour le rendre chélateur) [77].

## 3. Les peptides chélateurs de fer

Une grande majorité des références citées dans l'étude bibliographique proviennent de la littérature traitant de l'identification de peptides chélateurs au sein d'hydrolysats protéiques. En effet, ces travaux constituent une source importante d'informations, permettant d'établir un lien entre structure peptidique et capacité de chélation (comme mentionné au paragraphe **II.2**).

En outre, seules quelques références ont pour objet l'étude de complexes fer-peptide en solution (par titration potentiométrique, analyses spectrophotométriques et spectroscopiques).

Les résultats de cette étude bibliographique sont synthétisés et concernent à la fois le fer(III) et le fer(II). Les **Tableaux 6** et **7** – présentés ci-après – renseignent dans chaque cas (i) l'origine des peptides, (ii) le critère retenu pour le fractionnement, (iii) la méthode pour étudier la complexation en solution, (iv) la nature des peptides chélateurs identifiés ainsi que (v) les diverses conclusions tirées – par les auteurs de chaque étude – quant aux éléments favorisant la complexation.

Afin de mettre en relief la nature des acides aminés et motifs complexants, les résultats ont été interprétés sous l'angle de la théorie HSAB (cf. **II.1.1.1**).

### 3.1. Chélateurs du fer(III)

Le **Tableau 6** récapitule les résultats concernant les peptides identifiés dans la littérature comme étant de bons complexants du fer(III).

Dans le cas des travaux sur les hydrolysats, la composition en acides aminés de la fraction chélatrice est souvent comparée avec celle de l'hydrolysat global, afin d'en déduire *a priori* les résidus complexants [27] [30] [107].

Comme attendu, les fonctions chimiques favorisant la complexation avec le fer(III) sont des bases dures de Lewis, principalement les groupes phosphates (phosphopeptides) et carboxylates des chaines latérales (acide aspartique, acide glutamique). Par ailleurs, les motifs correspondant à un enchainement de trois acides aminés acides (DDE, EDE, DED, EEE, DDD…) montrent de façon évidente un effet stabilisateur sur le chélate fer(III)-peptide.

La complexation de quatre pentapeptides (FEEEA, FDDDA, FEEEK et FDDDK) en présence d'ions ferriques a été étudiée par potentiométrie, spectroscopie par dichroïsme circulaire (DC) et RMN [76]. Il a été démontré que la chélation du fer(III) impliquait les 4 groupes COOH présents (COOH terminal de la lysine ou de l'alanine, ainsi que les 3 COOH latéraux de l'acide glutamique ou de l'acide aspartique), mais pas les amines primaires (ni le $NH_2$ terminal de la phénylalanine, ni le $NH_2$ latéral de la lysine). Par ailleurs, les quatre complexes Fe(III)-pentapeptide en question présentent une stabilité qui doit leur permettre de solubiliser le fer *in*

*vivo* à un pH compris entre 2 et 8. Une étude potentiométrique avait précédemment mis en évidence la grande stabilité des complexes associés au système Fe(III):DDD par rapport à ceux du système Fe(III):DD [79].

Dans le cas des polypeptides, les enchainements de glycine et proline – par leur flexibilité – apportent une contribution secondaire pour stabiliser l'édifice autour du cation ferrique [41] [63] [65] [80].

**Tableau 6.** Peptides chélateurs du fer(III) présentés selon la théorie HSAB.
En rouge : les acides (**$Fe^{3+}$**) et bases dures (**D, etc.**) de Lewis
En vert : les acides (**$Fe^{2+}$**) et bases intermédiaires (**H, etc.**) de Lewis

| Sujet d'étude | Critère de fractionnement | Méthode étude complexation | Eléments complexants | Peptides chélateurs | Ref |
|---|---|---|---|---|---|
| **Protéines noyer** HE | Affinité $Fe^{3+}$ | - | DDE<br>EDE | LAGNPDDEFRPQ<br>VEDELVAVV | [63] |
| **Protéines soja** HE | Affinité $Fe^{3+}$ | - | DED<br>EEE | Peptide 11 kDa<br>Peptide 17 kDa | [35] |
| **Protéines soja** HE | Affinité $Fe^{3+}$ | $Ca^{2+}$ | E / D / Q / K / P (1) | DEGEQPRPFPFP<br>EEKHGGKGSEEEQDEREHPRPH<br>Q<br>LFSREEGQQQGEQRL<br>LFGREEGQQQGEERL<br>EDEDEPRPIPFPRPQPRQ<br>DEGEQPRPFPFPRP | [36] |
| **Protéines lait** HE<br><br>(β-lactoglobuline, α-lactalbumine, BSA) | Affinité $Fe^{3+}$ | **Compétition** Ferr **(?)** $Fe^{2+}$ [81] **(x?)** | D / E (1) | 3 régions β-lactoglobuline:<br>YVEELKPTPEGDLEIL<br>VRTPEVDDEALEK<br>VLDTDYK<br>2 régions α-lactalbumine:<br>CKDDQNPH<br>DDDLTDDI<br>2 régions BSA:<br>FKDLGEEH<br>KDDSPDLPK | [60] |
| **Protéines levure** HE | Affinité $Fe^{3+}$ | **Compétition** Ferr **(?)** $Fe^{2+}$ [82] | H / K / R / G (1)<br>< 5 kDa | - | [54] |
| **Protéines anchois** HE | Taille + Affinité $Fe^{3+}$ | **Compétition** Ferr $Fe^{2+}$ [83] | E / S / G<br>(G/E: stabilisation hélice α [80]) | S-$(G)_7$-L-G-S-$(G)_2$-S-I-R<br>I-$(E)_2$-L-$(E)_3$-I-E-A-E-R | [53] |
| **Protéine lait** HE (β-caséine) | Affinité $Fe^{3+}$ | - | **phosphate** (S*/Y*) * | 2 phosphopeptides | [84] |
| **Phosphoprotéine** HE | Affinité $Fe^{3+}$ | - | **phosphate** (S*) * | GS*HMAS*MTGGQQMGR | [85] |
| **Protéomique** HE | Affinité $Fe^{3+}$ | - | **phosphate** (S*/T*) * | 299 phosphopeptides | [86] |
| **Protéomique** HE | Affinité $Fe^{3+}$ | - | **phosphate** | ? (84 sites de phosphorylation) | [87] |
| **Protéomique** HE | Affinité $Fe^{3+}$ | - | **phosphate** | > 5000 phosphopeptides | [88] |
| **Phosphopeptides** STD | Affinité $Fe^{3+}$ | - | **phosphate** (Y*) * | 7 phosphopeptides | [89] |
| **Protéines érythrocyte** HE | Affinité $Fe^{3+}$ | - | **phosphate** | ? | [90] |
| **Protéomique** HE | Affinité $Fe^{3+}$ | - | **phosphate** | 796 peptides / 408 phosphopeptides | [91] |
| **Protéines HLA** HE | Affinité $Fe^{3+}$ | - | **phosphate** | ? | [92] |
| **Phosphopeptides** STD | Affinité $Fe^{3+}$ | - | **phosphate** (S*/T*/Y*) * | 11 phosphopeptides | [93] |
| **Peptides** STD | | **Potentiométrie, DC, RMN** | DDD<br>EEE | FEEEA, FDDDA, FEEEK, FDDDK | [76] |
| **Peptides** STD | | **Potentiométrie** | DD<br>DDD | DD, DDD | [79] |

**HE** : peptides générés par hydrolyse enzymatique ; **STD** : composé standard

**Ferr** : test de compétition avec la ferrozine [81]

(1) : conclusions tirées par comparaison de la composition en acide aminés de la (ou des) fraction(s) d'hydrolysat chélatrice(s) avec celle de l'hydrolysat total

* : S*, T* et Y* correspondent respectivement à la sérine O-phosphate, à la thréonine O-phosphate et à la tyrosine O-phosphate

### 3.2. Chélateurs du fer(II)

Le **Tableau 7** récapitule les résultats concernant les peptides identifiés dans la littérature comme étant de bons complexants du fer(II).

Le fer(II), en tant qu'acide de Lewis intermédiaire, forme effectivement des complexes avec des peptides contenant des bases intermédiaires comme l'imidazole (histidine) [122] [128] [155] [156] [157].

Toutefois, son mode de coordination n'est pas spécifique, comme pouvait l'être celui du fer(III).

En effet, plusieurs études font également ressortir l'influence des bases dures de Lewis sur la formation des complexes fer(II)-peptide : à savoir les fonctions OH de la sérine et de la tyrosine, les groupes COOH des chaines latérales (D et E), le groupe $NH_2$ de la lysine ou encore les $NH_2$ et COOH terminaux.

Par ailleurs, la formation des complexes associés aux systèmes Fe(II):DD et Fe(II):DDD a été étudiée par potentiométrie [136]. Cette étude a permis de valider la formation de deux complexes Fer(II)-DD ([MHL] et [ML]), avec des constantes de stabilité toutefois bien inférieures à celles calculées dans le cas du système Fe(III):DD précédemment cité. Avec le tripeptide DDD, la formation d'un complexe de fer(II) n'est observée qu'à partir de pH 9.

En outre, les fractions peptidiques de plus faible taille (PM < 3 kDa, voire < 1 kDa) sont les plus efficaces pour la chélation du fer(II) [78] [91] [128] [131].

**Tableau 7.** Peptides chélateurs du fer(II) présentés selon la théorie HSAB.
En rouge : les acides ($Fe^{3+}$) et bases dures (**D, etc.**) de Lewis
En vert : les acides ($Fe^{2+}$) et bases intermédiaires (**H, etc.**) de Lewis
En bleu : les bases molles de Lewis (**C**)

| Sujet d'étude | Critère de fractionnement | Méthode étude complexation | Eléments complexants | Peptides chélateurs | Ref |
|---|---|---|---|---|---|
| Protéines pois chiche HE | Affinité $Cu^{2+}$ | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [95] | H (1) | - | [55] |
| Protéines *Pyropia C.* HE (plante) | Taille | Compétition Ferr(?) $Fe^{2+}$ (ascorbique+ferrozine) | H / S (1)<br>< 1 kDa | - | [69] |
| Protéines lait HE | - | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [95] | < 3 kDa | - | [75] |
| Protéines haricot HE | Taille | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [95] | < 1 kDa | - | [65] |
| Protéines palmier HE | - | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [96] | - | GGIF<br>YLLLK | [67] |
| Protéines *Jatropha curcas* HE | Taille | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [95] | faibles M | - | [68] |
| Protéines Goberge HE (poisson) | Taille + Affinité $Fe^{2+}$ | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [95] | - | GPAGPHGPPG | [61] |
| Peptide STD | - | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [95] | - | SGSTGH<br>GPAGPR | |
| Protéines *Trichiuridae* HE (poisson) | - | - | - | - | [59] |
| Protéine morue HE | Affinité $Fe^{2+}$ | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [55] [95] | $NH_2$ term<br>COOH term<br>Liaison peptidique<br>R (amine, imine)<br>+ secondairement :<br>K / H / D (2) | GPAGPHGPPGKDGR<br>AGPHGPPGKDGR<br>AGPAGPAGAR | [49] |
| Protéine sésame HE | Affinité $Zn^{2+}$ | Mesure EDTA $Fe^{2+}$ | S / C (3)<br>COOH term (3) | NCS | [64] |
| Protéines goberge HE (poisson) | Affinité $Fe^{2+}$ | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [55] [95] | H / S / C (3) | SCH | [97] |
| Protéine Ascidies HE (ressource marine) | Taille | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [98] | - | LEW<br>MTTL<br>YYPYQL | [74] |
| Protéines canard HE | Taille<br>+ Nature ionique | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [99] | EEL<br>A / L (1) | LQAEVEELRAALE | [71] |
| Protéines soja HE | Taille | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [100] | > 10 kDa | - | [62] |
| Protéines *Vicia faba* HE (plante) | Nature ionique | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ | K / Y / D (3)<br>+<br>Pas impact de H | LSPGDVLVIPAGYPVAIK | [101] |
| Protéine morue HE | Taille | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [83] | < 3 kDa | - | [102] |
| Peptide STD | | Compétition Ferr $Fe^{2+}$ [96] | H | carnosine (βAH) | [103]<br>[104]<br>[105] |
| Peptides STD | | Potentiométrie | DD | DD | [79] |

**HE** : peptides générés par hydrolyse enzymatique ; **STD** : composé standard

**Ferr** : mesure spectrophotométrique suite au test de compétition avec la ferrozine [81]

**EDTA** : mesure spectrophotométrique après complexation par EDTA (fort complexant)

**(1)** : conclusions tirées par comparaison de la composition en acide aminés de la (ou des) fraction(s) d'hydrolysat chélatrice(s) avec celle de l'hydrolysat total

**(2)** : conclusions tirées sur la base d'une analyse FTIR (Infra-rouge à transformée de Fourier)

**(3)** : conclusions tirées de la bibliographie

* : S*, T* et Y* correspondent respectivement à la sérine O-phosphate, à la thréonine O-phosphate et à la tyrosine O-phosphate

## 4. Conclusion

Les hydrolysats protéiques générés par voie enzymatique constituent une ressource majeure de peptides chélateurs de métaux (cf. **Étude bibliographique, II.2** et **II.3**).

Ces composés d'origine naturelle sont d'un grand intérêt pour le secteur de la santé (**Figure 20**).

Les peptides chélateurs de fer présentent un large potentiel d'applications : amélioration de l'absorption intestinale du fer (chélation des formes $Fe^{II}$ et $Fe^{III}$), lutte contre le stress oxydant (chélation des formes $Fe^{II}$ et $Fe^{III}$) et élimination de l'excès de fer circulant par administration *per os* (chélation de la forme $Fe^{III}$).

La composition en acides aminés des peptides chélateurs de fer dépend directement du degré d'oxydation du métal ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$). Conformément à la théorie HSAB, des complexants efficaces du fer(III) possèdent systématiquement des bases dures de Lewis (phosphate, carboxylate, etc.) alors que des complexants efficaces du fer(II) possèdent généralement des bases intermédiaires de Lewis (imidazole de l'histidine), sans toutefois exclure l'implication des bases dures (interaction moins spécifique que dans le cas de la forme ferrique).

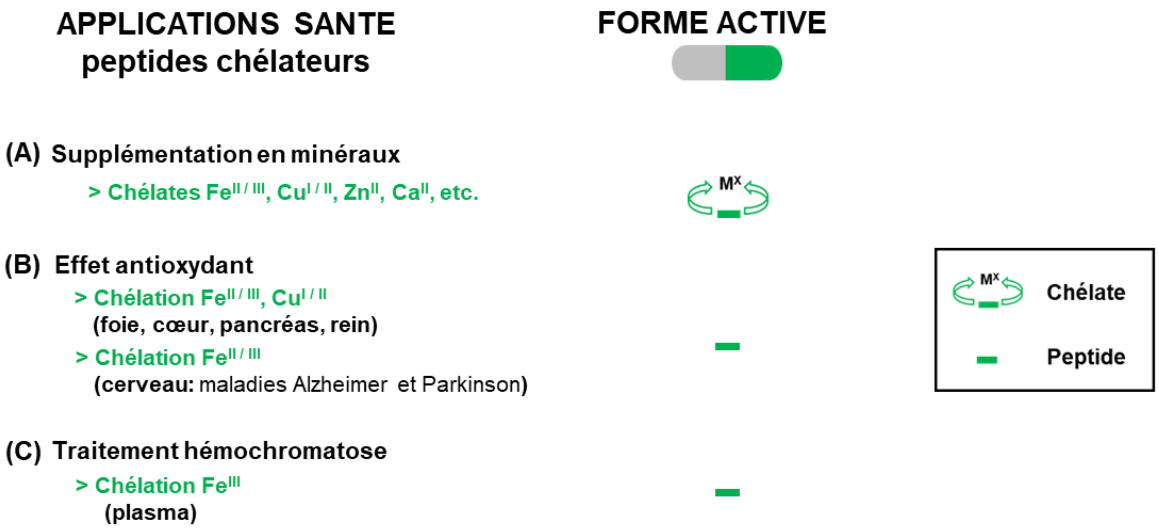



**Figure 20.** Applications santé potentielles des peptides chélateurs de métaux dont **(A)** la supplémentation en minéraux, **(B)** la lutte contre le stress oxydant et **(C)** le traitement de l'hémochromatose.

# <u>Chapitre III</u> : criblage des peptides chélateurs de métaux

La purification des peptides chélateurs de métaux à partir d'un hydrolysat protéique représente un vrai défi. En effet, ce type de mélange complexe contient généralement plus d'une centaine de peptides (cf. **Annexe 1**), et d'autre part les peptides chélateurs – s'il y en a – peuvent être présents à faible concentration (**Figure 21A**). Une approche bioinformatique – reposant sur la relation structure-activité – a récemment émergé pour la prédiction de séquences peptidiques bioactives, mais celle-ci n'est pas encore suffisamment robuste [82]. Il apparait donc crucial de mettre en place une phase de criblage et d'identification performante (**Figure 21B**) afin d'optimiser le procédé de fractionnement (**Figure 21C**), du point de vue de son efficacité et de sa durée globale de mise en œuvre.

Dans cette partie, je présenterai un état de l'art des stratégies mises en œuvre pour sonder (**Figure 21B (1)**) et caractériser (**Figure 21B (2)**) les peptides chélateurs de métaux dans des mélanges complexes.

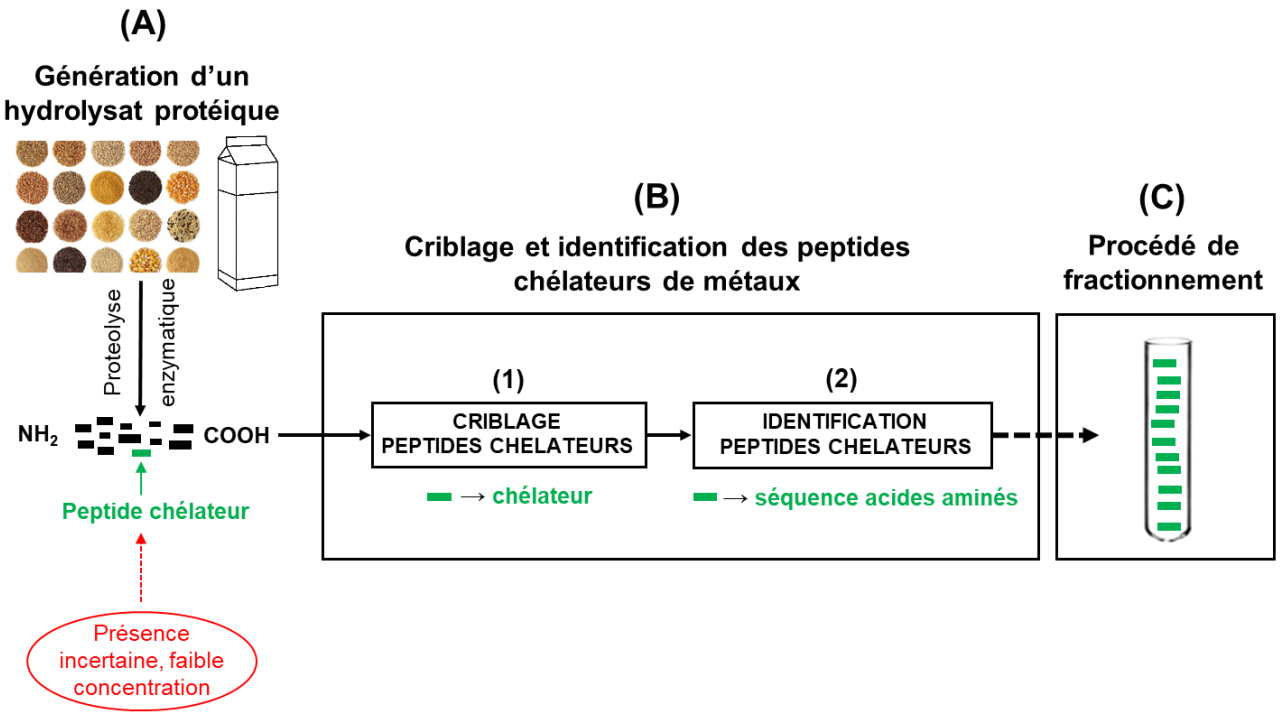



**Figure 21.** Processus global de production des peptides chélateurs bioactifs avec les phases de **(A)** Production d'un hydrolysat protéique (à partir de protéines d'origines diverses), **(B)** Criblage et identification à partir de ce mélange complexe et **(C)** Fractionnement des peptides chélateurs identifiés.

## 1. Protocole de criblage empirique

Ce protocole est applicable à la recherche de tout type d'activité biologique (*i.e.* pas uniquement la propriété de chélation des métaux).

### 1.1. Principe

Des purifications successives – guidées à chaque étape par la mesure de la bioactivité – sont appliquées à l'hydrolysat dans une démarche rationnelle (**Figure 22**). Initialement, un fractionnement assez grossier permet de cibler rapidement les fractions avec un niveau d'activité intéressant. Par la suite, des techniques de purification de plus en plus résolutives sont mises en œuvre de façon à isoler les peptides bioactifs avec un degré de pureté satisfaisant. Au final, l'identification des peptides d'intérêt est réalisée par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) [82] [83].

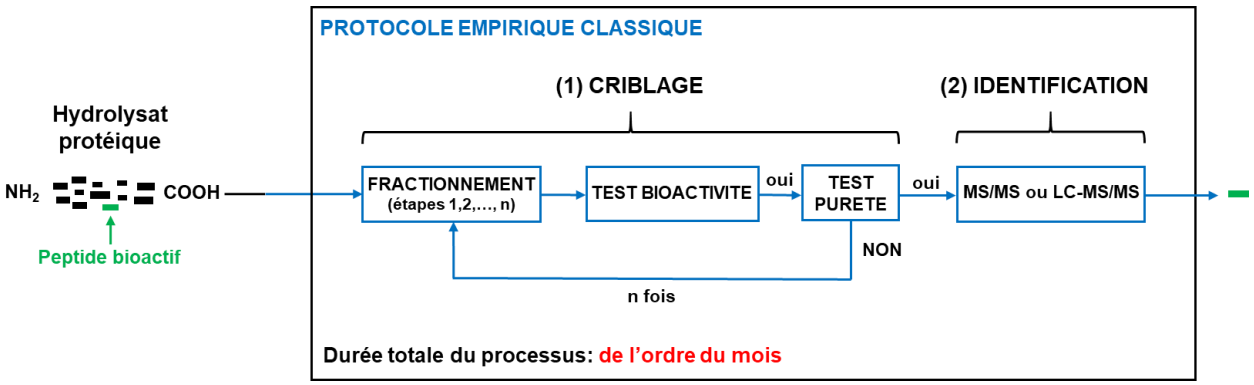



**Figure 22.** Protocole empirique classique avec les phases de **(1)** Criblage des peptides bioactifs (cycles répétés de (i) fractionnement / (ii) test de bioactivité / (iii) test de pureté) et **(2)** Identification du peptide d'intérêt (par spectrométrie de masse en tandem).

### 1.2. Mise en œuvre

À l'aide d'exemples tirés de la bibliographie, je décris plus en détail le protocole de criblage empirique.

#### 1.2.1. Fractionnement

1) Préfractionnement

Classiquement, l'hydrolysat protéique est préfractionné afin d'enrichir certaines fractions en peptides bioactifs. Les techniques couramment mises en œuvre sont (i) l'ultrafiltration (UF) [62] [65] [84] et deux techniques chromatographiques à basse pression : (ii) la chromatographie d'exclusion de taille (SEC) [53] [65] [74] et (iii) la chromatographie échangeuse de cations (SCX) [95]. Une majorité de travaux ayant montré un lien entre la taille des peptides et leur capacité de chélation [65] [68] [69] [84] , il apparait donc pertinent d'effectuer un premier tri sur ce critère (UF, SEC). Une autre technique récemment développée – la chromatographie de partage centrifuge (CPC) – peut aussi être utilisée pour diviser un hydrolysat en fractions moins complexes [85].

Cette première étape permet de générer un nombre restreint de fractions brutes – entre trois et six en moyenne – qu'il est possible de soumettre à une mesure d'activité dans un laps de temps raisonnable (de l'ordre de la journée).

À l'image du procédé reporté par Wang *et al.* [71], les techniques citées peuvent être combinées pour améliorer la séparation des constituants. Dans cet exemple précis, l'hydrolysat a d'abord été soumis à (i) une UF (conduisant à trois fractions), puis (ii) la fraction UF d'intérêt a été analysée par SEC (conduisant à 3 fractions) et enfin (iii) la fraction SEC d'intérêt a été injectée en SCX (conduisant finalement à 6 fractions). La **Figure 23** rend compte de l'efficacité de ce cheminement pour le criblage de l'activité recherchée.

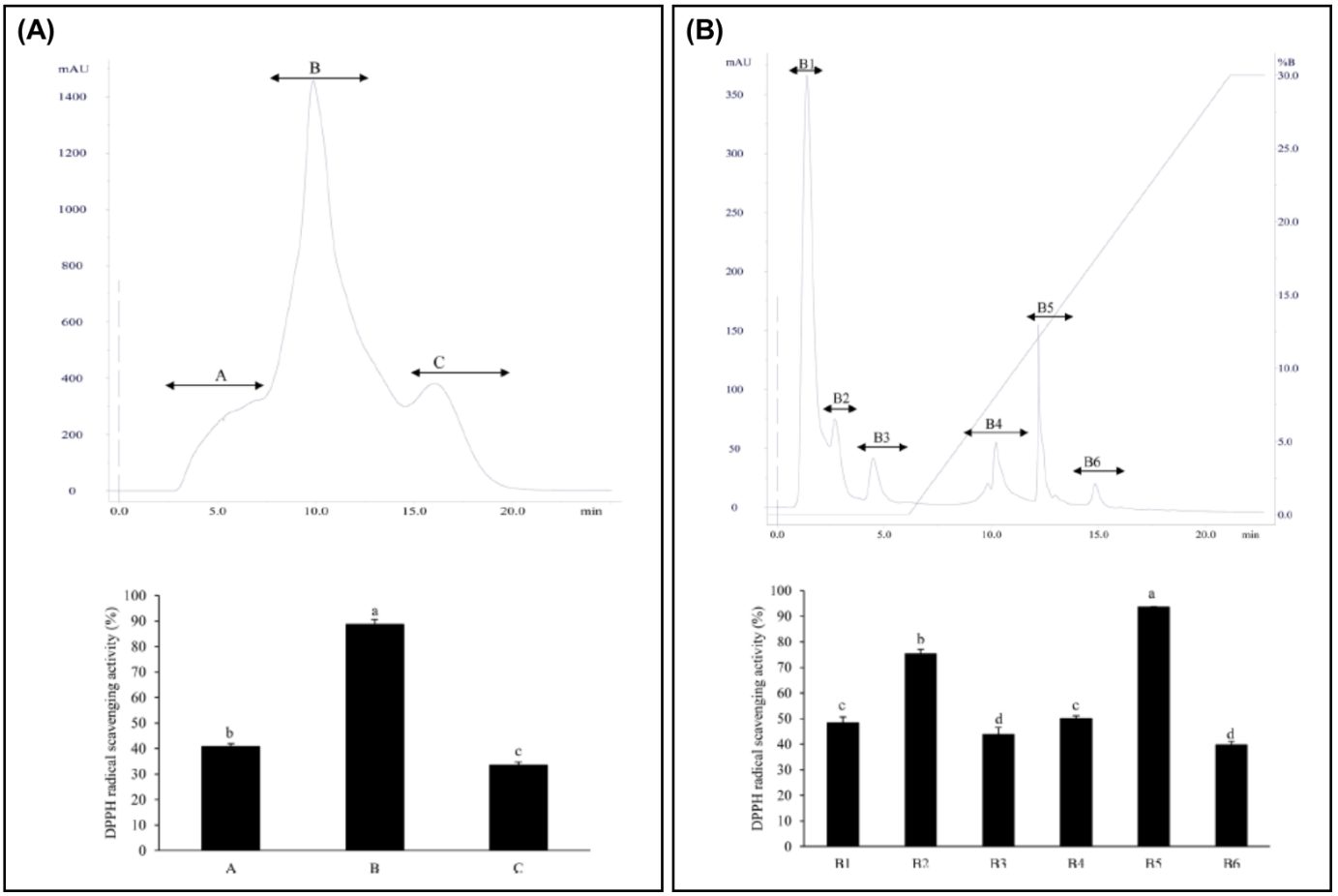



**Figure 23.** *Consécutivement à une étape d'ultrafiltration (UF) sur un hydrolysat protéique d'origine animale (canard) :* **(A)** Fractionnement de la fraction UF d'intérêt par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) et mise en évidence de l'activité de la fraction B, **(B)** Fractionnement de cette fraction B par chromatographie échangeuse de cations (SCX) et mise en évidence de l'activité de la fraction B5 [71].

2) Purification

La chromatographie liquide haute-performance (HPLC) intervient généralement dans la dernière étape du processus de fractionnement. Grâce à sa plus grande capacité de pics comparativement aux méthodes précédemment évoquées, cette technique permet de séparer –

idéalement en une seule analyse – les peptides contenus dans la fraction d'intérêt de l'hydrolysat.

▪ Mode RP-HPLC

De nombreux travaux récents ont mis en œuvre la chromatographie en phase liquide à polarité de phases inversée (RP-HPLC ou RPLC) pour purifier des peptides bioactifs, parmi lesquels des peptides antioxydants agissant par chélation des métaux [67] [68].

Classiquement, la séparation des peptides est réalisée à l'aide d'un gradient d'élution eau-acétonitrile, avec l'acide trifluoroacétique (TFA) comme « agent d'appariement d'ions » (IP-RP-HPLC) [67] [68] [86] [87] [88]. Dans ces conditions de phase mobile (pH < 2), les acides aminés basiques sont protonés au niveau de leur chaine latérale ($NH_3^+$), entrainant la formation de paires d'ions avec le TFA [89]. Les paires d'ions rendant alors les peptides globalement électriquement neutres, ceux-ci interagissent de manière plus efficace avec les chaines aliphatiques greffées (C18, C8, etc.). Parfois, la séparation est opérée selon un protocole RP-HPLC classique, soit en présence d'acide formique (à la place du TFA) [90] [91], soit en l'absence de tout additif [92] [93].

Dans un nombre important de cas, la méthode RPLC est appliquée après plusieurs étapes de préfractionnement (UF et SEC), permettant ainsi de récupérer des séquences peptidiques pures identifiables par MS/MS [87] [88] [90] [93] [94] (**Figure 24**). Après fractionnement par SCX et SEC, il est parfois nécessaire d'appliquer deux purifications RPLC successives pour obtenir un peptide pur identifiable par spectrométrie de masse [95].

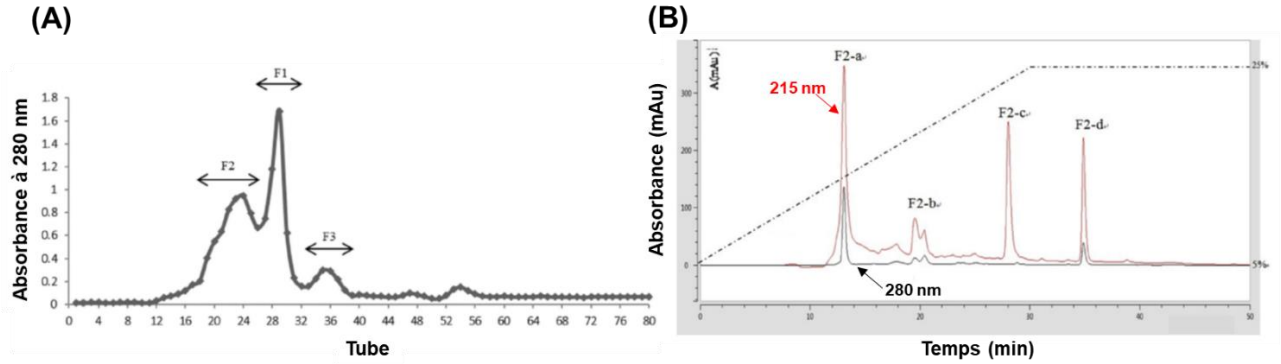



**Figure 24.** *Consécutivement à deux étapes d'ultrafiltration (UF) sur un hydrolysat protéique d'origine végétale (algue marine)* : **(A)** Fractionnement de la fraction UF d'intérêt par chromatographie d'exclusion de taille (SEC), **(B)** Fractionnement de F2 par RPLC (F2-a ayant révélé la présence d'un peptide unique par MS/MS) [93].

Quand le fractionnement de l'hydrolysat est exclusivement réalisé par RPLC (sans étape de préfractionnement), chaque fraction contient encore plusieurs peptides candidats qu'il convient d'identifier par LC-MS/MS [91] [96] (**Figure 25**).

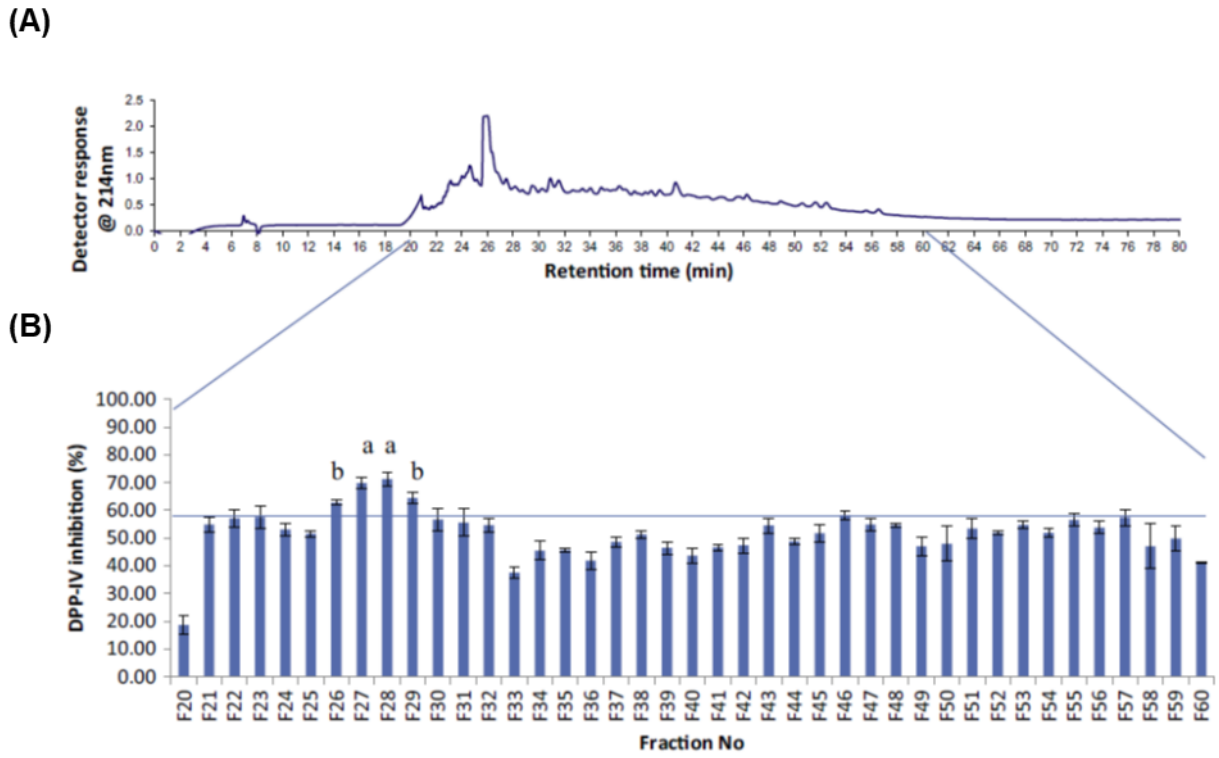



**Figure 25.** **(A)** Profil chromatographique chargé obtenu par un unique fractionnement RPLC d'un hydrolysat protéique d'origine végétale (algue marine) **(B)** Mise en évidence de l'activité particulière de la fraction F28 (dont l'analyse ultérieure par LC-MS/MS a révélé la présence de 14 peptides différents) [91].

▪ Mode HILIC

Depuis quelques années, la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) est de plus en plus utilisée pour analyser les peptides en mélange complexe [97] [98] [99]. Par rétention des composés polaires et chargés, ce mode séparatif est complémentaire de la méthode RP-HPLC. Une stratégie de purification bidimensionnelle, mettant en jeu un premier fractionnement par RPLC suivi d'un deuxième par HILIC, est parfois adoptée pour réduire de façon significative la complexité de l'hydrolysat [100]. Des modes de séparation mixtes (chromatographie d'interaction hydrophile-échange de cation ou HILIC-CEC [101], chromatographie zwitterionique-interaction hydrophile ou ZIC-HILIC [102]) ont également été développés pour améliorer la sélectivité des composés possédant un large panel de propriétés physico-chimiques, comme les peptides.

### 1.2.2. Test de chélation

La capacité de chélation d'un hydrolysat – ou de fractions brutes d'hydrolysat – est souvent évaluée par compétition avec une molécule de référence. Ainsi, le test à la ferrozine [81] (cf. **Tableau 6** et **Tableau 7**) et les tests au pyrocatéchol ou au murexide [61] [72] [103] sont respectivement réalisés dans le cas du fer ($Fe^{II}$) et du cuivre ($Cu^{II}$).

Un titrage colorimétrique est parfois mis en œuvre pour le zinc ($Zn^{II}$) et le fer ($Fe^{II}$) à l'aide d'un fort complexant tel que l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) [64].

Concernant le calcium ($Ca^{II}$), la capacité de chélation du mélange peptidique est habituellement mesurée par spectrophotométrie d'absorption atomique flamme (FAAS) [36] [104].

### 1.2.3. Test de pureté

En pratique, il n'y a pas – à proprement parler – de test de pureté effectué à la fin de chaque nouveau cycle de fractionnement (cf. le schéma théorique en **Figure 22**). À l'appui des exemples présentés plus haut, le principe est de soumettre l'hydrolysat à un protocole de fractionnement préétabli, intégrant une UF et des techniques analytiques couplées (orthogonales : SEC/RP, SCX/RP, RP/HILIC ; RP/RP) [105]. En général, plus les étapes de fractionnement sont nombreuses, plus la fraction peptidique finale est pure.

Cependant, pour des matrices extrêmement complexes – même après deux étapes chromatographiques à haute pression (RPLC puis HILIC) – les fractions bioactives peuvent encore contenir un nombre très important de peptides [100] (**Figure 26**).

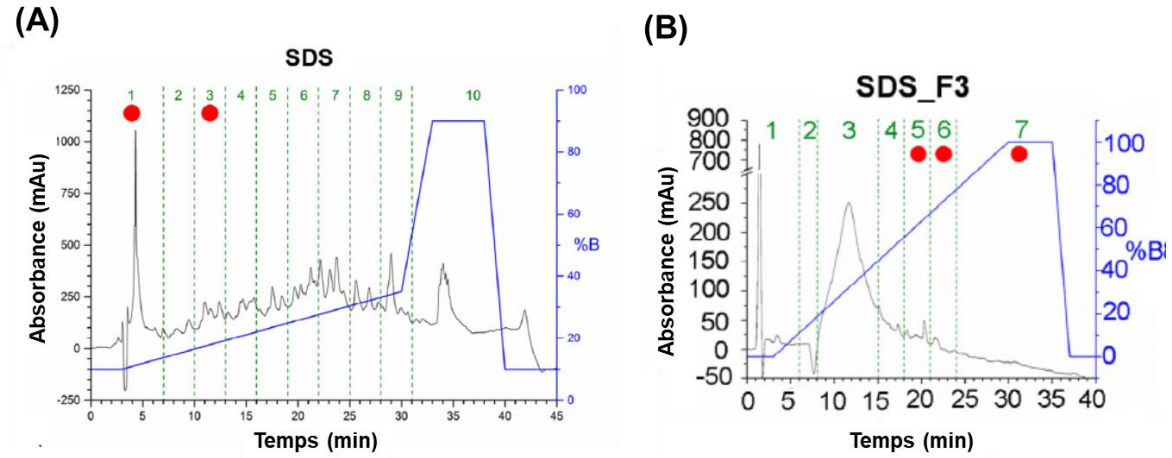



**Figure 26.** **(A)** Fractionnement RPLC d'un hydrolysat protéique d'origine végétale (choux fleur) avec 2 fractions d'intérêt mises en évidence (SDS_F1 et SDS_F3), **(B)** Fractionnement HILIC de SDS_F3 avec 3 fractions bioactives mises en évidence (5, 6, 7), dont l'analyse ultérieure par LC-MS/MS a révélé la présence de 303, 636 et 698 peptides, respectivement [100].

Enfin, la sélectivité apparente observée sur les chromatogrammes UV ainsi que l'aspect des pics ne sont pas des critères suffisants pour estimer la pureté. Pour preuve, nous montrons ci-dessous un profil UV220 obtenu lors du fractionnement RPLC d'un hydrolysat complexe (non préfractionné) : malgré la finesse des pics obtenus, de deux à quatre peptides différents ont été détectés sous chacun d'eux par spectrométrie de masse (**Figure 27**).

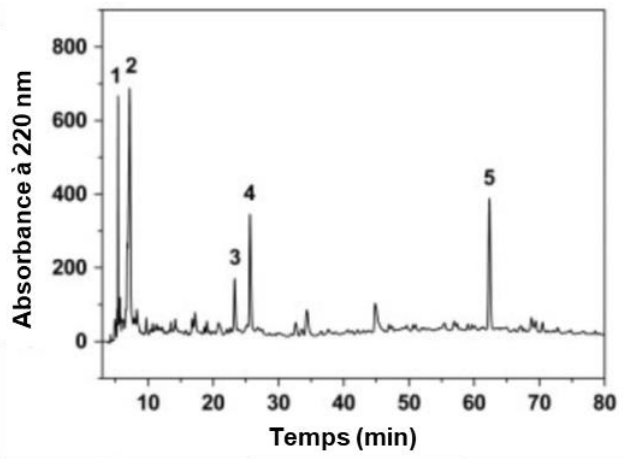



**Figure 27.** Fractionnement RPLC d'un hydrolysat protéique d'origine animale : 5 fractions *a priori* pures mais contenant chacune entre deux et quatre peptides (d'après les résultats d'identification obtenus par analyse MS/MS [96].

### 1.2.4. Identification

Comme souligné dans les exemples précédents, les peptides contenus dans les fractions d'intérêt sont généralement identifiés par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Grâce à sa sensibilité et sa facilité de mise en œuvre, cette technique a supplanté la méthode de dégradation d'Edman (parfois encore utilisée pour sa précision [106] [107]). La technique MS/MS permettant de séquencer les peptides en mélange, il n'est donc pas nécessaire d'entreprendre une purification longue et fastidieuse avant analyse (contrairement à la méthode d'Edman).

1) Spectromètres de masse

Deux principaux types d'instrumentation sont habituellement utilisés pour analyser et séquencer les peptides bioactifs :

▪ les spectromètres de type Maldi-ToF/ToF, associant une source à ionisation-désorption laser assistée par matrice (Maldi) avec un analyseur à temps de vol (ToF/ToF) [87] [88] [90] [94] [107] ;

▪ les spectromètres de type ESI-MS/MS, associant une source d'ionisation par électrospray (ESI) avec diverses combinaisons d'analyseurs :

- Q/ToF, combinant un analyseur quadripolaire (Q) avec un analyseur à temps de vol (associés à une cellule de collision quadripolaire) [92] [108] [109] [110] ;

- QqQ, combinant deux analyseurs quadripolaires (associés à une cellule de collision quadripolaire) [111] ;

- une trappe ionique de géométrie 3D (IT) [86] [112] [113] ou 2D (LIT) [114] ;

- une trappe ionique 2D (LTQ ™) associée à une trappe électrostatique à transformée de Fourier (Orbitrap ™), dans le cas du système hybride LTQ-Orbitrap ™ [115] [116] [117] ;

- ou bien encore un analyseur quadripolaire (Q) associé à une trappe électrostatique (Orbitrap ™), dans le cas du système Tribrid Orbitrap ™.

Ces analyseurs diffèrent fortement par leur résolution en masse (M/ΔM). Cette valeur est approximativement de 2000 pour un quadripôle (le moins résolutif), 5000 pour une trappe ionique, 20000 à 50000 pour un analyseur à temps de vol (ToF) et plus de 100000 pour les derniers modèles de trappe électrostatique (Orbitrap ™). Les analyseurs haute résolution (ToF, Orbitrap ™) mesurent la masse des ions avec une grande précision et justesse, permettant l'établissement de leur formule brute.

2) Analyse en tandem

Hormis pour la trappe ionique, qui réalise une fragmentation MS/MS temporelle (les ions restent au centre de la trappe lors du processus), toutes les autres configurations citées mettent en œuvre une fragmentation spatiale. J'en expose brièvement le principe : (i) les ions sont produits dans la source par Maldi ou électronébulisation (cf. **Étude bibliographique, II.1.2.3**), (ii) ils sont focalisés par une optique de transfert (suite de lentilles) jusqu'au premier analyseur, (iii) un ion particulier (de ratio m/z donné) est sélectionné qui poursuit son trajet vers la cellule de collision, (iv) à ce niveau, l'ion – dit précurseur – se fragmente par collision avec un gaz inerte (CID : Collision-Induced Dissociation), donnant ainsi naissance à des ions fils $MS^2$, (v) ces ions fils sont finalement éjectés selon leur ratio m/z grâce au deuxième analyseur (full scan $MS^2$), (vi) avant leur comptage par le système de détection (**Figure 28**).

Selon la nature du premier analyseur MS (Analyseur n°1), la collision CID se fera :

- à basse énergie (inférieure à 1 keV) dans le cas des systèmes Q/Q, Q/ToF, IT ou LIT ;

- à haute énergie (entre 1 et 20 keV) dans le cas des systèmes ToF/ToF et Orbitrap ™ (*via* la cellule HCD – Higher Collisional Dissociation – qui permet de fragmenter à plus haute énergie qu'en CID [118]).

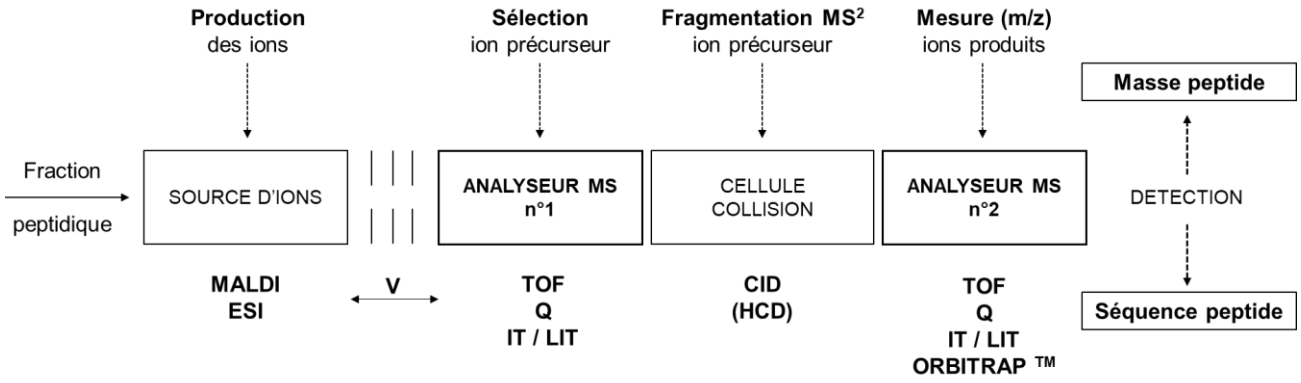



**Figure 28.** Schéma général d'un système de spectrométrie de masse en tandem.

3) Analyse directe et analyse couplée

▪ Analyse directe

Lorsque le fractionnement de l'hydrolysat est multidimensionnel, la technique Maldi-ToF-ToF est habituellement appliquée car le peptide est supposé suffisamment pur. C'est effectivement le cas dans plusieurs travaux qui aboutissent à l'identification d'un peptide unique par fraction [87] [90] [94] [107]. La technique ESI-Q/ToF est aussi utilisée dans ce même cas de figure [93].

▪ Analyse couplée

Lorsque le fractionnement est plus sommaire (une seule étape chromatographique à haute pression), une technique couplée est généralement mise en œuvre (LC-ESI-MS/MS). La plupart des études utilisant ce protocole reportent en effet un grand nombre de peptides identifiés dans la fraction bioactive [92] [100].

La phase séparative est presque exclusivement réalisée par RPLC et quelquefois en HILIC [99]. Ces deux modes sont parfaitement adaptés à un interfaçage avec la technique ESI-MS car les phases mobiles utilisées (i) ont une composition aqueuse-organique qui favorise la désolvatation (fort pourcentage de solvant organique en HILIC) et (ii) le plus souvent, ne comportent pas de sels minéraux non-volatiles.

En outre, les séparations RPLC ne sont quasiment jamais mises en œuvre avec du TFA (IP-RPLC) à cause de son effet suppresseur d'ions. L'acide formique [86] [91] [92] [100] et l'acide acétique [99] lui sont préférés pour acidifier la phase mobile et favoriser la protonation des fonctions amine.

4) Identification du (ou des) peptide(s) dans la fraction bioactive

▪ Détermination de la masse du (ou des) peptide(s)

Une première analyse de type MS permet d'accéder à la masse du (ou des) peptide(s) présents dans la fraction bioactive. Selon la résolution de l'analyseur utilisé, il sera possible d'accéder soit à sa masse nominale (± 0.2 u), soit à sa masse exacte (avec une précision et une justesse acceptables).

Quand l'échantillon est particulièrement complexe (nombreux peptides présents), un phénomène d'extinction du signal MS (suppression ionique) est souvent observé pour les espèces possédant une faible capacité d'ionisation (par compétition avec les espèces dont la capacité d'ionisation est plus grande) [97]. Dans ce cas de figure, il est préférable de recourir à une analyse couplée LC-ESI-MS/MS pour détecter un maximum de composés.

▪ Fragmentation d'un peptide

Une deuxième analyse de type MS/MS permet – grâce aux deux analyseurs en tandem – de fragmenter le peptide sélectionné. Comme indiqué en **Figure 29**, trois types de coupure peuvent se produire pour former des ions appartenant aux séries (i) a et x (cassure de type 1), (ii) b et y

(cassure de type 2) et (iii) c et z (cassure de type 3). Selon la résolution de l'analyseur (Analyseur MS n°2), les écarts entre fragments successifs – autrement dit les acides aminés – seront déterminés avec plus ou moins de précision (**Figure 30** : $b_9$-$b_8$, $b_8$-$b_7$, etc.).

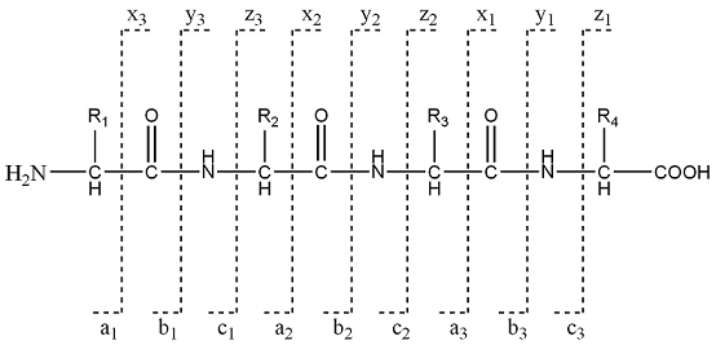



**Figure 29.** Sites de fragmentation potentiels d'un peptide par $MS^2$.

Dans le cas d'une collision CID, les séries d'ions b et y sont préférentiellement observées (**Figure 30**).

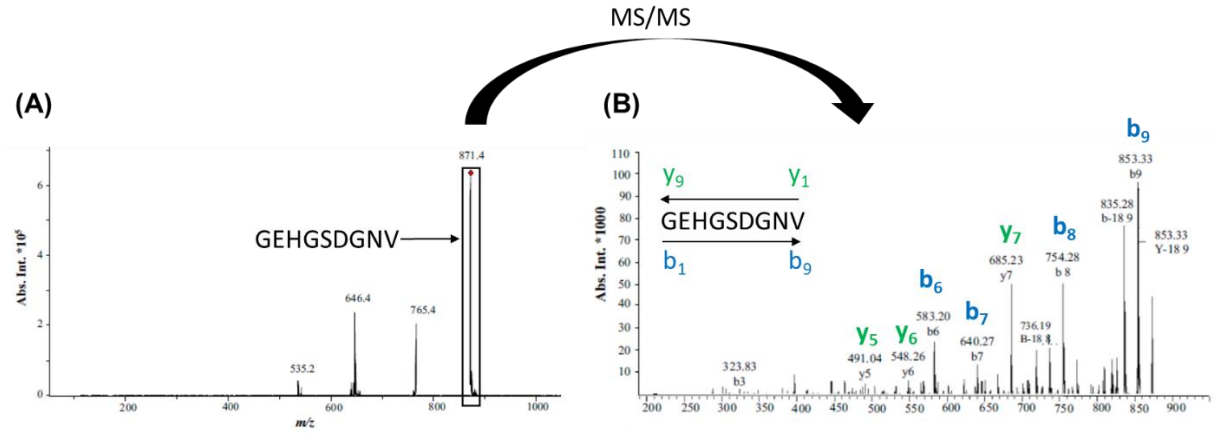



**Figure 30.** Fragmentation MS/MS du peptide GEHGSDGNV avec observation des ions fils $b_6$-$b_7$-$b_8$-$b_9$ et $y_5$-$y_6$-$y_7$ (mode CID : IT) [86].

Le mode CID basse énergie présente l'inconvénient majeur d'occasionner le réarrangement des ions dans la chambre de collision, ce qui conduit à des spectres $MS^2$ difficilement interprétables [119]. Le mode CID haute énergie permet de générer des spectres $MS^2$ plus informatifs grâce à la possibilité de fragmenter (i) les peptides (sous forme monoprotonée) contenant des acides aminés fortement basiques [120], (ii) les peptides de poids moléculaire élevé (égal ou supérieur à 3000 Da) [120] et (iii) les chaines latérales peptidiques [121].

Quoiqu'il en soit, la fragmentation CID produit généralement des séries d'ions b et y incomplètes (comme observé en **Figure 30**). Pour pallier ce problème, des modes de fragmentation spécifiques – ETD (Electron Transfer Dissociation) et ECD (Electron Capture Dissociation) – ont été développés pour améliorer significativement la couverture de séquence (observation des séries d'ions c et z) [122].

▪ Stratégies d'identification

La première stratégie est directement inspirée de l'approche protéomique classique. Lorsque le sujet d'étude (organisme végétal ou animal) est séquencé (génome), les données expérimentales MS – masse du peptide et spectre MS/MS – sont utilisées pour effectuer une recherche en bibliothèque. Cette méthode est très efficace (i) si la banque de données de protéines est complète [105], (ii) si l'enzyme de coupure est spécifique [105] et (iii) si les données MS et MS/MS ont été acquises à haute résolution [123].

Une deuxième stratégie – le séquençage *de novo* – est envisageable lorsque l'organisme n'est pas séquencé (cas de la plupart des végétaux). Il s'agit d'une identification *in silico* basée sur l'interprétation réelle des spectres MS/MS, dans le but de retrouver tous les acides aminés constitutifs. Dans ce cas, le profil de fragmentation doit nécessairement être complet pour remonter à l'intégralité de la séquence (intérêt des modes ETD et ECD).

Une approche bioinformatique a été développée afin de tirer profit de la masse exacte du peptide (obtenue sur un analyseur haute résolution comme l'Orbitrap $^{TM}$) [124]. À partir de cette valeur précise, les séquences potentielles sont calculées puis les fragmentations MS/MS correspondantes sont simulées ; elles seront *in fine* comparées avec le spectre MS/MS expérimental.

▪ Identification des peptides bioactifs

Au terme d'un protocole empirique idéal, aboutissant à une fraction peptidique pure (comme cela est mentionné en **Figure 22**), le peptide bioactif est identifié sans ambiguïté.

Souvent, la fraction active contient encore plusieurs peptides et, même après leur identification par spectrométrie de masse, il est impossible de déterminer avec certitude lequel (ou lesquels) d'entre eux est (sont) bioactif(s). Dans ce cas, des algorithmes (basés sur une stratégie de modélisation *in silico* vis-à-vis de l'activité ciblée) peuvent être appliqués pour faire ressortir les séquences potentiellement actives [100].

## 1.3. Analyse critique du protocole de criblage empirique

### 1.3.1. Points forts et opportunités

▪ L'avantage majeur de cette approche réside dans sa transposition aisée vers la phase industrielle de production des peptides bioactifs. En effet, les techniques mises en œuvre (UF, SEC, HPLC) sont disponibles aux échelles laboratoire, pilote et industrielle.

▪ De plus, les techniques utilisées sont simples, peu onéreuses et très répandues dans les laboratoires de recherche.

▪ Bien qu'elle soit moins résolutive que sa version analytique, la technique HPLC semi-préparative est idéale pour la purification des peptides bioactifs à l'échelle du laboratoire [86] [87] [88] [91] [92] [106]. Elle permet d'isoler les peptides candidats en quantité suffisante (pour les tests d'activité) et dans un délai modéré (quelques jours).

▪ Comme précédemment testé pour l'identification de peptides antioxydants [125], l'étape de fractionnement RPLC peut être couplée en ligne avec le test de bioactivité. Cette approche automatisée facilite l'étape de purification, mais ne réduit pas significativement la durée globale du processus. La purification automatisée peut être répétée plusieurs fois pour obtenir un peptide pur (avant son identification MS).

### 1.3.2. Points faibles

▪ Le protocole de criblage empirique – par les nombreuses étapes manuelles qu'il implique – est d'emblée long, répétitif et fastidieux.

▪ Dans le cas d'un hydrolysat très complexe (hydrolyse de plusieurs protéines en mélange), l'obtention d'un peptide pur bioactif pourrait nécessiter largement plus d'un mois de travail.

▪ En pratique, de nombreux travaux se « limitent » à identifier une liste de peptides candidats (contenus dans la fraction bioactive) et émettent des hypothèses quant aux séquences bioactives.

▪ Un autre problème de l'approche empirique est la faible sensibilité de détection. En effet, seuls les peptides présents en quantité suffisante peuvent être retenus pour les phases ultérieures de fractionnement.

▪ En cas d'absence de peptide bioactif dans le mélange testé, le protocole nécessitera un temps incompressible d'investigation (non rentable).

▪ Enfin, l'identification des peptides requiert l'utilisation d'un spectromètre de masse, ce qui représente un surcoût important par rapport aux techniques de routine mises en œuvre lors du fractionnement.

## 2. Protocole de criblage IMAC

Le criblage des peptides chélateurs de métaux est très couramment réalisé en mettant à profit leur capacité de complexation.

### 2.1. Principe

Un criblage sélectif des peptides chélateurs de métaux est effectué grâce à la chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC). Les phases mobiles mises en œuvre étant généralement non volatiles, il est nécessaire de procéder à un dessalage avant l'identification par spectrométrie de masse.

Les trois grandes étapes du protocole IMAC classique sont indiquées en **Figure 31**.

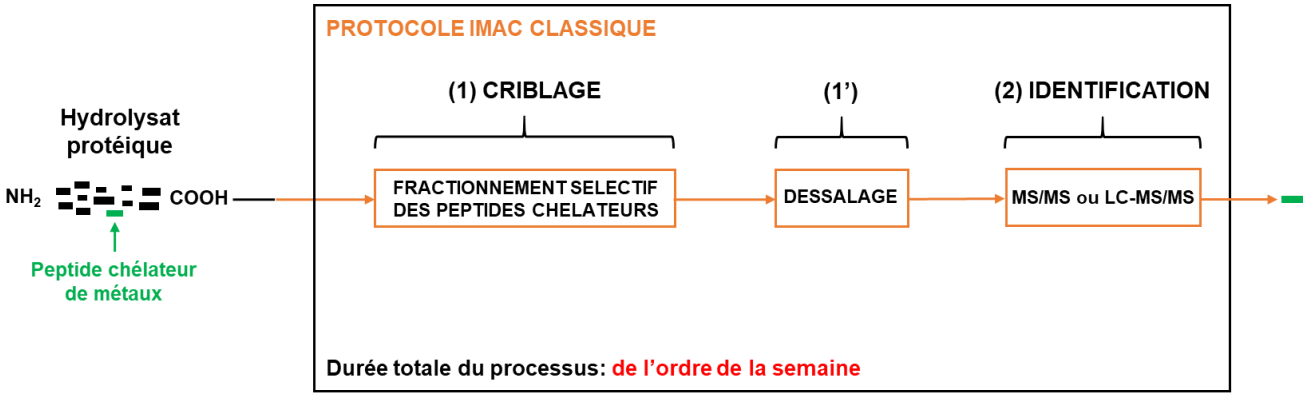



**Figure 31.** Protocole IMAC classique avec les phases de **(1)** Criblage des peptides chélateurs par fractionnement sélectif en IMAC, **(1')** Dessalage et **(2)** Identification des peptides d'intérêt par spectrométrie de masse en tandem.

## 2.2. Mise en œuvre

### 2.2.1 Présentation de la technique IMAC

La technique IMAC se fonde sur l'interaction entre des ligands – circulant dans la phase mobile – et un cation métallique immobilisé [126].

Comme indiqué en **Figure 32**, le support IMAC est composé d'un agent complexant polydenté – tel que l'acide nitrilotriacétique (NTA) tétradenté ou l'acide iminodiacétique (IDA) tridenté – greffé de façon covalente à une bille de résine *via* un bras espaceur. Après mise en contact avec une solution du métal à fixer, la phase stationnaire IMAC prête à emploi est obtenue (support greffé). Le cation métallique $M^{n+}$ immobilisé présente un nombre de sites accepteurs libres égal à son nombre de coordination (classiquement 6) soustrait de la denticité de l'agent complexant : soit 2 dans le cas du NTA (**Figure 32A**) et 3 dans le cas de l'IDA (**Figure 32B**).

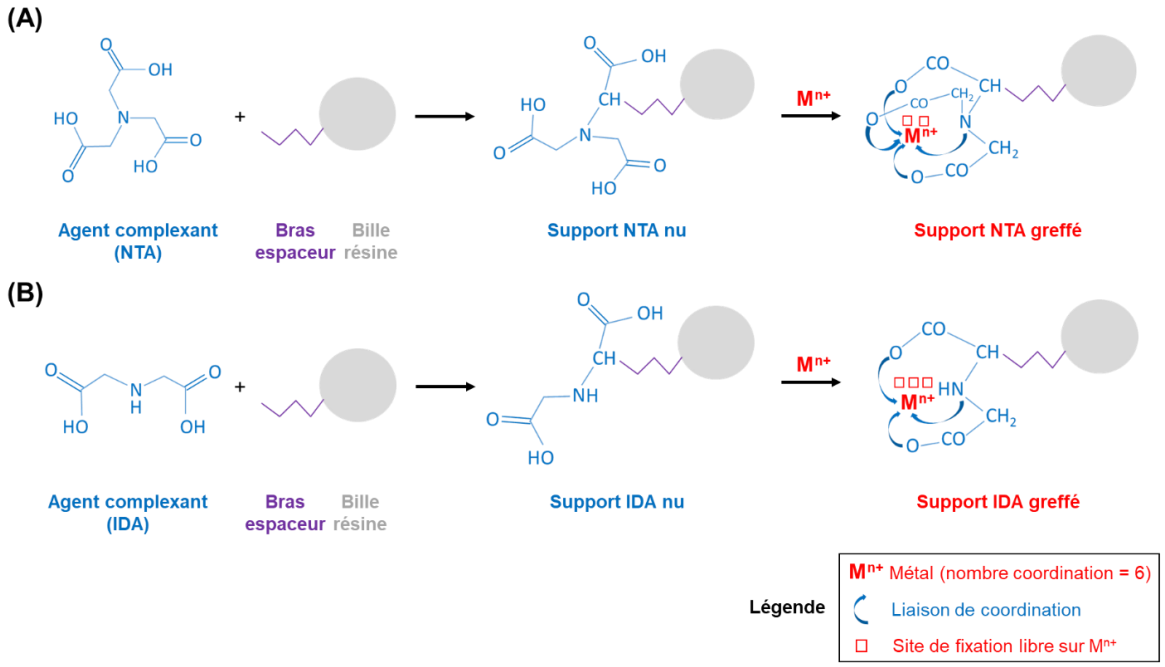



**Figure 32.** Structures du support nu (non greffé) et du support greffé (phase stationnaire IMAC prête à emploi) dans le cas des agents complexants classiques, à savoir **(A)** le NTA et **(B)** l'IDA.

La **Figure 33** donne le principe général du fractionnement IMAC en mode chromatographique : après le chargement en métal de la résine contenue dans la colonne (phase **A**), les ligands (peptides ou protéines) possédant des acides aminés et motifs chélateurs exposés en surface sont fixés par formation de liaisons de coordination entre les atomes donneurs du ligand et les sites accepteurs libres du métal (phase **B**) puis relargués dans un deuxième temps par l'intermédiaire d'un agent d'élution (phase **C**) [127].

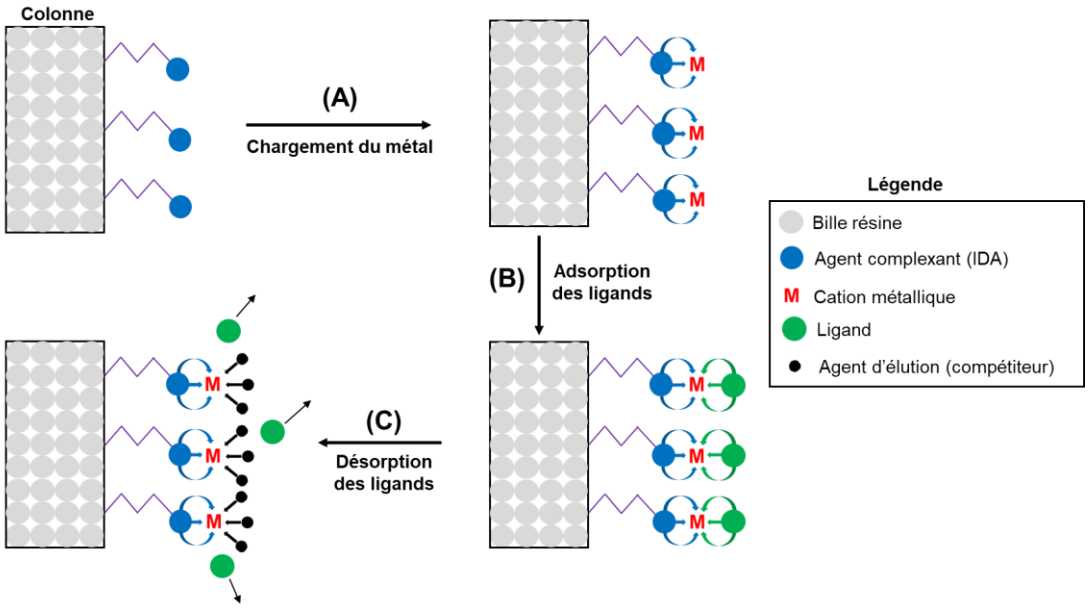



**Figure 33.** Principe général du fractionnement par chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC) dans le cas d'une élution par un agent compétiteur (*e.g.* imidazole)

### 2.2.2. Fractionnement

Une étude bibliographique de la technique IMAC – reposant essentiellement sur l'analyse des peptides et protéines – m'a permis de dresser trois tableaux de synthèse en **Annexe 3**, renseignant sur les paramètres clés du fractionnement et les stratégies mises en œuvre.

Ci-dessous, j'évoque les différentes étapes de l'analyse IMAC d'un hydrolysat protéique.

1) Préparation de la protéine

Dans certains cas, la protéine est chimiquement modifiée pour (i) améliorer l'efficacité de l'hydrolyse à venir (par réduction-alkylation pour casser les ponts disulfures [128] [129]) et (ii) optimiser le fractionnement, soit par méthylation des groupes COOH latéraux dans le cas des phosphoprotéines [130] [131], soit par déamidation en transformant les groupes amide des chaines latérales en groupes COOH [35] [36]).

2) Préparation de la phase stationnaire

▪ Résines

En référence aux premiers travaux de Porath *et al* en 1975 [132], les phases IMAC traditionnellement utilisées pour le fractionnement des peptides et protéines mettent en jeu des gels d'agarose le plus souvent greffés avec l'IDA [133].

Depuis, de nombreux types de résines ont été mis au point à base de cellulose [134], de chitine [135], de silice fondue [133] ou encore de polymères synthétiques [136] [137].

Si une large majorité des résines sont de nature réticulée et poreuse (polymères biosourcés), certains gels à cœur non poreux ont été développés pour améliorer la qualité du processus chromatographique. On peut par exemple citer des microsphères à base (i) de silice fondue (recouverte d'une fine pellicule rétentive) [133] et (ii) de styrène-divinylbenzène (doté de chaines polyacrylate greffées poly-IDA) [138]. Ce type de résine a donné naissance à des modes séparatifs HPLC directement dérivés de l'IMAC (avec transfert de charge rapide), à savoir la chromatographie d'interaction métallique (MIC) [133] et la chromatographie par chélation d'ions à haute performance (HPCIC) [139].

La plupart du temps, les colonnes sont préparées à l'aide d'un gel commercial (même si parfois, la résine est synthétisée par les utilisateurs eux-mêmes [64] [140] [129] [135]).

Des colonnes remplies avec un support pré-greffé [63] [141] [142] [143] ou non [138] [139] [144] [145] [146] sont disponibles chez certains fournisseurs.

▪ Agents complexants

En plus du NTA et de l'IDA, d'autres molécules sont parfois utilisées comme agents complexants pour tester leur impact sur l'adsorption des ligands : le tris(2-aminoéthyl)amine (TREN) tétradenté, le carboxyméthylaspartate (CM-Asp) tétradenté [147] ou encore le tris(carboxyméthyl)éthylènediamine (TED) pentadenté [148]. Plus la denticité de l'agent

complexant est grande, plus la sélectivité d'adsorption est élevée (car il y a moins de sites accepteurs libres sur le métal) ; à l'inverse, plus la denticité est faible, plus la capacité d'adsorption est grande (car il y a davantage de sites libres).

D'un point de vue pratique, un agent complexant de faible denticité retiendra moins fortement le métal, ce qui représentera un risque de fuite de ce dernier. Il peut être intéressant d'associer un agent complexant de forte denticité avec un métal dont le numéro de coordination est élevé (tel que l'ytterbium $Yb^{III}$ : 8/9) [145]. En effet, le métal est d'une part fortement retenu au support, et d'autre part, le nombre de sites accepteurs libres pour le ligand reste important.

▪ Choix du métal

Les métaux les plus couramment utilisés sont le nickel(II), le cuivre(II), le zinc(II), le cobalt(II), le fer(III), le calcium(II) et l'aluminium(III) [149].

Selon les principes de la théorie HSAB (cf. **Étude bibliographique, II.1.1.1**) :

- un métal de type acide dur de Lewis ($Fe^{III}$, $Ca^{II}$, $Ga^{III}$, etc.) sera logiquement sélectionné pour interagir avec des bases dures de Lewis (phosphate, carboxylate, sulfate, phénol, etc.) [150] ;

- un métal de type acide intermédiaire de Lewis ($Cu^{II}$, $Ni^{II}$, etc.) sera logiquement sélectionné pour interagir avec des bases intermédiaires de Lewis (imidazole de l'histidine, etc.).

Pour un fractionnement efficace, il est donc primordial de bien cibler – en amont – les groupes d'intérêt présents dans les peptides et protéines à isoler.

Les trois tableaux en **Annexe 3** indiquent, pour chaque étude citée, la dureté du métal vis-à-vis de celle du motif donneur visé : on constate que les stratégies adoptées sont globalement en accord avec la théorie HSAB. Pour les peptides non phosphorylés, cette conclusion est toutefois à nuancer : le choix du métal ne parait pas toujours adéquat vu les attentes des auteurs [64] [144] et parfois ce choix est réalisé sans viser de groupe donneur particulier [49] [61] [140].

▪ Chargement en métal

Les chlorures [128] [130] [131] et les sulfates [64] [129] [146] métalliques sont mis en œuvre de façon équivalente pour charger la résine.

La capacité de la colonne peut être évaluée par analyse frontale, en injectant des volumes croissants d'une solution d'un ligand standard [151].

Le contrôle du niveau de greffage est réalisé par une mesure AAS, après décrochage du métal de son support par un fort complexant (EDTA).

▪ Lavage de l'excès métallique

Ce lavage permet d'éliminer le métal lié de manière non-spécifique sur le support (donc faiblement lié).

Il peut être réalisé simplement avec de l'eau déionisée [64] [128] [151] [129] [135] [144] [146]. Souvent, ce lavage à l'eau est suivi d'une deuxième étape avec un complexant faible (formiate, acétate) [35] [36] [54] [60] [63] [134].

D'autres protocoles mettent en jeu une solution saline NaCl (0.5 M) combinée à un complexant faible (acétate [35] [63]) ou un complexant plus fort à faible concentration (phosphate à C < 50 mM [152] [153], imidazole à C < 50 mM [154]).

3) Équilibrage de la colonne

Les conditions d'équilibrage (pH et nature des phases) sont généralement similaires à celles utilisées pour l'adsorption des ligands sur la résine.

4) Adsorption

L'hydrolysat protéique brut est introduit en tête de colonne. Pour optimiser l'adsorption des ligands sur la résine, le pH de la solution d'injection est habituellement supérieur au p*K*a des groupes donneurs de doublets visés chez les peptides (et protéines).

5) Élution

▪ Nature des tampons d'élution

La majorité des éluants sont des tampons non volatiles à base de phosphates (monosodique, disodique, trisodique) ou de molécules sulfonées zwittérioniques (MES, HEPES et MOPS) dont l'intérêt est de minimiser l'interaction des ions du tampon avec l'agent complexant [154].

Afin de diminuer les interactions électrostatiques et privilégier les interactions spécifiques par complexation [147], les phases mobiles contiennent habituellement une forte concentration en NaCl (0.5 M).

Lorsque le NaCl est remplacé par de l'hydroxyde ou du chlorure d'ammonium ($NH_4OH$, $NH_4Cl$), la présence d'ammoniac $NH_3$ en solution (en équilibre avec $NH_4OH$ ou $NH_4Cl$) peut perturber la séparation par son effet compétiteur pour les sites métalliques [64].

Des interactions hydrophobes peuvent aussi se produire entre le ligand et le support [64] [147] [155]. Pour s'en affranchir, il est possible d'introduire une proportion de solvant organique (acétonitrile) dans le tampon [156] ou d'utiliser des supports recouverts d'une pellicule hydrophile [138].

Dans le cas des phosphopeptides, cependant, le fractionnement est réalisé avec des éluants volatiles tels que des tampons acétate d'ammonium [138] [151] [129] ou des mélanges eau-solvant organique en présence d'un acide (acide acétique [142], acide trifluoroacétique [156]).

▪ Mécanismes d'élution

L'élution est réalisée de manière séquentielle :

- dans un premier temps, les peptides (ou protéines) non retenus sont élués à l'aide d'un tampon de composition similaire à celui utilisé lors de la phase d'adsorption ;

- dans un deuxième temps, les peptides (ou protéines) retenus sont finalement élués.

Deux mécanismes différents peuvent être mis en jeu pour éluer les peptides (ou protéines) retenus : par compétition ou par protonation du ligand.

Les trois tableaux en **Annexe 3** indiquent la stratégie d'élution mise en œuvre dans chaque étude citée.

6) Régénération de la résine

Après chaque cycle de purification, la colonne est habituellement régénérée en pratiquant un décrochage des ions métalliques (stripping) à l'EDTA (10 à 50 mM) [54] [60] [144] [152] avant un rechargement du support avec le métal.

Pour certaines colonnes (modèle ProPac ™ IMAC-10, Dionex), la durée d'utilisation préconisée – sans effectuer d'étape de régénération – est supérieure à trois mois en conditions d'utilisation standard (*i.e.* avec un métal de nature adaptée).

Si le métal choisi ne fait pas partie des métaux classiquement mis en œuvre en IMAC (pour cause d'instabilité sur le support), une régénération systématique entre chaque échantillon étudié est indispensable.

### 2.2.3. Dessalage

Lorsque l'analyse IMAC met en jeu des tampons volatiles, comme c'est le cas pour les phosphopeptides, le dessalage des fractions n'est pas nécessaire pour réaliser une identification MS ultérieure. Pour ces derniers néanmoins, comme leur caractérisation est souvent lié à l'étude du phosphoprotéome, un piégeage sur pré-colonne RP est couramment pratiqué pour améliorer la sensibilité de détection MS [130] [131] [138].

Dans tous les autres cas (tampons phosphate, utilisation de compétiteurs comme l'imidazole, l'EDTA, etc.), il est obligatoire de réaliser une étape de dessalage.

Celle-ci peut être réalisée succinctement, à l'aide d'une résine échangeuse de cations (pour éliminer les ions sodium) [61], ou par passage sur une cartouche C18 à basse pression (pour retenir sélectivement les peptides) [60].

Plus fréquemment, un fractionnement RPLC est mis en œuvre pour réaliser cette étape de dessalage et les fractions les plus intéressantes sont identifiées par mesure de leur capacité de chélation (selon une stratégie analogue au protocole empirique) [36] [63] [64]. Cette démarche permet de sélectionner un nombre restreint de peptides fortement chélateurs pour l'étape d'identification MS (à titre d'exemple, six séquences ont été identifiées dans les travaux de Wang *et al.*, 2012 [64])

### 2.2.4. Identification

Cette étape est en tous points identique à ce qui a été précédemment décrit en **III.1.2.4 (Étude bibliographique).**

### 2.2.5. Cas pratiques

1) Fractionnement d'un peptide non phosphorylé

▪ Si le groupe donneur visé est l'imidazole de l'histidine, le métal utilisé est un acide de Lewis intermédiaire comme le nickel(II) ou le cuivre(II) :

L'adsorption est réalisée à un pH légèrement supérieur à 7 de façon à favoriser la déprotonation de l'imidazole ($pKa_{\text{imidazole}} = 7.0$) ;

L'élution est obtenue :

- soit par compétition avec l'imidazole (introduit à concentration constante ou croissante) [137], le pH restant inchangé par rapport à l'étape d'adsorption ;

- soit par protonation du peptide, suite à une diminution nette du pH [157] [158].

▪ Si le groupe donneur visé est le carboxylate, le métal utilisé est un acide dur de Lewis comme le fer(III) ou le calcium(II) :

L'adsorption est réalisée à un pH compris entre 4.4 et 8, de façon à favoriser la déprotonation des acides carboxyliques ($pK_{\text{COOH terminal}} = 2.0$ ; $pK_{\text{COOH latéral}} = 4.0$) ;

L'élution est le plus souvent obtenue par compétition avec des groupes phosphate (introduits à concentration constante [54] [60] ou en gradient [36]).

2) Fractionnement d'un peptide phosphorylé

Le groupe donneur visé est systématiquement le phosphate et le métal utilisé est presque toujours le fer(III) :

L'adsorption est réalisée à un pH bas (entre 2.5 et 3.5) de façon déprotoner les groupes phosphate ($pK_{\text{phosphate}} < 2.0$), sans toutefois déprotoner les acides carboxyliques portés par les chaines latérales des résidus d'acides aminés ($pK_{\text{COOH latéral}} = 4.0$) ;

L'élution est obtenue :

- soit par compétition avec les ions hydroxydes, suite à une augmentation nette de pH au-delà de 8.5-9.0 (saut de pH [151] [129] ou en mode gradient [128] [138]). Au-delà de pH 7, le greffage métallique est susceptible de se dégrader par formation de complexes insolubles $Fe(OH)_3$ ;

- soit par compétition avec des groupes phosphate [130] [131], ascorbate [142] ou trifluoroacétate [156], introduits à concentration constante.

Afin de fractionner les phosphopeptides avec davantage de spécificité, les phosphoprotéines sont parfois préalablement méthylées au niveau des groupes COOH afin d'éviter la coélution des peptides phosphorylés et non phosphorylés.

3) Fractionnement d'une protéine non phosphorylée

À la différence des peptides non phosphorylés, les protéines non phosphorylées sont systématiquement fractionnées par affinité avec un métal divalent de type acide de Lewis intermédiaire ($Cu^{II}$ ou $Ni^{II}$), en mettant à profit les groupes imidazole. En effet, la présence de régions riches en résidus histidine – et accessibles en surface [159] – est fréquente pour de nombreuses protéines [34].

L'élution est obtenue :

- soit par compétition avec l'imidazole (introduit à concentration constante [160] [161] ou croissante [147] [162]), le pH restant inchangé par rapport à l'étape d'adsorption (autour de 7) ;

- soit par protonation du peptide, suite à une diminution nette du pH jusqu'à une valeur de 4, opérée par paliers successifs [159] [163] ou par gradient linéaire [164].

## 2.3. Analyse critique du protocole de criblage IMAC

### 2.3.1. Points forts et opportunités

▪ En une seule séquence analytique, ce protocole reposant sur l'IMAC permet de cibler sélectivement les peptides chélateurs de métaux.

▪ Pour des applications standards (*i.e.* couple métal-ligand bien référencé), la technique IMAC est robuste et fiable.

▪ A la différence du protocole empirique, il est théoriquement possible d'identifier des peptides chélateurs présents à faible concentration dans l'hydrolysat (ces derniers seront retenus sur la résine IMAC au même titre que les peptides chélateurs présents à forte concentration).

▪ La technique IMAC a un coût faible.

▪ Une montée en échelle linéaire (du millilitre au litre de phase stationnaire) est envisageable pour une production industrielle (un modèle de colonne Ni-NTA à haut débit – plus de 50 litres de gel – est utilisé dans des procédés de production biopharmaceutique) [165].

▪ La durée d'un criblage basé sur le protocole IMAC classique est de l'ordre de la semaine (ce qui représente une avancée significative par rapport au protocole empirique).

▪ Dans le cas des phosphopeptides, l'identification MS peut être réalisée en ligne avec la séparation IMAC car les tampons sont volatiles (même si les applications sont limitées comme le montre le faible nombre de publications sur le sujet) [128].

▪ Dans le cas des peptides non phosphorylés, un protocole automatisé en ligne est envisageable pour (i) retenir sélectivement, (ii) dessaler et (iii) identifier par MS (sur un principe similaire au protocole mis en œuvre par Wang *et al.* pour (i) retenir sélectivement, (ii) enrichir et (iii) identifier des phosphopeptides [130]) (**Figure 34**).

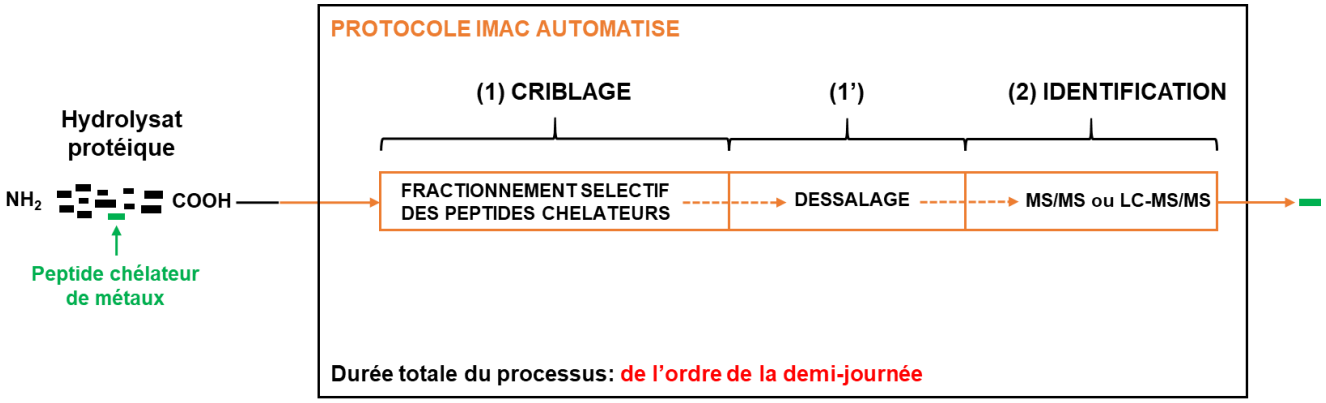



**Figure 34.** Protocole IMAC automatisé en ligne avec les phases de **(1)** Fractionnement sélectif des peptides chélateurs de métaux, **(1')** Dessalage et **(2)** Identification MS/MS.

### 2.3.2. Points faibles

▪ Le protocole IMAC classique requiert une succession d'étapes manuelles : fractionnement (chargement métallique, rinçage de l'excès métallique, équilibrage, adsorption, élution, régénération), dessalage (souvent par fractionnement RPLC suivi d'une mesure de la capacité de chélation) et identification MS/MS.

▪ Le fractionnement IMAC des peptides non phosphorylés demande une bonne évaluation préalable du couple métal-groupe donneur (en effet, les peptides non phosphorylés ne possèdent pas de groupe donneur aussi efficace et prédictible que les phosphopeptides et les protéines).

▪ L'utilisation d'un métal non conventionnel en IMAC peut s'avérer problématique (problème de stabilité sur le support) et empêcher la mise en place d'un criblage des peptides ayant une affinité pour ce métal.

▪ Si les peptides chélateurs présents à faible concentration dans l'hydrolysat sont effectivement retenus sur la résine, leur identification n'est pas assurée : (i) ils peuvent être perdus lors du fractionnement RPLC intermédiaire et (ii) un effet suppresseur d'ions peut se produire au niveau MS (impact des peptides présents à plus haute concentration).

▪ Le faible nombre de sites accepteurs libres sur le métal (classiquement 2 ou 3) peut représenter un biais pour évaluer la capacité de complexation d'un peptide (par comparaison à la complexation en solution : 6 sites accepteurs accessibles dans ce cas).

▪ La production à l'échelle industrielle est techniquement faisable, mais il faut faire attention à la fuite potentielle des cations métalliques (nocivité des métaux lourds) [165]. Ce phénomène est observé (i) si le métal a une constante de liaison faible avec l'agent complexant ou (ii) si une réaction de type MIT (Metal Ion Transfer) se produit comme cela peut être le cas avec le cuivre et le nickel (transfert du métal vers le peptide) [155].

▪ L'identification des peptides requiert quoiqu'il en soit l'utilisation d'un spectromètre de masse, ce qui représente un surcoût important par rapport aux techniques mises en œuvre lors du fractionnement.

## 3. Criblage des peptides chélateurs de fer

Pour les raisons évoquées dans le paragraphe précédent, le criblage des peptides chélateurs de fer est généralement réalisé par la technique IMAC (même si l'approche empirique est parfois adoptée [67] [68]).

### 3.1. IMAC-$Fe^{III}$

La technique IMAC-$Fe^{III}$ est généralement mise en œuvre pour le fractionnement des phosphopeptides et dans une moindre mesure pour celui des peptides non phosphorylés (cf. **Annexe 3**).

L'utilisation routinière des ions ferriques en IMAC provient (i) de leur sélectivité particulière pour les bases dures (propriété mise à profit pour isoler des biomacromolécules contenant des phosphates : phosphoprotéines, ADN) [166], (ii) de leur stabilité sur les supports à base de IDA et NTA (constante de liaison supérieure à celles des autres métaux: $Fe^{III} > Cu^{II} > Ni^{II} > Zn^{II} > Fe^{II}$) [167] et (iii) de leur inertie sur ces supports (pas de réduction en $Fe^{2+}$ dans ces conditions) [168].

La technique IMAC-$Fe^{III}$ est donc robuste, fiable et aisée dans sa réalisation. Notamment, elle ne nécessite pas de travailler en conditions inertes.

### 3.2. IMAC-$Fe^{II}$

La technique IMAC-$Fe^{II}$ est quant à elle rarement utilisée.

Cela s'explique par le fait que les ions ferreux sont (i) peu stables sur les supports IDA et NTA (constante de liaison inférieure à celles des métaux courants en IMAC) [167] et (ii) aussi fortement enclins à s'oxyder en ions ferriques même s'ils sont immobilisés sur le support [149] [166] [169].

Afin de conforter les résultats obtenus par IMAC-$Fe^{II}$, il apparait donc indispensable de réaliser des analyses contrôles par IMAC-$Fe^{III}$ et sur support IMAC nu (IDA ou NTA, en l'absence d'ions métalliques immobilisés) [167].

Dans des conditions maîtrisées, le fer(II) immobilisé s'avère intéressant car il apporte une sélectivité différente de celle obtenue avec le fer(III) greffé [167]. Porath et Olin ont souligné que le fer(III) et le fer(II) en IMAC montraient des comportements globalement différents concernant leurs propriétés d'adsorption [170]. Du point de vue purement analytique, la méthode IMAC-$Fe^{II}$ se positionne comme un outil complémentaire aux analyses IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$M^{II}$ (M = $Cu^{II}$, $Ni^{II}$, $Zn^{II}$, $Co^{II}$).

Ces dernières années, quelques travaux (menés au sein du même institut : College of Food Science of Engineering, Ocean University of China) ont mis en œuvre l'IMAC-$Fe^{II}$ pour fractionner des peptides non phosphorylés [49] [61] [140] (cf. **Annexe 3**). Ces analyses ont été *a priori* réalisées sans précautions particulières pour éviter l'éventuelle oxydation des ions ferreux en ions ferriques (conditions non inertes, pas d'expériences contrôles). Par ailleurs, on constate que l'élution des peptides retenus a été réalisée selon deux stratégies opposées : en assimilant le fer(II) soit à (i) un acide de Lewis intermédiaire, par protonation du ligand [61] ou par compétition avec l'EDTA à pH constant [140], soit à (ii) un acide dur de Lewis, par compétition avec les ions hydroxydes [49].

Étant donné le manque évident de recul sur la technique (aujourd'hui encore faiblement documentée), l'IMAC-$Fe^{II}$ doit être utilisée avec le maximum de précautions pour s'assurer de la fiabilité des résultats.

## 4. Conclusion

Une analyse comparée des deux approches de criblage discutées dans ce chapitre est donnée dans le **Tableau 8**.

**Tableau 8.** Comparatif des protocoles de criblage empirique et IMAC classique.

| CRITERES | Protocole de criblage **EMPIRIQUE CLASSIQUE** | Protocole de criblage **IMAC CLASSIQUE** |
|---|---|---|
| **Coût équipements de criblage** | **+** (UF, LC, HPLC: ≈ 100 kE) | **+** (LC, HPLC: ≈ 60 kE) |
| **Accessibilité équipements** | **+** (répandus) | **+** (répandus) |
| **Mise en œuvre** | **---** (fractionnements multiples) | **-** (semi-empirique) |
| **Durée totale** | **---** (de l'ordre du mois) | **-** (de l'ordre de la semaine) |
| **Spécificité** | **---** (aucune spécificité) | **++** (bonne spécificité) |
| **Sensibilité** | **-** (détection peptides très concentrés ) | **+** (risque de perte peptides peu concentrés) |
| **Efficacité** | **---** (liste de peptides candidats) | **+++** (liste de peptides chélateurs) |
| **Transposition purification** | **+++** (transposition aisée) | **++** (fuite éventuelle des ions métalliques) |
| **Surcoût séquençage** | **---** (achat système MS/MS: ≈ 200 kE) | **---** (achat système MS/MS: ≈ 200 kE ) |
| **Coût global équipements (criblage + séquençage)** | ≈ 300 kE | ≈ 300 kE |

On constate que le protocole IMAC classique est bien plus adapté que le protocole empirique pour cribler les hydrolysats protéiques. En effet, sa spécificité est un atout majeur qui permet d'améliorer la sensibilité et l'efficacité du processus. Ces avantages contribuent à diminuer sensiblement la durée du criblage, pour atteindre environ une semaine. Le protocole traditionnel, bien que fastidieux et chronophage, présente toutefois l'intérêt d'être plus aisément transposable pour une purification à grande échelle.

Dans les deux cas, l'identification du peptide nécessite l'utilisation d'un spectromètre de masse en tandem, ce qui représente un surcoût très important par rapport aux équipements dédiés au criblage.

# PARTIE 2 : OBJECTIF DE LA THÈSE

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux peptides chélateurs de fer pour leurs propriétés antioxydantes potentielles. En cas de stress oxydant, ces peptides doivent théoriquement permettre la séquestration intracellulaire des formes labiles du fer ($Fe^{II}$, $Fe^{III}$) afin de ralentir la production des ROS.

L'objectif de mon travail de thèse est de développer des méthodes innovantes pour le criblage et l'identification des peptides chélateurs de fer au sein des hydrolysats protéiques.

Par comparaison avec les deux approches de criblage précédemment discutées (**Figures 35A** et **35B**), le protocole visé devra idéalement être (i) **direct**, *i.e.* criblage et identification réalisés dans une seule et même étape analytique, (ii) **rapide**, pour un gain en temps substantiel, (iii) **sensible**, pour mettre en lumière des peptides chélateurs à basse concentration en mélange complexe, (iv) **robuste**, pour une bonne reproductibilité des résultats et (v) **fiable**, *i.e.* en accord avec les mécanismes de complexation fer-peptide (**Figures 35C**).

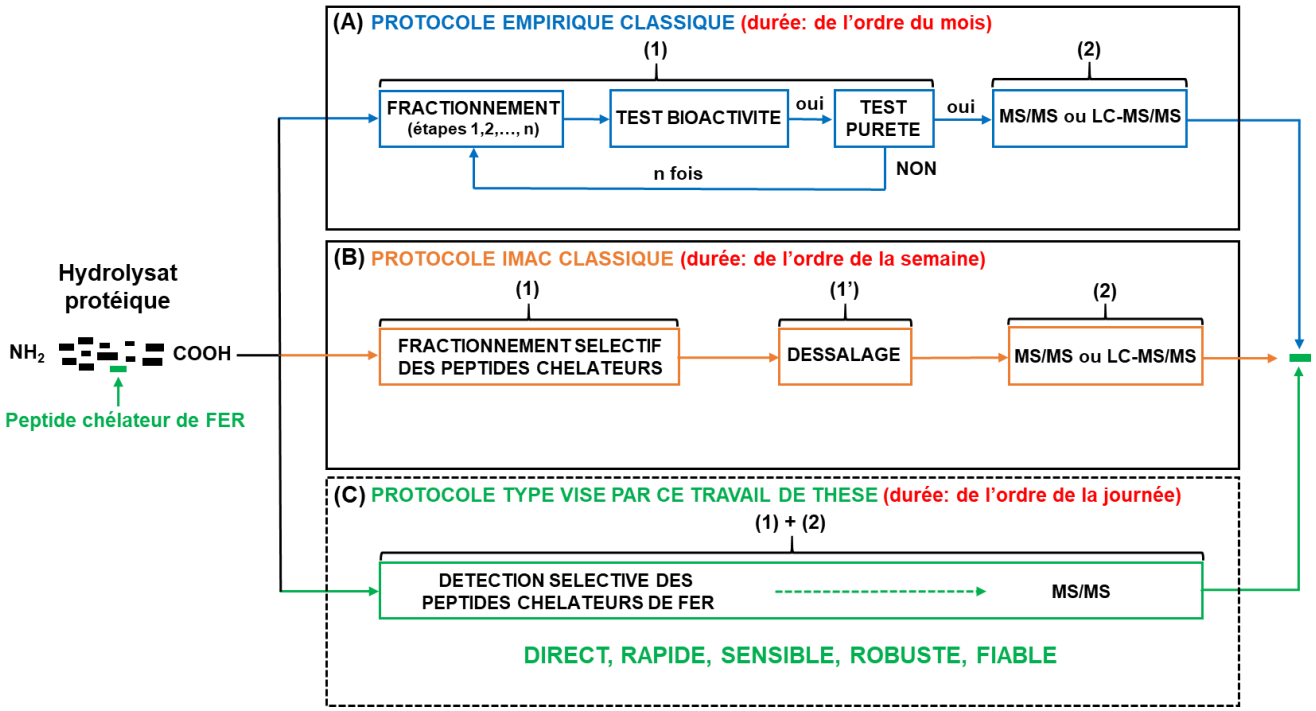



**Figure 35.** Vue d'ensemble des méthodes de criblage des peptides chélateurs de fer au sein des hydrolysats protéiques, avec **(A)** le protocole empirique classique multi-étapes, **(B)** le protocole IMAC classique à trois étapes et **(C)** le protocole type visé associant dans une seule et même étape les phases de **(1)** criblage et **(2)** identification des peptides chélateurs de métaux.

# PARTIE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 1. Produits chimiques et réactifs

### 1.1. Ligands de référence

La Terpyridine (96%, Acros Organics) et la desferrioxamine (sel de mésylate, > 92.5%, Sigma-Aldrich) ont été utilisées comme ligands de référence pour les manipulations avec le fer(II) et le fer(III), respectivement (cf. **Étude bibliographique, I.1.3.2**).

### 1.2. Peptides standards

#### 1.2.1. Liste des peptides standards

Les peptides se répartissent en 7 dipeptides (HI [1], HF [1], HK [1], HW [1], HH [1], CC [1], βAH), 30 tripeptides (DTH, DSH, DAH, DMH, EAH, GGH, RCH [1], GNH [1], CAH, RTH [1], HGH, HHH, GGHa, AGHa [2], RYN [1], RKR, RQR, LAN [1], IAN [1], NCS, KYS [1], NLS [1], CAC [1], IKP [2], IKW [2], WWW [2], DDD [2], DED, EEE [2], γECG [2]), 4 tétrapeptides (CAAC [1], YPISL [2], FDDDK [2], FDDDA [2]), 1 hexapeptide (HHHHHH [2]), 1 décapeptide (LLPHHADADY [2]) et 1 acide aminé (G).

Parmi ces peptides, 39 ont été achetés auprès de GeneCust (Dudelange, Luxembourg), avec une pureté supérieure à 95%. Deux peptides (βAH et γECG) ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), avec une pureté supérieure à 98%. Deux peptides (FDDDK, FDDDA) ont été synthétisés au Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, avec une pureté supérieure à 98% [76].

[1] : peptides uniquement utilisés dans le cadre du protocole de criblage IMAC (soit 31 peptides standards mis en œuvre pour développer le protocole IMAC)

[2] : peptides uniquement utilisés dans le cadre du protocole de criblage IP-RPLC-MS (soit 27 peptides standards mis en œuvre pour développer le protocole IP-RPLC-MS)

#### 1.2.2. Critères de choix

Les expériences ont été réalisées sur un panel relativement large de peptides standards non phosphorylés présentant des tailles de 2 à 10 résidus d'acides aminés et des séquences variées. Dans l'optique d'une administration *per os* (pour des traitements nutraceutiques et/ou thérapeutiques), une majorité de di- et tripeptides ont été sélectionnés (37/43) pour leur biodisponibilité [171] (**Annexe 2** : dans le paragraphe traitant du comportement *in vivo* des peptides actifs).

Les séquences peptidiques ont été choisies d'après notre étude bibliographique sur les peptides chélateurs du fer, dont les résultats principaux sont récapitulés ci-dessous (**Tableau 9**).

**Tableau 9.** Groupements et motifs reportés dans la littérature comme complexants du fer(II) et du fer(III).

| | **$Fe^{II}$** (1)<br>**acide Lewis**<br>**INTERMEDIAIRE** | **$Fe^{III}$** (2)<br>**acide Lewis**<br>**DUR** |
|---|---|---|
| **GROUPEMENTS COMPLEXANTS PREFERENTIELS**<br><br>**→ FORTE STABILITE** | **bases Lewis intermédiaire**<br>imidazole (His)<br>$NH_2$ term<br>amide (Gln) | **bases Lewis dures**<br>phosphate (phosphopeptides)<br>$COOH_{latéral}$ (Asp, Glu)<br>$NH_{2\ latéral}$ (Lys)<br>$COOH_{term}$ |
| **groupements complexants possibles**<br><br>→ FAIBLE STABILITE | **bases Lewis dures**<br>OH (Ser, Tyr)<br>$COOH_{latéral}$ (Asp, Glu)<br>$NH_{2\ latéral}$ (Lys, Arg)<br>C=NH (Arg)<br>$COOH_{term}$<br><br>**bases Lewis molles**<br>SH (Cys) | **bases Lewis intermédiaires**<br>imidazole (His)<br>$NH_2$ term<br>amide (Gln) |
| **MOTIFS COMPLEXANTS** (3) | **HISTAMINYL** (His en N-term)<br>MACROCHELATE (His en C-term) | **TRIACIDE** (DDD, EEE…)<br>MACROCHELATE (His en C-term) |

(1) tiré du **Tableau 7** traitant de la complexation du fer(II) par les peptides
(2) tiré du **Tableau 6** traitant de la complexation du fer(III) par les peptides
(3) tiré du paragraphe **II.1.1.3** renseignant les motifs complexants rencontrés chez les peptides

Une part importante des peptides standards sélectionnés (20/43) contient au moins un résidu histidine pour favoriser la complexation avec le fer(II), parmi lesquels :

- 4 dipeptides avec un résidu His en position N-terminale (motif bidenté histaminyl) ;

- 1 dipeptide et 10 tripeptides avec un résidu His en position C-terminale (motif bidenté « macrochélate » impliquant imidazole et COOH terminal de His), parmi lesquels 7 sont aussi pourvus d'un résidu avec une chaine latérale complexante (Asp, Glu, Cys) ;

- 3 peptides uniquement composés d'histidine pour évaluer l'impact du nombre de résidus His sur la capacité de chélation (di-His, tri-His et hexa-His).

Une autre part importante des peptides standards (12/43) contient au moins un résidu acide (D, E) pour favoriser la complexation avec le fer(III), parmi lesquels :

- 5 tripeptides avec un seul résidu acide (en association avec une histidine en C-terminal) ;

- 3 tripeptides et 2 pentapeptides avec un motif de trois résidus acides successifs (motif tétradenté impliquant le COOH terminal et les 3 COOH latéraux) ;

- 1 décapeptide contenant 2 résidus acides séparés par un résidu non complexant (Ala).

Enfin, 2 tripeptides comportent en dernière position un résidu d'acide aminé histamine (porteur du groupe imidazole), en association avec des résidus non complexants (Gly, Ala).

## 1.3. Hydrolysats

Deux types d'hydrolysat ont été utilisés pour développer nos protocoles analytiques, à savoir un hydrolysat synthétique correspondant à un mélange de peptides standards et un hydrolysat réel (hydrolysat trypsique de caséines).

### 1.3.1. Hydrolysat synthétique

L'hydrolysat synthétique a été obtenu par mélange de 13 peptides, à savoir γECG, NCS, IKP, DDD, DED, EEE, HHH, IKW, RKR, RQR, YPISL, HHHHHH et LLPHHADADY. Cinquante µL de chaque solution mère (10 $g \cdot L^{-1}$) ont été prélevés puis rassemblés pour obtenir un mélange à 0.77 $g \cdot L^{-1}$ par peptide. Ce mélange a ensuite été dilué 10 fois avec de l'eau pour obtenir l'hydrolysat synthétique à 0.077 $g \cdot L^{-1}$ par peptide, équivalent à une concentration totale en peptide de 1 $g \cdot L^{-1}$ (**Tableau 10**).

**Tableau 10.** Concentrations molaires des peptides dans l'hydrolysat synthétique (chacun des 13 peptides ayant une concentration massique de 0.077 $g \cdot L^{-1}$, la concentration totale en peptides est de 1 $g \cdot L^{-1}$).

| Peptide | γECG | NCS | IKP | DDD | DED | EEE | HHH | IKW | RKR | RQR | YPISL | 6H | LLPHHADADY |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **M** | 307 | 322 | 356 | 363 | 377 | 405 | 429 | 445 | 458 | 458 | 591 | 840 | 1150 |
| **[Pep] (mM)** | 0.25 | 0.24 | 0.22 | 0.21 | 0.20 | 0.19 | 0.18 | 0.17 | 0.17 | 0.17 | 0.13 | 0.09 | 0.07 |

### 1.3.2. Hydrolysat trypsique de caséines

L'hydrolysat trypsique de caséines a été préparé à une concentration totale en peptide de 1 $g \cdot L^{-1}$. Le caséinate de sodium issu de lait de vache (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a été solubilisé à 5 $g \cdot L^{-1}$ dans du bicarbonate de sodium (50 mM, pH 8.0). La trypsine (EC 3.4.21.4) issue de pancréas bovin et traitée à la L-1-tosylamide-2-phényléthylchlorométhylcétone (10000 ester éthylique de Nα-benzoyl-L-arginine hydrochloré ou unités BAEE·$mg^{-1}$ enzyme ; Sigma-Aldrich) a été ajoutée à 50 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Après hydrolyse à 37 °C sous agitation douce pendant 2 h, la réaction a été arrêtée en abaissant le pH à environ 2.0 avec de l'acide trifluoroacétique. L'hydrolysat dessalé a été centrifugé à 10000 g pendant 2 min à 4 °C, puis lyophilisé et conservé à –20 °C.

## 1.4. Produits pour la chromatographie

### 1.4.1. Analyses IMAC

Les différents éluants chromatographiques ont été préparés à l'aide d'eau ultrapure (système Purelab Flex Pure Water, Elga-Véolia), d'acide acétique (qualité analytique, Fisher Chemical), d'acétate d'ammonium (qualité analytique, Fisher Chemical) et d'hydroxyde d'ammonium (qualité analytique, 28%, Prolabo).

Les phases stationnaires ont été préparées à l'aide de chlorure ferrique $FeCl_3$ (97%, Sigma-Aldrich), de chlorure ferreux $FeCl_2$ (98%, Sigma-Aldrich), d'EDTA (> 99%, Sigma-Aldrich), de NaCl (99.7%, VWR Prolabo) et d'acide formique (98-100%, Fischer Chemical).

#### 1.4.2. Analyses IP-RPLC

Les différents éluants chromatographiques ont été préparés à l'aide d'eau ultrapure (système Purelab Flex Pure Water, Elga-Véolia), de méthanol de qualité LC-MS (≥99.9%, Carlo Erba), d'acétonitrile de qualité LC-MS (≥99.9%, Carlo Erba), d'acide nonafluoropentanoique (NFPA, 97%, Sigma-Aldrich) et d'acide trifluoroacétique (TFA, 99.0%, Acros Organics).

### 1.5. Préparation des solutions IMAC

#### 1.5.1. Solutions de greffage

▪ Solution de greffage du fer(III)

La solution de greffage du fer(III) a été obtenue par solubilisation de $FeCl_3$ (25 mM) en présence d'un excès d'acide acétique (100 mM) (cf. **Étude bibliographique, I.1.3.3**, **Figure 9**).

La quantité nécessaire de chlorure ferrique (1.01 g) a été solubilisée dans 1.5 mL d'acide acétique glacial, puis de l'eau ultrapure a été ajoutée peu à peu sous agitation jusqu'à 250 mL. Une double filtration (0.20 µm) a ensuite été réalisée de façon à éliminer les traces éventuelles d'insolubles (pH 1.90). La solution de greffage a été transférée et stockée dans une bouteille en verre transparent. La stabilité de la solution ferrique a été contrôlée au cours du temps (i) d'après l'aspect visuel de la solution (orangé et parfaitement homogène) et (ii) par un dosage ICP-OES réalisé à intervalles réguliers durant la période correspondant aux expériences IMAC (cf. **Matériel et méthode, 4.2.3**).

▪ Solution de greffage du fer(II)

La solution de greffage du fer(II) a été obtenue par solubilisation de $FeCl_2$ (25 mM) en présence d'un excès d'acide acétique (100 mM).

La quantité nécessaire de chlorure ferreux (0.76 g) a été solubilisée dans 1.5 mL d'acide acétique glacial, puis de l'eau ultrapure a été ajoutée peu à peu sous agitation jusqu'à 250 mL. Une double filtration (0.20 µm) a ensuite été réalisée de façon à éliminer les traces éventuelles d'insolubles (pH 2.71). Après un bullage de 5 minutes à l'hélium, la solution d'acétate ferreux a été transférée dans une bouteille en verre transparent. Une purge à l'azote a également été appliquée au niveau du col de la bouteille de façon à supprimer toute trace d'oxygène et ainsi éviter l'oxydation du fer(II) en fer(III) pendant le stockage. La stabilité de la solution ferreuse a été contrôlée au cours du temps (i) d'après l'aspect visuel de la solution (incolore et parfaitement homogène) et (ii) par un dosage ICP-OES réalisé à intervalles réguliers durant la période correspondant aux expériences analyses IMAC (cf. **Matériel et méthode, 4.2.3**).

### 1.5.2. Solution de lavage

La solution de lavage des colonnes IMAC est une solution d'acide formique (20 mM), préparée en diluant 750 µL d'acide formique glacial dans l'eau ultrapure (qsp 1000mL) (pH 2.73).

### 1.5.3. Solution de stripping

La solution de stripping – utilisée pour décrocher les ions métalliques – est une solution d'EDTA (50 mM) et de NaCl (0.5 M), préparée en solubilisant 14.6 g EDTA et 29.2 g NaCl dans de l'eau ultrapure (qsp 1000mL) (pH 4.26).

### 1.5.4. Phases mobiles

La préparation des quatre éluants chromatographiques est décrite ci-après. Un tampon d'acide acétique pH 3.0 (0.1 M) a été préparé par dilution de 3 mL d'acide acétique avec de l'eau ultrapure (qsp 500 mL). Un tampon d'acétate d'ammonium pH 7.4 a été préparé à partir d'un tampon acétate ammonium pH 7.0 et d'ammoniaque $NH_3$ aqueux (2.5%). Un tampon d'acétate d'ammonium pH 9.0 a été préparé à partir d'un tampon acétate ammonium pH 7.0 et d'ammoniaque $NH_3$ aqueux (10 et 28%). Enfin, un tampon d'acétate d'ammonium pH 10.0 a été préparé à partir d'un tampon acétate ammonium pH 7.0 et d'ammoniaque $NH_3$ aqueux (10 et 28%).

Le tampon acétate d'ammonium pH 7.0 (0.1%, w/v) a été initialement préparé en solubilisant 1 g d'acétate d'ammonium dans l'eau ultrapure (qsp 1000 mL).

## 2. Système LC-MS

Les analyses LC-MS ont été réalisées sur un système UHPLC-MS (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) comportant une pompe quaternaire (U3000 ™) connectée à un détecteur à barrette de diodes (PDA) et à un spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap ™. Le premier analyseur MS (LTQ ™) est une trappe ionique linéaire basse résolution, et le second (Orbitrap ™) est une trappe électrostatique haute résolution à transformée de Fourier (résolution maximale de 100000 à m/z = 400).

## 3. Caractérisation de l'hydrolysat caséique

Une caractérisation partielle de l'hydrolysat caséique a été réalisée sur le système LC-MS décrit plus haut (cf. **Matériel et méthode, 2**).

Dix microlitres d'hydrolysat trypsique de caséines (5 $g \cdot L^{-1}$) ont été injectés sur une colonne en phase inverse C18 Alltima (150×2.1 mm, 5 µm - Grace/Alltech, Darmstadt, Allemagne) équipée d'une pré-colonne C18 Alltima (7.5×2.1 mm, 5 µm) et disposée dans un four à 25 °C. Le débit était de 0.2 $mL \cdot min^{-1}$ et les phases mobiles étaient constituées d'un mélange de A:

solution aqueuse de TFA (0.1%) et de B: acétonitrile avec TFA (0.1%). Les peptides d'hydrolyse ont été séparés grâce à un gradient linéaire de 5 à 98% de B en 50 min. L'analyse MS a été réalisée en mode ESI positif ($ESI^+$). La tension d'électrospray était de 5.0 kV. La température capillaire était de 300 °C. Les débits des gaz de nébulisation, auxiliaire et de focalisation ont été fixés à 40, 10 et 10 (unités arbitraires), respectivement. La tension capillaire était de 36 V. Les tensions des lentilles tube lens, split lens et front lens étaient de 80 V, -44 V et -3.25 V, respectivement. Les paramètres de l'optique de transfert ont été préalablement optimisés par infusion (5 $\mu L \cdot min^{-1}$) d'une solution standard du tétrapeptide LQKW (0.1 $g \cdot L^{-1}$) dans le flux de la phase mobile (A/B : 50/50). Les spectres MS full scan (120 à 2000 m/z) ont été acquis à haute résolution (R = 60000 à m/z 400) sur l'analyseur Orbitrap™ pour accéder aux masses exactes des peptides. Les données brutes ont été traitées à l'aide du logiciel XCALIBUR ™ (version 2.1, http://www.thermoscientific.com).

D'après les travaux de *Hart et al.*, 2002 [172], six phosphopeptides et deux peptides non phosphorylés possédant des résidus d'acides aminés acides ont pu être identifiés (et leurs séquences validées grâce à la base UniProt) (cf. **Annexe 4**).

## 4. Protocole IMAC-MS

### 4.1. Colonne IMAC

La colonne ProPac IMAC-10 (ThermoFisher Scientific), de dimensions 2×50 mm (10 µm), a été utilisée. Le support est constitué de billes non poreuses dotées d'un cœur imperméable en styrène-divinylbenzène, recouvert de chaines polyacrylate (120 nm) greffées poly-IDA. D'après les informations de la fiche technique, cette couche réticulée hydrophile permet de prévenir les interactions hydrophobes entre les ligands et le cœur. Lors de l'activation par un métal, les chaines acrylates s'effondrent en surface de la bille pour former des nanoparticules compactes de 2-5 nm (équivalent à la taille moyenne d'une protéine).

Selon le fournisseur, la capacité de charge spécifique est de 40 µmol de $Cu^{2+} \cdot g^{-1}$ résine et la masse totale de résine contenue dans la colonne est de 0.112 g. La capacité de charge théorique de la colonne est donc de 4.48 µmol de $Cu^{2+}$ (0.112×40), soit par transposition directe 4.48 µmol de $Fe^{2+}/Fe^{3+}$. D'après cette hypothèse, la capacité de charge théorique en masse de peptide est approximativement de $1.34 \times 10^{-3}$ g en considérant une masse moyenne de 300 $g \cdot mol^{-1}$ pour un peptide.

### 4.2. Préparation et régénération du support greffé, contrôle du greffage

Ces manipulations ont été réalisées sur une chaine HPLC dédiée pour éviter tout dépôt métallique dans le système de pompage du système LC-MS (cf. **Matériel et méthode, 2**). Les analyses IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$ ont été réalisées sur deux colonnes distinctes afin de garantir au mieux la spécificité du greffage.

Des procédures similaires ont été mises en œuvre pour les deux types de greffage :

- le greffage $Fe^{III}$ réalisé conformément aux instructions de la fiche technique de la colonne (cf. **Annexe 5**)

- et le greffage $Fe^{II}$ réalisé par défaut selon le protocole de greffage $Fe^{III}$ (en l'absence de spécifications pour ce cation sur la fiche technique)

Dans le cas du greffage $Fe^{II}$, les manipulations ont été réalisées en conditions inertes (hormis la première série d'expériences), *via* un bullage minutieux à l'hélium des différentes solutions (greffage, lavage, stripping) juste avant leur utilisation (cf. **Annexe 6**).

### 4.2.1. Préparation du support greffé (chargement)

L'immobilisation des ions métalliques sur le support a été réalisé selon les étapes suivantes :

- rinçage des voies A et B à l'eau ultrapure

- rinçage de la voie A avec la solution de chargement en fer ($FeCl_3$ ou $FeCl_2$, 25 mM)

- rinçage de la voie B à l'acide formique (20mM)

- installation de la colonne (équipée de son préfiltre) sur le système HPLC

- lavage de la colonne à l'acide formique (20mM) pendant 3 min à 0.2 $mL \cdot min^{-1}$ (0.6 mL, volume légèrement supérieur aux 3 volumes de colonne préconisés : 0.47 mL)

- chargement de la colonne avec la solution de fer à 25 mM ($FeCl_3$ ou $FeCl_2$) pendant 3 min à 0.2 $mL \cdot min^{-1}$ (0.6 mL, volume légèrement supérieur aux 3 volumes de colonne préconisés : 0.47 mL)

- lavage de la colonne à l'acide formique (20 mM) pendant 20 min à 0.2 $mL \cdot min^{-1}$ (4 mL, volume légèrement supérieur aux 20 volumes de colonne préconisés : 3.14 mL)

- rinçage des voies A et B à l'eau ultrapure

- rinçage de la voie A avec la solution EDTA (50 mM) afin d'éliminer toute trace de fer dans le système HPLC

- rinçage de la voie A à l'eau ultrapure

### 4.2.2. Régénération du support greffé (stripping et rechargement)

Selon les données de la fiche technique de la colonne, la procédure de régénération est à réaliser théoriquement tous les trois mois dans le cas d'un greffage IMAC-$Fe^{III}$ (aucune information n'est fournie sur ce point dans le cas d'un greffage IMAC-$Fe^{II}$).

La régénération de la phase stationnaire comprend un stripping (ou décrochage des ions métalliques immobilisés) suivi d'un rechargement métallique.

Le stripping du support a été appliqué comme suit :

- rinçage des voies A et B à l'eau ultrapure

- rinçage de la voie A avec la solution EDTA (50 mM)

- rinçage de la voie B à l'acide formique (20mM)

- installation de la colonne (équipée de son préfiltre) sur le système HPLC

- pompage de la solution EDTA (50 mM) dans la colonne pendant 25 min à 0.2 $mL \cdot min^{-1}$ (5 mL, volume légèrement supérieur aux 30 volumes de colonne préconisés : 4.71 mL)

- lavage de la colonne à l'acide formique (20 mM) pendant 25 min à 0.4 $mL \cdot min^{-1}$ (10 mL, ce qui correspond au volume préconisé)

Le chargement de la colonne IMAC en ions métalliques a été appliqué selon la procédure précédemment décrite (cf. **Matériel et méthode, 4.2.1**).

### 4.2.3. Contrôle du greffage en fer

Afin de contrôler (i) l'efficacité des procédures de chargement et de stripping, ainsi que (ii) la spéciation et le niveau de greffage en fer au cours du temps, des mesures physico-chimiques ont été réalisées sur différentes fractions collectées en sortie des deux colonnes IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$.

1) Collecte de fractions

▪ Des collectes ont été réalisées – soit en mode cinétique (plusieurs fractions de faible volume récupérées au cours du temps), soit en mode batch (une fraction unique) – selon le schéma reporté ci-dessous (**Figure 36**).

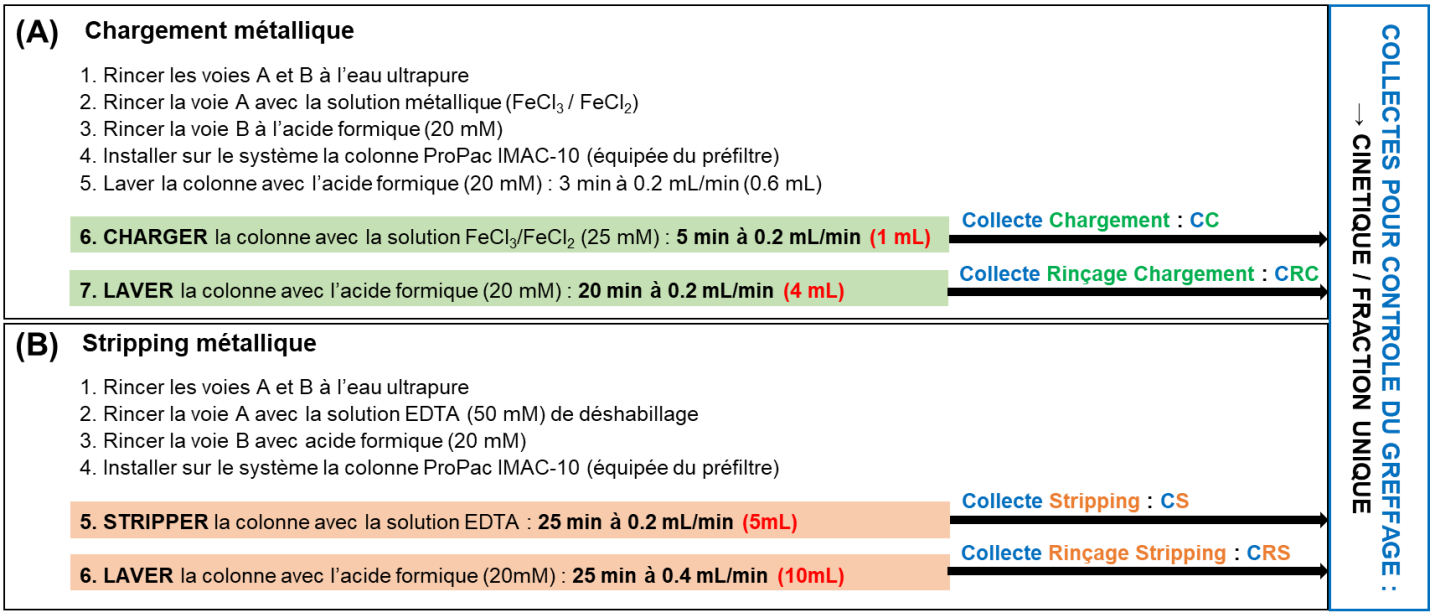



**Figure 36.** Fractions récupérées lors des étapes de **(A)** Chargement métallique (**CC** et **CRC**) et de **(B)** Stripping métallique (**CS** et **CRS**).

▪ Les collectes et injections réalisées au cours du temps sur les deux colonnes IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$ sont détaillées en **Annexe 6**, respectivement. Ces tableaux permettent de repérer (i) avec quel niveau de greffage et (ii) dans quelles conditions (inertes/non inertes) les analyses IMAC ont été réalisées (afin d'interpréter au mieux les résultats IMAC).

2) Dosage du fer par ICP-OES

Un dosage précis du fer a été réalisé par spectroscopie d'émission optique avec plasma à couplage inductif ICP-OES (modèle ICAP 6300 Duo, ThermoScientific).

Les mesures d'absorbance ont été réalisées à 259 nm, en mode radial. Dans le cas des collectes cinétiques (faible volume par fraction), des dilutions ont été réalisées avant mesure à l'aide d'une solution aqueuse d'acide formique (0.5%).

L'analyse conjointe de la phase de greffage $Fe^{III}$ (25 mM) et de la phase de greffage $Fe^{II}$ (25 mM) a permis de valider que les coefficients de réponse des ions ferriques et ferreux étaient identiques, comme attendu. Par ailleurs, ces deux mesures – répétées à chaque nouvelle séance de travail – ont permis de contrôler la stabilité des deux phases de greffage au cours du temps.

Une droite de calibration a été initialement réalisée sur des solutions ferriques standards (0.025 à 1.25 mM, avec un coefficient de détermination $r^2$ = 0.9998) (**Figure 37**). À chaque nouvelle séance de travail, un point de gamme (1.25 mM) a été injecté pour vérifier la stabilité de la réponse au cours du temps.

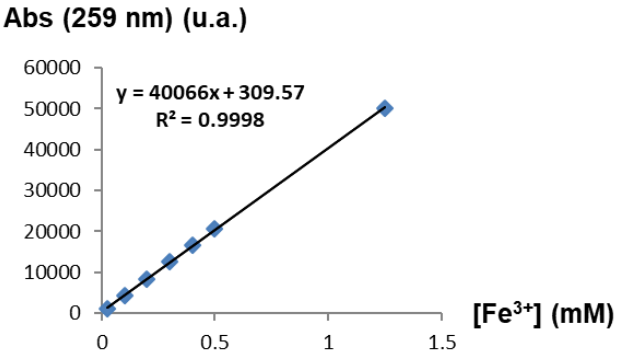



**Figure 37.** Courbe de calibration ICP-OES obtenue à l'aide de solutions ferriques standards (0.025-1.25 mM), avec l'absorbance mesurée à 259 nm (intensité exprimée en unités arbitraires).

Les analyses ont été réalisées en triplicats et un blanc (solution aqueuse d'acide formique à 0.5%) a systématiquement été injecté entre deux échantillons consécutifs pour prévenir les contaminations croisées.

3) Spéciation et dosage du fer par spectrophotométrie

Les deux protocoles détaillés ci-après ont été mis en œuvre (i) pour déterminer l'état d'oxydation du fer greffé sur les deux colonnes (IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$) et (ii) pour réaliser le dosage des ions « fer » (en complément de la mesure par ICP-OES).

Les mesures ont été réalisées sur des fractions collectées lors des procédures de chargement et de stripping (**Figure 36**), à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-1605, Shimadzu) équipé d'une cuve en plastique de 1 cm.

▪ Test de complexation avec o-phénanthroline ($Fe^{II}$)

Un dosage spectrophotométrique du fer ferreux a été réalisé en se basant sur la réaction de complexation avec l'ortho-phénanthroline [173]:

$Fe^{2+}$ + 3 o-phénanthroline → [(o-phénanthroline)$_3$+ $Fe^{II}$]$^{2+}$

Le protocole suivant a été mis au point : 2 mL d'une solution d'ortho-phénanthroline (2.5 mM) dans l'acide formique (0.5%) sont mélangés à 0.5 mL de la solution de fer à doser (concentration en o-phénanthroline équivalente à trois fois la concentration maximale en $Fe^{II}$). L'intensité d'absorbance du complexe formé est mesurée à une longueur d'onde de 510 nm.

Une courbe de calibration a été réalisée entre 0 et 2.5 mM (intensité d'absorbance du complexe en fonction de la concentration en ions ferreux), permettant de mettre en évidence un domaine de concentration utilisable pour la quantification des ions $Fe^{2+}$ (0 à 0.3 mM avec un coefficient de détermination $r^2$ = 0.9993, régression quadratique) (**Figure 38**).

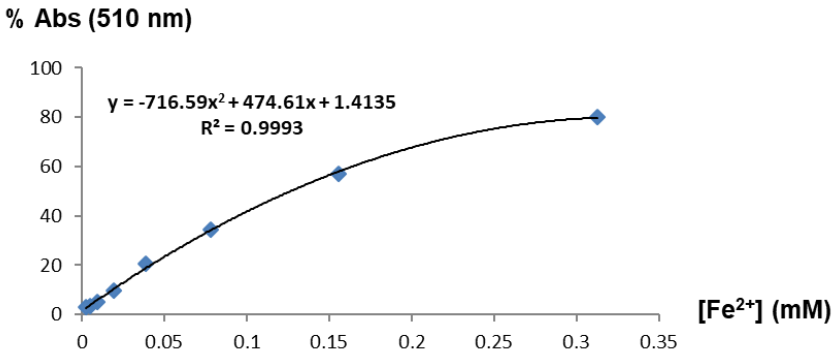



**Figure 38.** Courbe de calibration spectrophotométrique obtenue sur des solutions ferreuses standards, avec l'absorbance mesurée à 510 nm (exprimée en pourcentage).

L'application de ce protocole à des solutions ferriques standards a démontré que la formation d'un complexe en présence de l'ortho-phénanthroline n'était pas spécifique aux ions ferreux (intensité d'absorbance à 510 nm non négligeable en présence des ions ferriques). Ce dosage ne permet donc pas d'accéder à la spéciation d'une solution de fer inconnue.

▪ Test de complexation avec le DFO ($Fe^{III}$) (cf. **Étude bibliographique, I.1.3.2**, **Figure 7**)

Un dosage spectrophotométrique du fer ferrique a été réalisé en se basant sur la réaction de complexation avec la desferrioxamine (DFO) :

$Fe^{3+} + DFO \rightarrow [(DFO\text{-}3H)+Fe^{III}]$

Le protocole suivant a été mis au point : 2 mL d'une solution de desferrioxamine (0.8 mM) dans l'acide formique (0.5%) sont mélangés à 0.5 mL de la solution de fer à doser (concentration en DFO équivalente à la concentration maximale en $Fe^{III}$). L'intensité d'absorbance du complexe formé est mesurée à une longueur d'onde de 448 nm.

Une courbe de calibration a été tracée entre 0 et 2.5 mM (intensité d'absorbance du complexe en fonction de la concentration en ions ferriques), permettant de mettre en évidence un domaine de concentration utilisable pour la quantification des ions $Fe^{3+}$ (0 à 0.3 mM avec un coefficient de détermination $r^2 = 0.9976$, régression quadratique) (**Figure 39**).

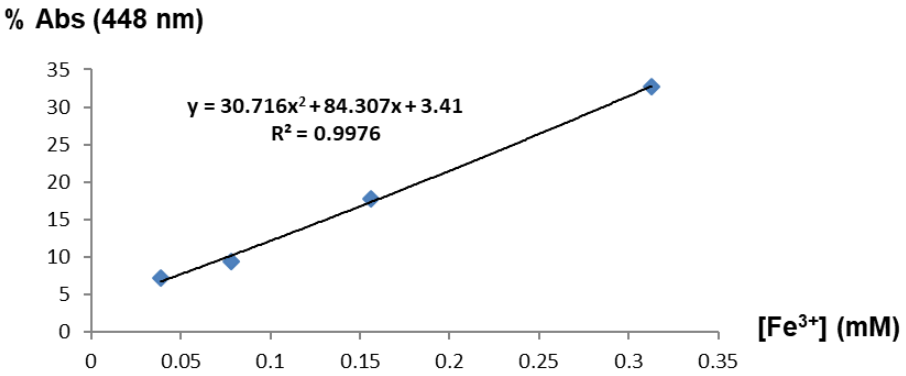



**Figure 39.** Courbe de calibration spectrophotométrique obtenue avec des solutions ferriques standards, avec l'absorbance mesurée à 448 nm (exprimée en pourcentage).

L'application de ce protocole à des solutions ferreuses standards a démontré que la formation d'un complexe en présence du DFO était spécifique aux ions ferriques (intensité d'absorbance à 448 nm quasiment nulle en présence des ions ferreux, **Figure 40**). Ce dosage permet donc d'accéder à la spéciation d'une solution de fer inconnue (de manière directe pour les ions $Fe^{3+}$ et de manière indirecte pour les ions $Fe^{2+}$).

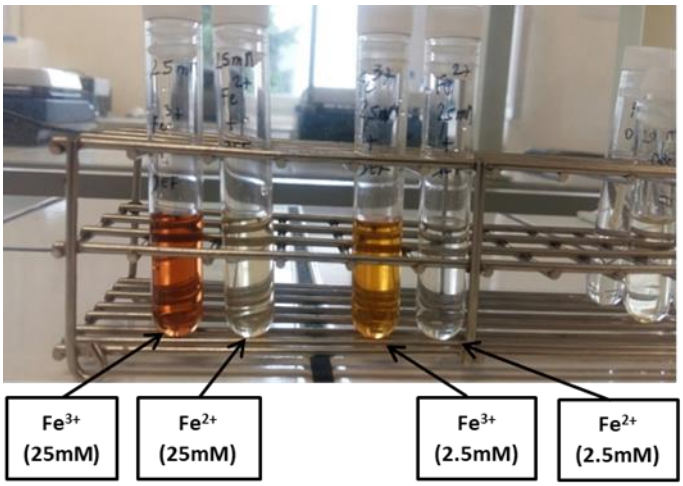



**Figure 40.** Comparatif visuel des solutions de DFO en présence (i) d'ions $Fe^{3+}$ (colorées) et (ii) d'ions $Fe^{2+}$ (incolores), pour 2 concentrations en fer (2.5 mM et 25 mM).

▪ Combinaison des deux tests de complexation : DFO ($Fe^{3+}$) et o-phénanthroline ($Fe^{2+}$)

D'après les observations précédentes, il est donc *a priori* possible de doser (i) les ions ferriques par le test de complexation avec le DFO et (ii) les ions ferreux par le test de complexation avec l'ortho-phénanthroline, après déduction de la contribution éventuelle des ions ferriques.

### 4.3. Analyses IMAC-MS

Ces analyses ont été réalisées sur le système LC-MS précédemment décrit (cf. **Matériel et méthode, 2**).

Chaque échantillon (ligands de référence, peptides, hydrolysat trypsique de caséines) a été conjointement analysé sur trois colonnes distinctes de même modèle ProPac IMAC-10 (cf. **Matériel et méthode, 4.1**) : la première étant chargée en $Fe^{III}$, la deuxième en $Fe^{II}$ et la dernière non chargée servant de contrôle (IDA seulement). Pour chacun des trois supports (IDA-$Fe^{III}$, IDA-$Fe^{II}$, IDA), plusieurs programmes de séparation – basés sur des gradients de pH – ont été testés, à l'aide des phases mobiles volatiles décrites plus haut (cf. **Matériel et méthode, 1.5.4**).

Un volume variable d'échantillon (1 à 10 µL) a été injecté sur la colonne IMAC équipée d'un préfiltre (0.20 µm) et disposée dans un four à 25 °C. Les gradients de pH suivants (gradient linéaire ou par paliers) ont été appliqués à un débit de 0.2 $mL \cdot min^{-1}$ : pH 3-pH 9 (20 min), pH 3-pH 10 (20 min), pH 7.4-pH 3 (20 min), pH 7.4-pH 3 (15 min).

La détection MS a été réalisée en mode ESI positif ($ESI^+$). La tension d'électrospray était de 4.5 kV. La température capillaire était de 250 °C. Les débits des gaz de nébulisation, auxiliaire et

de focalisation ont été fixés à 30, 10 et 10 (unités arbitraires), respectivement. La tension capillaire était de 48 V. Les tensions des lentilles tube lens, split lens et front lens étaient de 120 V, -34 V et -4.25 V, respectivement. Les paramètres de l'optique de transfert ont été préalablement optimisés par infusion (5 µL·min$^{-1}$) d'une solution à 0.1 g·L$^{-1}$ de la carnosine (βAH) dans le flux de la phase mobile (A/B : 50/50). Le suivi MS a été réalisé (i) à résolution unitaire sur l'analyseur LTQ ™ (full scan de 100 à 2000 m/z) dans le cas des ligands de référence et des peptides standards et (ii) à haute résolution (R = 60000 à m/z 400) sur l'analyseur Orbitrap ™ dans le cas de l'hydrolysat trypsique de caséines (pour accéder aux masses exactes des peptides). Les données brutes ont été traitées à l'aide du logiciel XCALIBUR ™ (version 2.1, http://www.thermoscientific.com).

# 5. Protocole IP-RPLC-HRMS

## 5.1. Formation des complexes fer-peptide

Afin de se placer dans des conditions similaires au pool de fer labile intracellulaire (cf. **Étude bibliographique, I.1.3.3**), le fer ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$) doit être solubilisé en présence d'une base faiblement complexante. Pour répondre à ce critère, les deux solutions de greffage IMAC précédemment décrites (cf. **Matériel et méthode, 1.5.1**) ont été utilisées pour ces tests : $Fe^{III}$ (25 mM) / acétate (100 mM) et $Fe^{II}$ (25 mM) / acétate (100 mM).

Chaque expérience de complexation a été réalisée conjointement en présence des ions $Fe^{II}$ (solution d'acétate ferreux), des ions $Fe^{III}$ (solution d'acétate ferrique) et en l'absence de fer (contrôle). Les essais ont été réalisés sous atmosphère non inerte.

### 5.1.1. Complexation avec un peptide pur

Une étude de complexation a été réalisée sur chaque peptide standard individuellement, ainsi que sur les deux composés de référence.

Une solution mère du peptide (10 g·L$^{-1}$, 300 µL) a été diluée avec de l'eau ultrapure (100 µL) pour obtenir une solution à 7.5 g·L$^{-1}$ (400 µL). Le pH de la solution peptidique a été ajusté, quand nécessaire, juste en dessous de 3.0 par de l'acide chlorhydrique dilué (HCl 0.1 M), afin d'optimiser la solubilisation ultérieure du fer. Ensuite, 100 µL de la solution d'acétate de fer à 25 mM ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$) ont été ajoutés à la solution peptidique (7.5 g·L$^{-1}$, 400 µL) pour aboutir au mélange réactionnel final (500 µL). Le pH du mélange réactionnel final a été ajusté autour de 3.0 par de l'ammoniaque diluée (0.25%, m/v) [174], afin de favoriser la déprotonation des groupes donneurs du peptide. Le ratio de concentration peptide/fer est compris entre 1 pour le peptide de plus haute masse moléculaire (LLPHHADADY) et 5.4 pour celui de plus basse masse moléculaire (GGHa) (**Tableau 11**). Par ailleurs, en ce qui concerne les ligands de référence desferrioxamine (DFO) et terpyridine (TERPY), les tests de complexation ont été conduits avec les ratios suivants : [$Fe^{III}$]/[DFO] = 0.50 et [$Fe^{II}$]/[TERPY] = 0.50.

**Tableau 11.** Ratios [peptide]/[fer]] et [fer]/[peptide] dans les échantillons finaux « fer-peptide pur ».

| Peptide | M | [Pep] (mM) | [Fe] (mM) | [Pep]/[Fe] | [Fe]/[Pep] |
|---|---|---|---|---|---|
| **GGHa** | 225 | 27 | 5 | **5.4** | **0.19** |
| **βAH** | 226 | 27 | 5 | **5.4** | **0.19** |
| **AGHa** | 239 | 25 | 5 | **5.0** | **0.20** |
| **GGH** | 269 | 22 | 5 | **4.4** | **0.23** |
| **γECG** | 307 | 20 | 5 | **4.0** | **0.25** |
| **NCS** | 322 | 19 | 5 | **3.8** | **0.26** |
| **CAH** | 330 | 18 | 5 | **3.6** | **0.28** |
| **DAH** | 342 | 18 | 5 | **3.4** | **0.28** |
| **HGH** | 350 | 17 | 5 | **3.4** | **0.29** |
| **IKP** | 356 | 17 | 5 | **3.4** | **0.29** |
| **EAH** | 356 | 17 | 5 | **3.4** | **0.29** |
| **DSH** | 357 | 17 | 5 | **3.4** | **0.29** |
| **DDD** | 363 | 17 | 5 | **3.4** | **0.29** |
| **DTH** | 372 | 16 | 5 | **3.2** | **0.31** |
| **DED** | 377 | 16 | 5 | **3.2** | **0.31** |
| **DMH** | 402 | 15 | 5 | **3.1** | **0.32** |
| **EEE** | 405 | 15 | 5 | **3.1** | **0.32** |
| **HHH** | 429 | 14 | 5 | **2.8** | **0.36** |
| **IKW** | 445 | 13 | 5 | **2.6** | **0.38** |
| **RQR** | 458 | 13 | 5 | **2.6** | **0.38** |
| **RKR** | 458 | 13 | 5 | **2.6** | **0.38** |
| **WWW** | 576 | 10 | 5 | **2.0** | **0.50** |
| **FDDDA** | 581 | 10 | 5 | **2.0** | **0.50** |
| **YPISL** | 591 | 10 | 5 | **2.0** | **0.50** |
| **FDDDK** | 638 | 9 | 5 | **1.8** | **0.56** |
| **6H** | 840 | 7 | 5 | **1.4** | **0.71** |
| **LLPHHADADY** | 1150 | 5 | 5 | **1.0** | **1.00** |

### 5.1.2. Complexation avec un hydrolysat

Une étude de complexation – en présence des ions ferreux $Fe^{II}$ – a été réalisée de façon similaire pour un hydrolysat synthétique (mélange de peptides de synthèse) et pour un hydrolysat trypsique de caséines.

L'hydrolysat (461,5 µL) a été initialement dopé avec une solution du peptide GGH ($C_{GGH}$, 38.5 µL) pour obtenir 500 µL de solution peptidique finale. Différentes concentrations de GGH ont été utilisées, à savoir 0.01 $g \cdot L^{-1}$, 0.1 $g \cdot L^{-1}$ et 1.0 $g \cdot L^{-1}$. Le pH de l'hydrolysat dopé en GGH a été ajusté, si nécessaire, juste en dessous de 3.0 avec de l'acide chlorhydrique dilué (HCl 0.1 M). Ensuite, 100 µL d'acétate de fer(II) (25 mM) ont été ajoutés à l'hydrolysat dopé (400 µL) pour obtenir le mélange réactionnel final (500 µL). Le pH a été ajusté autour de 3.0 avec de l'ammoniaque diluée (0.25%, m/v) (**Tableau 12**).

**Tableau 12.** Ratios [peptide]/[fer(II)]] et [fer(II)]/[peptide] dans les échantillons finaux « fer(II)-hydrolysat synthétique ».

| | Peptide | M | [Pep] (mg·L$^{-1}$) | [Pep] (µM) | [$Fe^{II}$] (µM) | [Pep]/[$Fe^{II}$] | [$Fe^{II}$]/[Pep] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | γECG | 307 | 57 | 190 | 5000 | **0.038** | **26** |
| | NCS | 322 | 57 | 180 | 5000 | **0.036** | **28** |
| | IKP | 356 | 57 | 160 | 5000 | **0.032** | **31** |
| | DDD | 363 | 57 | 160 | 5000 | **0.032** | **31** |
| | DED | 377 | 57 | 150 | 5000 | **0.030** | **33** |
| | EEE | 405 | 57 | 140 | 5000 | **0.028** | **36** |
| | HHH | 429 | 57 | 130 | 5000 | **0.026** | **38** |
| | IKW | 445 | 57 | 130 | 5000 | **0.026** | **38** |
| | RKR | 458 | 57 | 120 | 5000 | **0.024** | **42** |
| | RQR | 458 | 57 | 120 | 5000 | **0.024** | **42** |
| | YPISL | 591 | 57 | 100 | 5000 | **0.020** | **50** |
| | HHHHHH | 840 | 57 | 70 | 5000 | **0.014** | **71** |
| | LLPHHADADY | 1150 | 57 | 50 | 5000 | **0.010** | **100** |
| GGH (ajout dosé en mg·L$^{-1}$) | 77 | 269 | 62 | 231 | 5000 | **0.046** | **22** |
| | 7.7 | | 6.2 | 23.1 | 5000 | **0.0046** | **220** |
| | 0.77 | | 0.62 | 2.31 | 5000 | **0.00046** | **2200** |

## 5.2. Analyses en mode flow-injection ESI-MS

Les analyses en mode flow-injection ESI-HRMS (*i.e.* perfusion dans le flux de la phase mobile couplée à une détection ESI-HRMS) ont été réalisées sur le système LC-MS précédemment décrit (cf. **Matériel et méthode, 2**)

L'échantillon a été injecté à l'aide d'un raccord en T à 10 µL·min$^{-1}$ dans la phase mobile chromatographique pompée à 0.2 mL·min$^{-1}$. La phase mobile était composée d'un mélange 1:1 de A: solution aqueuse de NFPA (5 mM) et de B: méthanol. Les analyses MS ont été réalisées en mode ESI positif (ESI$^{+}$). La tension d'électrospray était de 4.5 kV. La température capillaire était de 300 °C. Les débits des gaz de nébulisation, auxiliaire et de focalisation ont été fixés à 40, 5 et 5 (unités arbitraires), respectivement. La tension capillaire était de 46 V. Les tensions des lentilles tube lens, split lens et front lens étaient de 112 V, -70 V et -6.25 V, respectivement. Les paramètres de l'optique de transfert ont été préalablement optimisés par infusion (5 µL·min$^{-1}$) d'une solution du complexe stable fer(III)-desferrioxamine (0.1 g·L$^{-1}$) dans le flux de la phase mobile (A/B : 50/50). Les spectres MS full scan (120 à 2000 m/z) ont été acquis à haute résolution (R = 60000 à m/z 400) sur l'analyseur Orbitrap$^{TM}$ pour accéder aux masses exactes des peptides et des complexes fer-peptide (ainsi qu'aux masses exactes des deux composés de référence et de leurs complexes de fer). Les solutions d'incubation obtenues pour les deux ligands de référence (desferrioxamine et terpyridine) – *i.e.* résultant de leur mise en contact avec le fer – ont aussi été analysées en mode flow-injection ESI-MS, mais avec une phase mobile de nature différente de celle utilisée pour les peptides : eau/acétonitrile/TFA (50:50:0.1). Les données brutes ont été traitées à l'aide du logiciel XCALIBUR $^{TM}$ (version 2.1, http://www.thermoscientific.com).

### 5.3. Analyses IP-RPLC-HRMS

Ces analyses ont été réalisées sur le système LC-MS précédemment décrit (cf. **Matériel et méthode, 2**) en utilisant des paramètres MS similaires à ceux de l'analyse en mode flow-injection ESI-MS (cf. **Matériel et méthode, 5.2**).

Seize microlitres d'échantillon ont été injectés sur une colonne en phase inverse C18 Alltima (150×2.1 mm, 5 µm - Grace/Alltech, Darmstadt, Allemagne) équipée d'une pré-colonne C18 Alltima (7.5×2.1 mm, 5 µm) et disposée dans un four à 25 °C. Le débit était de 0.2 $mL \cdot min^{-1}$ et les phases mobiles étaient constituées d'un mélange de A: solution aqueuse de NFPA (5 mM) et B: méthanol. Un programme de séparation court (21 min), contenant un gradient linéaire de 5 à 98% de B en 10 min, a été mis en œuvre pour l'analyse des échantillons peptidiques simples (*i.e.* étude de la complexation des peptides purs). Un programme de séparation plus long (36 min), contenant un gradient linéaire de 5 à 98% de B en 25 min, a été appliqué pour l'analyse des échantillons peptidiques complexes (*i.e.* étude de la complexation des peptides contenus dans un hydrolysat). Dans le cas des deux composés de référence, la séparation a été obtenue à l'aide d'un mélange de A: solution aqueuse de TFA (0.1%) et B: acétonitrile avec TFA (0.1%), par application d'un gradient de 5 à 98% de B en 20 min (avec la même colonne, la même température de four et le même débit que pour les échantillons peptidiques).

### 5.4. Traitement de données

Les données brutes LC-HRMS ont été prétraitées à l'aide de la plateforme en ligne XCMS (https://xcmsonline.scripps.edu).

Une analyse comparative (mode pairwise) a été réalisée entre l'échantillon incubé avec du fer(II) et le contrôle correspondant sans fer [175]. En pratique, les données brutes obtenues en triplicats ont été soumises à l'expérience pairwise en utilisant la méthode de paramétrage standard appelée "HPLC-Orbitrap II" pour la détection des caractéristiques m/z, la correction du temps de rétention, l'alignement des pics chromatographiques et le traitement statistique. La détection des pics a été effectuée avec la méthode CentWave ($\Delta$ m/z = 2.5 ppm, largeur de pic (10–60), seuil de signal sur bruit = 10). La correction du temps de rétention a été réalisée avec la méthode obiwarp et l'alignement avec les paramètres suivants (minfrac = 0.5, bw = 5, mzwid = 0.015). Le test t de Welch (variance inégale) a été utilisé comme méthode de test statistique (valeur $p < 0.05$). Le traitement de données est discuté plus en détail dans la partie **Résultats et discussion**.

# PARTIE 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

# Chapitre I : stratégie de criblage IMAC-MS

## 1. Mise en œuvre du protocole

### 1.1. Objectif

La technique IMAC est incontournable pour purifier des peptides chélateurs de métaux au sein des hydrolysats. Grâce à la spécificité d'interaction entre un métal donné – immobilisé sur la phase stationnaire IMAC – et des motifs complexants déterminés, il est possible d'identifier sélectivement les composés chélateurs présents dans des mélanges complexes. Le protocole de criblage IMAC classique a ainsi permis de rationaliser le processus d'identification jusqu'alors réalisé selon une approche purement empirique (cf. **Tableau 8**).

Nous avons décidé de mettre à profit la technique IMAC pour développer une méthode de criblage innovante des peptides chélateurs de fer. Notre objectif étant de parvenir à une détection rapide de ces molécules d'intérêt, nous réalisons un couplage en ligne avec la spectrométrie de masse (MS).

Dans le cas des peptides non phosphorylés, ciblés dans notre étude, une solution devra nécessairement être trouvée pour que les éluants – traditionnellement non volatils – soient compatibles avec une détection MS.

En pratique, notre stratégie repose sur la rétention sélective des peptides chélateurs de fer sur une colonne IMAC (greffée $Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$) et leur détection directe par spectrométrie de masse (MS). Le temps de rétention associé à un peptide nous renseignera sur son affinité relative pour le fer ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$) et par extension sur sa capacité de chélation de l'ion métallique en solution. De plus, notre protocole de criblage IMAC-MS pourra aisément être complété par une phase de séquençage (MS/MS), tout en conservant une seule étape analytique pour l'ensemble des opérations (**Figure 41**).

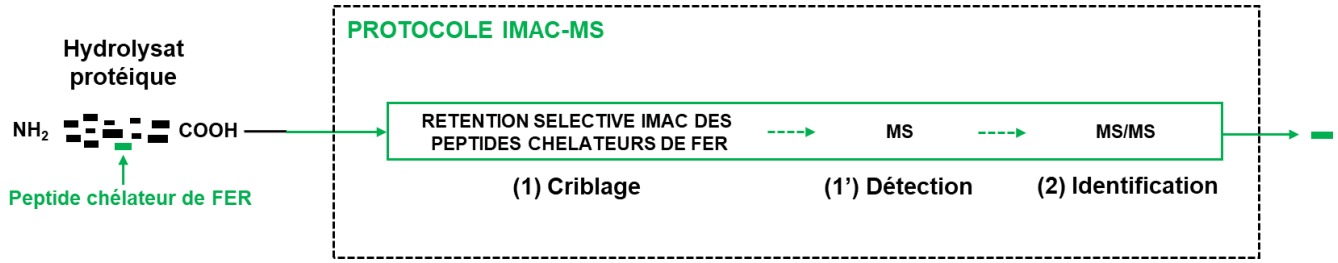



**Figure 41.** Schéma théorique du protocole IMAC-MS associant dans une seule étape **(1)** la phase de criblage des peptides chélateurs de fer par IMAC, **(1')** la détection directe par MS et **(2)** la phase d'identification par MS/MS.

## 1.2. Analyse préalable des freins à la mise en place du protocole IMAC-MS et identification des leviers

Avant de développer le protocole de criblage IMAC-MS, plusieurs points bloquants ou limites potentielles ont été relevés. Ils sont présentés ci-dessous en proposant dans chaque cas une (ou plusieurs) solution(s) pour contourner ou prévenir le problème mentionné.

### 1.2.1. Volatilité de l'éluant

Le fractionnement IMAC des peptides non phosphorylés nécessite habituellement des éluants non volatils (tampons phosphate, NaCl concentré, etc.), incompatibles avec une détection directe par ESI-MS (cf. **Étude bibliographique, III.2**). Dans ces conditions, le rendement d'ionisation se trouverait fortement impacté et des dépôts de sels encrasseraient rapidement l'entrée du spectromètre de masse [176].

Pour cette raison, nous nous sommes inspirés des conditions opératoires mises en œuvre pour l'analyse IMAC-$Fe^{III}$ des phosphopeptides, les tampons étant dans ce cas volatils (cf. **Étude bibliographique, III.2**). Par application d'un couplage direct IMAC-ESI-MS, Nuwaysir et Stults, 1993 ont pu (i) retenir sélectivement, (ii) séparer et (iii) identifier des phosphopeptides contenus dans un hydrolysat caséique [128] (**Annexe 4**). Cette publication concernant les phosphopeptides a servi de référence au développement de nos méthodologies IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$, prioritairement destinées à l'étude des peptides non phosphorylés.

### 1.2.2. Mode d'élution

Pour répondre à notre objectif analytique, l'utilisation de compétiteurs non volatils (imidazole, EDTA, etc.) – généralement mis en œuvre pour l'élution des peptides non phosphorylés – est également proscrite.

Par conséquent, nous avons décidé de réaliser les élutions en appliquant systématiquement un gradient de pH (croissant ou décroissant).

### 1.2.3. Qualité du greffage en ions « fer »

Si le greffage et la stabilité des ions ferriques sur le support IMAC ne posent théoriquement pas de problème, il n'en est pas de même pour les ions ferreux (cf. **Étude bibliographique, III.3**). Un doute peut objectivement être émis concernant (i) leur rendement initial de greffage, du fait d'une stabilité réputée moindre sur les supports classiques IDA et NTA (comparativement aux ions ferriques) et (ii) leur stabilité physico-chimique sur le support au cours du temps (en prenant en compte leur oxydation potentielle en ions ferriques).

De ce fait :

▪ l'ensemble des opérations en IMAC-$Fe^{II}$, *i.e.* la préparation de la phase stationnaire et les tests expérimentaux, ont été conduites en conditions inertes (cf. **Matériel et méthodes, 4.2**) ;

▪ des contrôles du niveau de greffage en ions métalliques ont été réalisés pour les deux colonnes IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$ (cf. **Matériel et méthodes, 4.2.3**) ;

▪ enfin, des analyses ont été menées pour étudier la spéciation du fer sur ces deux colonnes (cf. **Matériel et méthodes, 4.2.3**).

### 1.3. Méthodologie appliquée

Les leviers techniques précédemment identifiés ont permis de définir des conditions analytiques *a priori* adaptées au développement de notre protocole (cf. **Matériel et méthodes, 4.3**).

Selon une approche obéissant à la théorie « Hard and Soft Acid Base » (HSAB) et en accord avec les conclusions de notre étude bibliographique IMAC (**Annexe 3**) :

- l'élution d'un ligand de type base dure de Lewis (phosphate, carboxylate) analysé en IMAC-$Fe^{III}$ est théoriquement obtenue par application d'un gradient $GpH^+$, autrement dit par compétition avec les ions hydroxydes (**Figure 42A**) ;

- l'élution d'un ligand de type base intermédiaire de Lewis (imidazole) analysé en IMAC-$Fe^{II}$ est théoriquement obtenue par application d'un gradient $GpH^-$, autrement dit par protonation du ligand (**Figure 42B**).

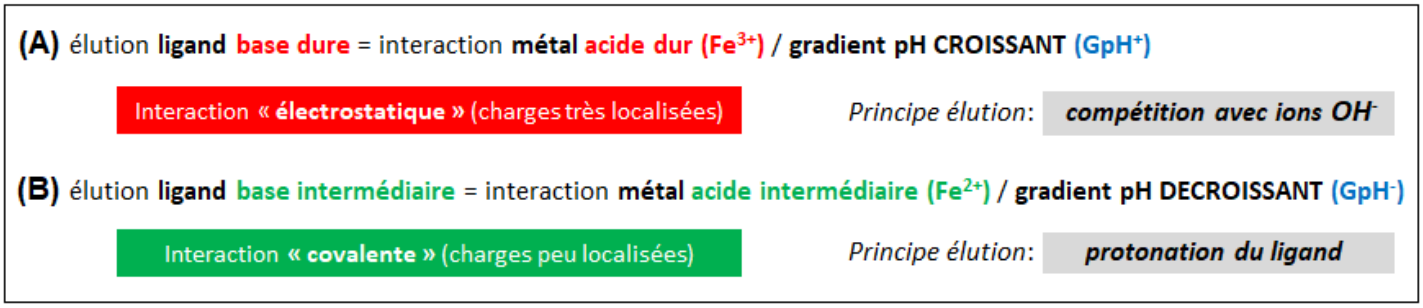



**Figure 42.** Protocole visé pour l'analyse IMAC d'un ligand de type **(A)** base dure de Lewis ou **(B)** base intermédiaire de Lewis.

En pratique, les expériences ont été conduites selon les modalités données en **Figure 43**. En plus du test visé, mené dans des conditions conformes à la théorie HSAB, deux contrôles ont été réalisés afin de valider avec certitude l'identification d'un ligand : (i) le contrôle n°1 mené dans des conditions contraires à la théorie HASB, c'est-à-dire par interaction avec des ions « fer » à l'autre degré d'oxydation ($Fe^{II}$ si le test visé a été fait avec $Fe^{III}$ ; $Fe^{III}$ si le test visé a été fait avec $Fe^{II}$) et (ii) le contrôle n°2 correspondant à une injection sur une colonne non greffée, c'est-à-dire par interaction avec les seuls groupes acide iminodiacétique (IDA).

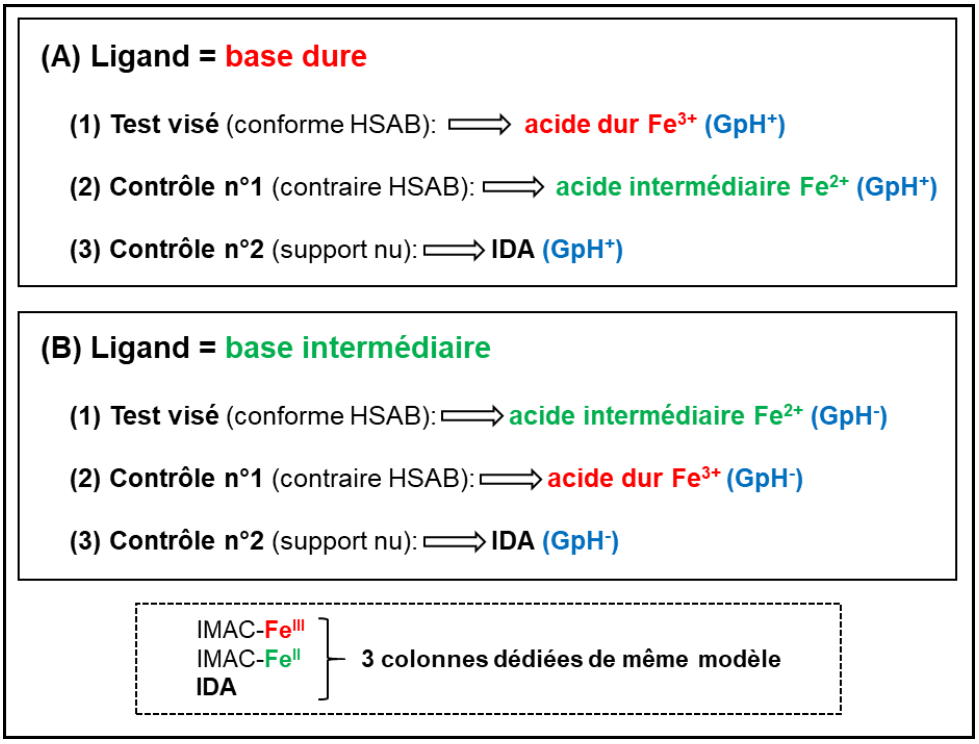



**Figure 43.** Approche expérimentale mise en œuvre pour identifier un ligand de type **(A)** base dure de Lewis ou **(B)** base intermédiaire de Lewis : par comparaison des résultats obtenus à la suite d'analyses réalisées **(1)** de manière conforme à la théorie HSAB, **(2)** de manière non conforme à la théorie HSAB et **(3)** sur support nu composé de groupes IDA libres (*i.e.* colonne non greffée en fer).

## 2. Étude du greffage en fer

L'évaluation du greffage en fer des deux colonnes IMAC utilisées est un prérequis pour apprécier en toute rigueur la faisabilité de notre protocole. En particulier, de fortes incertitudes subsistent concernant l'efficacité de greffage des ions fer(II) ainsi que leur stabilité au cours du temps. Les colonnes IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$ ont été soumises à plusieurs séries de tests dans le but de déterminer dans chaque cas (i) l'efficacité des procédures de stripping et de chargement, (ii) le niveau de greffage en fer et (iii) la spéciation du fer greffé. À cette fin, des mesures physico-chimiques ont été réalisées sur différentes fractions collectées en sortie des deux colonnes (selon le schéma de collecte précisé en **Annexe 6**).

### 2.1. Évaluation des procédures de stripping et de chargement

Une première série de collectes cinétiques – réalisée après environ 1 mois d'utilisation (sans régénération du support greffé) – a permis d'évaluer l'efficacité de la procédure de stripping (à l'aide des fractions appelées « Collecte Stripping » et notées **CS**) et de la procédure de chargement (à l'aide des fractions appelées « Collecte Chargement » et notées **CC**).

### 2.1.1. Stripping à l'EDTA (50 mM)

Les 4 premières fractions collectées lors du stripping (ou décrochage des ions « fer ») – *i.e.* **CS1** à **CS4** (0.1 mL chacune, soit 30 secondes de collecte à 0.2 mL/min) – ont été soumises à un dosage du fer par spectroscopie d'émission optique avec plasma à couplage inductif (ICP-OES). Cette technique permet de quantifier les ions « fer » avec une grande précision, et de façon indépendante de leur degré d'oxydation ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$).

Selon ces mesures expérimentales, la quantité totale de fer décrochée est de 4.87 µmol pour la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (**Figure 44A1**) et de 1.27 µmol pour la colonne IMAC-$Fe^{II}$ (**Figure 44B1**). En se basant sur la capacité de charge théorique de 4.48 µmol de $Cu^{2+}$ (cf. **Matériel et méthodes, 4.1**), on peut estimer que (i) l'ensemble des sites étaient occupés dans le cas de l'IMAC-$Fe^{III}$ (valeur > 100%) et (ii) environ 30% des sites étaient occupés dans le cas l'IMAC-$Fe^{II}$.

Comme observé sur les graphiques traçant la quantité de fer décrochée en fonction du temps (**Figure 44A2** et **Figure 44B2**), le stripping réalisé à l'aide de l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) est efficace : la fraction **CS2** contient à elle seule 70% du fer total dans le cas de la colonne IMAC-$Fe^{III}$ et 78% dans le cas de la colonne IMAC-$Fe^{II}$ (sachant qu'un volume de 0.09 mL de solution d'EDTA à 50 mM doit théoriquement permettre le décrochage de 4.48 µmol de fer).

L'analyse complémentaire de la fraction « Collecte Rinçage Stripping » (**CRS**), obtenue suite au stripping par rinçage avec 10 mL d'acide formique, a confirmé l'efficacité du décrochage : en effet, le fer n'a été retrouvé qu'en quantités résiduelles en sortie des colonnes IMAC-$Fe^{III}$ (0.005 µmol, soit 0.1% de la capacité de charge) et IMAC-$Fe^{II}$ (0.12 µmol, soit 2.7% de la capacité de charge) (Résultats non montrés).

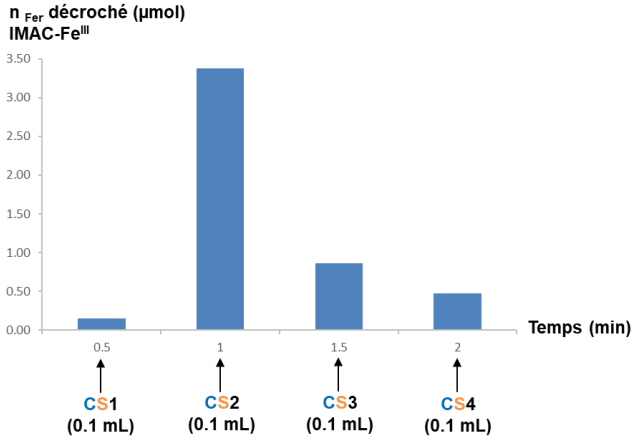
(A1)

| IMAC-$Fe^{III}$ | |
|---|---|
| Fraction | $n_{Fer}$ (µmol) |
| CS1 | 0.15 |
| CS2 | 3.38 |
| CS3 | 0.86 |
| CS4 | 0.48 |
| $n_{Fer\ (total)}$ (µmol) | 4.87 |

(B1)

| IMAC-$Fe^{II}$ | |
|---|---|
| Fraction | $n_{Fer}$ (µmol) |
| CS1 | 0.02 |
| CS2 | 0.99 |
| CS3 | 0.21 |
| CS4 | 0.05 |
| $n_{Fer\ (total)}$ (µmol) | 1.27 |

(A2)




(B2)

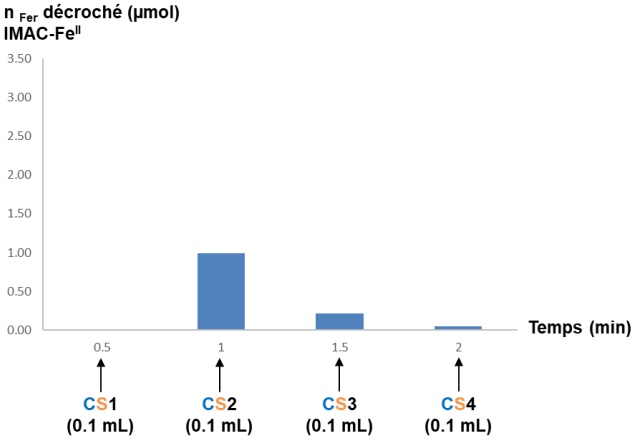



**Figure 44.** Quantité de fer mesurée (par ICP-OES) dans les 4 premières fractions de collecte (lors de la procédure de stripping) dans le cas des colonnes **(A1)** IMAC-$Fe^{III}$ et **(B1)** IMAC-$Fe^{II}$. Quantité de fer décrochée en fonction du temps lors de la procédure de stripping dans le cas des colonnes **(A2)** IMAC-$Fe^{III}$ et **(B2)** IMAC-$Fe^{II}$.

### 2.1.2. Chargement par le chlorure de fer (25 mM)

Le dosage ICP-OES du fer a été réalisé sur les 6 premières fractions collectées lors de la procédure de chargement, *i.e.* **CC1** à **CC6** (0.1 mL chacune, soit 30 secondes de collecte à 0.2 mL/min). En considérant la capacité de charge théorique de la colonne (4.48 µmol de $Cu^{2+}$), on peut donc estimer qu'un greffage complet (*i.e.* greffage de 100% des sites disponibles) nécessite un volume de 0.18 mL de chlorure de fer à 25 mM. Les mesures expérimentales effectuées ont révélé que le fer restait en intégralité sur la colonne lors du chargement : en effet, toutes les fractions **CC1** à **CC6** ont montré une concentration en fer nulle (IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$).

Des analyses complémentaires ont été réalisées, à l'occasion d'un autre chargement (collecte en mode batch dans ce cas), sur la fraction **CC** (1 mL) et sur la fraction « Collecte Rinçage Chargement » (**CRC**) obtenue par rinçage à l'acide formique suite au chargement (4 mL). De manière similaire pour les deux colonnes (IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$), les résultats obtenus ont (i) validé que 100% du fer (*i.e.* 25 µmol) restait accroché lors du chargement et (ii) montré que 80% du fer faiblement lié était éliminé lors de l'étape de lavage à l'acide formique, une concentration en fer de 4 mM ayant été trouvée dans la fraction **CRC** (soit 16 µmol de fer élués sur 20.62 µmol au total, avec 20.62 = 25-4.38) (Résultats non montrés).

### 2.1.3. Synthèse

D'après ces résultats, les conditions mises en œuvre pour le stripping et le chargement sont satisfaisantes du point de vue cinétique, et ce pour les deux types de greffage mis en œuvre ($Fe^{III}$ et $Fe^{II}$).

La durée du lavage à l'acide formique suite au chargement pourrait toutefois être doublée (de façon à éliminer la totalité du fer faiblement lié (*i.e.* lié de façon non spécifique au support).

## 2.2. Évaluation du niveau de greffage en fer

Le niveau de greffage en fer des deux colonnes IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$ a été évalué, après des périodes d'utilisation plus ou moins longues (de 0 à 30 jours) et un nombre variable d'injections (de 0 à quelques dizaines). Suite au greffage initial, quatre procédures de régénération ont été réalisées. Les fractions collectées – en modes batch ou cinétique – lors de la phase de stripping (effectuée à la fin de chaque période d'utilisation) ont été soumises à un dosage du fer par ICP-OES.

Les pourcentages de fer greffé sur les agents chélatants acide iminodiacétique (IDA) ont été calculés par rapport à la capacité de charge théorique.

### 2.2.1. Greffage des ions $Fe^{3+}$

En accord avec la bibliographie et avec les informations données dans la fiche colonne, la capacité de charge en ions ferriques est au minimum de 70% et la stabilité des $Fe^{3+}$ au cours du temps est excellente : une période d'utilisation d'un mois – incluant une quarantaine d'injections – n'a pas d'impact sur le niveau de greffage (68%) (**Tableau 13**). Le taux de greffage anormalement élevé calculé lors de la première régénération (> 100%) s'explique *a priori* par les conditions appliquées lors de la collecte cinétique : en effet, le faible volume récupéré pour les 4 premières fractions (0.1 mL) représente une source d'erreur non négligeable.

**Tableau 13.** Suivi du niveau de greffage en fer pour la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (sur une période supérieure à 2 mois).

| IMAC-$Fe^{III}$ | | |
|---|---|---|
| **Opérations / Injections *** | **Date / Période** | **Niveau de greffage** |
| **greffage initial** | J | |
| 23 injections | **30 jours** | |
| **régénération 1** | J+30 | **> 100%** [1] |
| 42 injections | **30 jours** | |
| **régénération 2** | J+60 | **68%** [2] |
| 0 injection | **0 jour** | |
| **régénération 3** | J+60 | **83%** [2] |
| 2 injections | **4 jours** | |
| **régénération 4** | J+64 | **69%** [2] |

* toutes les opérations et injections ont été réalisées en conditions non inertes

[1] mesure réalisée suite à collecte en mode cinétique (4 fractions de 0.1 mL)

[2] mesure réalisée suite à collecte en mode batch (1 seule fraction de 5 mL)

### 2.2.2. Greffage des ions $Fe^{2+}$

En accord avec les constantes de formation des complexes fer-IDA en solution (log*K*f [$Fe^{III}$-IDA] > log*K*f [$Fe^{II}$-IDA] : 10.42 > 5.80), le niveau de greffage de la colonne IMAC-$Fe^{II}$ est bien moindre que celui de la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (de l'ordre de 10%) (**Tableau 14**).

**Tableau 14.** Suivi du niveau de greffage en fer pour la colonne IMAC-$Fe^{II}$ (sur une période supérieure à 2 mois).

| IMAC-$Fe^{II}$ | | | |
|---|---|---|---|
| **Opérations / Injections** | **Conditions inertes** | **Date / Période** | **Niveau de greffage** |
| **greffage initial** | **non** | J | |
| 12 injections | **non** | **30 jours** | |
| **régénération 1** | **non** | J+30 | **30%** [1] |
| 42 injections | **oui** | **30 jours** | |
| **régénération 2** | **oui** | J+60 | **10%** [2] |
| 0 injection | **oui** | **0 jour** | |
| **régénération 3** | **oui** | J+60 | **16%** [2] |
| 2 injections | **oui** | **4 jours** | |
| **régénération 4** | **oui** | J+64 | **13%** [2] |

[1] mesure réalisée suite à collecte en mode cinétique (4 fractions de 0.1 mL)

[2] mesure réalisée suite à collecte en mode batch (1 seule fraction de 5 mL)

La valeur plus élevée calculée lors de la première régénération (30%) provient certainement (comme souligné plus haut) d'une erreur expérimentale liée au faible volume collecté (0.1 mL). Toutefois, une autre hypothèse peut être avancée dans ce cas précis : le chargement initial n'ayant pas été réalisé en conditions inertes, l'oxydation potentielle d'une partie des ions

ferreux en ions ferriques – au moment du greffage – n'est pas à exclure (ce qui s'accompagnerait automatiquement, si tel était le cas, d'un niveau de greffage plus élevé).

Les niveaux de greffage calculés en conditions inertes (*i.e.* à partir de la 1ère régénération) semblent indiquer que les ions ferreux sont cependant relativement stables sur le support : en effet, la valeur est de (i) 16% après une très courte période sans injection, (ii) 13% après une période de 4 jours comprenant 2 injections et (iii) 10% après 1 mois d'utilisation comprenant une quarantaine d'injections.

#### 2.2.3. Synthèse

Suite à ces mesures, on peut affirmer que la colonne IMAC-$Fe^{III}$ est d'une grande robustesse et que les résultats obtenus sur les échantillons seront pleinement exploitables.

Quant à la colonne IMAC-$Fe^{II}$, le faible pourcentage d'ions « fer » greffés ne permet pas d'envisager une interaction de nature purement complexante. En effet, les nombreux sites IDA restant libres (85-90% du total) pourront donner lieu à une rétention par échange de cations (*via* les groupes COOH déprotonés, $pK_{COOH\ IDA} = 2.98$).

Par ailleurs, le faible niveau de greffage de la colonne IMAC-$Fe^{II}$ – comparativement à celui de la colonne IMAC-$Fe^{III}$ – constitue un premier indice de la présence du fer au degré d'oxydation II (point restant à consolider).

### 2.3. Étude de spéciation du fer

Une étude de spéciation a été menée afin de lever le doute concernant le degré d'oxydation du fer greffé sur la colonne IMAC-$Fe^{II}$ (prioritairement) et sur la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (secondairement).

Des mesures spectrophotométriques ont été réalisées sur des fractions collectées en sortie des deux colonnes IMAC lors des procédures de chargement et de stripping.

#### 2.3.1. Chargement

Notre premier objectif est d'accéder au degré d'oxydation du fer collecté en sortie de colonne, immédiatement après le chargement métallique. Cette information nous permettra de statuer, de façon indirecte, sur la nature de l'ion fer initialement greffé ($Fe^{2+}$ ou $Fe^{3+}$). Le fer étant totalement retenu sur le support lors du chargement (comme précédemment observé), la fraction collectée à cette étape (**CC**) ne présente pas d'intérêt pour notre étude de spéciation. Pour cette raison, nous avons focalisé sur la fraction **CRC** obtenue suite au rinçage à l'acide formique (consécutif au chargement).

La fraction **CRC** (4 mL) a été soumise au test de complexation avec la desferrioxamine (DFO) démontré comme spécifique des ions $Fe^{3+}$ (cf. **Matériel et méthodes**). L'analyse

spectrophotométrique du complexe associé ([(DFO-3H)+$Fe^{III}$], λ = 448 nm) a permis de valider que les ions « fer » faiblement liés sur le support (*i.e.* retenus de manière aspécifique lors du chargement) étaient bien de nature (i) ferrique en sortie de colonne IMAC-$Fe^{III}$ ($I_{Abs}$ > 85% sur une solution diluée 2 fois) et (ii) ferreuse en sortie de colonne IMAC-$Fe^{II}$ ($I_{Abs}$ < 5% sur une solution diluée 2 fois).

En complément, un dosage spectrophotométrique des ions « fer » a été mis en œuvre sur une solution **CRC** diluée 50 fois (pour comparaison avec le résultat obtenu par ICP-OES). Dans le cas des ions ferriques (collectés en sortie de colonne IMAC-$Fe^{III}$), celui-ci a été réalisé grâce au test de complexation avec le DFO : [$Fe^{3+}$] = 0.07 mM ($Abs_{448\ nm}$ = 9.1%) soit 3.5 mM après correction de la dilution. Dans le cas des ions ferreux (collectés en sortie de colonne IMAC-$Fe^{II}$), le dosage a été réalisé grâce au test de complexation avec l'ortho-phénanthroline (cf. **Matériel et méthodes**) : [$Fe^{2+}$] = 0.09 mM ($Abs_{510\ nm}$ = 39.1%) soit 4.5 mM après correction de la dilution. Les valeurs de concentration trouvées par cette méthode dans les fractions **CRC** ([$Fe^{3+}$] = 3.5 mM et [$Fe^{2+}$] = 4.5 mM) sont donc en bon accord avec celles obtenues par ICP-OES ($C_{Fer}$ = 4 mM).

### 2.3.2. Stripping

Notre deuxième objectif est d'accéder au degré d'oxydation du fer collecté en sortie de colonne, immédiatement après le stripping métallique. Cette information nous permettra de statuer, de façon indirecte, sur la stabilité chimique de l'ion fer selon la durée de greffage ($Fe^{2+}$ ou $Fe^{3+}$).

Le dosage spectrophotométrique des ions $Fe^{3+}$ a été initialement appliqué à la fraction **CS** provenant de la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (suite au stripping avec 5 mL de solution d'EDTA), afin de valider la formation du complexe [(DFO-3H)+$Fe^{III}$] dans ces conditions. En nous basant sur la quantité de fer déterminée par la technique de référence ICP-OES (3.1 µmol, *i.e.* 69% de la capacité de charge théorique), nous avons déduit la concentration réelle en ions ferriques de la fraction **CS** ([$Fe^{3+}$]$_{réelle}$ ≈ 0.15 mM). De manière inattendue, la mesure spectrophotométrique a donné lieu à une valeur expérimentale anormalement faible et très éloignée de la concentration réelle ([$Fe^{3+}$]$_{exp}$ ≈ 0, correspondant à $Abs_{448\ nm}$ ≈ 2%). Ce résultat non conforme est probablement dû à un phénomène de compétition entre le DFO et l'EDTA pour la complexation des $Fe^{3+}$. Bien que log$K_{f\ Fer(III)\text{-}DFO}$ soit nettement supérieur à log$K_{f\ Fer(III)\text{-}EDTA}$ (30.6 > 25.1), la présence d'un large excès d'EDTA par rapport au DFO empêche la formation du complexe [(DFO-3H)+$Fe^{III}$] ([$Fe^{3+}$]/[DFO]/[EDTA]=1/3/15).

### 2.3.3. Synthèse

Les conditions du chargement métallique sont conformes puisque le greffage de la colonne IMAC-$Fe^{II}$ est bien réalisé avec des ions $Fe^{2+}$ et celui de la colonne IMAC-$Fe^{III}$ avec des ions $Fe^{3+}$.

Le test de complexation avec le DFO ne permet pas d'accéder à la spéciation du fer sur les solutions de stripping du fait de l'effet compétiteur de l'EDTA pour les ions ferriques. Il n'est

donc pas possible de déterminer le degré d'oxydation du fer greffé, ce qui reste problématique dans le cas de la colonne IMAC-$Fe^{II}$.

Une autre preuve de la nature du greffage ($Fe^{2+}$ ou $Fe^{3+}$), en complément du niveau de greffage déjà évoqué, pourra être apportée par la sélectivité chromatographique obtenue à la suite de l'injection d'échantillons identiques sur les deux colonnes (IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$).

## 3. Analyses IMAC-ESI-MS

Dans l'optique d'une identification rapide des peptides chélateurs de fer, la phase de criblage IMAC est associée en ligne avec une détection par spectrométrie de masse (MS). Ce couplage est rendu possible grâce à l'interface électrospray (ESI), classiquement mise en œuvre pour l'ionisation des peptides. La plateforme IMAC-ESI-MS ainsi constituée doit permettre (i) la rétention sélective des peptides présentant une affinité pour le fer ($Fe^{III}$ ou $Fe^{II}$) et (ii) leur mise en évidence à haute sensibilité grâce à la spectrométrie de masse. Comme précédemment souligné, les conditions IMAC ont été choisies de manière à être compatibles avec une détection ESI-MS (tampons volatils, élution par gradient de pH). Nos expérimentations IMAC-ESI-MS devront donc répondre aux deux questions suivantes : l'analyse IMAC des peptides non phosphorylés est-elle faisable dans des conditions très éloignées de celles traditionnellement utilisées (tampons et compétiteurs non volatils, NaCl à haute concentration) ? les colonnes IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$ sont-elles greffées avec le fer à l'état d'oxydation souhaité ?

Pour chaque type d'échantillon (ligand de référence, peptide standard, hydrolysat), des analyses ont été conjointement réalisées en IMAC-$Fe^{III}$, IMAC-$Fe^{II}$ et sur une colonne similaire sans ions « fer » immobilisés (selon l'approche expérimentale détaillée en **Figure 44**). Les expériences rapportées concernant la colonne IMAC-$Fe^{II}$ ont été réalisées en conditions inertes (*i.e.* après la première régénération).

### 3.1. Ligands de référence

La desferrioxamine (DFO) et la terpyridine (TERPY) sont d'excellents chélateurs du fer(III) et du fer(II), respectivement. Ces composés non peptidiques ont été injectés dans le but de caractériser sans ambiguïté les deux greffages. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 15**.

**Tableau 15.** Temps de rétention des composés DFO et TERPY sur les trois supports IMAC-$Fe^{III}$, IMAC-$Fe^{II}$ et IDA (colonne non greffée en fer). Mise en œuvre de gradients de pH croissant ($GpH^+$) et de gradients de pH décroissant ($GpH^-$) par paliers : $pH_{initial}$ (10 min) puis $pH_{final}$ (10 min).

| CONDITIONS | $GpH^+$ pH3-pH9 (20 min) | DFO Tr (min) | $GpH^-$ pH7.4-pH3 (20 min) | TERPY Tr (min) |
|---|---|---|---|---|
| **Test visé** | IMAC-$Fe^{III}$ | ≈ 1.0 [1] | IMAC-$Fe^{II}$ | 16.0 [2] |
| **Contrôle n°1** | IMAC-$Fe^{II}$ | ≈ 1.0 [1] | IMAC-$Fe^{III}$ | 18.0 [2] |
| **Contrôle n°2** | **IDA** | ≈ 1.0 [3] | **IDA** | erratique [3] |

[1] forme complexée (exclusivement)
[2] forme complexée + forme libre
[3] forme libre (exclusivement)

Nous discutons ci-après les résultats obtenus pour chacun des 2 ligands de référence.

### 3.1.1. Analyse de la desferrioxamine

Le DFO, très fort complexant, entraine un lessivage des ions « fer » et n'est donc pas retenu sur les supports greffés (Tr ≈ 1.0 min). Il est détecté sous la même forme complexée [(DFO-3H)+$Fe^{III}$] en sortie des colonnes IMAC-$Fe^{III}$ (de façon logique) et IMAC-$Fe^{II}$ (de manière plus inattendue) (**Figure 45**). Dans ce dernier cas, ce résultat s'explique par l'oxydation des ions fer(II) en ions fer(III) en présence de DFO. En ce qui concerne le test sur le support non greffé en ions métalliques, nous n'observons aucune interaction entre les groupes IDA (déprotonés à pH 3) et le DFO (Tr ≈ 1.0 min), ce dernier étant logiquement détecté sous sa seule forme libre (résultat non montré ici).

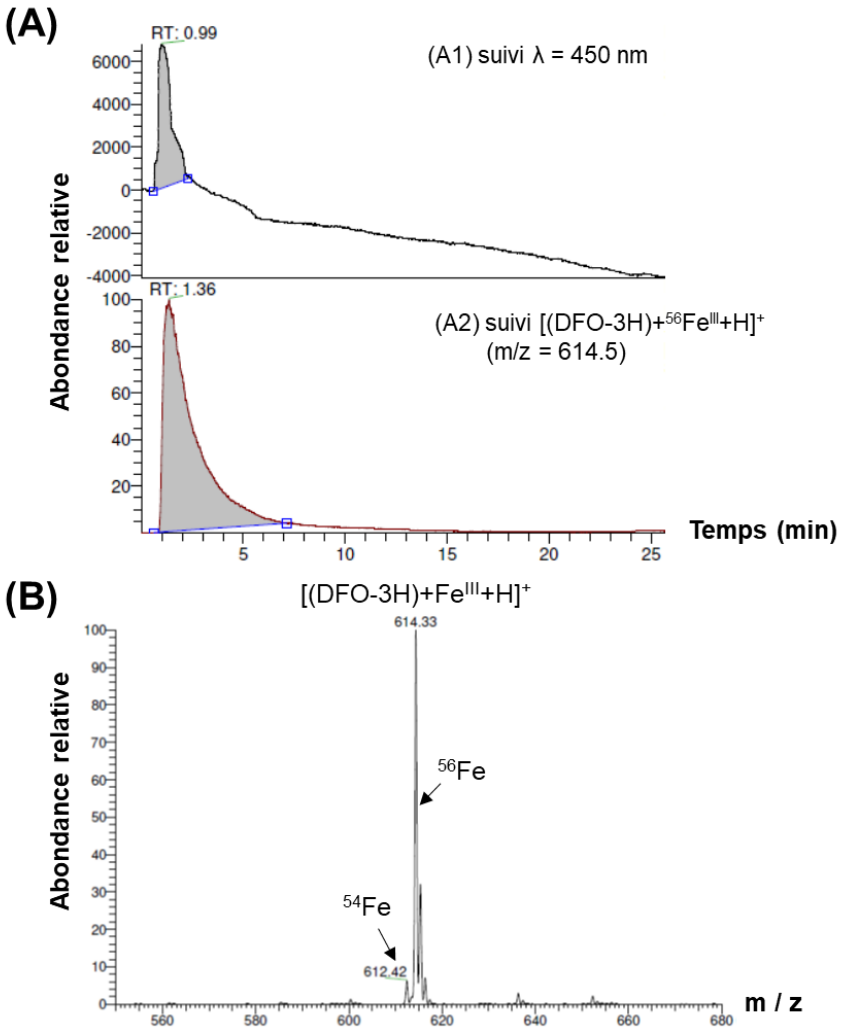



**Figure 45.** **(A)** Suivi de la desferrioxamine (DFO, M = 560) sous sa forme complexée [(DFO-3H)+$Fe^{III}$] par (A1) absorbance à λ = 450 nm et (A2) $ESI^+$-MS à m/z = 614.5 ([(DFO-3H)+$^{56}Fe^{III}$+H]$^+$), **(B)** Spectre $ESI^+$-MS montrant la desferrioxamine complexée avec $Fe^{3+}$, avec la contribution relative des isotopes $^{54}Fe$ (m/z = 612.5) et $^{56}Fe$ (m/z = 614.5).

### 3.1.2. Analyse de la terpyridine

Le TERPY est fortement retenu sur les deux supports IMAC-$Fe^{II}$ et IMAC-$Fe^{III}$ (16.0 et 18.0 min, respectivement), ce qui indique de prime abord (i) qu'il serait capable de complexer $Fe^{III}$ (contrairement au résultat attendu) et (ii) que son affinité serait même plus grande pour $Fe^{III}$ que pour $Fe^{II}$ (de façon très surprenante). Toutefois, dans ces deux cas, le TERPY est détecté – en plus de sa forme libre – sous la même forme complexée [$(TERPY)_2$+$Fe^{II}$]$^{2+}$ (**Figure 46**).

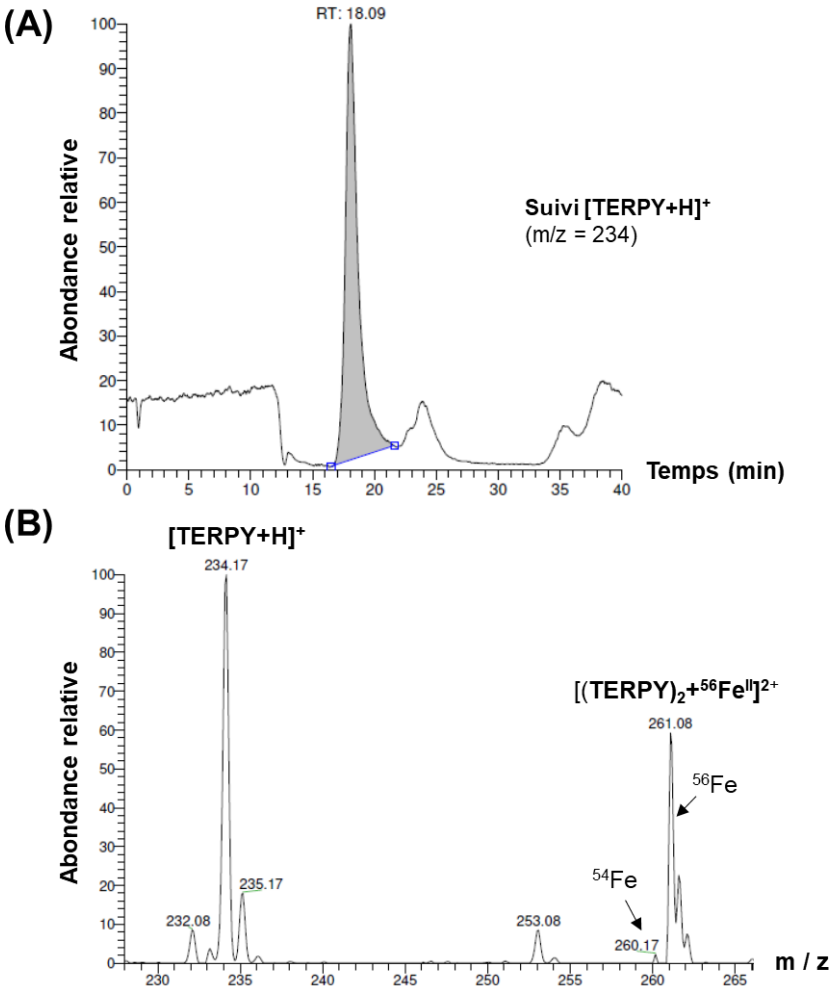



**Figure 46.** **(A)** Suivi $ESI^+$-MS de la terpyridine (TERPY, M = 233) sous sa forme libre à m/z = 234 ($[TERPY+H]^+$), (**B)** Spectre $ESI^+$-MS montrant la terpyridine sous sa forme libre et sa forme complexée $[(TERPY)_2+ Fe^{II}]^{2+}$ (m/z = 261), avec la contribution relative des isotopes $^{54}Fe$ (m/z = 260) et $^{56}Fe$ (m/z = 261).

Cela prouve que le TERPY entraine la réduction du $Fe^{III}$ en $Fe^{II}$ et qu'il lessive par ailleurs une partie des ions « fer » lors de l'élution. De ce fait, il n'est pas possible de relier sa rétention à la nature du greffage ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$). Quant à l'expérience réalisée sur la colonne contrôle (IDA), le TERPY – logiquement détecté sous sa forme libre (résultat non montré ici) – montre un comportement chromatographique radicalement différent de celui observé sur les supports greffés (sortie erratique).

### 3.1.3. Synthèse

Les deux ligands de référence (DFO, TERPY) ne permettent pas de conclure sur la nature exacte du greffage ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$). En effet, ceux-ci sont de trop forts complexants et provoquent (i) une modification de l'état d'oxydation du fer greffé (oxydation du $Fe^{II}$ en $Fe^{III}$ dans le cas du DFO, réduction du $Fe^{III}$ en $Fe^{II}$ dans le cas du TERPY) ainsi que (ii) un lessivage des ions « fer » aboutissant à la formation des complexes associés ($[(DFO-3H)+^{56}Fe^{III}]$ et $[(TERPY)_2+Fe^{II}]^{2+}$).

## 3.2. Peptides standards non phosphorylés

Dans un deuxième temps, une trentaine de peptides standards non phosphorylés de petite taille – constituant un large éventail de séquences en acides aminés – ont été analysés. De façon à réduire le nombre des tests, ces peptides ont été préalablement classés en deux groupes selon leur capacité supposée à se complexer :

- avec le fer(II), en se basant prioritairement sur le groupe imidazole (H, Ha) et secondairement sur les acides aminés comportant une base de Lewis intermédiaire (N, Q) ou molle (C) : HI, HF, HK, HW, HH, CC, βAH, DTH, DSH, DAH, DMH, EAH, GGH, RCH, GNH, CAH, RTH, HGH, HHH, GGHa, LAN, IAN, NCS, NLS, CAC, CAAC ;

- ou avec le fer(III), en se basant prioritairement sur le motif à 3 résidus acides successifs et secondairement sur les acides aminés comportant une base de Lewis dure (K, R, Y) : DED, RYN, RKR, RQR, KYS.

### 3.2.1. Peptides potentiellement complexants du fer(II)

Le **Tableau 16** détaille le comportement chromatographique de trois peptides représentatifs du premier groupe, dont la carnosine (βAH) plusieurs fois reportée dans la littérature comme chélatrice du fer(II) (cf. **Étude bibliographique, II.3.2**, **Tableau 7**).

**Tableau 16.** Temps de rétention des peptides GGHa, GGH et βAH (carnosine) sur les trois supports IMAC-$Fe^{III}$, IMAC-$Fe^{II}$ et IDA. Mise en œuvre d'un gradient $GpH^-$ mixte : $pH_{initial}$ = 7.4 (5 min), $pH_{initial}$ = 7.4 à $pH_{final}$ = 3 (5 min), $pH_{final}$ = 3 (10 min).

| CONDITIONS | $GpH^-$ pH7.4-pH3 (20 min) | GGHa Tr (min) | GGH Tr (min) | βAH Tr (min) |
|---|---|---|---|---|
| **Test visé** | IMAC-$Fe^{II}$ | 13.5 | 2.4 | 2.2 |
| **Contrôle n°1** | IMAC-$Fe^{III}$ | 13.9 | 5.1 | 4.7 |
| **Contrôle n°2** | **IDA** | 14.0 | 2.7 | 2.5 |

De façon systématique pour tous les peptides de ce groupe (cf. la table des temps de rétention donnée en **Annexe 7**), une rétention similaire est observée sur la colonne IMAC-$Fe^{II}$ et sur la colonne non greffée (IDA), ce qui ne permet pas d'établir l'existence de phénomènes de complexation avec les prétendus ions $Fe^{II}$. Ce résultat n'est pas aberrant car le niveau de greffage de la colonne IMAC-$Fe^{II}$ est très faible (environ 90% de groupes IDA non greffés).

En l'absence de sel à haute concentration dans nos éluants IMAC, des interactions ioniques peuvent se produire entre les groupes IDA libres déprotonés (chargés négativement) et les peptides chargés positivement à pH 7.4 (pH de début d'élution). Ainsi, le tripeptide GGHa de charge globale +1 ($NH_{2\ term}$ protoné) est élué tardivement (Tr = 14.0 min) alors que GGH et βAH ne sont quasiment pas retenus (Tr ≈ 2.5 min) du fait d'une charge globale nulle ($NH_{2\ term}$ protoné et $COOH_{\ term}$ déprotoné). Les peptides comportant un acide aminé avec une chaine latérale basique (lysine (K) de $pK_R$ = 10.5 et arginine (R) de $pK_R$ = 12.5, charge +1) donnent

également lieu à des interactions ioniques et sont fortement retenus (HK, RCH, RTH). Concernant les tripeptides avec un résidu acide et une histidine (DTH, DSH, DAH, DMH, EAH), ceux-ci ne sont quasiment pas retenus en raison d'une charge globale estimée à -1 ($NH_2$ $_{term}$ protoné, COOH $_{term}$ déprotoné, imidazole déprotoné et COOH $_{latéral}$ déprotoné).

Dans le cas des peptides fortement retenus (*i.e.* ceux qui sont chargés positivement à pH 7.4 comme GGHa), l'expérience contrôle sur la colonne IMAC-$Fe^{III}$ montre une rétention identique à celle observée sur les colonnes IMAC-$Fe^{II}$ et non greffée. Une interaction purement ionique *via* les groupes IDA libres est donc *a priori* mise en jeu sur les trois types de supports, y compris pour la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (pour laquelle environ 30% des groupes IDA ne sont pas greffés).

Pour les peptides qui sont neutres à pH 7.4 (cas de GGH et βAH), on constate une rétention sensiblement supérieure en IMAC-$Fe^{III}$ sans doute attribuable à une interaction par complexation. Toutefois, ce résultat n'apparait pas conforme à la logique de notre démarche expérimentale : en effet, l'injection sur la colonne IMAC-$Fe^{III}$ doit théoriquement servir de contrôle négatif (*via* une faible rétention) pour valider un ligand du $Fe^{II}$ (détecté comme tel grâce à une rétention sensiblement plus élevée sur la colonne IMAC-$Fe^{II}$).

La **Figure 47** permet d'observer que l'élution des peptides n'entraine pas de lessivage des ions « fer », puisque seules les formes libres sont détectées ($[M+H]^+$ et parfois $[M+Na]^+$).

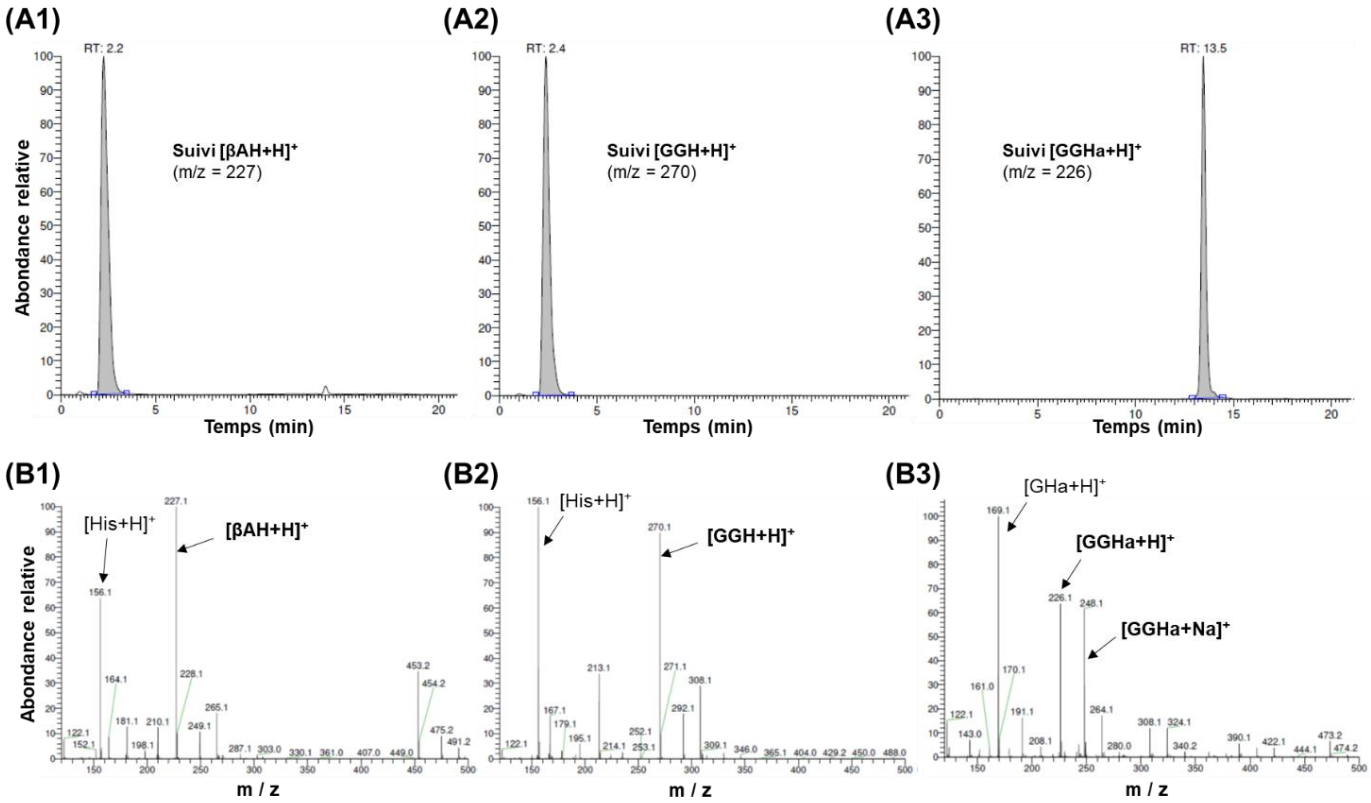



**Figure 47.** Suivi $ESI^+$-MS de **(A1)** βAH, **(A2)** GGH et **(A3)** GGHa, après injection sur la colonne IMAC-$Fe^{II}$. Spectres MS enregistrés sous les pics chromatographiques de **(B1)** βAH, avec m/z = 227 attribué à $[βAH+H]^+$, **(B2)** GGH, avec m/z = 270 attribué à $[GGH+H]^+$et **(B3)** GGHa, avec m/z = 226 attribué à $[GGHa+H]^+$ et m/z = 248 attribué à $[GGHa+Na]^+$.

### 3.2.2. Peptides potentiellement complexants du fer(III)

Le **Tableau 17** détaille le comportement chromatographique du tripeptide DED, dont le motif à 3 résidus acides est *a priori* parfaitement adapté pour complexer le fer(III). On constate que DED (de charge globale neutre à pH 3) n'est retenu sur aucun des trois supports (Tr ≈ 1.0 min), le temps de rétention obtenu correspondant au temps mort du système (initialement mesuré par injection de glycine). Un test complémentaire, réalisé en injectant une solution du peptide à pH 7.4 (pour favoriser la déprotonation des fonctions COOH latérales), n'a pas non plus permis de mettre en évidence une interaction par complexation sur la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (Tr ≈ 1.0 min).

**Tableau 17.** Temps de rétention du tripeptide DED sur les trois supports IMAC-$Fe^{III}$, IMAC-$Fe^{II}$ et IDA. Mise en œuvre d'un gradient $GpH^+$ par paliers : $pH_{initial}$ = 3 (10 min) puis $pH_{final}$ = 9 (10 min).

| CONDITIONS | $GpH^+$ pH3-pH9 (20 min) | DED [1] Tr (min) | DED [2] Tr (min) |
|---|---|---|---|
| **Test visé** | IMAC-$Fe^{III}$ | ≈ 1.0 | ≈ 1.0 |
| **Contrôle n°1** | IMAC-$Fe^{II}$ | ≈ 1.0 | ≈ 1.0 |
| **Contrôle n°2** | **IDA** | ≈ 1.0 | ≈ 1.0 |

[1] solution standard DED injectée à pH 3.0

[2] solution standard DED injectée à pH 7.4

Les autres peptides testés (RYN, RKR, RQR, KYS) – chargés positivement à pH 3.0 au niveau des acides aminés basiques (R, K) – présentent une rétention élevée et indépendante du support (mêmes Tr obtenus sur IMAC-$Fe^{III}$, IMAC-$Fe^{II}$ et le support non greffé), cela indiquant une interaction purement électrostatique avec les groupes IDA déprotonés (cf. la table des temps de rétention donnée en **Annexe 7**).

### 3.2.3. Synthèse

Les résultats obtenus sur les peptides standards non phosphorylés de petite taille ne permettent pas d'identifier des chélateurs évidents du fer(III) ou du fer(II). Certains peptides présentent une rétention importante sur les supports greffés, mais celle-ci n'est pas due à un phénomène de complexation avec les ions « fer ». En effet, la faible force ionique de nos éluants IMAC (absence de NaCl) favorise les interactions électrostatiques entre les groupes IDA libres (représentant une part significative des sites pour les deux supports IMAC étudiés) et les peptides portant une charge nette positive en début d'élution.

Une rétention par complexation a bien été mise en évidence en IMAC-$Fe^{III}$, mais ce résultat ne s'inscrit malheureusement pas dans notre approche méthodologique : d'une part, les peptides concernés sont de potentiels chélateurs de $Fe^{II}$ (et non de $Fe^{III}$) et d'autre part, les paramètres d'élution mis en œuvre sont contraires à notre théorie de référence (HSAB). Le comportement chromatographique propre à la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (observé en cette occasion) permet toutefois de supposer la nature ferrique du greffage.

Dans ces conditions, il est surprenant de constater qu'un tripeptide modèle comme DED ne montre pas l'interaction escomptée avec la colonne IMAC-$Fe^{III}$. Cela pourrait s'expliquer par la taille trop faible du peptide qui l'empêcherait de trouver la conformation idéale pour se fixer sur l'ion ferrique.

Afin de pouvoir conclure plus objectivement sur (i) la faisabilité de notre protocole analytique concernant l'analyse des peptides non phosphorylés et sur (ii) la nature exacte des greffages, nous poursuivons cette étude sur un mélange peptidique complexe présentant une grande diversité de séquences (en termes de taille et de composition).

## 3.3. Hydrolysat caséique

L'hydrolysat trypsique de caséines a été utilisé ici comme une librairie de peptides. La présence conjointe d'un grand nombre de phosphopeptides et de peptides non phosphorylés (aux propriétés acides ou non) a été mise à profit pour étudier la spécificité des greffages, et par extension leur nature. La caractérisation préalable de l'hydrolysat caséique par RPLC-UV-HRMS a permis d'identifier – par référence aux travaux de Hart *et al.*, 2002 [172] – six phosphopeptides et deux peptides non phosphorylés avec des propriétés acides (cf. **Matériel et méthodes, 3** et **Annexe 4** pour la structure des peptides). Par ailleurs, une cinquantaine de peptides de séquence inconnue ont également été mis en évidence, repérés par leur temps de rétention et leur ratio m/z.

L'hydrolysat caséique a été analysé selon la procédure établie et en utilisant de surcroit une détection MS à haute résolution (IMAC-ESI-HRMS). De cette manière, j'ai pu réaliser un criblage à masse exacte des peptides présélectionnés (phosphopeptides, peptides non phosphorylés acides, autres peptides inconnus).

### 3.3.1. Analyse IMAC des phosphopeptides et peptides « acides »

Une première série d'expériences a été réalisée en focalisant sur les composés assimilés à des bases dures de Lewis. Quatre phosphopeptides et un peptide « acide » ont finalement été sélectionnés pour cette étude. Le **Tableau 18** reporte leur comportement chromatographique sur les trois supports testés. L'élution comparée des phosphopeptides et du peptide « acide » valide sans ambiguïté la nature ferrique du greffage IMAC-$Fe^{III}$. À l'inverse, l'absence (ou quasi-absence) de rétention sur la colonne IMAC-$Fe^{II}$ permet de conclure que le greffage n'est *a priori* pas composé d'ions $Fe^{3+}$.

**Tableau 18.** Temps de rétention de quatre phosphopeptides et d'un peptide « acide » sur les trois supports IMAC-$Fe^{III}$, IMAC-$Fe^{II}$ et IDA. Mise en œuvre d'un gradient $GpH^+$ mixte (repris sur la fiche technique de la colonne ProPac IMAC-10) : $pH_{initial}$ = 3 à $pH_{final}$ = 10 (6 min) puis $pH_{final}$ = 10 (14 min).

| | | PHOSPHOPEPTIDES | | | | PEPTIDE ACIDE |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **CONDITIONS** | $GpH^+$ pH3-pH10 (20 min) | **n°1** M = 2060 Tr (min) | **n°2** M = 1465 Tr (min) | **n°3** M = 1950 Tr (min) | **n°4** M = 1659 Tr (min) | **n°1** M = 3025 Tr (min) |
| **Test visé *** | IMAC-$Fe^{III}$ | 8.6 | 8.8 | 8.9 | 8.8 | 2.7 |
| **Contrôle n°1 *** | IMAC-$Fe^{II}$ | 1.1 | 1.1 | 2.5 | 1.0 | 1.4 |
| **Contrôle n°2 *** | **IDA** | 1.0 | 1.0 | 1.4 | 1.0 | 1.3 |

* analyses en triplicats

Par ailleurs, le comportement spécifique du phosphopeptide n°3 ($Tr_{IMAC\text{-}fer(III)} > Tr_{IMAC\text{-}fer(II)} > Tr_{IDA}$) semble indiquer que les trois supports sont bien de natures différentes (d'autant que la répétabilité de ces résultats a été validée par des analyses en triplicats) (**Figure 48**).

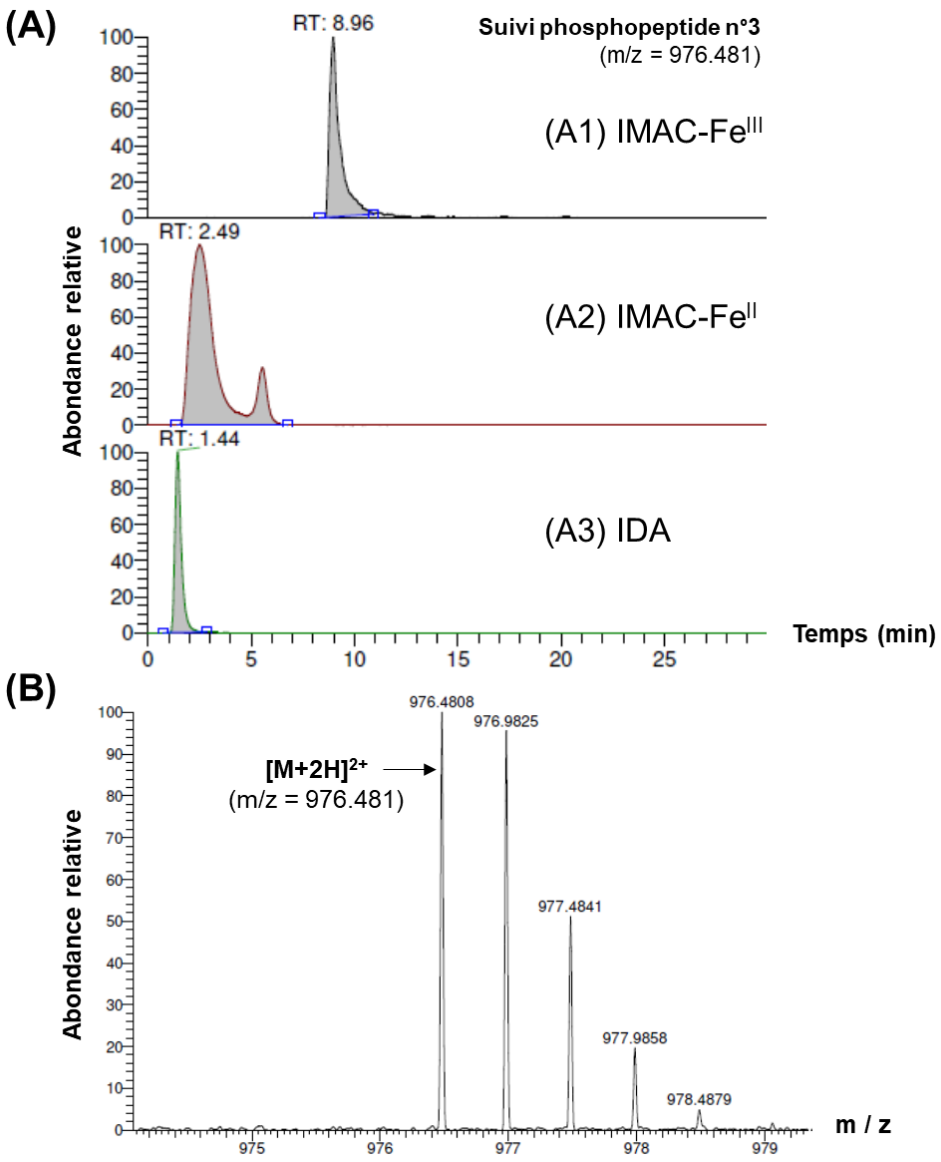



**Figure 48.** **(A)** Suivi ESI$^{+}$-MS du phosphopeptide n°3 (M $_{exacte}$ = 1950.968) après injection sur les colonnes (A1) IMAC-Fe$^{III}$, (A2) IMAC-Fe$^{II}$ et (A3) IDA, **(B)** Spectre MS enregistré sous le pic du phosphopeptide n°3, avec m/z = 976.481 attribué à [M+2H]$^{2+}$.

Un test contrôle complémentaire (contrôle n°3) réalisé sur la colonne IMAC-Fe$^{III}$ en appliquant un gradient de pH décroissant – contraire à une rétention selon le principe HSAB – a permis de valider que les quatre phosphopeptides et le peptide acide non phosphorylé n'étaient pas du tout retenus dans ces conditions inadaptées (**Tableau 19**).

**Tableau 19.** Temps de rétention de quatre phosphopeptides et d'un peptide acide non phosphorylé sur le support IMAC-$Fe^{III}$. Mise en œuvre d'un gradient $GpH^-$ mixte : $pH_{initial}$ = 7.4 (5 min), $pH_{initial}$ = 7.4 à $pH_{final}$ = 3 (5 min), $pH_{final}$ = 3 (5 min).

| | | PHOSPHOPEPTIDES | | | | PEPTIDE ACIDE |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CONDITION | GpH⁻ pH7.4-pH3 (15 min) | n°1 M = 2060 Tr (min) | n°2 M = 1465 Tr (min) | n°3 M = 1950 Tr (min) | n°4 M = 1659 Tr (min) | n°1 M = 3025 Tr (min) |
| Contrôle n°3 | IMAC-$Fe^{III}$ | 1.2 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |

### 3.3.2. Analyse IMAC des peptides non phosphorylés (et non « acides »)

Une deuxième série d'expériences a été réalisée en focalisant sur les composés assimilés à des bases intermédiaires de Lewis. Parmi la cinquantaine de peptides inconnus présélectionnés, quatre ont révélé des rétentions en accord avec notre objectif (**Tableau 20**).

**Tableau 20.** Temps de rétention de quatre peptides inconnus (identifiés par leurs Tr et m/z) sur les trois supports IMAC-$Fe^{III}$, IMAC-$Fe^{II}$ et IDA. Mise en œuvre d'un gradient $GpH^-$ mixte : $pH_{initial}$ = 7.4 (5 min), $pH_{initial}$ = 7.4 à $pH_{final}$ = 3 (5 min), $pH_{final}$ = 3 (10 min).

| | | PEPTIDES NON PHOSPHORYLES | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| CONDITIONS | GpH⁻ pH7.4-pH3 (20 min) | n°1 M = 524 Tr (min) | n°2 M = 493 Tr (min) | n°3 M = 614 Tr (min) | n°4 M = 2280 Tr (min) |
| Test visé * | IMAC-$Fe^{II}$ | 15.8 | 15.0 | 18.0 | 5.6 |
| Contrôle n°1 | IMAC-$Fe^{III}$ | nd [1] | nd [1] | nd [1] | 4.9 |
| Contrôle n°2 | IDA | 4.8 | 4.7 | 7.7 | 3.0 |

* analyses en triplicats

[1] non déterminé

La rétention élevée de ces quatre peptides sur le support IMAC-$Fe^{II}$, comparativement à celle obtenue sur le support IDA seul, tend à montrer que le greffage en ions ferreux est effectif. De façon surprenante, il semble que trois de ces peptides (n°1, n°2 et n°3) restent accrochés sur la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (cela se traduisant par une absence de pic chromatographique). Ce phénomène parait cependant difficilement explicable par un mécanisme de complexation. En effet, en considérant ces peptides comme :

- des bases intermédiaires de Lewis (comme cela semble être le cas vu les résultats obtenus sur la colonne IMAC-$Fe^{II}$), ceux-ci ne devraient théoriquement pas montrer d'affinité particulière pour les ions ferriques (et par conséquent occasionner une rétention faible ou nulle) ;

- des bases dures de Lewis (selon un raisonnement par l'absurde), ils ne devraient pas non plus être retenus. En effet, il a précédemment été vérifié que les phosphopeptides et peptides « acides » étaient élués au temps mort (Tr ≈ 1.0 min) dans ces mêmes conditions (cf. **Tableau 19**).

Afin d'éclaircir ce point, le suivi de ces quatre peptides a été réalisé à travers une série de tests complémentaires (**Tableau 21**) : un gradient de pH croissant (pH 3 à pH 10) a été appliqué en IMAC-$Fe^{II}$ (contrôle 3), en IMAC-$Fe^{III}$ (contrôle 4) et sur le support non greffé (contrôle 5). Ces nouveaux résultats permettent d'affirmer que les peptides en question (chargés positivement à pH 3) interagissent ici de manière purement ionique avec les groupes IDA libres, puisque chaque peptide montre des Tr similaires sur les trois supports. Dans ce cas, l'élution est *a priori* obtenue par compétition avec les cations ammonium, dont la concentration augmente avec le pH (le $NH_4OH$ étant mis en œuvre pour ajuster le pH des éluants).

**Tableau 21.** Temps de rétention des quatre peptides inconnus (identifiés par leurs Tr et m/z) sur les trois supports IMAC-$Fe^{III}$, IMAC-$Fe^{II}$ et IDA. Mise en œuvre d'un gradient $GpH^+$ mixte : $pH_{initial}$ = 3 à $pH_{final}$ = 10 (6 min) puis $pH_{final}$ = 10 (14 min).

| | | PEPTIDES NON PHOSPHORYLES | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| CONDITIONS | $GpH^+$ pH3-pH10 (20 min) | n°1 M = 524 Tr (min) | n°2 M = 493 Tr (min) | n°3 M = 614 Tr (min) | n°4 M = 2280 Tr (min) |
| **Contrôle n°3** | IMAC-$Fe^{II}$ | 8.4 | 8.4 | 8.4 | 8.4 |
| **Contrôle n°4** | IMAC-$Fe^{III}$ | 9.0 | 9.0 | 9.0 | 9.0 |
| **Contrôle n°5** | **IDA** | 8.6 | 8.6 | 8.7 | 8.0 |

Toutefois, l'hypothèse d'une interaction électrostatique avec les groupes IDA libres (à pH 7.4) n'est pas en mesure d'expliquer l'absence de pic chromatographique pour 3 des 4 peptides lors de l'expérience IMAC-$Fe^{III}$ menée avec un gradient de pH décroissant (cf. **Tableau 20**). En effet, si tel était le cas, le même phénomène aurait également dû être observé sur la colonne non greffée en fer (IDA). La coexistence d'interactions de natures diverses (ioniques, complexantes, forces de London…) pourrait engendrer une forte diffusion de certains peptides, aboutissant à des pics chromatographiques non détectables (phénomène d'aplatissement).

### 3.3.3. Synthèse

Un hydrolysat trypsique de caséines a été injecté sur les trois types de supports (IMAC-$Fe^{III}$, IMAC-$Fe^{II}$, IDA), afin de statuer sur la nature du greffage en fer ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$) et sur la faisabilité de notre protocole. Dans cet objectif, nous avons comparé les sélectivités obtenues (sur chacun des 3 supports) pour des peptides appartenant à une même classe selon la théorie HSAB (bases dures de Lewis ou bases intermédiaires de Lewis).

Dans un premier temps, nous avons focalisé sur les bases dures de Lewis, ce qui nous a conduit à sélectionner – dans cet hydrolysat – 4 phosphopeptides et 1 peptide reconnu comme possédant des propriétés acides. Pour cette série d'expériences, une élution par gradient de pH croissant a été mise en œuvre, de manière conforme à notre approche méthodologique. Le suivi MS ciblé de ces 5 peptides a permis de valider (i) la nature ferrique du greffage dans le cas de la colonne IMAC-$Fe^{III}$ et *a contrario* (ii) la nature non-ferrique du greffage dans le cas de la colonne IMAC-$Fe^{II}$. En effet, les phosphopeptides ont été fortement retenus en IMAC-$Fe^{III}$ (avec des Tr aux alentours de 9.0 min) et non ou faiblement retenus en IMAC-$Fe^{II}$ (avec des Tr correspondant généralement au temps mort du système, de manière similaire à ce qui a été

observé sur la colonne non greffée en fer). La rétention comparée du peptide « acide » confirme ce résultat, puisque celui est davantage retenu en IMAC-$Fe^{III}$ (Tr = 2.7 min) qu'en IMAC-$Fe^{II}$ (Tr = 1.4 min, soit une rétention identique à celle observée sur le support IDA). Par ailleurs, l'un des 4 phosphopeptides sélectionnés a montré un comportement chromatographique sensiblement différent sur les supports IMAC-$Fe^{II}$ (Tr = 2.5 min) et IDA (Tr = 1.4 min), ce qui pourrait s'expliquer par une interaction complexante avec les potentiels ions $Fe^{II}$.

Dans un second temps, nous avons cherché à mettre en évidence – au sein de notre hydrolysat caséique – des peptides apparentés à des bases intermédiaires de Lewis. Pour ce faire, un nombre important de séquences peptidiques candidates – préalablement repérées par leur ratio m/z – ont été scrutées concernant leur affinité relative pour les 3 supports étudiés. Par application d'un gradient de pH décroissant (conformément à notre approche méthodologique), 4 peptides se sont révélés intéressants *via* une rétention nettement plus élevée en IMAC-$Fe^{II}$ que sur la colonne non greffée (écart de 10 min relevé entre ces 2 supports pour les 3 premiers peptides et 2.5 min pour le 4$^{e}$). Cependant, trois de ces peptides n'ont pas montré de pic chromatographique en IMAC-$Fe^{III}$ (dans les mêmes conditions d'élution par pH décroissant), ce qui pourrait s'expliquer par un phénomène de diffusion intense. Quoiqu'il en soit, ces 4 peptides non phosphorylés nous ont permis de montrer la spécificité d'interaction de la colonne IMAC-$Fe^{II}$ vis-à-vis des bases intermédiaires de Lewis (selon notre hypothèse), et *in fine* de supposer la nature ferreuse du support.

## 4. Faisabilité d'un criblage IMAC-MS des peptides chélateurs de fer au sein d'un hydrolysat

Les résultats encourageants obtenus sur l'hydrolysat caséique indiquent que notre protocole analytique est *a priori* utilisable pour identifier des peptides de type (i) bases dures de Lewis sur un support IMAC-$Fe^{III}$ (phosphopeptides et peptides « acides ») et de type (ii) bases intermédiaires de Lewis sur un support IMAC-$Fe^{II}$ (peptides non phosphorylés).

Toutefois, nous avons constaté que les expériences contrôles – réalisées sur une colonne IMAC greffée avec le fer à l'autre état d'oxydation ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$) et sur un support non greffé en fer (IDA) – sont indispensables pour s'affranchir des interactions aspécifiques. En particulier, les interactions électrostatiques avec les groupes IDA libres – conséquence directe de l'absence de sels à haute concentration dans les phases mobiles – sont une potentielle cause d'erreurs à prendre en compte dans notre processus d'identification des composés chélateurs.

Pour cette raison, nous proposons d'évaluer la faisabilité d'un criblage IMAC-MS des peptides chélateurs de fer en appliquant – dans une première approche – la démarche manuelle suivante (cf. **Figure 43** pour le rappel des 3 expériences standards) :

- **étape 1** = on met en évidence un pic d'intérêt sur le chromatogramme du courant ionique total (TIC-MS) associé au **test visé (conforme à la théorie HSAB)** ;

- **étape 2** = on enregistre le spectre MS correspondant au pic d'intérêt mis en évidence sur le TIC-MS du **test visé** ;

- **étape 3** = on enregistre, pour une fenêtre de rétention identique à celle du pic d'intérêt (vu sur le **test visé**), le spectre MS obtenu dans les conditions du **contrôle n°2 (support nu, IDA)** ;

- **étape 4** = on enregistre, pour une fenêtre de rétention identique à celle du pic d'intérêt (vu sur le **test visé**), le spectre MS obtenu dans les conditions du **contrôle n°1 (contraire à la théorie HSAB)** ;

- **étape 5** = on réalise un suivi ciblé de chacun des signaux MS d'intérêt dans les 3 expériences réalisées, *i.e.* le **test visé**, le **contrôle n°2 (support nu, IDA)** et le **contrôle n°1 (contraire HSAB)**.

L'**étape 1** permet de cibler les potentiels peptides chélateurs en repérant un pic jugé suffisamment retenu dans le **test visé** (*e.g.* en IMAC-$Fe^{III}$). Le spectre MS obtenu en **étape 2** montre les signaux (i) des potentiels peptides chélateurs (du $Fe^{III}$ dans notre exemple) et/ou (ii) des peptides éventuellement retenus de manière aspécifique. Grâce au spectre MS obtenu lors de l'**étape 3**, il est possible de soustraire les signaux des peptides retenus de manière électrostatique *via* les groupes IDA libres (en IMAC-$Fe^{III}$ dans notre exemple). L'**étape 4**, quant à elle, permet de vérifier que les signaux restants sont absents dans des conditions contraires au principe HSAB (ici en IMAC-$Fe^{II}$), et donc de confirmer que ceux-ci concernent des peptides retenus spécifiquement par chélation (du $Fe^{III}$ dans notre exemple). Enfin, l'**étape 5** permet de relever le temps de rétention de chaque peptide candidat dans chacune des 3 conditions expérimentales, et donc de statuer sans ambiguïté sur sa capacité de chélation (du $Fe^{III}$ dans notre exemple).

### 4.1. Test de criblage manuel des peptides chélateurs du fer(III)

La démarche de criblage manuel, précédemment décrite, a été testée pour rechercher – de manière non ciblée – des peptides chélateurs du fer(III) au sein de notre hydrolysat caséique. Pour ce faire, nous utilisons les expériences dont l'élution a été réalisée avec un gradient de pH croissant (en accord avec la théorie HSAB).

Comme observé en **Figure 49**, un pic chromatographique d'intérêt est aisément mis en évidence aux alentours de 9.0 min sur le TIC-MS obtenu par injection de l'hydrolysat sur la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (**test visé - étape 1**). Dans un deuxième temps, le spectre MS moyenné correspondant à la base du pic d'intérêt ($t_1$ à $t_2$) est obtenu (**test visé - étape 2**). Pour la même zone de rétention ($t_1$ à $t_2$), on obtient les deux spectres MS associés d'une part à l'expérience sur la colonne non greffée (**contrôle n°2** – **étape 3**) et d'autre part à l'expérience sur la colonne IMAC-$Fe^{II}$ (**contrôle n°1** – **étape 4**).

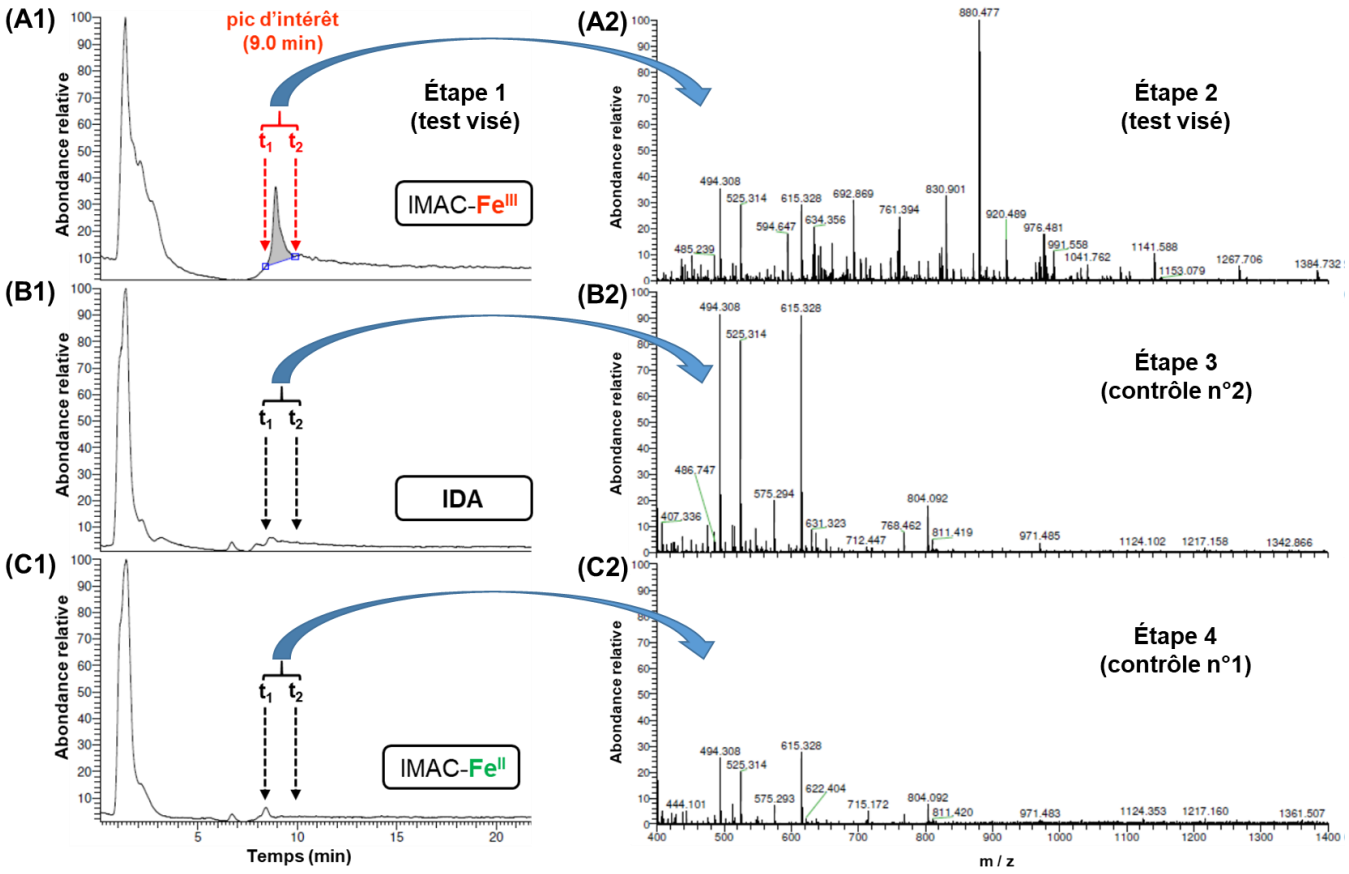



**Figure 49.** Suivi du courant ionique total (TIC-MS) de l'hydrolysat caséique analysé avec un gradient de pH croissant sur les supports **(A1)** IMAC-Fe$^{III}$ (**test visé-conforme HSAB**), **(B1)** IDA (**contrôle n°2- support nu**) et **(C1)** IMAC-Fe$^{II}$ (**contrôle n°1- contraire HSAB**). Spectre MS enregistré sur la fenêtre de rétention du pic d'intérêt (mis en évidence en IMAC-Fe$^{III}$) pour les expériences réalisées sur les supports **(A2)** IMAC-Fe$^{III}$, **(B2)** IDA et **(C2)** IMAC-Fe$^{II}$.

Une comparaison directe des spectres MS obtenus dans les trois conditions permet de réaliser une analyse différentielle pour extraire les signaux associés aux peptides retenus spécifiquement par complexation avec les ions ferriques, en IMAC-Fe$^{III}$ (**Figure 50**).

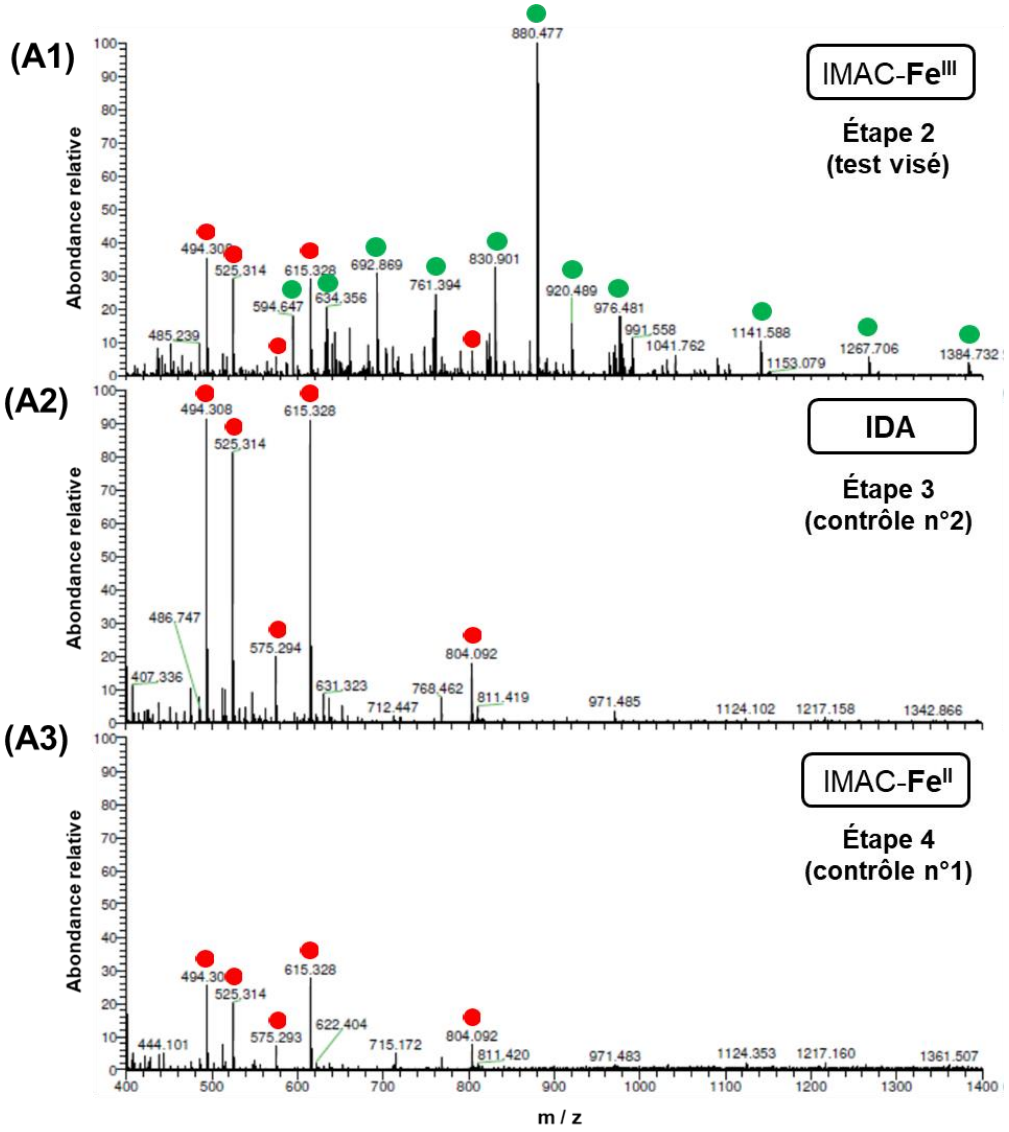



**Figure 50.** Focus sur les spectres MS enregistrés sur la fenêtre de rétention [$t_1$-$t_2$] (correspondant au pic d'intérêt vu en IMAC-$Fe^{III}$) pour les expériences réalisées sur les supports **(A1)** IMAC-$Fe^{III}$, **(A2)** IDA et **(A3)** IMAC-$Fe^{II}$. Les points rouges indiquent les signaux correspondant aux peptides retenus de manière aspécifique, *i.e.* ceux vus dans les expériences contrôle n°2 (IDA) et n°1 (IMAC-$Fe^{II}$). Les points verts indiquent les signaux associés aux peptides logiquement retenus par complexation avec les ions ferriques (en IMAC-$Fe^{III}$).

Après élimination des 5 ions majoritaires observés dans les deux expériences contrôles (points rouges) – et correspondant à des peptides retenus par interaction électrostatique avec les groupes IDA libres –, les signaux théoriquement attribuables à des peptides chélateurs du fer(III) sont déduits (points verts). Le **Tableau 22** dresse la liste des rapports masse sur charge (m/z) des ions d'intérêt.

**Tableau 22.** Liste des valeurs m/z attribuables à des peptides chélateurs du $Fe^{III}$ (obtenue à la suite de l'interprétation des spectres MS en **Figure 50**) accompagnée de (i) la masse du peptide associé à chaque valeur m/z, (ii) l'attribution d'un numéro par peptide mis en évidence et (iii) la séquence en acides aminés correspondante (si le peptide est identifié).

| Valeurs *m/z* d'intérêt | Forme de l'ion | Etat de charge | Masse du peptide correspondant | Attribution peptide (n°) | Séquence |
|---|---|---|---|---|---|
| 594.647 | $[M+2H+Na]^{3+}$ | 3 | 1758.954 | **1** | inconnue |
| 634.356 | $[M+2H]^{2+}$ | 2 | 1266.712 | **2** | inconnue |
| 692.869 | $[M+2H]^{2+}$ | 2 | 1383.738 | **3** | inconnue |
| 761.394 | $[M+3H]^{3+}$ | 3 | 2281.182 | **4** | inconnue |
| 830.901 | $[M+2H]^{2+}$ | 2 | 1659.802 | **5** | VPQLEIVPNS*AEER (1) |
| 880.477 | $[M+2H]^{2+}$ | 2 | 1758.954 | **1** | inconnue |
| 920.489 | $[M+H]^{+}$ | 1 | 919.489 | **6** | inconnue |
| 976.481 | $[M+2H]^{2+}$ | 2 | 1950.962 | **7** | YKVPQLEIVPNS*AEER (2) |
| 1141.588 | $[M+2H]^{2+}$ | 2 | 2281.176 | **4** | inconnue |
| 1267.706 | $[M+H]^{+}$ | 1 | 1266.706 | **2** | inconnue |
| 1384.732 | $[M+H]^{+}$ | 1 | 1383.732 | **3** | inconnue |

(1) pré-identifié dans l'hydrolysat caséique par référence à *Hart et al.* , 2002 (*i.e.* **phosphopeptide n°4** en **Annexe 4**)
(2) pré-identifié dans l'hydrolysat caséique par référence à *Hart et al.* , 2002 (*i.e.* **phosphopeptide n°3** en **Annexe 4**)
* : indique le site de phosphorylation (ici sur le résidu sérine S)

Pour chacune des 11 valeurs m/z d'intérêt, la masse du peptide correspondant a été calculée, en tenant compte de la forme de l'ion et de son état de charge (**Tableau 22**). Finalement, 7 peptides distincts ont été mis en évidence, 4 d'entre eux étant vus sous 2 états de charge différents (peptides n° 1, 2, 3 et 4). Par ailleurs, deux peptides ont pu être identifiés grâce à leur masse exacte (n°5 et 7). Ceux-ci correspondent à deux phosphopeptides précédemment caractérisés dans l'hydrolysat caséique (notés « phosphopeptide n°3 » et « phosphopeptide n°4 » en **Annexe 4**). En ce qui concerne les 5 autres peptides, ceux-ci n'ont pas encore été élucidés à ce stade.

Afin de valider avec certitude que les 7 peptides en question sont réellement complexants pour le fer(III), nous réalisons leur suivi comparé sur les 3 supports (**Figure 51**).

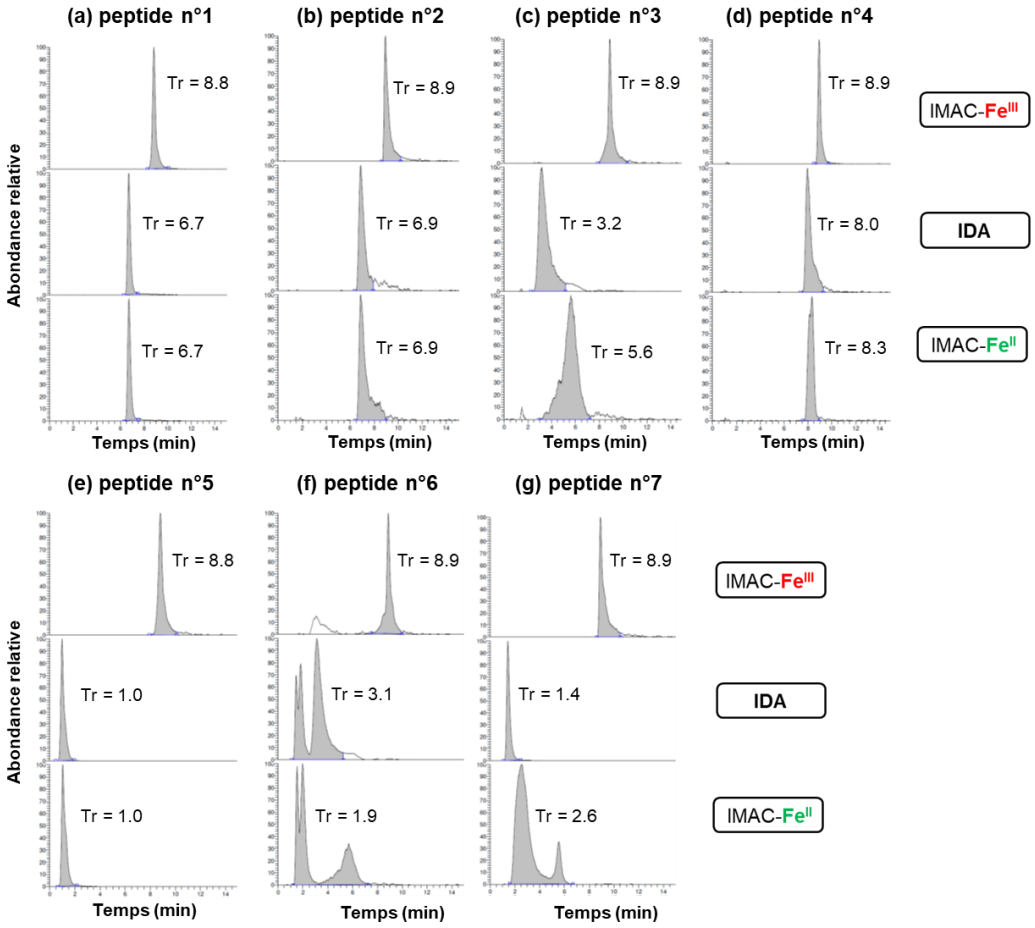



**Figure 51.** Suivi ciblé HRMS (masse exacte), sur les 3 supports IMAC-$Fe^{III}$ (panneau supérieur), IDA (panneau central) et IMAC-$Fe^{II}$ (panneau inférieur), des 7 peptides potentiellement chélateurs du fer(III), *i.e.* **(a)** peptide n°1, **(b)** peptide n°2, **(c)** peptide n°3, **(d)** peptide n°4, **(e)** peptide n°5 (phosphopeptide), **(f)** peptide n°6 et **(g)** peptide n°7 (phosphopeptide).

Tous les peptides sont davantage retenus en IMAC-$Fe^{III}$ que sur les deux autres supports, ce qui confirme leur affinité particulière pour les ions ferriques. Dans la majorité des cas, la spécificité d'interaction avec le fer(III) est évidente, le temps de rétention en IMAC-$Fe^{III}$ étant très nettement supérieur à celui relevé en IMAC-$Fe^{II}$ et sur la colonne non greffée ($\Delta Tr \approx$ 2-8 min). Concernant le peptide inconnu 4, la différence est moins marquée ($\Delta Tr$ = 1 min). Toutefois, l'écart de rétention $\Delta Tr$ ($Tr_{(IMAC\text{-}FeIII)} - Tr_{(IMAC\text{-}FeII)}$ ou $Tr_{(IMAC\text{-}FeIII)} - Tr_{(IDA)}$) ne traduit pas formellement la capacité de complexation d'un peptide. En effet, une même séquence peptidique peut donner lieu à des interactions complexantes avec le $Fe^{III}$ (selon le schéma attendu) et le $Fe^{II}$ (à rebours du schéma attendu), ainsi que des interactions ioniques avec les groupements IDA. Ce phénomène est observé pour le peptide inconnu 3 qui montre un pic bien au-delà du temps mort sur chacun des 3 supports (8.9, 3.2 et 5.6 min, respectivement sur IMAC-$Fe^{III}$, IDA et IMAC-$Fe^{II}$).

Dans ces circonstances, la répétabilité des Tr est un critère déterminant pour valider une différence de rétention (même faible) entre les 3 supports, et *in fine* le caractère complexant d'un peptide.

## 4.2. Test de criblage manuel des peptides chélateurs du fer(II)

La même démarche de criblage a été testée pour rechercher des peptides chélateurs du fer(II) dans l'hydrolysat caséique. Pour ce faire, nous utilisons les expériences dont l'élution a été réalisée avec un gradient de pH décroissant (en accord avec la théorie HSAB).

Comme constaté en **Figure 52**, le chromatogramme TIC-MS obtenu par injection de l'hydrolysat sur la colonne IMAC-$Fe^{II}$ (**test visé - étape 1**) comporte potentiellement plusieurs pics d'intérêt entre 14 et 20 min. Par ailleurs, la comparaison directe des TIC-MS dans les 3 conditions (IMAC-$Fe^{II}$, IDA et IMAC-$Fe^{III}$) indique que les deux contrôles sont également assez complexes dans cette zone de rétention (14-20 min). À titre d'exemple, nous nous sommes intéressés ici au pic de Tr = 18.0 min. Le spectre MS moyenné correspondant à la base de ce pic ($t_1$ à $t_2$) est enregistré (**test visé - étape 2**), puis successivement les deux spectres MS associés aux expériences sur la colonne non greffée (**contrôle n°2** – **étape 3**) et sur la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (**contrôle n°1** – **étape 4**).

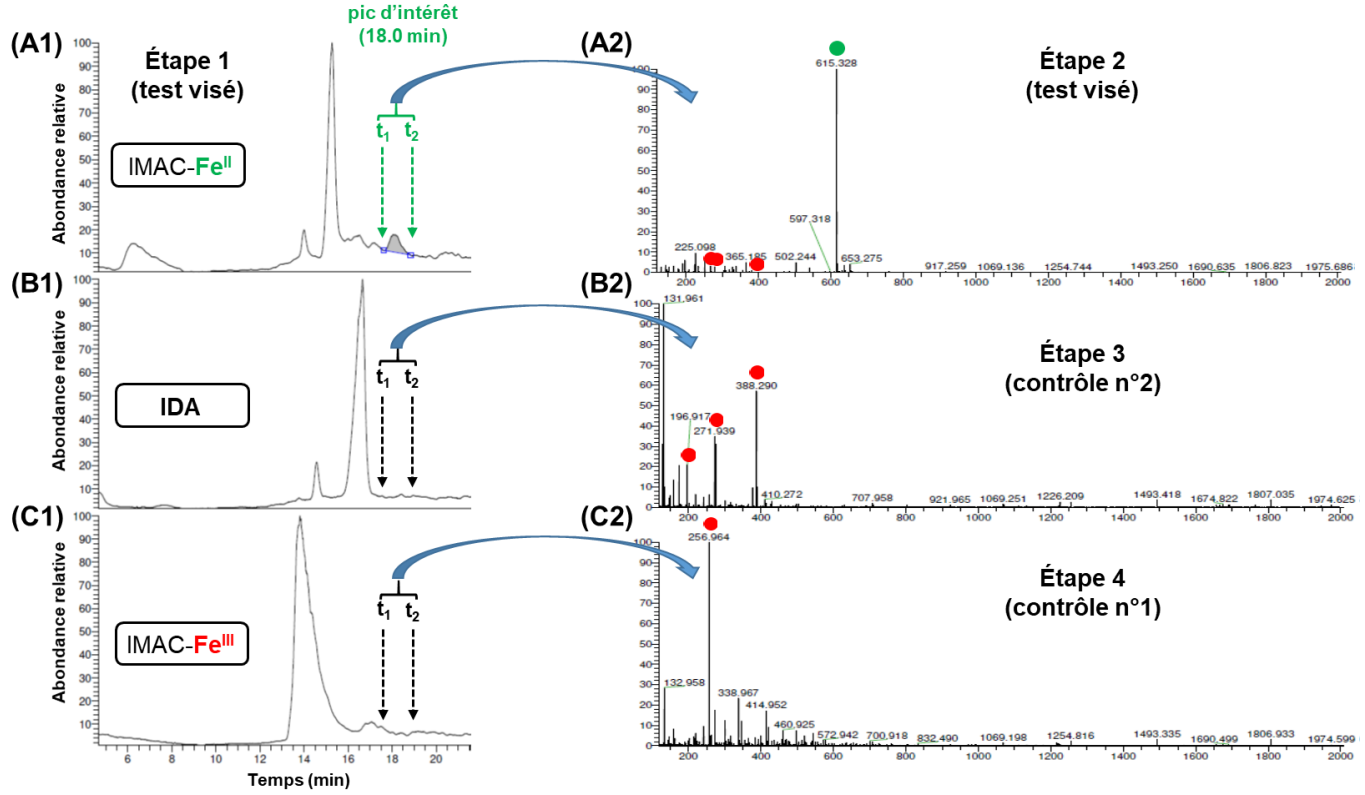



**Figure 52.** Suivi TIC-MS de l'hydrolysat caséique analysé avec un gradient de pH décroissant sur les supports **(A1)** IMAC-$Fe^{II}$ (**test visé-conforme HSAB**), **(B1)** IDA (**contrôle n°2- support nu**) et **(C1)** IMAC-$Fe^{III}$ (**contrôle n°1- contraire HSAB**). Spectre MS enregistré sur la fenêtre de rétention du pic d'intérêt (mis en évidence en IMAC-$Fe^{II}$) pour les expériences réalisées sur les supports **(A2)** IMAC-$Fe^{II}$, **(B2)** IDA et **(C2)** IMAC-$Fe^{III}$. En rouge, les signaux associés aux peptides retenus de manière aspécifique (mis en évidence dans les expériences contrôles n°2 (IDA) et n°1 (IMAC-$Fe^{III}$) ; en vert, le signal associé au peptide logiquement retenu par complexation avec les ions ferreux (en IMAC-$Fe^{II}$).

Les ions observés dans les deux expériences contrôle (IDA et IMAC-$Fe^{III}$) sont très minoritaires par rapport à l'ion d'intérêt de m/z = 615 ($[M+H]^+$). Il ressort que le peptide de masse M = 614 ($M_{exacte}$ = 614.328) doit être un bon chélateur du fer(II). Pour plus de certitude sur sa capacité de chélation, nous réalisons son suivi ciblé sur les 3 colonnes (**Figure 53**). Comme précédemment constaté lors de l'étude de l'hydrolysat caséique (paragraphe **3.3.2**), celui-ci est davantage retenu en IMAC-$Fe^{II}$ (Tr = 18.0 min) que sur la colonne non greffée (Tr = 7.7 min), ce qui corrobore notre hypothèse. Comme proposé précédemment, l'absence de pic chromatographique en IMAC-$Fe^{III}$ pourrait provenir de la forte diffusion de certains peptides, du fait de la coexistence d'interactions de natures diverses.

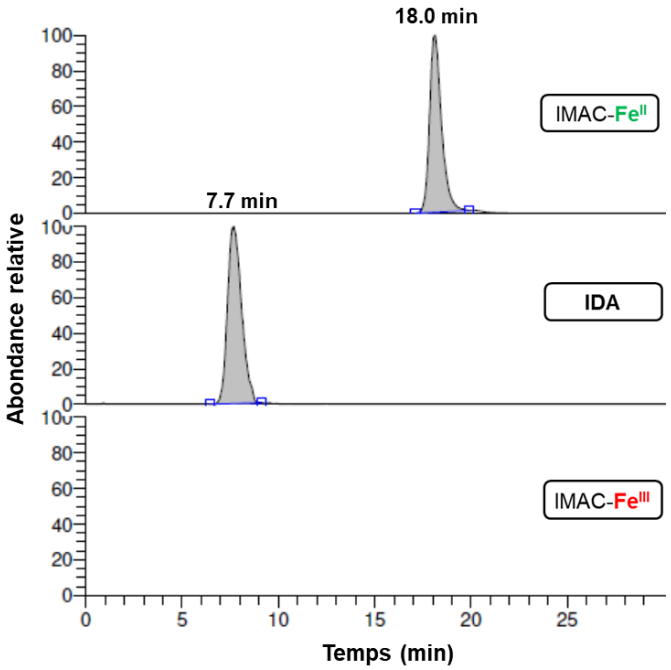



**Figure 53.** Suivi ciblé HRMS (masse exacte) du peptide potentiellement chélateur du fer(II) ($M_{exacte}$ = 614.328) sur les 3 supports : IMAC-$Fe^{II}$ (panneau supérieur), IDA (panneau central) et IMAC-$Fe^{III}$ (panneau inférieur).

### 4.3. Synthèse

Une approche de criblage intégrant les 2 expériences contrôles permet de s'affranchir des interactions électrostatiques liées à la faible force ionique de nos phases mobiles IMAC.

Le criblage manuel des peptides chélateurs du fer(III) au sein de l'hydrolysat caséique a conduit à des résultats pertinents. En effet, 2 phosphopeptides ont été clairement identifiés parmi les 7 peptides candidats, lesquels ont tous montré une plus grande affinité pour le support IMAC-$Fe^{III}$ que pour les supports IMAC-$Fe^{II}$ et IDA. L'identification des 5 autres peptides candidats, inconnus à ce stade, permettrait de valider définitivement notre approche dans le cas du fer(III).

La différence de rétention observée entre l'expérience IMAC-$Fe^{III}$ et les expériences contrôles (IMAC-$Fe^{II}$ et IDA) peut être faible sans que cela ne préjuge de la capacité de complexation du peptide concerné. En effet, une même séquence en acides aminés peut donner lieu à des

interactions de natures différentes, *i.e.* complexantes (avec $Fe^{III}$ et $Fe^{II}$) ou électrostatiques (avec IDA). La mesure précise du temps de rétention d'un peptide (à l'aide de triplicats) apparait indispensable pour déterminer avec fiabilité des différences de comportement sur les 3 supports, et ainsi statuer sur la capacité de complexation.

Le criblage manuel des peptides chélateurs du fer(II) au sein de l'hydrolysat caséique a permis de mettre en évidence un peptide candidat (en s'intéressant à un seul des pics d'intérêt). Sa structure n'étant pas connue, il n'est pas possible de valider avec certitude ce résultat. Ce peptide n'a toutefois pas montré de pic chromatographique en IMAC-$Fe^{III}$. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une diffusion importante, aboutissant à un pic non détectable.

## 5. Conclusion

Notre objectif était de mettre au point une méthode de criblage IMAC-MS pour la détection directe des peptides chélateurs du fer(II) et du fer(III).

Une étude physico-chimique, menée en parallèle des tests analytiques, a montré que le niveau initial de greffage en fer de la colonne IMAC était dépendant du degré d'oxydation du métal. Ainsi, le fer est immobilisé à hauteur de 70% de la capacité de charge théorique en IMAC-$Fe^{III}$, contre seulement 10% en IMAC-$Fe^{II}$. Concernant l'évolution de ce niveau de greffage au cours du temps, la colonne IMAC-$Fe^{III}$ ne subit aucune altération, conformément aux données de la littérature. Pour ce qui est de la colonne IMAC-$Fe^{II}$, nous avons constaté que le taux de fer immobilisé était également stable à l'utilisation.

Nous avons également cherché à déterminer le degré d'oxydation du fer immobilisé sur nos deux colonnes IMAC. Cette donnée est particulièrement importante dans le cas de la colonne IMAC-$Fe^{II}$ car l'oxydation des ions ferreux en ions ferriques reste un phénomène cinétique redouté (même si des précautions ont été prises pour travailler en conditions inertes). Cependant, le test physico-chimique mis en œuvre sur les solutions de stripping s'est révélé inefficace en présence d'un excès d'EDTA. Malgré cela, une preuve indirecte de la spéciation du fer immobilisé a pu être obtenue en comparant la rétention d'un même composé sur les 3 colonnes testées, *i.e.* en IMAC-$Fe^{III}$, en IMAC-$Fe^{II}$ et sur un support similaire non greffé en fer (acide iminodiacétique ou IDA).

Pour garantir la compatibilité avec la détection MS, notre protocole IMAC – à rebours de la méthode d'analyse classique des peptides non phosphorylés – utilise des phases mobiles volatiles dépourvues de NaCl. Le respect de cette contrainte a pour corollaire de rendre possibles les interactions électrostatiques avec les groupes IDA libres (qui représentent respectivement 30 et 90% des sites en IMAC-$Fe^{III}$ et IMAC-$Fe^{II}$).

Les tests réalisés sur un hydrolysat trypsique de caséines ont permis de valider la nature ferrique du greffage en IMAC-$Fe^{III}$ et de supposer la nature ferreuse du greffage en IMAC-$Fe^{II}$. Ces conclusions reposent (i) sur la rétention en IMAC-$Fe^{III}$ de peptides identifiés comme des bases dures de Lewis et (ii) sur la rétention en IMAC-$Fe^{II}$ de peptides « supposés » comme des bases intermédiaires de Lewis.

Cependant, l'analyse IMAC des peptides « supposés » complexants du fer(II) montre une anomalie se traduisant par l'absence de pic chromatographique en IMAC-$Fe^{III}$. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une forte diffusion des composés concernés, liée à la coexistence d'interactions de natures diverses, et conduisant à des pics non détectables. Dans ce contexte, il serait préférable de disposer d'un test pour statuer avec certitude sur l'état d'oxydation du fer immobilisé sur la colonne IMAC-$Fe^{II}$.

Quoiqu'il en soit, notre protocole IMAC-MS ne s'est pas révélé efficace vis-à-vis des di- et tripeptides non phosphorylés (utilisés comme peptides standards). Dans ce cas, la taille trop

faible du peptide l'empêcherait d'atteindre une conformation idéale pour complexer le fer ($Fe^{III}$ et $Fe^{II}$).

Enfin, un test de criblage non ciblé a été appliqué à l'hydrolysat caséique, en prenant en compte non seulement l'expérience IMAC visée mais aussi les 2 expériences contrôles. Les résultats obtenus ont démontré la faisabilité d'une telle approche pour identifier des peptides chélateurs du fer au sein d'un mélange complexe. L'automatisation de ce criblage représente une perspective prometteuse pour mettre en évidence des peptides d'intérêt dans un court laps de temps (de l'ordre de la journée).

# Chapitre II : stratégie de criblage IP-RPLC-HRMS

## 1. Mise en œuvre du protocole

### 1.1. Objectif

Alors que l'approche IMAC-MS base le criblage des peptides chélateurs sur leur interaction spécifique avec des ions « fer » greffés ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$), une autre stratégie consiste à évaluer la formation des complexes fer-peptide en solution. Dans ce cas, tous les sites libres du métal sont accessibles par le ligand pour former des liaisons de coordination (au contraire de la technique IMAC qui présente un biais potentiel de ce point de vue) et, d'autre part, les conditions de solubilisation peuvent simuler le milieu visé (*i.e.* le milieu intracellulaire). Par ailleurs, l'observation de la forme complexée avec le fer ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$) fournirait une preuve directe et irréfutable de la capacité de chélation d'un peptide. Ainsi, la mise en évidence d'un peptide chélateur pourrait être réalisée par détection concomitante de sa forme libre (peptide) et de sa forme complexée (fer-peptide). Dans cette approche, la spectrométrie de masse – du fait de sa sensibilité et de sa spécificité – apparait naturellement comme une technique de choix pour réaliser le criblage souhaité.

En pratique, la stratégie repose sur l'incubation préalable du mélange peptidique avec du fer ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$) dans le but de former en solution les potentiels complexes fer-peptide. Dans un deuxième temps, l'analyse MS conjointe de cette solution test (peptides + fer) et d'une solution contrôle sans fer (peptides seuls) permet d'envisager le criblage des peptides chélateurs, par analyse différentielle des deux courants ioniques obtenus. En outre, ce protocole MS offre l'avantage de pouvoir coupler criblage (MS) et séquençage (MS/MS) au sein d'une seule et même étape analytique (**Figure 54**).

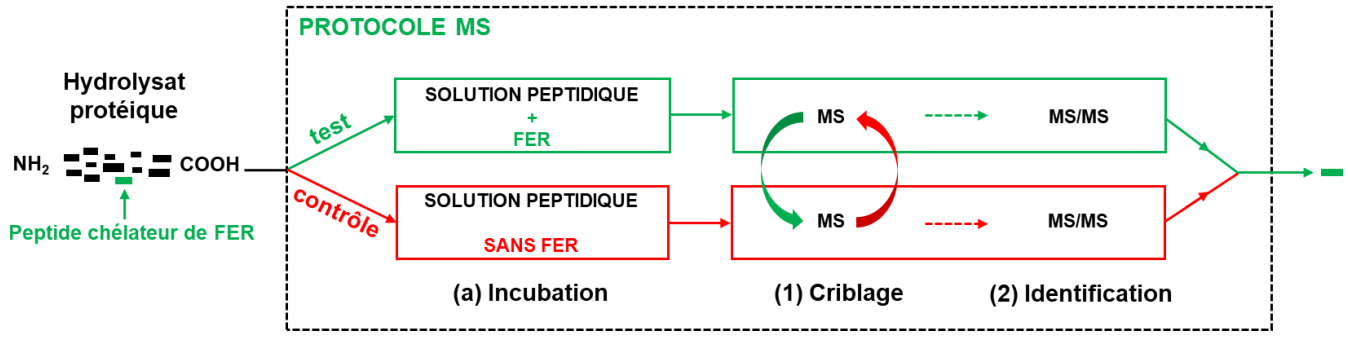



**Figure 54.** Schéma théorique du protocole MS comprenant **(a)** une phase initiale d'incubation en présence de fer, **(1)** la phase de criblage des peptides chélateurs de fer par analyse différentielle MS (*i.e.* par comparaison des spectres de masse des deux solutions test et contrôle) et **(2)** la phase d'identification par MS/MS.

## 1.2. Analyse préalable des freins à la mise en place du protocole MS et identification des leviers

Préalablement au développement du protocole de criblage MS, plusieurs points bloquants ou limites potentielles ont été relevés. Ils sont présentés ci-dessous en proposant dans chaque cas une (ou plusieurs) solution(s) pour contourner ou prévenir le problème mentionné.

### 1.2.1. Formation des complexes en solution

La faible solubilité du fer constitue un frein majeur à la formation des potentiels complexes fer-peptide lors de la phase d'incubation. Comme constaté sur le diagramme E-pH du fer (cf. **Étude bibliographique, I.1.2**), (i) les ions $Fe^{3+}$ précipitent dès pH 2 sous forme d'hydroxyde ferrique et (ii) les ions $Fe^{2+}$ – théoriquement solubles jusqu'à pH 7.5 – s'oxydent « spontanément » en ions $Fe^{3+}$ en présence de dioxygène à l'état de trace.

Pour garantir leur parfaite solubilité jusqu'à pH 5.5, les ions ferriques et ferreux ont été solubilisés, de façon analogue, en présence d'un large excès d'acétate (cf. **Étude bibliographique, I.1.3.3**). Dans ces conditions, le pH de la solution d'incubation peut être ajusté – sans risque de précipitation – à une valeur suffisamment élevée (pH ≈ 3.5) pour favoriser la déprotonation du peptide en vue de sa complexation. Par ailleurs, la solubilisation du métal en présence d'une base faiblement complexante telle que l'acétate permet de travailler dans un environnement similaire au pool de fer labile intracellulaire – parfaitement adapté à l'étude des propriétés antioxydantes des peptides.

### 1.2.2. Stabilité des complexes fer-peptide par MS

La solution d'incubation contenant le potentiel complexe fer-peptide est ensuite analysée par spectrométrie de masse. La possible dégradation du complexe lors du processus d'ionisation représente le deuxième frein.

L'ionisation par électronébulisation (ESI), en tant que technique douce à pression atmosphérique, s'impose comme un choix évident. Qui plus est, l'ESI-MS a déjà montré son efficacité pour l'étude de nombreuses espèces non covalentes [45] (cf. **Étude bibliographique, II.1.2.3**). Par ailleurs, les peptides – dont la détection est nécessaire à notre étude – sont aussi classiquement analysés par $ESI^{+}$-MS.

### 1.2.3. Contrôle du degré d'oxydation du fer

Pour répondre à notre objectif, deux protocoles analytiques distincts doivent être développés, l'un pour la recherche des peptides chélateurs du fer(II), et l'autre pour la recherche des peptides chélateurs du fer(III). Dans chaque cas de figure, il est indispensable que le fer conserve – tout au long du processus – son degré d'oxydation initial. Dans le cas contraire, cela conduirait à des interprétations erronées concernant la nature des complexes détectés. Deux causes

principales ont été identifiées, qui pourraient justement engendrer une modification incontrôlée du degré d'oxydation métallique :

- la première est liée au risque d'oxydation de la solution ferreuse utilisée pour l'incubation ;

- la seconde est liée au risque d'oxydoréduction des complexes fer-peptide lors du processus d'ionisation ESI, soit plus précisément (i) une oxydation des complexes ferreux en complexes ferriques dans le mode ESI positif et (ii) une réduction des complexes ferriques en complexes ferreux dans le mode ESI négatif.

Afin d'éviter l'oxydation de la solution ferreuse, celle-ci a été purgée à l'azote après chaque utilisation et conservée sous atmosphère inerte. Par ailleurs, nous avons réalisé un contrôle du degré d'oxydation du fer en testant chaque peptide standard à la fois sur le « protocole fer(II) » et sur le « protocole fer(III) ». La comparaison directe des résultats obtenus à ces 2 tests (l'un servant de contrôle négatif pour l'autre) nous a permis de valider la conformité de l'ensemble du processus vis-à-vis du degré d'oxydation (*i.e.* la nature de la solution de fer, la nature du complexe fer-peptide formé en solution et la nature de l'ion associé à ce complexe).

### 1.2.4. Travail sur des hydrolysats complexes

Un hydrolysat protéique peut potentiellement contenir des peptides isobares (masses extrêmement proches) ou isomères (formules brutes identiques). Dans ce cas, une analyse par perfusion ne permet pas une identification simple des peptides d'intérêt, car le spectre MS/MS correspondant montre conjointement les ions fils de plusieurs espèces (spectre composite).

Pour pallier ce problème, une solution consiste à séparer les peptides en amont de la détection par une méthode LC suffisamment sélective. Nous avons opté pour une chromatographie en phase inverse par paires d'ions (IP-RPLC), à l'aide d'un acide carboxylique perfluoré comme agent d'appariement (NFPA). Cette technique, développée au début des années 2000, est efficace pour la séparation des acides aminés non dérivés [177] [178] et des petits peptides [179]. Par ailleurs, elle est pleinement compatible avec une détection MS en mode ESI positif.

### 1.2.5. Mise en œuvre du criblage

Nous prévoyons de réaliser le criblage par une analyse différentielle des courants ioniques obtenus sur l'échantillon test (avec le fer) et sur l'échantillon contrôle (sans le fer). Les hydrolysats complexes comportant plus d'une centaine de peptides, les spectres de masse obtenus risquent d'être extrêmement bruités malgré la mise en place d'une séparation LC. Dans ces circonstances, la mise en évidence des peptides chélateurs de fer – souvent présents à basse concentration – risque de se révéler ardue.

Pour une efficacité maximale, les spectres de masse seront acquis sur un analyseur à haute résolution (HRMS). La précision et la justesse en masse constitueront des atouts majeurs pour fiabiliser les résultats et discriminer des peptides de masses proches, en plus de leur différence de temps de rétention (Tr).

Toutefois, la technique LC-HRMS a comme inconvénient relatif de générer une très grande quantité de données. Afin de garantir (i) la faisabilité du criblage et (ii) sa réalisation sur un laps de temps court, un traitement automatisé sera certainement nécessaire.

### 1.3. Méthodologie appliquée

Les leviers techniques précédemment identifiés ont permis de définir des conditions analytiques *a priori* adaptées au développement de notre méthode (cf. **Matériel et méthodes, 5.3**).

La **Figure 55** schématise le protocole IP-RPLC-HRMS finalement retenu pour cribler, dans des hydrolysats complexes, les peptides antioxydants agissant par chélation du fer. La phase chromatographique IP-RPLC a pour objectifs de (i) retenir suffisamment les petits peptides hydrophiles afin d'éviter leur sortie au temps mort (comme ce serait le cas avec une méthode RPLC classique) et (ii) de permettre la séparation des composés isobares. La détection à haute résolution (HRMS) permet, quant à elle, d'envisager des analyses différentielles très performantes. En outre, l'utilisation d'un système MS hybride autorise le séquençage des peptides grâce à la capacité MS/MS (en complément de la haute résolution).

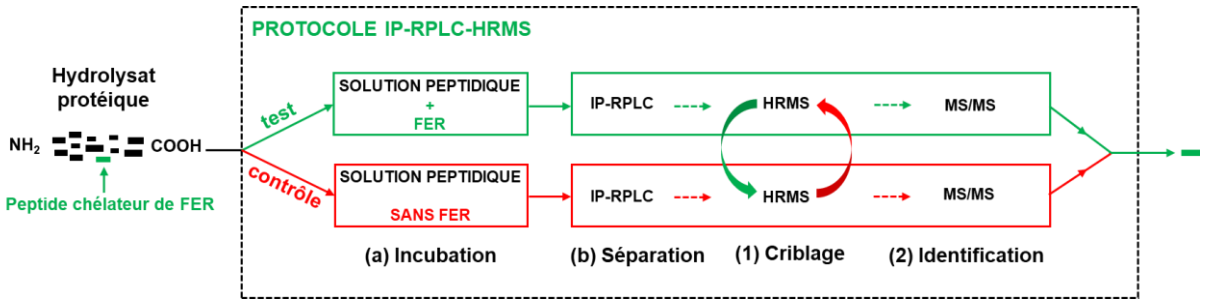



**Figure 55.** Schéma du protocole IP-RPLC-HRMS intégrant **(a)** une phase initiale d'incubation en présence de fer, **(b)** une phase séparative IP-RPLC, **(1)** la phase de criblage des peptides chélateurs de fer par analyse différentielle HRMS (*i.e.* par comparaison des spectres de masse obtenus pour les deux solutions test et contrôle) et **(2)** la phase d'identification par MS/MS.

Notre approche méthodologique repose sur deux points essentiels :

- (i) la méthode doit discriminer les peptides en fonction de leur capacité à chélater le fer, les peptides chélateurs les plus intéressants étant censés former des complexes stables en solution ;

- (ii) la méthode doit révéler les meilleurs peptides chélateurs du fer. Dans cette optique, le passage préalable sur colonne C18 permettra théoriquement de filtrer les complexes fer-peptide les plus forts. En effet, ces derniers devraient logiquement être préservés lors du processus chromatographique, contrairement aux complexes faibles [45] [50] (cf. **Étude bibliographique, II.1.2.3**).

## 2. Étude des complexes fer-ligand de référence

Des tests préliminaires ont été réalisés avec deux ligands de référence non peptidiques (desferrioxamine : DFO et terpyridine : TERPY) afin de valider les étapes clés du protocole. En tant qu'excellents chélateurs du $Fe^{III}$ (DFO) et du $Fe^{II}$ (TERPY), ces composés formeront spontanément les complexes stables correspondants (cf. **Étude bibliographique, I.1.3**). La phase d'incubation a été mise en œuvre à l'aide des solutions d'acétate ferrique (dans le cas du DFO) et d'acétate ferreux (dans le cas du TERPY), avec un large excès d'acétate par rapport au fer (4/1) et un ratio [fer]/[ligand] = 1/2.

### 2.1. Détection ESI-MS

Chaque solution d'incubation a tout d'abord été analysée en mode flow-injection ESI-MS, c'est-à-dire en la perfusant à faible débit (10 $\mu L \cdot min^{-1}$) dans le flux de l'éluant eau/acétonitrile/TFA (50:50:0.1) pompé à 0.2 $mL \cdot min^{-1}$ (cf. **Matériel et méthodes, 5.2**). Cette étape permet d'optimiser la détection MS des complexes fer-ligand dans des conditions similaires à celles de la future analyse couplée LC-ESI-MS (en ce qui concerne la nature des solvants composant la phase mobile et son débit).

#### 2.1.1. Complexe fer(III)-DFO

L'analyse $ESI^+$-MS de la solution d'incubation de la desferrioxamine (DFO + $Fe^{III}$) permet de visualiser le complexe [(DFO-3H)+$Fe^{III}$] (**Figure 56**). Étant donné l'excès initial de desferrioxamine par rapport aux ions ferriques (2/1) et la stœchiométrie de formation du complexe (DFO/$Fe^{III}$ = 1/1), il est normal d'observer des intensités ioniques relativement proches pour le DFO libre et le DFO complexé (en accord avec le caractère total de la réaction de complexation). Par ailleurs, les profils isotopiques des ions attribués au complexe fer(III)-DFO (m/z = 614.5 et 636.5) valident sans ambiguïté la présence d'un atome de fer dans la structure, grâce à la signature caractéristique liée aux deux isotopes majoritaires $^{54}Fe$ (5.8%) et $^{56}Fe$ (91.8%) (**Figure 56B**).

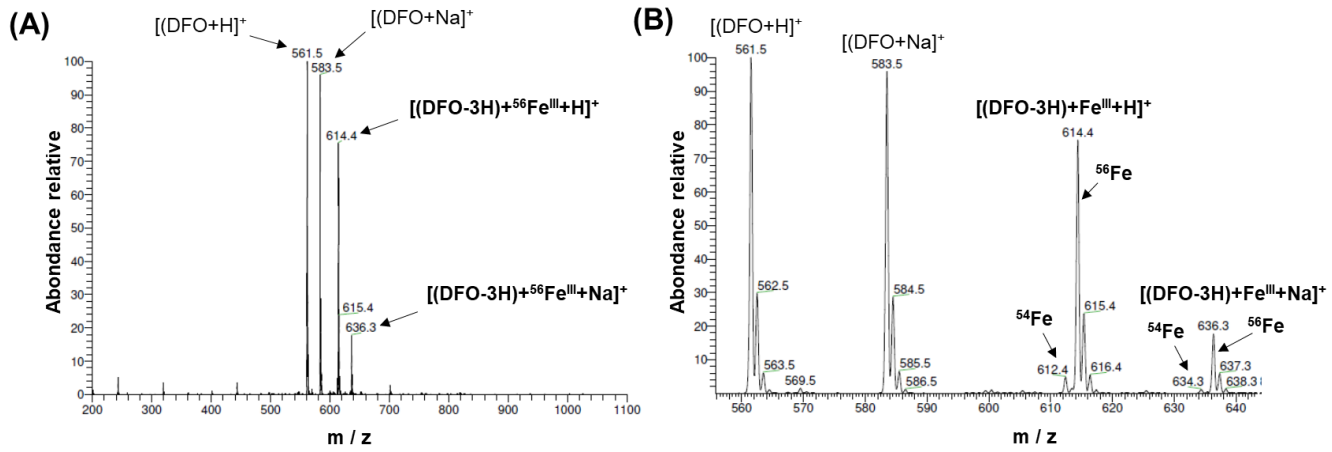



**Figure 56.** **(A)** Spectre MS de l'incubat $Fe^{III}$ + DFO ($[Fe^{III}]/[DFO] = 1/2$) avec observation conjointe du DFO libre (M = 560.5) et du complexe $[(DFO\text{-}3H)+{}^{56}Fe^{III}]$ (M = 613.5), **(B)** Détail des profils isotopiques avec observation des contributions de $^{54}Fe$ et $^{56}Fe$, pour les deux ions attribués au complexe $[(DFO\text{-}3H)+Fe^{III}]$.

### 2.1.2. Complexe fer(II)-TERPY

L'analyse $ESI^+$-MS de la solution d'incubation de la terpyridine (TERPY + $Fe^{II}$) permet de constater la seule présence du complexe $[(TERPY)_2+ Fe^{II}]^{2+}$ (**Figure 57**). Étant donné l'excès initial de terpyridine par rapport aux ions ferreux (2/1) et la stœchiométrie de formation du complexe ($TERPY/Fe^{II}$ = 2/1), l'absence de TERPY libre confirme que la réaction de complexation est complète. Le profil isotopique de l'ion associé au complexe valide la présence de l'atome de fer, *via* la signature caractéristique liée aux deux isotopes majoritaires ($^{54}Fe$ et $^{56}Fe$) (**Figure 57B**).

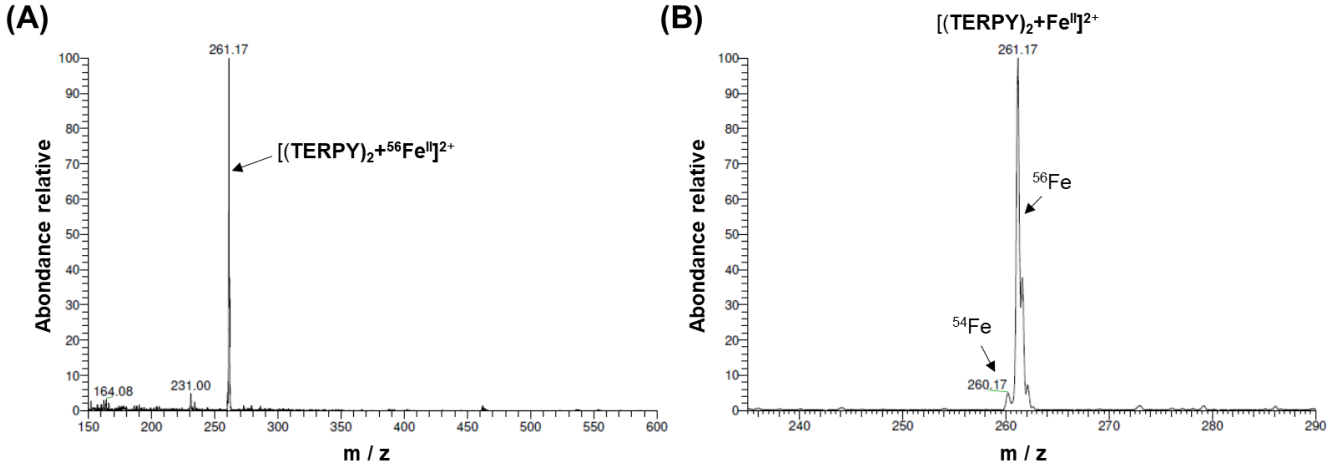



**Figure 57.** **(A)** Spectre $ESI^+$-MS de l'incubat $Fe^{II}$ + TERPY ($[Fe^{II}]/[TERPY] = 1/2$) avec observation du complexe $[(TERPY)_2+ {}^{56}Fe^{II}]^{2+}$ (M = 522) à m/z = 261 et **(B)** Profil isotopique de l'ion dichargé associé au complexe $[(TERPY)_2+ {}^{56}Fe^{II}]^{2+}$, avec observation des contributions de $^{54}Fe$ et $^{56}Fe$.

### 2.1.3. Synthèse

Les ligands de référence (DFO, TERPY) ont été initialement incubés avec une solution d'acétate de fer, de nature ferrique dans le cas du DFO et de nature ferreuse dans le cas du TERPY. L'analyse des deux incubats en mode flow-injection $ESI^+$-MS a montré de manière évidente la présence des complexes attendus ($[(DFO\text{-}3H)+Fe^{III}]$ et $[(TERPY)_2+^{56}Fe^{II}]^{2+}$).

Au premier abord, ce résultat valide le degré d'oxydation du fer dans les environnements ferrique (III) et ferreux (II). Il faut toutefois rester prudent sur ce point car nous avons précédemment observé que (i) le DFO pouvait entrainer l'oxydation du fer(II) en fer(III) et que (ii) le TERPY, à l'inverse, pouvait entrainer la réduction du fer(III) en fer(II) (cf. **Résultats et discussion, I.3.1**).

Quoiqu'il en soit, nous pouvons certifier que les conditions analytiques mises en œuvre sont compatibles avec l'observation MS de complexes très forts, tels que $[(DFO\text{-}3H)+Fe^{III}]$ et $[(TERPY)_2+Fe^{II}]^{2+}$. Les intensités ioniques relatives des formes libre et complexée sont en accord, pour les deux ligands, avec un rendement de complexation de 100%. Par ailleurs, les conditions d'ionisation propices à l'oxydation ($ESI^+$) n'ont pas d'impact sur le degré d'oxydation du complexe ferreux formé en présence du TERPY.

## 2.2. Détection LC-ESI-MS

Dans un second temps, les solutions d'incubation de la desferrioxamine (DFO + $Fe^{III}$) et de la terpyridine (TERPY + $Fe^{II}$) ont été analysées par chromatographie liquide en phase inverse par paires d'ions (IP-RPLC) couplée avec la spectrométrie de masse ($ESI^+$-MS). L'élution a été réalisée à l'aide d'un mélange eau/acétonitrile en présence de TFA comme agent d'appariement (0.1%).

### 2.2.1. Complexe fer(III)-DFO

L'analyse RPLC-UV236 de l'incubat $Fe^{III}$ + DFO fait apparaitre deux pics chromatographiques majoritaires et correctement séparés ($\Delta Tr$ = 0.5 min) (**Figure 58A**). L'étude comparative des spectres UV-Vis associés à ces deux pics (**Figure 58a$_1$-a$_2$**) permet *a priori* d'attribuer le premier à la forme complexée du DFO (Tr = 8.0 min) et le deuxième à sa forme libre (Tr = 8.5 min). En effet, le maximum d'absorption observé à $\lambda$ = 436 nm (**Figure 58a$_1$**) est conforme à la valeur attendue pour le complexe ferrique $[(DFO\text{-}3H)+Fe^{III}]$ (cf. **Matériel et méthode, 4.2.3**). Le suivi $ESI^+$-MS valide ces conclusions, le ligand complexé étant clairement détecté sous la forme de l'ion $[(DFO\text{-}3H)+^{56}Fe^{III}+H]^+$ (**Figure 58b**) et le ligand libre sous la forme de l'ion $[DFO+H]^+$ (**Figure 58c**).

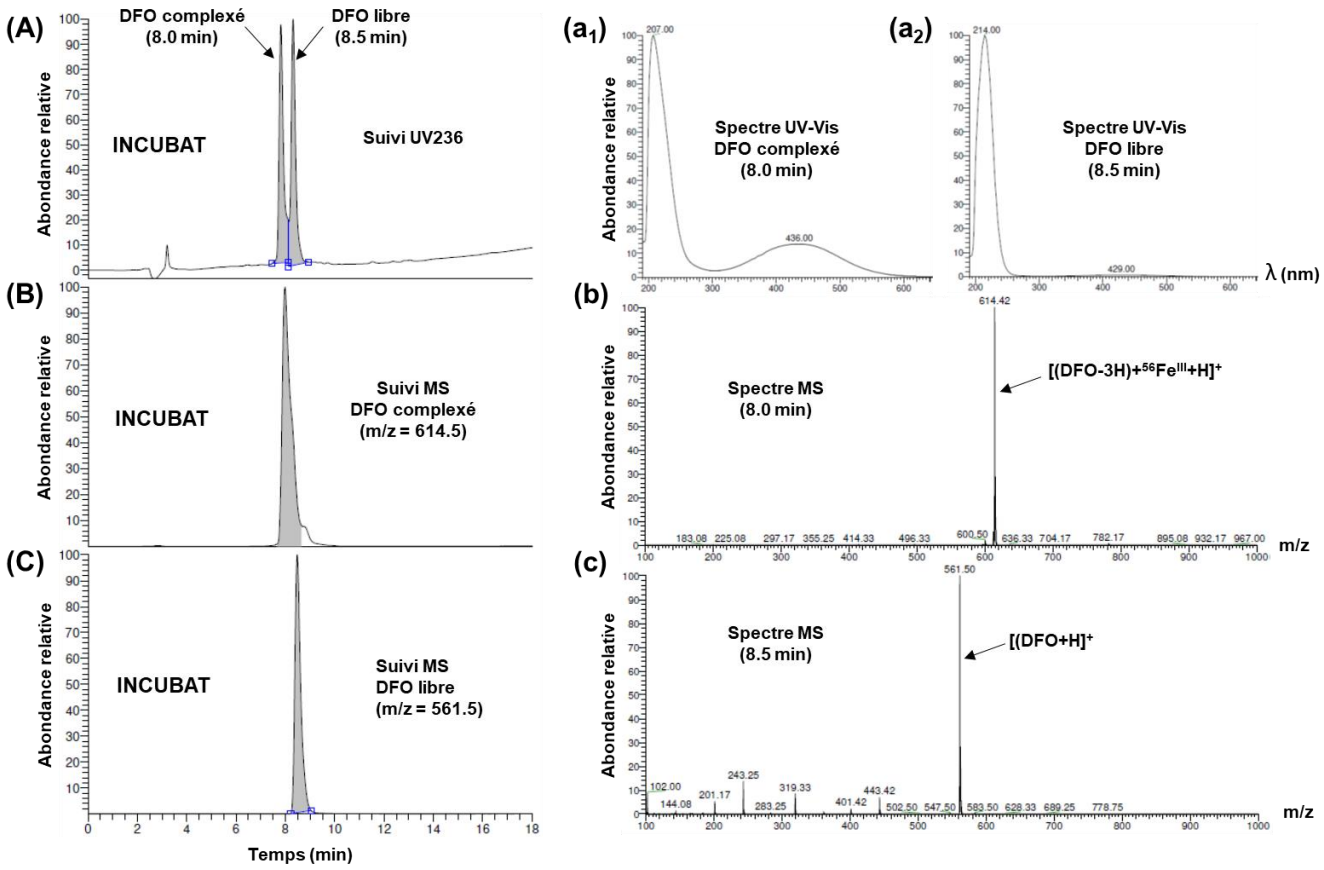



**Figure 58. Analyse RPLC de l'incubat $Fe^{III}$ + DFO ($[Fe^{III}]/[DFO]$ = 1/2)** montrant la présence conjointe de DFO complexé ([(DFO-3H)+$Fe^{III}$]) et de DFO libre, *via* un suivi par absorbance UV-Vis à 236 nm **(A)** et par $ESI^+$-MS (**B** et **C**). *Spectres UV-Vis du DFO complexé* (**a**$_1$) *et du DFO libre* (**a**$_2$), *et spectres $ESI^+$-MS associés au DFO complexé vu à 8.0 min* (**b**) *et au DFO libre vu à 8.5 min* (**c**).

### 2.2.2. Complexe fer(II)-TERPY

L'analyse RPLC-UV280 de l'incubat $Fe^{II}$ + TERPY montre un seul pic majoritaire (Tr = 10.0 min) (**Figure 59A**). Le spectre UV-Vis associé à ce pic indique un maxima d'absorption aux alentours de 550 nm (**Figure 59a**$_1$), en accord avec la présence d'un complexe de fer. Cette hypothèse est confirmée par le spectre $ESI^+$-MS correspondant, *via* l'observation claire du complexe attendu $[(TERPY)_2 + {}^{56}Fe^{II}]^{2+}$ (**Figure 59a**$_2$). Toutefois, contrairement à l'analyse préliminaire réalisée en mode flow-injection MS, nous constatons la présence conjointe – et en quantité relativement importante – de l'ion associé au TERPY libre (**Figure 59a**$_2$). Afin de lever le doute sur ce point, une solution standard de terpyridine (TERPY 50 mM) a été analysée dans les mêmes conditions que l'incubat. Le résultat obtenu indique que le TERPY libre est élué à un temps de rétention bien inférieur (Tr = 7.6 min) à celui de son complexe de fer(II) associé (Tr = 10.0 min) (**Figures 59B1** et **59B2**). Cela permet de conclure que le TERPY est présent dans l'incubat exclusivement sous sa forme complexée, et que la présence de l'ion m/z = 234 à Tr = 10.0 min est consécutive à une décomposition thermique du complexe dans le bloc source

MS. L'absence de dégradation en mode flow-injection MS pourrait s'expliquer par un rapport solvant aqueux/solvant organique (v/v) différent de celui de l'expérience LC-MS (le débit et la nature des 2 solvants composant la phase mobile étant identiques dans les deux cas).

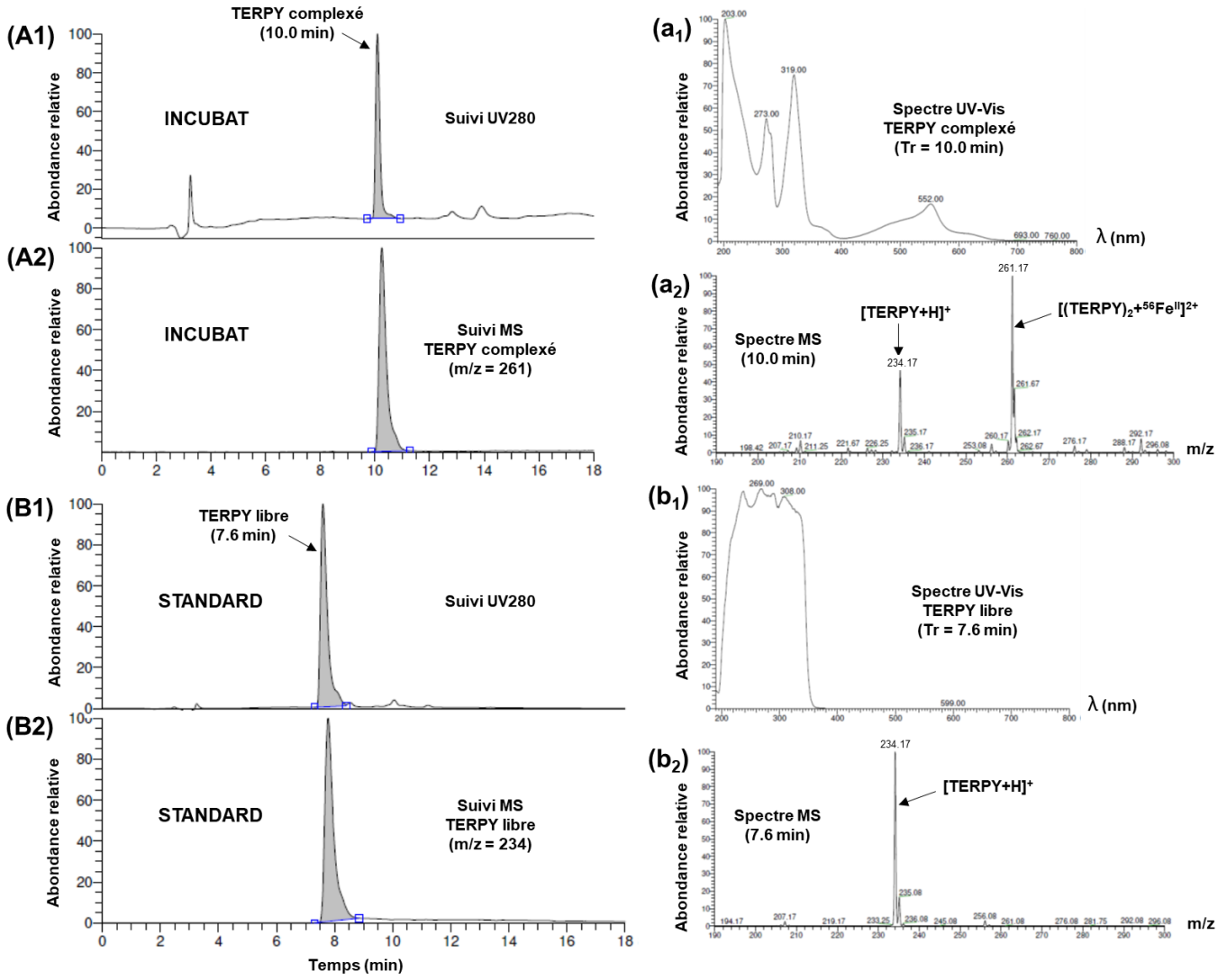



**Figure 59. Analyse RPLC de l'incubat $Fe^{II}$ + TERPY ($[Fe^{II}]/[TERPY] = 1/2$)** montrant la seule présence de TERPY complexé ($[(TERPY)_2+ {}^{56}Fe^{II}]^{2+}$), *via* un suivi par absorbance UV-Vis à 280 nm **(A1)** et par $ESI^+$-MS (**A2**). *Spectres UV-Vis* (**a1**) *et* $ESI^+$*-MS* (**a2**), *associés au TERPY complexé vu à 10.0 min.* **Analyse RPLC d'une solution standard de TERPY (50 mM)** montrant le TERPY libre, *via* un suivi par absorbance UV-Vis à 280 nm (**B1**) et par $ESI^+$-MS (**B2**). *Spectres UV-Vis* (**b1**) *et* $ESI^+$*-MS* (**b2**), *associés au TERPY libre vu à 7.6 min.*

### 2.2.3. Synthèse

L'analyse LC-ESI-MS des deux solutions d'incubation ($Fe^{III}$ + DFO et $Fe^{II}$ + TERPY) a permis une détection aisée des complexes de fer initialement formés en solution, *i.e.* $[(DFO\text{-}3H)+Fe^{III}]$ et $[(TERPY)_2+Fe^{II}]^{2+}$. Les conditions mises en œuvre sont donc parfaitement compatibles avec

l'étude des complexes très stables, ceux-ci étant préservés lors de l'élution sur la phase chromatographique C18.

La méthode IP-RPLC utilisée – avec le TFA comme agent d'appariement d'ions – s'avère efficace pour retenir un complexe de fer chargé positivement tel que $[(TERPY)_2+^{56}Fe^{II}]^{2+}$, en occasionnant une interaction hydrophobe avec la phase stationnaire. Par ailleurs, les formes libre et complexée du ligand ont été séparées dans les deux exemples étudiés. Dans le cas du DFO, la présence d'un atome de fer au sein de la structure augmente son caractère hydrophile, ce qui se traduit par une rétention légèrement plus faible. Dans le cas du TERPY, la forme complexée comporte 2 molécules de ligand pour 1 atome de fer et sort donc logiquement plus tard que la forme libre.

## 3. Étude des complexes fer-peptide

Les résultats prometteurs obtenus sur les ligands de référence permettent d'envisager la mise en œuvre d'un protocole IP-RPLC-ESI-MS pour cribler des peptides chélateurs de fer au sein de mélanges complexes. De façon similaire à ce qui a été initialement réalisé pour le DFO et le TERPY, une condition préalable est de s'assurer que les complexes fer-peptide sont effectivement détectables par $ESI^+$-MS.

Cette phase de test a été menée sur une trentaine de peptides standards (cf. **Matériel et méthodes, 1.2**). Pour chacun d'eux, la phase d'incubation a été réalisée (i) d'une part en présence d'ions $Fe^{II}$, à l'aide de la solution d'acétate ferreux et (ii) d'autre part en présence d'ions $Fe^{III}$, à l'aide de la solution d'acétate ferrique. La valeur du rapport [fer]/[peptide] est comprise entre 0.19 et 1.00, selon la masse moléculaire du peptide considéré (cf. **Matériel et méthodes, 5.1.1**).

### 3.1. Détection ESI-HRMS

Lors de la première étape, les peptides ont été perfusés dans des conditions chromatographiques. Ainsi, la perfusion a été réalisée à 10 $\mu L \cdot min^{-1}$ dans le flux LC (0.2 $mL \cdot min^{-1}$), à l'aide d'une phase mobile eau/méthanol additionnée d'acide nonafluoropentanoique (NFPA) comme agent d'appariement d'ions (cf. **Matériel et méthodes, 5.2**).

Chaque peptide standard a d'abord été analysé seul et le spectre de masse a été comparé à celui obtenu à partir du même peptide mis en contact avec le fer ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$) comme décrit par Wu *et al.* [49].

#### 3.1.1. Complexes fer(II)-peptide

Les résultats sont présentés en **Figure 60** pour la carnosine (βAH), RKR (deux chélateurs du $Fe^{II}$ d'après la littérature [64] [180] [181]) et WWW. Ils illustrent le comportement typique des peptides standards vis-à-vis du fer(II).

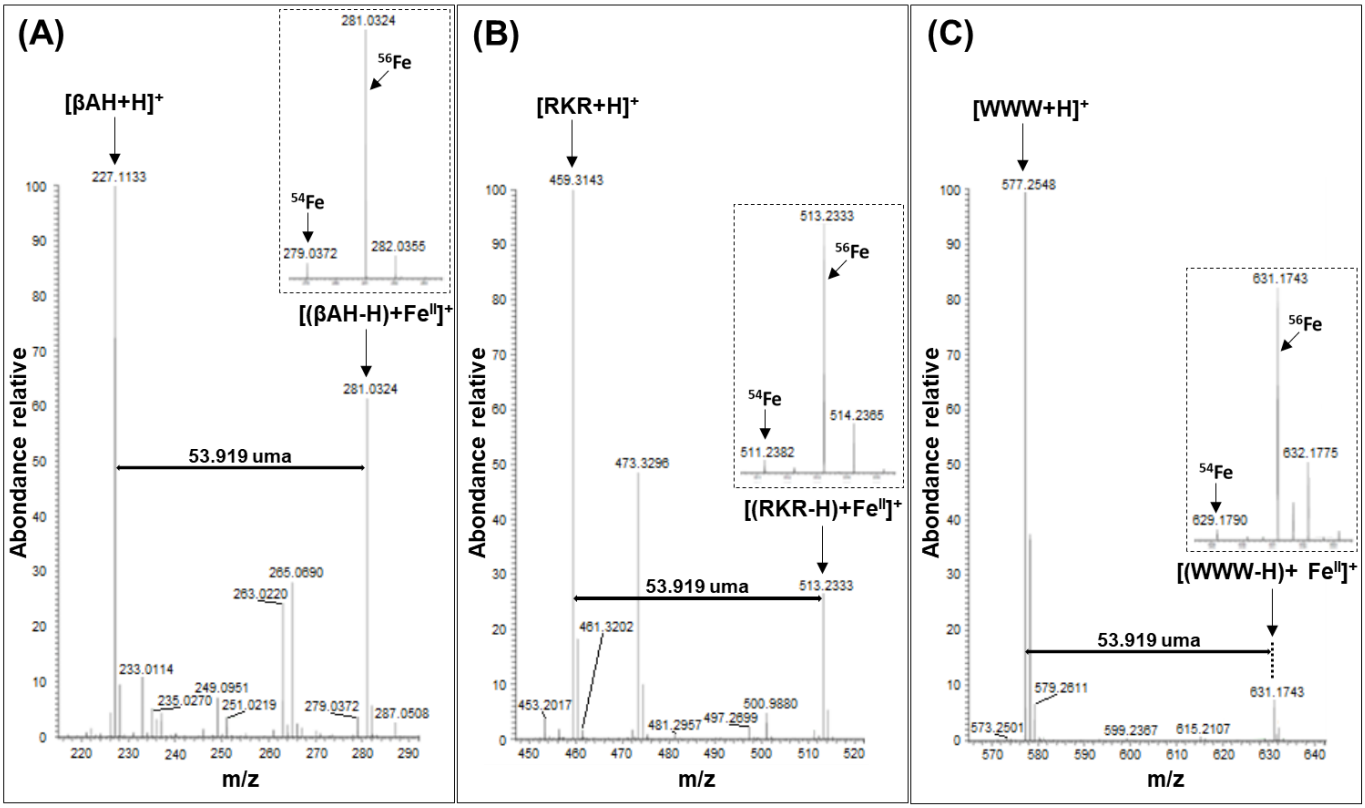



**Figure 60.** Spectres ESI$^+$-HRMS obtenus en mode flow-injection pour les peptides **(A)** βAH, **(B)** RKR et **(C)** WWW, suite à leur incubation avec le fer(II). Encarts en pointillés : profil isotopique du complexe $[(M-H)+Fe^{II}]^+$ montrant la contribution relative des isotopes $^{54}Fe$ et $^{56}Fe$.

Pour chacun des 27 peptides standards évalués, le spectre de masse acquis en présence de fer(II) montre de nouveaux pics, attribuables au complexe monochargé $[(M-H)+Fe^{II}]^+$, comme précédemment décrit par Lagarrigue *et al.* [182] (**Tableau 23**). Dans chacun des cas, le pic principal est décalé de + 53.919 (± 0.001) u par rapport au peptide protoné $[M+H]^+$ (**Figure 60**), ce qui est cohérent avec la complexation de $^{56}Fe^{II}$ (55.935 u) par le peptide (55.935–2×1.008 = 53.919). La formation d'un complexe de fer est confirmée par le profil isotopique du nouvel ion, en bon accord avec les abondances relatives naturelles de $^{54}Fe$ (5.85%) et $^{56}Fe$ (91.75%).

**Tableau 23.** Valeurs m/z observées en mode flow-injection ESI$^+$-HRMS pour les peptides libres et leurs complexes de fer(II) associés et différence de masse (Δ m/z) entre le pic principal du complexe et le pic du peptide.

| Peptide | Peptide libre | | Complexe de fer(II) | Δ m/z |
|---|---|---|---|---|
| | Masse (u) | $[M+H]^+$ $(m/z)_1$ | $[(M-H)+^{56}Fe]^+$ $(m/z)_2$ | $(m/z)_2$ - $(m/z)_1$ |
| GGHa | 225.125 | 226.133 | 280.053 | 53.920 |
| βAH | 226.105 | 227.113 | 281.032 | 53.919 |
| AGHa | 239.141 | 240.149 | 294.069 | 53.920 |
| GGH | 269.111 | 270.119 | 324.038 | 53.919 |
| γECG | 307.082 | 308.090 | 362.009 | 53.919 |
| NCS | 322.093 | 323.101 | 377.020 | 53.919 |
| CAH | 329.113 | 330.121 | 384.040 | 53.919 |
| DAH | 341.132 | 342.140 | 396.059 | 53.919 |
| HGH | 349.147 | 350.155 | 404.074 | 53.919 |
| IKP | 356.241 | 357.249 | 411.168 | 53.919 |
| EAH | 355.148 | 356.156 | 410.075 | 53.919 |
| DSH | 357.127 | 358.135 | 412.054 | 53.919 |
| DDD | 363.090 | 364.098 | 418.017 | 53.919 |
| DTH | 371.143 | 372.151 | 426.070 | 53.919 |
| DED | 377.106 | 378.114 | 432.033 | 53.919 |
| DMH | 401.135 | 402.143 | 456.063 | 53.920 |
| EEE | 405.135 | 406.143 | 460.062 | 53.919 |
| HHH | 429.186 | 430.194 | 484.113 | 53.919 |
| IKW | 445.267 | 446.275 | 500.194 | 53.919 |
| RQR | 458.269 | 459.277 | 513.196 | 53.919 |
| RKR | 458.306 | 459.314 | 513.233 | 53.919 |
| WWW | 576.247 | 577.255 | 631.174 | 53.919 |
| FDDDA | 581.195 | 582.203 | 636.122 | 53.919 |
| YPISL | 591.325 | 592.333 | 646.252 | 53.919 |
| FDDDK | 638.252 | 639.260 | 693.179 | 53.919 |
| HHHHHH | 840.363 | 841.371 | 895.291 | 53.920 |
| LLPHHADADY | 1150.541 | 1151.549 | 1205.469 | 53.920 |

La structure typiquement observée pour les complexes de fer(II) indique que le peptide est présent sous une forme monodéprotonée. L'incubation avec le fer étant réalisée à pH 3, le site de déprotonation le plus probable est le groupement acide carboxylique terminal de faible p*K*a ($1.8 < pKa < 2.5$). Cependant, ce mécanisme n'est pas transposable aux peptides GGHa et AGHa, l'histamine (Ha) étant dépourvue de fonction acide carboxylique. Dans ce cas de figure, la libération du proton devrait donc nécessairement se produire au niveau d'un NH peptidique très faiblement acide ($pK_{NH} \approx 15$ [32]). En effet, en présence d'un cation de métal de transition, la déprotonation a souvent lieu à un pH bien inférieur au p*K*a [28]. Cependant, le fer(II) n'est pas connu pour sa capacité à déprotoner les NH peptidiques (contrairement à $Cu^{II}$, $Ni^{II}$ et $Zn^{II}$), même si cette hypothèse a déjà été proposée [32] [183].

Afin d'approfondir le mécanisme de complexation concernant les peptides à histamine, une étude complémentaire par perfusion ESI-MS a été réalisée sur une solution de AGHa incubée en présence de fer(II). Les conditions d'analyse étant particulièrement favorables, les formes tétra- et dihydratée du complexe de fer(II) ont pu être mises en évidence (**Figure 61A**). Leur fragmentation MS/MS a permis de démontrer clairement leur filiation avec l'espèce

déshydratée $[(AGHa-H)+Fe^{II}]^+$ (**Figures 61B-C**). Par analogie avec l'étude $MS^2$ du peptide libre AGHa (**Figure 61D**), le profil de fragmentation du complexe déshydraté (**Figure 61E**) montre une perte de neutre caractéristique de 128 u correspondant au départ de l'entité «AG - $H_2O$ » (146–18). Les ions formés consécutivement à cette cassure sont (i) la forme protonée de l'histamine ($[Ha+H]^+$) dans le cas du peptide (**Figure 61D**) et (ii) l'espèce $[(Ha-H)+^{56}Fe]^+$ dans le cas du complexe fer(II)-peptide (**Figure 61E**). Dans ce dernier cas, la présence de fer dans la structure est validée par la contribution des isotopes $^{54}Fe$ et $^{56}Fe$ (**Figure 61E**). La déprotonation de l'histamine se produirait au niveau du groupement $N^1$-H de l'imidazole (convention IUPAC), pourtant très faiblement acide (p*K*a > 14). Comme cela a déjà été démontré, la coordination entre un métal et l'azote $N^3$ de l'imidazole peut induire le départ du proton $N^1$-H à un pH bien inférieur à son p*K*a (pH ≈ 10), sans que l'azote $N^1$ ne soit pour autant coordinant [184]. Quoiqu'il en soit, ce résultat intéressant permet d'affirmer que le tripeptide AGHa se coordine avec le fer(II) *via* l'histamine, et plus précisément son groupement imidazole en adéquation avec le mécanisme supposé pour les peptides à histidine. Par ailleurs, deux hypothèses sont finalement envisageables quant au site de déprotonation pour les peptides à histamine, soit (i) au niveau d'un NH peptidique, ce qui permettrait une 3$^e$ liaison coordinante avec le métal (en plus du $NH_2$ terminal et du $N^3$ de l'imidazole), soit (ii) au niveau du $N^1$-H du cycle imidazole (site non coordinant).

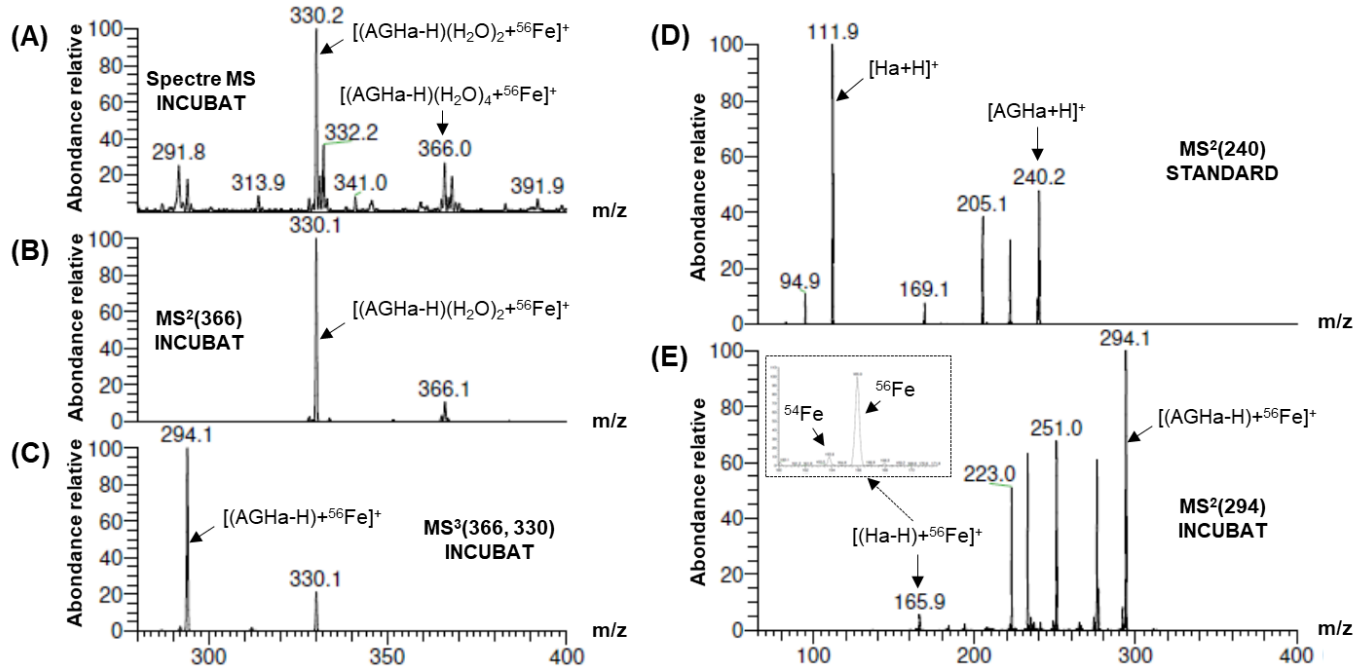



**Figure 61. (A)** Spectre $ESI^+$-MS obtenu pour l'incubat $Fe^{II}$ + AGHa, **(B)** Spectre $ESI^+$-$MS^2$ du complexe fer(II)-AGHa tétrahydraté, **(C)** Spectre $ESI^+$-$MS^2$ du complexe fer(II)-AGHa dihydraté, **(D)** Spectre $ESI^+$-$MS^2$ du peptide libre AGHa et **(E)** Spectre $ESI^+$-$MS^2$ du complexe fer(II)-AGHa déshydraté ($MS^2$ appliquée sur l'ion parent avec Δ m/z = ± 2 u).

Les expériences contrôles réalisées sur ces mêmes peptides en présence de fer(III) ont permis d'exclure l'oxydation potentielle des complexes ferreux en complexes ferriques dans les conditions $ESI^+$. En effet, les complexes fer(III)-peptide identifiés dans les incubats avec le fer(III) (cf. **Résultats et discussion, II.3.1.2**) n'ont jamais été observés dans les incubats avec

le fer(II). Le complexe fer(II)-peptide est donc suffisamment stable pour empêcher son oxydation, même dans des conditions propices à ce phénomène.

### 3.1.2. Complexes fer(III)-peptide

Selon leur composition en résidus d'acides aminés, les peptides standards ont montré deux comportements différents vis-à-vis des ions fer(III).

1) Cas général

Les peptides ne possédant pas de motif à 3 résidus acides successifs ont tous formé un complexe monoprotoné de formule $[(M-2H)+Fe^{III}]^+$, comme détaillé ci-après pour GGHa, GGH et HHHHHH (**Figure 62**). Le pic principal de cette nouvelle entité est décalé de + 52.911 (± 0.001) u par rapport au signal du peptide libre, en accord avec la complexation de $^{56}Fe^{III}$ (55.935 u) par le peptide (55.935–3×1.008 = 52.911). Le profil isotopique de cette espèce confirme la présence d'un atome de fer, la contribution des isotopes majoritaires $^{54}Fe$ et $^{56}Fe$ étant clairement visible (**Figure 62**). La forme doublement déprotonée du peptide implique un départ de proton au niveau de la fonction COOH terminale et au niveau d'un NH peptidique. Dans le cas des peptides à histamine (GGHa et AGHa), les groupements concernés par la déprotonation sont nécessairement un NH peptidique et le $N^1$-H du cycle imidazole (ces 2 groupements ayant déjà été proposés comme sites de déprotonation potentiels pour le complexe ferreux).

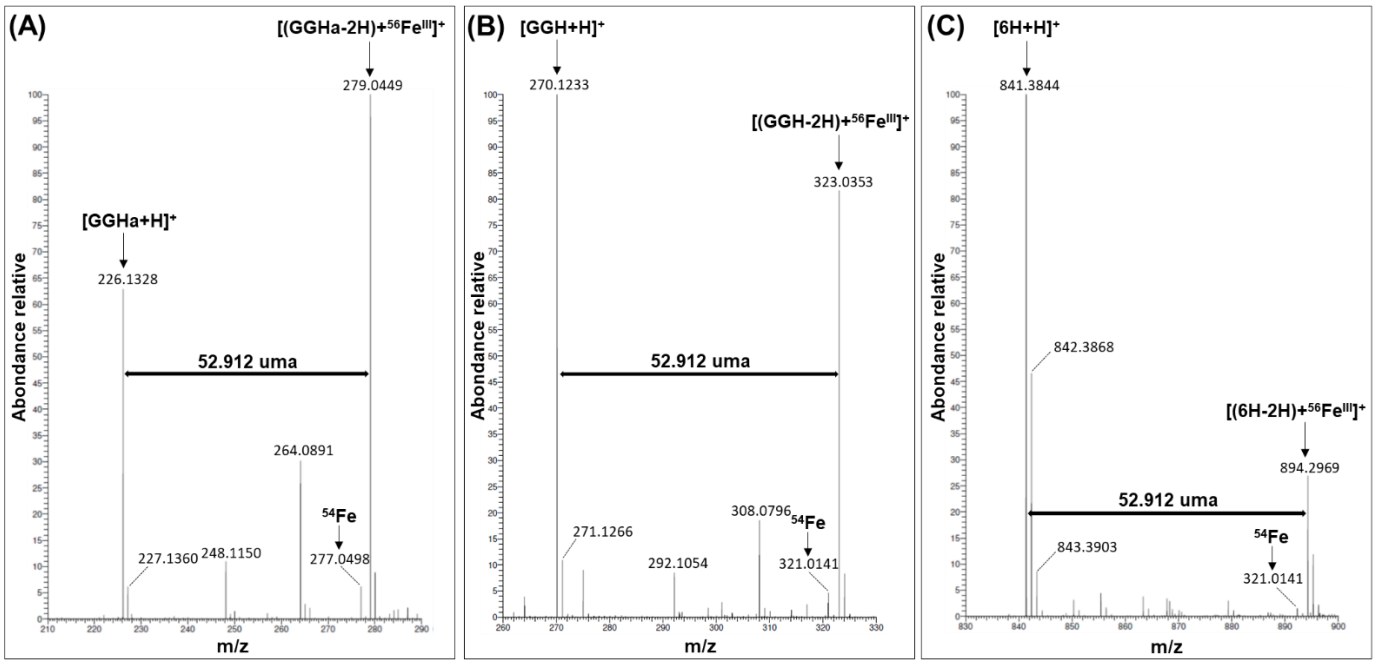



**Figure 62.** Spectres $ESI^+$-HRMS obtenus en mode flow-injection pour les peptides **(A)** GGHa, **(B)** GGH and **(C)** HHHHH (ou 6H), suite à leur incubation avec le fer(III).

2) Cas particulier

Les 5 peptides dotés d'un motif à trois résidus acides successifs (*i.e.* DDD, DED, EEE, FDDDK et FDDDA) ont montré des profils ESI-MS comparables après leur incubation avec le fer(III). Comme illustré pour l'incubat du pentapeptide FDDDA (**Figure 63A**), plusieurs nouveaux signaux ont été mis en évidence par comparaison avec l'expérience contrôle sans fer (**Figure 63B**).

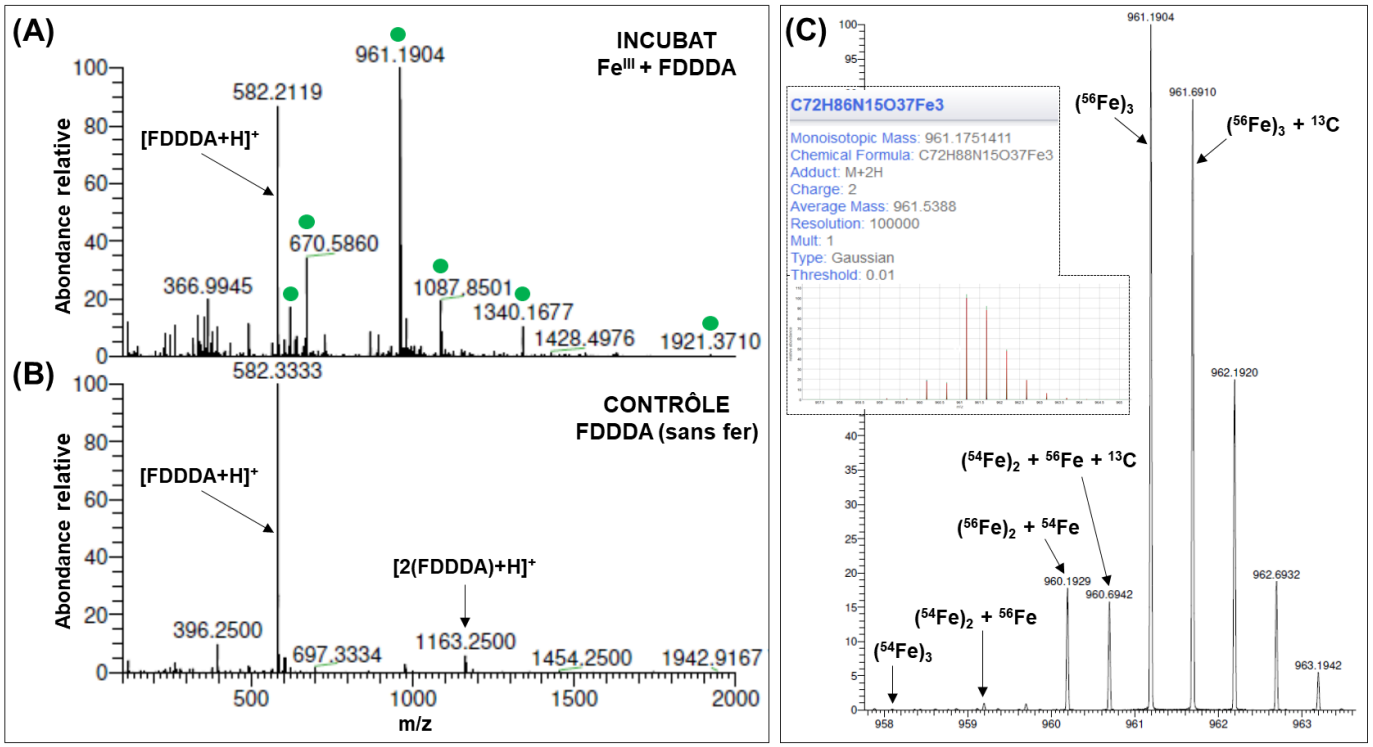



**Figure 63.** Spectres ESI$^+$-HRMS obtenus en mode flow-injection pour le peptide FDDDA (M = 581) **(A)** Après son incubation avec les ions Fe$^{III}$ et **(B)** Sans incubation préalable avec le fer (les points verts identifient les signaux spécifiques à l'incubat). **(C)** Profil isotopique expérimental et simulé (encart en pointillé, *www.envipat.eawag.ch*) de l'ion dichargé m/z = 961 attribué au complexe trimétallique Fe$^{III}$-FDDDA ($C_{72}H_{86}N_{15}O_{37}Fe_3$).

Selon le modèle de l'acétate de fer basique $[Fe_3(\mu_3\text{-}O)(OAc)_6(H_2O)_3]^+$ (cf. **Étude bibliographique, I.1.3.3**), les 6 nouveaux pics identifiés dans l'incubat (points verts, **Figure 63A**) pourraient correspondre au complexe trimétallique de structure $[Fe_3(\mu_3\text{-}O)(FDDDA\text{-}3H)_2(FDDDA\text{-}H)(H_2O)_3]$ (M = 1974). Le **Tableau 24** attribue à chaque valeur m/z d'intérêt la forme de l'ion correspondant et la structure détaillée de l'entité associée. Les trois molécules d'eau impliquées dans la sphère de coordination ne sont pas observées, les conditions ESI$^+$-MS en mode flow-injection étant trop rudes. Le complexe est ainsi détecté sous sa forme déshydratée (M = 1920), préférentiellement à l'état de charge +2 (m/z = 961). Le profil isotopique de cet ion dichargé, reporté en **Figure 63C**, est en parfaite cohérence avec la formule brute proposée pour l'édifice ($C_{72}H_{86}N_{15}O_{37}Fe_3$). Les autres ions associés au complexe sont formés par décomposition thermique dans le bloc source, à la suite du départ d'un ou deux motifs peptidiques FDDDA. Par ailleurs, un adduit trichargé est observé, correspondant à

l'association du complexe déshydraté avec le même complexe soustrait d'un motif peptidique (M = 3260). L'étude de l'incubat FDDDA en mode ESI$^-$-MS a confirmé ces résultats, les entités précédemment décrites ayant toutes été observées (résultats en ESI négatif non montrés).

**Tableau 24.** Identification des nouveaux signaux observés par ESI$^+$-HRMS dans l'incubat $Fe^{III}$ + FDDDA.

| Signaux (m/z) | Charge (+) | Masse (u) | Forme générale de l'ion | Structure de l'entité |
|---|---|---|---|---|
| 635.124 | 1 | 634.124 | [Fe(FDDDA-3H)+H]$^+$ | [Fe(FDDDA-3H)] |
| 670.586 | 2 | 1339.172 | [(**Cplex ***-FDDDA)+2H]$^{2+}$ | [$Fe_3$($\mu_3$-O)(FDDDA-3H)(FDDDA-4H)] |
| 961.190 | 2 | 1920.381 | [**Cplex**+2H]$^{2+}$ | [$Fe_3$($\mu_3$-O)(FDDDA-3H)$_2$(FDDDA-H)] |
| 1087.850 | 3 | 3260.550 | [(**Cplex**)(**Cplex**-FDDDA)+3H]$^{3+}$ | [$Fe_3$($\mu_3$-O)(FDDDA-3H)$_2$(FDDDA-H)][$Fe_3$($\mu_3$-O)(FDDDA-3H)(FDDDA-4H)] |
| 1340.168 | 1 | 1339.168 | [(**Cplex**-FDDDA)+H]$^+$ | [$Fe_3$($\mu_3$-O)(FDDDA-3H)(FDDDA-4H)] |
| 1921.371 | 1 | 1920.371 | [**Cplex**+H]$^+$ | [$Fe_3$($\mu_3$-O)(FDDDA-3H)$_2$(FDDDA-H)] |

* **Cplex**: complexe déshydraté [$Fe_3$($\mu_3$-O)(FDDDA-3H)$_2$(FDDDA-H)], de formule brute $C_{72}H_{86}N_{15}O_{37}Fe_3$ (M = 1920)

L'étude ESI$^+$-MS$^2$ de l'ion diprotoné associé au complexe déshydraté (m/z = 961) a définitivement validé sa structure, en produisant simultanément l'ion peptidique (m/z = 582) et l'ion du complexe ayant perdu le motif peptidique (m/z = 1340) (**Figure 64**).

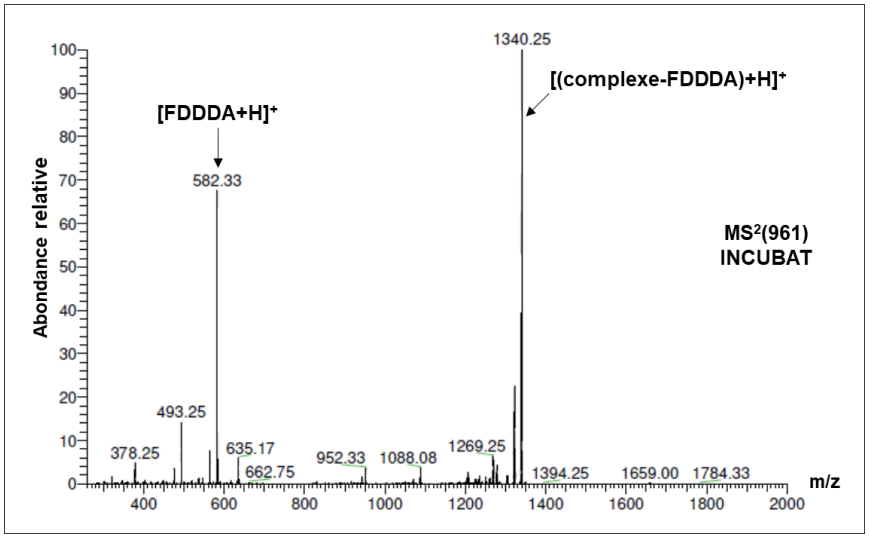



**Figure 64.** Spectre ESI$^+$-MS/MS de l'ion dichargé m/z = 961 associé au complexe déshydraté [$Fe_3$($\mu_3$-O)(FDDDA-3H)$_2$(FDDDA-H)] (M = 1920).

Pour les 5 peptides standards possédant un motif à 3 résidus acides successifs, une série d'ions analogue à celle détaillée pour FDDDA a été identifiée après leur incubation avec les ions fer(III) (**Tableau 24**). Cette similarité a permis de valider la formation d'un complexe triferrique de structure générale [$Fe^{III}_3$($\mu_3$-O)(peptide-3H)$_2$(peptide-H)($H_2O$)$_3$] pour DDD, DED, EEE, FDDDK et FDDDA.

### 3.1.3. Synthèse

Les résultats positifs de cette première série d'expériences sont essentiels pour le développement d'un protocole LC-MS visant à cribler les peptides antioxydants agissant par chélation du fer. L'étude $ESI^+$-MS des solutions d'incubation a permis de valider la formation de complexes fer-peptide, aussi bien en présence des ions ferreux que des ions ferriques.

Dans le cas des incubats avec le fer(II), le complexe monomérique $[(M-H)+Fe^{II}]^+$ a été détecté pour tous les peptides étudiés, indépendamment de leur composition en acides aminés.

Dans le cas des incubats avec le fer(III), deux types de complexes ont été mis en évidence :

- les peptides possédant un motif à 3 résidus acides successifs ont systématiquement formé un complexe trimérique de structure $[Fe^{III}_3(\mu_3\text{-}O)(M-3H)_2(M-H)(H_2O)_3]$ et de stœchiométrie 1/1 (peptide/métal). Celui-ci a pu être identifié grâce à l'apparition de plusieurs nouveaux pics par rapport à l'expérience contrôle sans fer, parmi lesquels l'ion doublement chargé associé à la forme déshydratée $[Fe^{III}_3(\mu_3\text{-}O)(M-3H)_2(M-H)+2H]^{2+}$ ;

- les peptides ne possédant pas ce motif particulier ont tous formé un complexe monomérique $[(M-2H)+Fe^{III}]^+$.

Cette étude a permis de démontrer que les différents complexes formés étaient stables dans la phase mobile LC du système chromatographique choisi (IP-RPLC avec NFPA comme agent d'appariement d'ions). Par ailleurs, les conditions $ESI^+$-MS employées sont suffisamment douces pour observer des complexes *a priori* faibles, tels que les espèces fer(II)-WWW (WWW étant connu pour être faiblement chélateur [37]) ou encore fer(III)-$NH_2$-X-X-X-His-COOH (avec X, un acide aminé autre que Asp ou Glu). Enfin, le fait de détecter des complexes différents selon l'environnement testé – *i.e.* ferreux après incubation avec le fer(II) et ferriques après incubation avec le fer(III) – a permis de valider les étapes de nos 2 protocoles ($Fe^{II}$ et $Fe^{III}$) vis-à-vis du degré d'oxydation métallique (natures de la solution de fer, du complexe néoformé et de l'ion associé à ce complexe).

## 3.2. Détection IP-RPLC-ESI-HRMS

La chromatographie liquide en phase inverse par paires d'ions – à l'aide d'acides carboxyliques perfluorés comme agents d'appariement – a été largement utilisée en couplage avec la spectrométrie de masse (IP-RPLC-MS) pour séparer des acides aminés et petits peptides hydrophiles. Deperson et coll. ont même montré que l'ajout d'acide nonafluoropentanoique (NFPA) dans la phase mobile offrait des sensibilités de détection comparables aux acides formique ou acétique couramment utilisés en spectrométrie de masse [185]. Cependant, le comportement vis-à-vis de la rétention des complexes métal-peptide doit être évalué et comparé à la rétention du peptide libre en vue d'un criblage différentiel par LC-HRMS. Par conséquent, la méthode IP-RPLC a d'abord été testée sur chacune des solutions de complexe fer-peptide avant de pouvoir être transposée aux hydrolysats protéiques réels.

### 3.2.1. Complexes fer(II)-peptide

1) Rétention des peptides et de leurs complexes de fer(II)

Un programme court de 21 minutes en élution par gradient a été appliqué, de façon individuelle, aux peptides standards et aux solutions d'incubation des peptides avec le fer(II) (cf. **Matériel et méthodes, 5.1.1** et **5.3**). Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 25**.

**Tableau 25.** Temps de rétention (Tr) et valeurs m/z obtenues par analyse IP-RPLC-ESI$^+$-HRMS (à l'aide du gradient court de 21 min) pour les peptides libres et leurs complexes de fer(II). Les valeurs RAC ont été calculées d'après l'**Équation 4**.

| Peptide | Peptide libre | | | Complexe fer(II)-peptide | | Δ m/z $(m/z)_2 - (m/z)_1$ | RAC (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Masse (u) | $[M+H]^+$ m/z | Tr (min) | $[(M-H)+^{56}Fe]^+$ m/z | Tr (min) | | |
| GGHa | 225.125 | 226.133 | **10.3** | 280.053 | **10.3** | **53.920** | **170** |
| AGHa | 239.141 | 240.149 | **10.3** | 294.069 | **10.3** | **53.919** | **125** |
| CAH | 329.113 | 330.121 | **10.4** | 384.040 | **10.4** | **53.920** | **82** |
| GGH | 269.111 | 270.119 | **10.1** | 324.038 | **10.3** | **53.919** | **55** |
| EAH | 355.148 | 356.156 | **10.1** | 410.075 | **10.2** | **53.919** | **36** |
| DAH | 341.132 | 342.14 | **10.1** | 396.059 | **10.2** | **53.919** | **23** |
| βAH | 226.105 | 227.113 | **10.1** | 281.032 | **10.3** | **53.919** | **18** |
| DMH | 401.135 | 402.143 | **10.5** | 456.063 | **10.4** | **53.919** | **17** |
| DTH | 371.143 | 372.151 | **10.1** | 426.070 | **10.3** | **53.919** | **13** |
| DSH | 357.127 | 358.135 | **10.0** | 412.054 | **10.2** | **53.919** | **11** |
| FDDDK | 638.252 | 639.26 | **10.5** | 693.179 | **10.4** | **53.919** | **7** |
| FDDDA | 581.195 | 582.203 | **9.9** | 636.122 | **10.2** | **53.919** | **3.5** |
| HGH | 349.147 | 350.155 | **10.9** | 404.074 | **10.7** | **53.919** | **2** |
| IKP | 356.241 | 357.249 | **10.8** | 411.168 | **10.6** | **53.919** | **1** |
| LLPHHADADY | 1150.541 | 1151.549 | **11.1** | 1205.469 | **11.0** | **53.919** | **0.8** |
| RQR | 458.269 | 459.277 | **10.8** | 513.196 | **10.7** | **53.920** | **0.7** |
| HHH | 429.186 | 430.194 | **11.2** | 484.113 | **10.9** | **53.919** | **0.3** |
| HHHHHH | 840.363 | 841.371 | **11.4** | 895.291 | **11.4** | **53.919** | **0.3** |
| RKR | 458.306 | 459.314 | **11.2** | 513.233 | **11.0** | **53.919** | **0.1** |
| WWW | 576.247 | 577.255 | **11.9** | 631.174 | **11.8** | **53.919** | **0.1** |
| YPISL | 591.325 | 592.333 | **11.3** | 646.252 | **11.1** | **53.919** | **0.1** |
| EEE | 405.135 | 406.143 | **8.4** | 460.062 | **nd** | **53.919** | **-** |
| DED | 377.106 | 378.114 | **7.7** | 432.033 | **nd** | **53.919** | **-** |
| DDD | 363.090 | 364.098 | **7.3** | 418.017 | **nd** | **53.919** | **-** |
| γECG | 307.082 | 308.09 | **7.3** | 362.009 | **nd** | **53.919** | **-** |
| NCS | 322.093 | 323.101 | **8.0** | 377.020 | **nd** | **53.920** | **-** |
| IKW | 445.267 | 446.275 | **11.3** | 500.194 | **nd** | **53.920** | **-** |

Les temps de rétention des peptides libres et de leurs complexes de fer(II) correspondants ne diffèrent pas de plus de ± 0.2 min. Les **Figures 65A1** et **65B1** montrent que les peptides GGH et DAH sont coélués avec leurs complexes de fer(II) respectifs, ce qui signifie que l'ion $[M+H]^+$ du peptide libre et l'ion $[M-H+^{56}Fe^{II}]^+$ du complexe peuvent être observés sur le même spectre de masse (**Figures 65A2** et **65B2**). Pour six peptides (*i.e.* EEE, DED, DDD, γECG, NCS et IKW), le temps de rétention du complexe n'a pas pu être déterminé, cela indiquant une très faible affinité pour le fer(II). Pour les 21 autres peptides, l'ion $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ a toujours été

détecté même pour des chélateurs faibles tels que WWW (cf. **Résultats et discussion, II.3.1.3**). Cependant, le signal de l'ion $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ est plus intense pour les forts chélateurs du fer(II). Ces résultats démontrent que la chromatographie d'appariement d'ions est valorisable dans le cadre d'une méthode de criblage IP-RPLC-HRMS des peptides chélateurs du fer(II). Deux pics chromatographiques coélués (séparés de 0.2 min au maximum) et présentant une différence de masse de 53.919 (± 0.001) u entre leurs courants ioniques devraient donc indiquer la présence d'un peptide chélateur du fer(II). Toutefois, leurs intensités relatives devront être discutées afin de discriminer les peptides d'intérêt (*i.e.* les chélateurs forts) des autres (*i.e.* les faibles chélateurs).

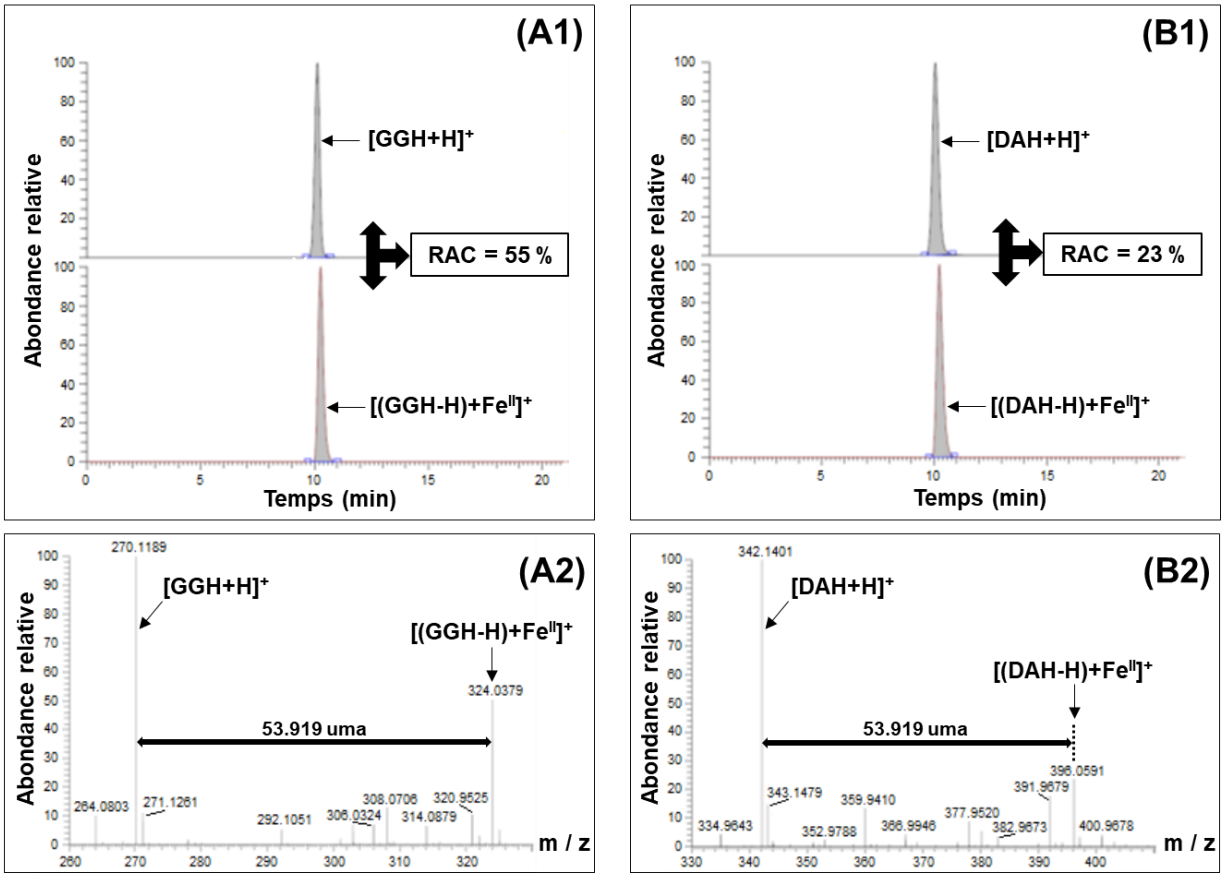



**Figure 65.** Analyse IP-RPLC-ESI$^+$-HRMS des solutions d'incubation de GGH et DAH, en présence des ions $Fe^{II}$. Les profils chromatographiques (chromatogrammes d'ion extrait de $[M+H]^+$ et $[(M-H)+Fe^{II}]^+$) sont montrés en **(A1)** pour GGH et **(B1)** pour DAH. Les spectres HRMS correspondants sont montrés en **(A2)** pour GGH et **(B2)** pour DAH. RAC : abondance relative du complexe calculée selon l'**Équation 4**.

2) Abondance relative du complexe de fer(II)

Pour comparer les performances de chélation de chaque peptide, l'abondance relative du complexe (RAC) a été définie comme le rapport de l'aire du pic chromatographique de l'ion $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ ($A_{Complex}$) sur celle du pic de l'ion $[M+H]^+$ ($A_{Peptide}$) et exprimée en pourcentage (**Équation 4**).

$$RAC = \frac{A_{Complex}}{A_{Peptide}} \times 100 \qquad \textbf{Équation 4}$$

Ainsi, plus l'intensité du pic $[(M\text{-}H)+^{56}Fe^{II}]^+$ est élevée sur le spectre de masse, plus la valeur RAC est élevée. D'après les résultats indiqués dans le **Tableau 25**, trois catégories de peptides émergent en fonction de leur RAC.

**Cas 1. RAC > 10% :** un premier ensemble de dix peptides émerge avec un RAC supérieur à 10% (de 11% pour DSH à 170% pour GGHa) indiquant une stabilité significative des complexes $[M\text{-}H+^{56}Fe^{II}]^+$ lors de l'analyse LC. Fait intéressant, tous ces peptides contiennent soit une histidine, soit une histamine en position C-terminale. Un mode de coordination tridenté impliquant le $NH_2$ terminal, le cycle imidazole et le $COO^-$ terminal a déjà été observé avec d'autres métaux [30] et pourrait expliquer la grande stabilité des complexes formés entre le fer(II) et le peptide contenant l'histidine en position 3. Selon la théorie HSAB [25], le fer(II) – en tant qu'acide de Lewis intermédiaire – forme des complexes de coordination plus stables avec les bases de Lewis intermédiaires telles que le cycle imidazole de l'histidine ou le $NH_2$ terminal. En outre, une corrélation positive entre la teneur en histidine et l'activité de chélation du fer(II) a déjà été observée dans des fractions d'hydrolysats de protéines de pois chiche [55]. Il n'est donc pas surprenant que ces peptides se soient révélés parmi les meilleurs chélateurs du fer(II) avec la méthode proposée. En ce qui concerne les deux tripeptides à histamine (GGHa et AGHa), leurs valeurs RAC très élevées (170 et 125 %, respectivement) révèlent des complexes *a priori* très stables. Selon l'hypothèse précédemment formulée (étude $MS^2$ de Fe(II)-AGHa, cf. **Résultats et discussion, II.3.1.1**), les complexes Fe(II)-AGHa et Fe(II)-GGHa impliquent certainement le $NH_2$ terminal, un NH peptidique et le cycle imidazole, selon un mode tridenté.

**Cas 2. RAC < 1% :** à l'opposé, en raison d'un signal ionique très faible pour le complexe fer-peptide, la valeur RAC ne peut pas être calculée pour 6 peptides n'ayant pratiquement aucune affinité pour le fer(II), à savoir EEE, DED, DDD, γECG, NCS et IKW. Sept autres peptides peuvent être ajoutés à cette liste avec une valeur RAC inférieure à 1%, considérée comme insuffisante pour un peptide chélateur du fer(II) d'intérêt. Le tripeptide WWW est dans cette catégorie avec un RAC de 0.1%, alors que l'intensité de l'ion $[(WWW\text{-}H)+^{56}Fe^{II}]^+$ était nettement plus élevée en perfusion avec une valeur RAC de 8% (sur la base du spectre MS en **Figure 60**). Ce résultat corrobore le fait que seuls les complexes de coordination forts peuvent être facilement détectés après le processus LC, contrairement aux complexes faibles [45].

**Cas 3. RAC de 1-10% :** le dernier groupe, présentant un comportement intermédiaire, est composé de quatre peptides dont les valeurs RAC sont comprises entre 1 et 10%, à savoir FDDDK, FDDDA, HGH et IKP. Fait intéressant, les pentapeptides FDDDK et FDDDA forment un complexe modérément stable (avec des RAC de 7% et 3.5%, respectivement), contrairement aux tripeptides à 3 résidus acides (*i.e.* DDD, DED, EEE) pour lesquels le RAC est quasiment nul. Il semble que le résidu Phe supplémentaire en position N-terminale du squelette triacide (*i.e.* DDD) puisse donner lieu à des interactions faibles avec le fer(II) (interaction d-π [28]).

### 3.2.2. Complexes fer(III)-peptide

Le même programme court en gradient d'élution (21 min) a été appliqué aux incubats peptidiques avec le fer(III).

1) Cas général

Par perfusion en mode flow-injection, la majorité des peptides standards avaient conduit à l'observation nette du complexe $[(M-2H)+Fe^{III}]^{+}$. Après analyse IP-RPLC, l'ion correspondant n'a toutefois jamais été observé. Ce type de complexe, trop faible pour être préservé lors de son élution sur la colonne C18, pourrait correspondre à un sel de fer(III) formé par une seule liaison coordinante (impliquant le COOH terminal ou un NH peptidique déprotoné dans le cas des peptides à histamine).

2) Cas particulier

Les peptides avec un motif à 3 résidus acides successifs avaient révélé par perfusion le complexe triferrique ($[Fe^{III}_3(\mu_3\text{-}O)(M-3H)_2(M-H)(H_2O)_3]$), détecté sous sa forme déshydratée doublement protonée. À l'issu de l'analyse LC, cet ion a été uniquement observé pour les pentapeptides FDDDA et FDDDK (**Figure 66**). L'écart de rétention important constaté au profit du complexe (+ 0.6 et + 1.2 min) conforte l'hypothèse d'une structure trimérique. D'autre part, ce paramètre ΔTr permet de valider avec certitude la grande stabilité de ce type de complexe. Les deux ions $[Complexe+2H]^{2+}$ (**Figures 66A-a4** et **66B-b4**) montrent un profil isotopique parfaitement conforme à celui attendu (**Figure 63C**). En revanche, le complexe formé en solution par les tripeptides ayant ce motif à 3 résidus acides successifs (DDD, DED et EEE) n'est pas suffisamment robuste pour être détecté dans ces conditions.

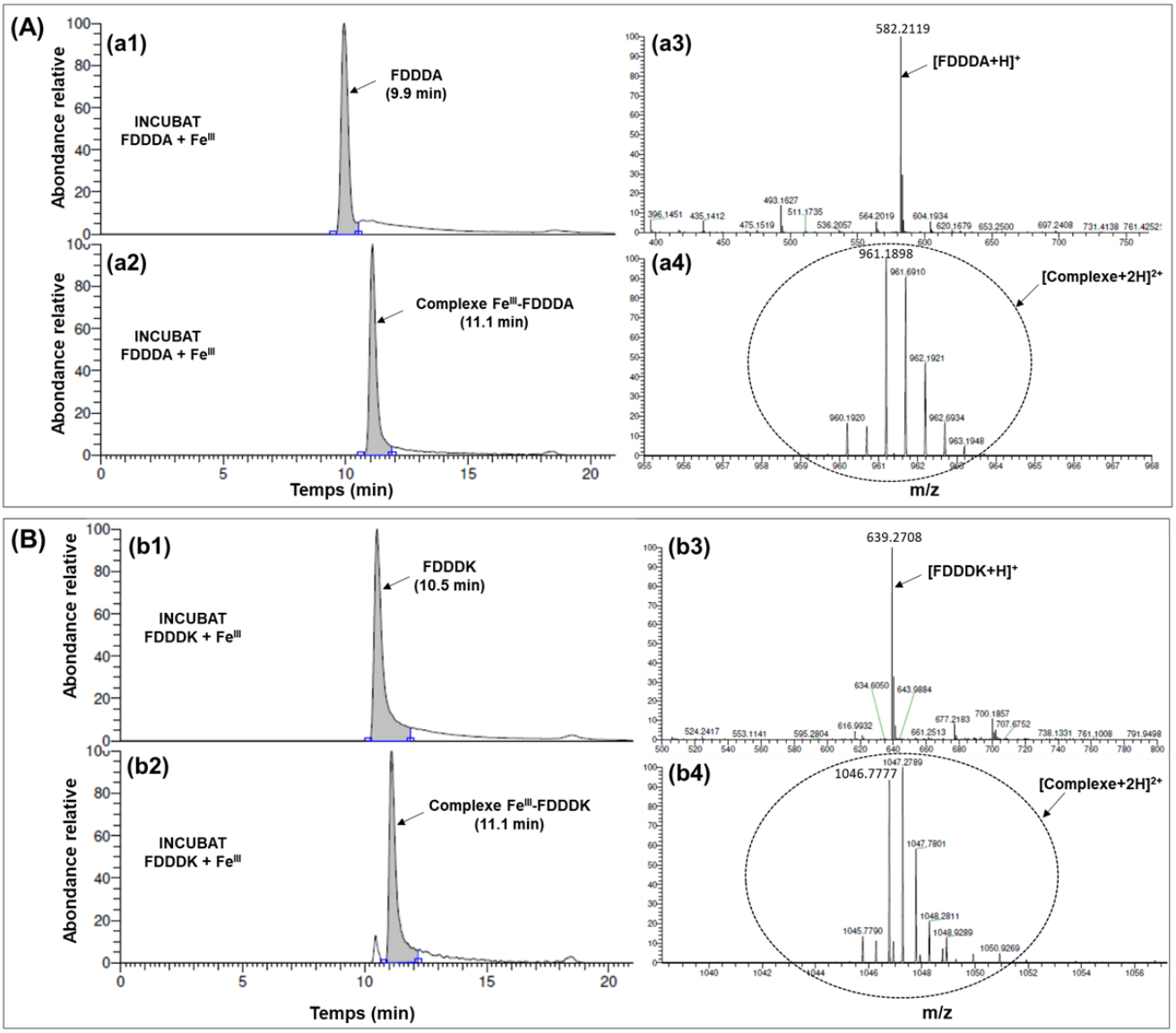



**Figure 66.** Analyse IP-RPLC-ESI$^{+}$-HRMS des solutions d'incubation de **(A)** FDDDA et **(B)** FDDDK, en présence des ions $Fe^{III}$. Les profils chromatographiques (chromatogrammes d'ion extrait de $[M+H]^{+}$ et $[Fe^{III}_3(\mu_3\text{-}O)(M\text{-}3H)_2(M\text{-}H)+2H]^{2+}$) sont donnés en **(a1)**/**(a2)** pour FDDDA et **(b1)**/**(b2)** pour FDDDK. Les spectres HRMS correspondants sont reportés en **(a3)**/**(a4)** et **(b3)**/**(b4)**, respectivement.

### 3.2.3. Synthèse

L'insertion d'une étape chromatographique avant la détection MS a pour effet de révéler les complexes fer-peptide les plus forts.

Concernant les tests en présence de fer(II), une claire dichotomie est constatée parmi les peptides standards, suite à l'analyse IP-RPLC-MS. Les di- et tripeptides possédant une histidine ou une histamine en position C-terminale donnent lieu à un ion complexe $[(M\text{-}H)+Fe^{II}]^{+}$ d'intensité remarquable comparativement aux autres peptides. Cette forte stabilité peut

s'expliquer, dans les deux cas de figure, par un mode de chélation tridenté. La grandeur RAC, définie comme l'abondance ionique du complexe par rapport au peptide libre, permet de classer les molécules étudiées selon leur capacité apparente de chélation du fer(II) : les chélateurs forts (RAC > 10%), les chélateurs moyens (1 < RAC < 10%) et les chélateurs faibles (RAC < 1%). Un paramètre intéressant est mis en exergue : en plus d'un décalage en masse fixe de 53.919 (± 0.001) u entre les ions du complexe et du peptide libre associé, ces deux entités sont systématiquement coéluées avec un écart de rétention inférieur à 0.2 min.

Concernant les tests en présence de fer(III), l'analyse LC-MS montre que les complexes de forme $[(M-2H)+Fe^{III}]^+$ sont trop faibles pour être observés dans ces conditions. Dans le cas des peptides avec un motif à 3 résidus acides successifs, le complexe triferrique $[Fe^{III}_3(\mu_3\text{-}O)(M-3H)_2(M-H)(H_2O)_3]$ n'est détecté après la LC que pour les pentapeptides FDDDA et FDDDK (et non pour les tripeptides DDD, DED et EEE). Ce résultat est en accord avec une étude récente par potentiométrie, selon laquelle leur grande stabilité proviendrait d'un mode de chélation tétradenté (*via* les 3 COOH latéraux et le COOH terminal de Ala ou Lys) [76]. Quoiqu'il en soit, en cas de complexes multimériques, il n'est pas possible de prédire l'écart de masse entre un peptide et sa forme complexée, ni leur différence de rétention en phase inverse (la différence d'hydrophobie entre les deux espèces dépendant de la nature même du peptide chélateur).

En l'état, le développement d'un protocole de criblage MS des peptides chélateurs du fer(II) parait plus facilement réalisable que pour les peptides chélateurs du fer(III). En effet, deux paramètres pourront être utilisés comme critères de sélection, à savoir (i) une différence de masse constante et précisément connue entre un peptide et le potentiel complexe correspondant et (ii) une rétention similaire de ces deux espèces.

Dans la suite de ce travail, nous poursuivons par conséquent la mise au point en focalisant sur les peptides chélateurs du fer(II).

## 4. Mise au point d'un criblage des peptides chélateurs du fer(II)

Les résultats précédents ont montré que la capacité de chélation du fer(II) pouvait être évaluée à partir de l'abondance relative du complexe (RAC). Cependant, il s'avère nécessaire d'examiner plus en profondeur cette grandeur pour pouvoir l'utiliser comme un paramètre discriminant. Cela inclut la définition d'une valeur de seuil pertinente. Ainsi, il apparait important d'étudier l'influence des conditions initiales de formation du chélate sur la valeur RAC, en particulier le rapport de la concentration en fer sur la concentration en peptide.

### 4.1. Effet du ratio [fer(II)]/[peptide] sur le RAC

Nous avons étudié l'influence du rapport initial de concentrations [fer(II)]/[peptide] sur la valeur finale du RAC. Malgré des valeurs RAC très élevées, GGHa et AGHa ont été écartés comme peptides modèles pour cette étude car l'histamine (Ha) n'est pas un acide aminé protéinogène. En raison de sa valeur RAC plus intéressante (55%), notre choix s'est porté sur GGH plutôt que sur le dipeptide chélateur de référence, la carnosine (18%). Par ailleurs, le peptide CAH n'a pas

été considéré en raison de sa dimérisation possible par oxydation du résidu cystéine. La première série d'expériences a été menée en utilisant une concentration fixe de 1 mM de fer(II). Le rapport de concentration a été testé d'un excès de 10 fois en peptide à un excès de 10 fois de fer. Les résultats sur le RAC de GGH sont présentés en **Figure 67**. La courbe montre deux tendances : premièrement, avec une carence en fer(II) (excès de peptide), la valeur du RAC augmente rapidement jusqu'à ce que le rapport [$Fe^{II}$]/[peptide] atteigne 1. Dans ce domaine, le fer(II) est rapidement séquestré pour former le chélate. Deuxièmement, en excès de fer(II), la courbe augmente lentement car la réaction de complexation n'est pas totale. La principale conclusion à tirer de cette courbe est que la valeur RAC fluctue moins en excès qu'en défaut de fer, même si celle-ci dépend du rapport [$Fe^{II}$]/[peptide]. Ainsi, il serait préférable de travailler avec un excès de fer(II) lors de la phase d'incubation pour mieux maitriser le rendement de formation des chélates.

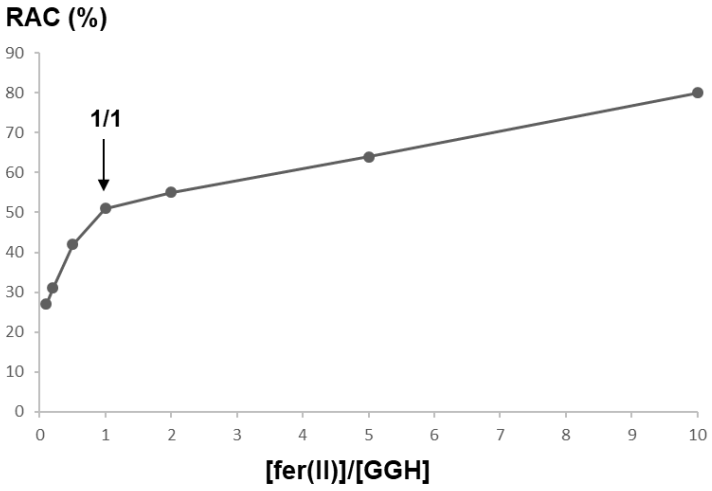



**Figure 67.** Évolution de l'abondance relative du complexe (RAC) en fonction du rapport de concentrations fer(II) sur peptide, dans le cas de GGH.

### 4.2. Effet matrice

Pour évaluer un effet de matrice potentiel, une deuxième série d'expériences a été réalisée avec le tripeptide GGH ajouté à des mélanges de complexité croissante : un hydrolysat synthétique composé de peptides non chélateurs et un hydrolysat trypsique de caséines (**Tableau 26**). Pour ces hydrolysats, une méthode IP-RPLC de 36 min a été appliquée pour améliorer la séparation des petits peptides dans les mélanges complexes (cf. **Matériel et méthodes, 5.3**) en particulier de GGH, qui ne coélue avec aucun autre peptide dans l'hydrolysat synthétique (**Figure 68A**). Dans ces nouvelles conditions chromatographiques, les différences de temps de rétention (Tr) entre le complexe et le peptide libre restent inférieures à 0.2 min. Chaque hydrolysat a été injecté seul (échantillon contrôle) et après incubation avec du fer(II) en excès. Dans le cas de l'hydrolysat synthétique, les RAC sont inférieurs à 0.8% dans l'échantillon contrôle pour tous les peptides, y compris GGH. Après incubation avec le fer(II), GGH est le seul peptide dont la valeur RAC augmente significativement, atteignant plus de 100% quel que soit le rapport

[$Fe^{II}$]/[GGH] testé. Les mêmes tendances ont été observées pour l'hydrolysat trypsique de caséines (**Figure 68B** et **Tableau 26**).

**Tableau 26.** Valeurs des paramètres utilisés pour le criblage des peptides chélateurs de fer(II) dans les hydrolysats (analyses en triplicats). Nd : non déterminé (sous la limite de détection ou absence de signal pour l'ion $[(M-H)^+{}^{56}Fe^{II}]^+$). NB : les grandeurs Up factor et Down factor seront explicitées au paragraphe **II.4.3**.

| Peptide | Matrice | [peptide] (µM) | [$Fe^{II}$]/[peptide] | Temps de rétention (min) peptide / complexe fer(II) | RAC (%) | Up factor | Down factor |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| γECG | Hydrolysat synthétique | 190 | 26 | 10.5 / 10.5 | < 0.5 | 0.7 ± 0.2 | 0.95 ± 0.08 |
| NCS | | 180 | 28 | 11.2 / Nd | Nd | Nd | 1.2 ± 0.2 |
| IKP | | 160 | 31 | 19.0 / 19.0 | 1.4 ± 0.3 | 7.6 ± 2.7 | 1.01 ± 0.06 |
| DDD | | 160 | 31 | 10.2 / Nd | Nd | Nd | 0.94 ± 0.08 |
| DED | | 150 | 33 | 10.8 / Nd | Nd | Nd | 0.9 ± 0.1 |
| EEE | | 140 | 36 | 12.4 / Nd | Nd | Nd | 0.9 ± 0.3 |
| HHH | | 130 | 38 | 19.8 / 19.8 | 1.21 ± 0.03 | 6.3 ± 1.1 | 1.01 ± 0.02 |
| IKW | | 130 | 38 | 20.6 / 20.6 | < 0.5 | 8.2 ± 3.5 | 1.0 ± 0.1 |
| RKR | | 120 | 42 | 20.0 / 20.0 | < 0.5 | 18.9 ± 7.1 | 0.97 ± 0.05 |
| RQR | | 120 | 42 | 19.3 / 19.3 | < 0.5 | 7.5 ± 1.5 | 0.97 ± 0.08 |
| YPISL | | 100 | 50 | 20.6 / 20.6 | < 0.5 | 11.1 ± 3.3 | 1.0 ± 0.1 |
| HHHHH | | 70 | 71 | 21.1 / 21.1 | < 0.5 | 4.0 ± 2.2 | 0.9 ± 0.2 |
| LLPHHADADY | | 50 | 100 | 20.2 / 20.2 | < 0.5 | 4.1 ± 1.5 | 1.0 ± 0.1 |
| **GGH** | Hydrolysat synthétique | 231 | 22 | 17.2 / 17.4 | 115 ± 1 | 82 ± 14 | 1.84 ± 0.01 |
| | | 23.1 | 220 | | 159 ± 8 | 38 ± 5 | 1.65 ± 0.05 |
| | | 2.31 | 2200 | | 125 ± 14 | 20 ± 7 | 1.0 ± 0.1 |
| | Hydrolysat caséique | 231 | 22 | 17.2 / 17.4 | 126 ± 3 | 85 ± 5 | 2.25 ± 0.05 |
| | | 23.1 | 220 | | 279 ± 3 | 56 ± 6 | 6.36 ± 0.21 |
| | | 2.31 | 2200 | | 281 ± 10 | 61 ± 20 | 10.46 ± 0.66 |

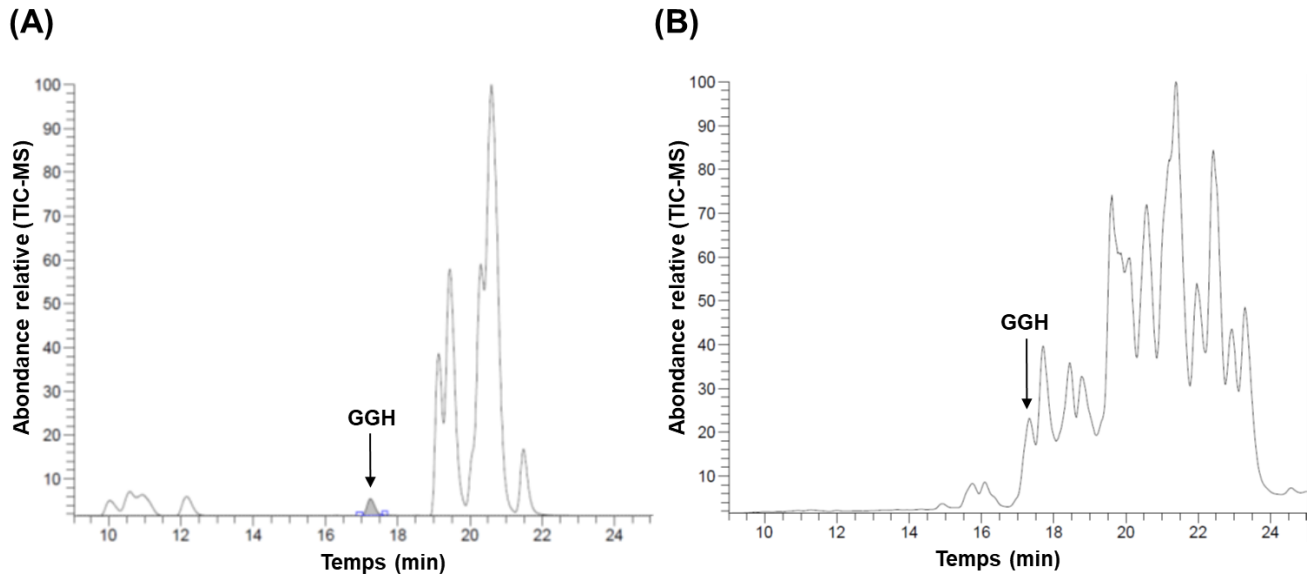



**Figure 68.** Courant ionique total (TIC-MS) mesuré par analyse IP-RPLC-ESI-HRMS (gradient long de 36 min) pour les deux hydrolysats enrichis en GGH à 77 $mg \cdot L^{-1}$. **(A)** Hydrolysat synthétique et **(B)** Hydrolysat trypsique de caséines.

### 4.3. Combinaison des facteurs ascendants et descendants

Comme vu précédemment, la détermination du RAC ne nécessite pas d'explorer les résultats d'un échantillon contrôle en absence de fer. Néanmoins, une autre approche intéressante pour cribler les peptides chélateurs d'ions métalliques consiste précisément à comparer le même échantillon, incubé et non incubé avec du fer(II). Un peptide chélateur de fer doit nécessairement fournir une augmentation du pic $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$, tandis que dans le même temps, le pic $[M+H]^+$ doit diminuer. Deux paramètres peuvent être calculés pour exprimer ces événements concomitants : le facteur ascendant et le facteur descendant.

Le facteur ascendant (Up factor) lié au complexe est exprimé comme le rapport des aires du pic chromatographique de l'ion $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ entre l'incubat et l'échantillon contrôle (**Équation 5**) :

$$\text{Up factor} = \frac{A_{\text{Complexe (incubat)}}}{A_{\text{Complexe (contrôle)}}} \qquad \textbf{Équation 5}$$

Dans les échantillons contrôles, aucun complexe ne doit être détecté du fait de l'absence de fer et l'aire de pic correspondante ($A_{\text{Complexe (contrôle)}}$) devrait être égale à zéro. Par conséquent, le RAC et le facteur d'augmentation ne devraient théoriquement pas être calculables. Cependant, dans les échantillons contrôles, un signal résiduel faible est souvent détecté (et automatiquement intégré par le logiciel MS) pour l'ion complexe au temps de rétention du peptide libre correspondant ± 0.2 min. Une hypothèse probable est que le fer(II) est libéré par des peptides faiblement chélateurs, échantillon après échantillon, maintenant ainsi un niveau d'ions métalliques à l'état de trace dans le système LC-MS. De ce fait, le facteur ascendant peut être calculé et sa valeur comparée au facteur de diminution correspondant.

Le facteur descendant (Down factor) est exprimé comme le rapport des surfaces du pic chromatographique de l'ion $[M+H]^+$ entre l'échantillon contrôle et l'incubat (**Équation 6**) :

$$\text{Down factor} = \frac{A_{\text{Peptide (contrôle)}}}{A_{\text{Peptide (incubat)}}} \qquad \textbf{Équation 6}$$

Dans cette approche, les deux facteurs augmentent simultanément en présence de peptides chélateurs du fer(II). En effet, pour une espèce chélatrice, l'apparition de l'ion $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ est corrélée à la disparition concomitante de $[M+H]^+$. C'est précisément ce qui a été observé dans le **Tableau 26** pour les peptides constituant l'hydrolysat synthétique. Même si certains d'entre eux présentent une légère augmentation de leur facteur ascendant, leur facteur descendant ne montre aucun changement significatif concernant l'aire de pic chromatographique de l'ion $[M+H]^+$ (down factor = 1). GGH est le seul peptide à montrer une augmentation simultanée de ces deux facteurs. Ainsi, même si les facteurs ascendant et descendant concernent des espèces ioniques différentes, avec des sensibilités de détection probablement inégales, ceux-ci peuvent être associés au RAC comme filtres pour le criblage ultérieur des peptides chélateurs du fer(II) par LC-ESI-HRMS.

### 4.4. Traitement de données *via* une stratégie de type métabolomique

La première partie du travail a montré la faisabilité technique d'un test de criblage pour mettre en évidence les peptides chélateurs du fer(II) par IP-RPLC-ESI-HRMS dans des hydrolysats. Premièrement, il a été possible de détecter par MS le complexe fer(II)-peptide avec un décalage systématique de + 53.919 u par rapport à l'ion du peptide libre. Deuxièmement, il a été observé qu'un peptide donné et son complexe de fer(II) associé montraient une différence de rétention en IP-RPLC inférieure à 0.2 min. Conjugués, ces deux paramètres mettent en évidence la formation d'un complexe de fer(II) sans toutefois fournir d'information sur l'efficacité de la complexation. Cet objectif peut être atteint par corrélation entre les deux facteurs ascendant et descendant, et le RAC après comparaison d'échantillons étudiés avec incubation ou non avec du fer(II). Néanmoins, dans un hydrolysat protéique, la grande quantité de données collectées représente un frein au traitement manuel des spectres de masse. Par conséquent, une approche de type métabolomique a été évaluée en vue d'un traitement automatisé des données IP-RPLC-ESI-HRMS. La **Figure 69** donne un aperçu du processus de sélection mis en œuvre.

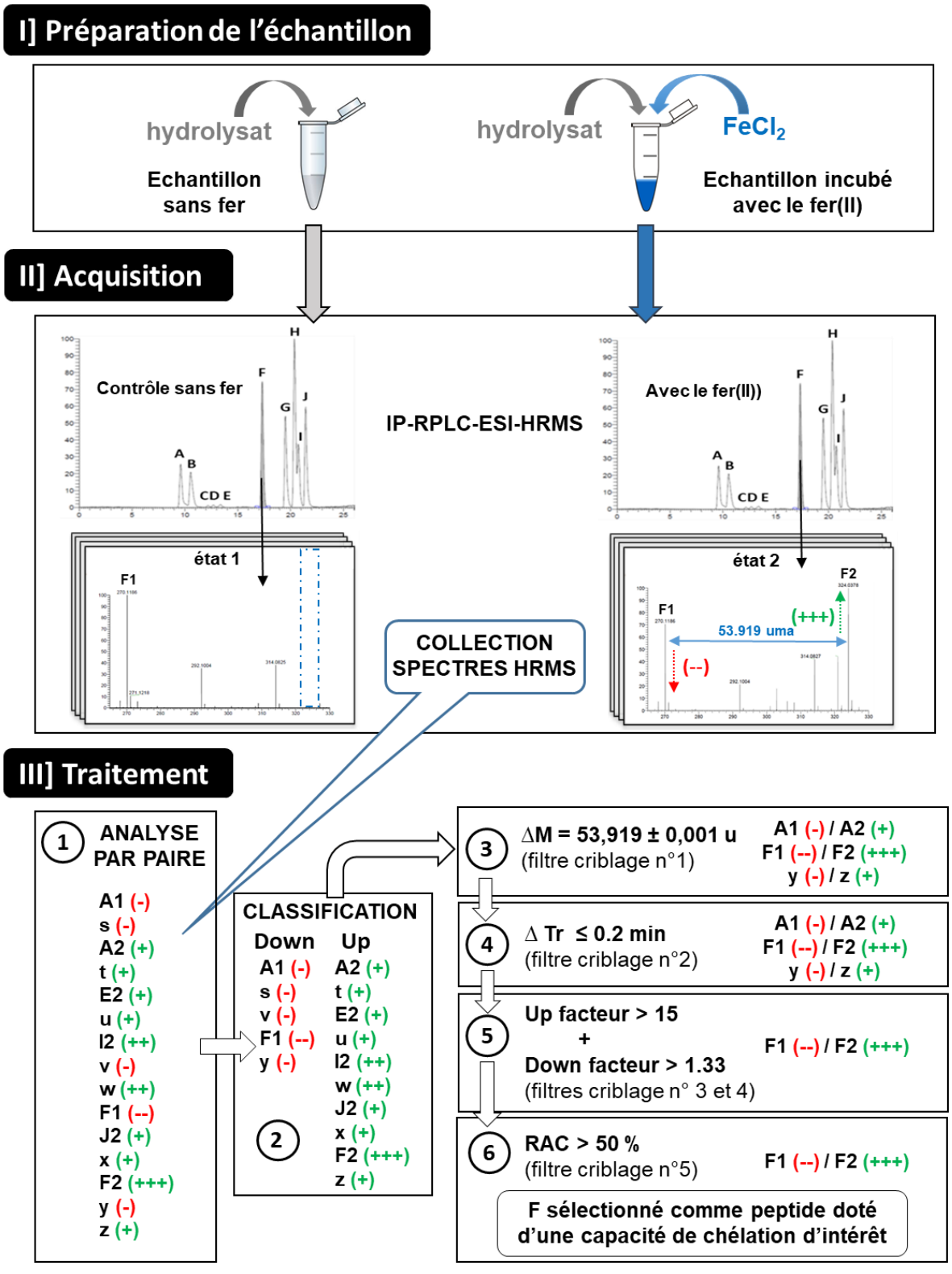



**Figure 69.** Vue d'ensemble du protocole combinant une analyse différentielle IP-RPLC-ESI-HRMS et un traitement de données de type métabolomique (analyse par paire) pour le criblage non ciblé de peptides fortement chélateurs du fer(II) dans un hydrolysat protéique. Propriétés chélatrices des peptides : les peptides B, C et D n'ont pas de capacité chélatrice, E et J sont des chélateurs faibles, A est un chélateur moyen et F est un chélateur fort. Les composés notés de s à z sont des impuretés potentielles.

La première étape du criblage (étape I) est la production des échantillons. L'hydrolysat est mis en contact avec le fer(II) (état 2 - incubat) pour comparaison ultérieure avec le même hydrolysat sans fer (état 1 - contrôle). Les deux échantillons sont injectés dans le système LC-ESI-HRMS (étape II). Deux séries de données indépendantes – consistant en des spectres de masse à haute résolution (HRMS) – sont collectées et soumises au processus automatisé (étape III). L'étape III comprend plusieurs étapes. Grâce au logiciel de métabolomique XCMS, dont le principe repose sur la détection des signaux selon leur degré de variation entre 2 conditions distinctes, une liste d'ions régulés à la hausse et à la baisse est extraite (étape III-①). Les ions régulés à la hausse sont ensuite séparés de ceux régulés à la baisse (grâce au logiciel MATLAB) de façon à constituer deux listes différentes (étape III-②). Les ions $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ sont attendus dans la liste des signaux régulés à la hausse (annotés du signe + sur la **Figure 69**), alors que les ions $[M+H]^+$ associés sont attendus dans la liste des signaux régulés à la baisse (annotés du signe – ). À ce stade et de manière facultative, les signaux régulés à la baisse (peptides potentiels) pour lesquels l'intensité d'aire ne répondrait pas au critère minimum fixé pour l'état 1 (contrôle) pourraient être éliminés. Dans la suite du traitement, plusieurs filtres sont successivement appliqués pour mettre en évidence les peptides chélateurs d'intérêt. Les deux premiers sont qualitatifs et concernent le décalage précis attendu de 53.919 ± 0,001 u (étape III-③) et une différence de rétention maximale inférieure à 0.2 min pour le peptide libre et son complexe de fer(II) (étape III-④). Le **Tableau 27** résume les résultats obtenus, à la suite de l'analyse métabolomique par paire, pour l'hydrolysat synthétique et l'hydrolysat caséique tous deux enrichis en GGH à 28.6 µM et 2.86 µM. Le nombre de signaux régulés à la baisse et à la hausse est conséquent dans les deux cas (étape III-①), ce qui est surprenant pour l'hydrolysat synthétique dont la matrice est assez simple. Cependant, en appliquant les deux premiers filtres qualitatifs (étape III-③ et ④), ce nombre diminue considérablement. En partant d'un peu moins de deux mille signaux, il n'en reste que 22 pour l'hydrolysat synthétique après application des filtres de masse et de rétention. Il en va de même pour l'hydrolysat caséique avec seulement un peu plus de 40 signaux restants. Comme attendu, les signaux correspondant à GGH et à son complexe de fer(II) font partie de ces dernières listes.

Des filtres quantitatifs sont ensuite appliqués pour discriminer les peptides fortement chélateurs grâce à la corrélation entre les facteurs ascendant (Up factor) et descendant (Down factor) (étape III-⑤) et la valeur RAC (étape III-⑥). Dans notre exemple, nous avons fixé un facteur ascendant minimal de 15 et un facteur descendant minimal de 1.3, ainsi qu'une valeur RAC de 50% au minimum (la surface chromatographique de l'ion $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ représentant dans ce cas au moins la moitié de la surface mesurée pour l'ion $[M+H]^+$). Cependant, chaque expérimentateur peut déplacer le curseur de chaque paramètre quantitatif en fonction de ses propres attentes (autrement dit sélectionner des chélateurs plus ou moins forts). Après la dernière étape, seuls deux signaux subsistent dans le cas de l'hydrolysat synthétique, et après un examen attentif, ceux-ci sont attribuables à GGH. En effet, le premier correspond au signal monoisotopique $[GGH+H]^+$ ( m/z 270.119) et le second correspond au deuxième pic isotopique de $[GGH+H]^+$ (m/z 271.122) en raison de l'abondance naturelle de $^{13}C$. Les mêmes tendances ont été observées pour l'hydrolysat de caséines enrichi en GGH (**Tableau 27**). Le peptide GGH est également ressorti comme chélateur d'intérêt sur la base du critère RAC, même à très faible concentration

(2.86 µM). L'hydrolysat caséique présente quelques signaux supplémentaires après l'application du dernier filtre, par comparaison avec l'hydrolysat synthétique. Ceux-ci indiquent la présence vraisemblable d'autres peptides chélateurs au sein de l'hydrolysat caséique (point discuté dans le paragraphe suivant).

Les filtres (1 à 5) sont détaillés pas à pas dans le **Tableau 27**, afin d'expliciter le cheminement du traitement des données. L'ensemble du processus pourrait évidemment être réalisé en une seule étape grâce à un tableau dynamique croisé.

**Tableau 27.** Résultats du traitement de données (présenté en **Figure 69**) appliqué pas à pas aux hydrolysats synthétique et caséique enrichis en GGH à 7.7 $mg \cdot L^{-1}$ (28.6 µM) et à 0.77 $mg \cdot L^{-1}$ (2.86 µM).

| Hydrolysat | $C_{GGH}$ ($mg \cdot L^{-1}$) | Nombre de caractéristiques significatives | Nombre de paires d'ions candidates retenues | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Analyse métabolomique par paire | Ecart de masse | Ecart de rétention | Up + down factors | RAC |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Synthétique | 7.7 | 1662 (354 d [a] + 1308 u [b]) | 36 (1)* | 22 | 7 | 2 |
| Caséique | 7.7 | 1885 (1071 d + 814 u) | 67 (23)* | 43 | 36 | 9 |
| | 0.77 | 1330 (578 d + 752 u) | 47 (43)* | 42 | 33 | 6 |

[a] d: caractéristiques significativement régulées à la baisse entre l'échantillon contrôle (sans fer) et l'échantillon incubé avec le fer(II)

[b] u: caractéristiques significativement régulées à la hausse entre l'échantillon contrôle (sans fer) et l'échantillon incubé avec le fer(II)

* classement du complexe fer(II)-GGH [324.0379] selon la valeur-p (test t de Welch), reposant sur la répétabilité de l'aire intégrée sur 3 tests

## 5. Application du criblage des peptides chélateurs de fer(II) à un hydrolysat trypsique de caséines

Durant la phase de développement, l'hydrolysat caséique a servi de matrice complexe pour le peptide chélateur modèle, afin de tester notre protocole dans des conditions réelles. À l'issu du criblage automatisé, le signal de GGH a émergé en même temps que d'autres signaux, ce qui a permis de valider cette approche. Les signaux non élucidés peuvent donc être exploités pour identifier des peptides chélateurs du fer(II) provenant spécifiquement de l'hydrolysat caséique.

Les six paires d'ions retenues dans le cas de l'hydrolysat caséique dopé avec GGH à 0.77 $mg \cdot L^{-1}$ (cf. **Tableau 27**) sont explicitées dans le **Tableau 28**.

**Tableau 28.** Paires d'ions sélectionnées de façon automatique à la suite du criblage IP-RPLC-HRMS réalisé sur l'hydrolysat caséique enrichi à 0.77 $mg \cdot L^{-1}$ en GGH (valeurs m/z corrigées par application du décalage en masse constaté pour GGH, soit - 0.018 u par rapport à la valeur expérimentale). Proposition de séquences pour les peptides chélateurs du fer(II).

| Paires d'ions retenues *via* XCMS [a] | | Intégration manuelle | | | | | Séquences proposées pour le peptide [g] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $[M+H]^+$ | $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ | Δ m/z [b] | Δ Tr [c] (min) | down factor [d] | up factor [e] | RAC [f] (%) | |
| 271.104 | 325.024 | 53.919 | +0.18 | 8.0 | infini | 190 | GGH |
| 438.216 | 492.136 | 53.919 | -0.05 | 1.3 | 26.0 | 51 | YQK |
| 289.143 | 343.063 | 53.919 | -0.08 | infini | infini | infini | RN / NR |
| 270.101 | 324.020 | 53.919 | +0.15 | 10.0 | 61.0 | 281 | GGH |
| 390.216 | 444.135 | 53.919 | -0.06 | 1.3 | 17.5 | 90 | GVSK |
| 391.220 | 445.139 | 53.919 | -0.04 | 1.3 | 26.4 | 78 | GVSK |

[a] logiciel métabolomique XCMS utilisé en mode d'analyse par paires (pairwise analysis)

[b] $\Delta\ m/z = (m/z)_{Complexe} - (m/z)_{Peptide}$

[c] $\Delta\ Tr = Tr_{Complexe} - Tr_{Peptide}$

[d] facteur de baisse du peptide entre l'échantillon contrôle sans fer et l'échantillon incubé avec le fer(II)

[e] facteur d'augmentation du complexe de fer(II) entre l'échantillon contrôle sans fer et l'échantillon incubé avec le fer(II)

[f] abondance ionique du complexe de fer(II) relativement au peptide, calculée pour l'échantillon incubé avec le fer(II)

[g] suite à la confrontation avec la liste exhaustive des fragments issus des protéines de caséine (beta, alpha S1, alpha S2, kappa)

Afin de vérifier la fiabilité de l'intégration automatique effectuée par le logiciel de métabolomique (XCMS), une intégration manuelle des pics du peptide et de son complexe de fer(II) a été réalisée (**Tableau 28**). Les résultats obtenus confirment que les critères de sélection qualitatifs (Δ m/z = 53.919 ± 0,001 u ; Δ Tr ≤ 0.2 min) et quantitatifs (down factor ≥ 1.3 ; up factor ≥ 15 ; RAC ≥ 50%) sont effectivement atteints. Pour l'une des paires d'ions (289.143-343.063), les facteurs descendant et ascendant tendent vers l'infini, en lien avec une disparition complète du peptide et une absence de complexe dans le contrôle sans fer (le logiciel XCMS réalisant une intégration systématique, y compris sur des pics chromatographiques légèrement supérieurs au bruit de fond, le calcul du up factor est rendu possible).

Après exclusion des deux signaux correspondant à GGH (270.101-324.020 et 271.104-325.024, cette dernière paire étant liée au 2e pic isotopique), seuls trois peptides restent finalement à identifier. En effet, deux autres paires d'ions sont également attribuables à un même peptide (390.216-444.135 et 391.220-445.139, cette dernière paire étant liée au 2e pic isotopique).

Par la suite, les masses exactes des 3 peptides inconnus ont été recherchées parmi l'ensemble des fragments théoriques issus des 4 protéines caséiques (beta, alpha S1, alpha S2 et kappa). À cette fin, un outil Excel simulant des fragmentations systématiques, acide aminé par acide aminé (*i.e.* sans règle de coupure), a été mis en œuvre avec les paramètres suivants : tolérance en masse de 5 ppm, un maximum de 10 résidus par peptide. Par ce biais, 4 séquences candidates ont pu être proposées : YQK (M = 437.216), RN ou NR (M = 288.143) et GVSK (M = 389.216) (**Tableau 28**). Après localisation de ces séquences au sein des protéines caséiques (cf. **Annexe 8**), une seule d'entre elles s'avère compatible avec le schéma de coupure de la trypsine (YQK). La production de l'hydrolysat datant de plus de 3 ans, la présence de petits peptides à l'état de traces pourrait être due à sa décomposition partielle.

En l'absence de résidus His dans leur séquence, ces peptides semblent peu adaptés pour complexer efficacement le fer(II), d'autant qu'une majorité des résidus présents sont classés comme des bases dures de Lewis (Lys, Tyr, Ser). Quoiqu'il en soit, une chélation tridentée est envisageable pour les trois candidats comportant un résidu avec une fonction amide sur la chaine latérale (Asn ou Gln, bases intermédiaires de Lewis) : *via* le $NH_2$ terminal, la fonction amide et le COOH terminal. Ces résultats préliminaires devront être complétés par une analyse par spectrométrie de masse en tandem afin de confirmer les séquences candidates, comme cela a été fait pour GGH (**Figure 70**).

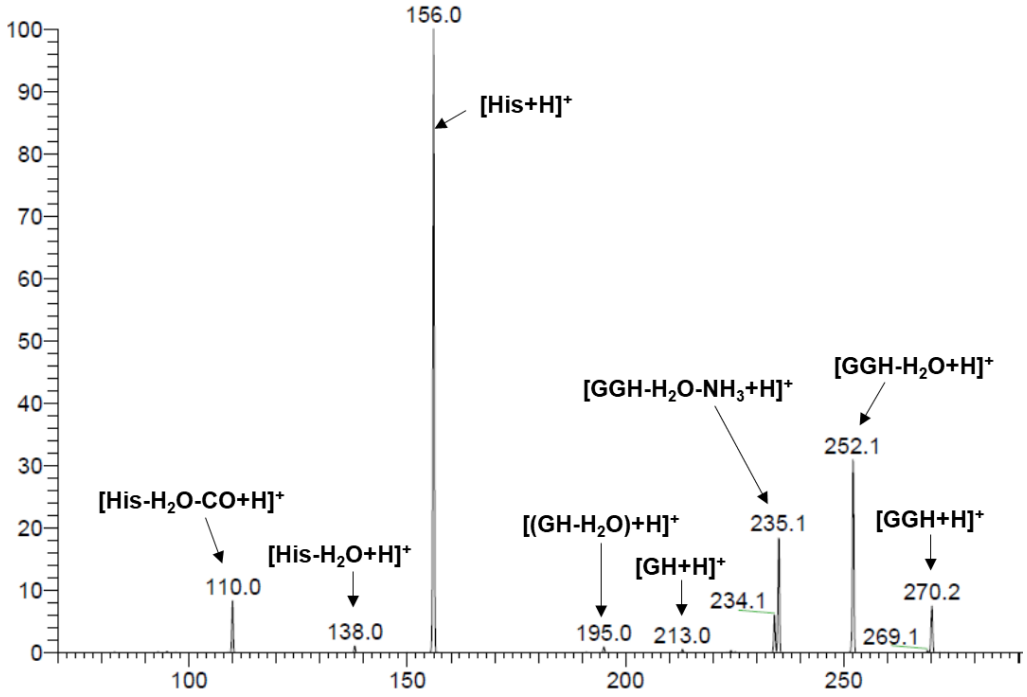



**Figure 70.** Spectre $MS^2$ acquis pour GGH sur une trappe ionique basse résolution ($LTQ^{TM}$).

## 6. Conclusion

Notre objectif était de mettre au point une méthode de criblage MS pour la détection directe des peptides chélateurs du fer(II) et du fer(III).

La stratégie reposant sur l'évaluation semi-quantitative d'un peptide et de son complexe de fer dans une solution d'incubation peptide + fer, la spectrométrie de masse a été choisie comme outil de criblage pour sa capacité à co-détecter les deux espèces d'intérêt. En complément, une étape IP-RPLC a été introduite avant la détection MS pour (i) discriminer les peptides isobares, (ii) retenir suffisamment les petits peptides hydrophiles et (iii) filtrer en théorie les complexes les plus forts au détriment des plus faibles. Par ailleurs, le suivi des espèces a été réalisé sur un analyseur haute résolution (HRMS) afin de procurer un niveau de performance adapté à la complexité d'un hydrolysat réel.

Le dispositif IP-RPLC-$ESI^+$-HRMS a d'abord été testé sur les ligands de référence desferrioxamine (DFO) et terpyridine (TERPY), ce qui a permis de montrer son applicabilité dans le cas de complexes extrêmement stables tels que fer(III)-DFO et fer(II)-TERPY. En effet, ceux-ci restent intacts lors de l'élution sur la colonne C18 et ne sont pas dénaturés par le processus d'ionisation $ESI^+$.

Après remplacement du TFA par du NFPA comme agent d'appariement d'ions, ce même protocole a été mis en œuvre sur une série de peptides de synthèse. Chacun d'eux a été conjointement analysé (i) en l'absence de fer, (ii) en présence d'ions ferreux et (iii) en présence d'ions ferriques, afin d'étudier la spéciation du fer selon son degré d'oxydation.

L'étude préliminaire par perfusion $ESI^+$-MS a permis de montrer que tous ces peptides, sans exception, forment un complexe ferreux en présence d'ions fer(II) et un complexe ferrique en présence d'ions fer(III). En environnement ferreux, le complexe $[(M-H)+Fe^{II}]^+$ est systématiquement observé quelle que soit la nature du peptide. En environnement ferrique, les peptides possédant un motif à 3 résidus acides successifs forment l'espèce trimérique ($[Fe^{III}_3(\mu_3\text{-}O)(M\text{-}3H)_2(M\text{-}H)(H_2O)_3]$), alors que l'espèce monomérique $[(M-2H)+Fe^{III}]^+$ est détectée dans tous les autres cas.

Comme attendu, l'insertion d'une étape chromatographique avant la détection par spectrométrie de masse fait émerger les complexes fer-peptide les plus stables. Ainsi, l'analyse LC-ESI-MS révèle que les di- et tripeptides avec une histamine ou une histidine en position C-terminale sont de bons chélateurs du fer(II). En effet, ces derniers conduisent à l'observation du complexe $[(M-H)+Fe^{II}]^+$ avec une abondance relative (RAC) supérieure à 10% comparativement au peptide libre. Quant aux incubats ferriques, seul le complexe trimérique $[Fe^{III}_3(\mu_3\text{-}O)(M\text{-}3H)_2(M\text{-}H)(H_2O)_3]$ s'avère suffisamment fort pour être détecté après l'élution chromatographique, et uniquement dans le cas des pentapeptides intégrant le motif particulier à 3 résidus acides successifs (*i.e.* FDDDA, FDDDK).

L'analyse IP-RPLC-$ESI^+$-HRMS des incubats ferreux ayant fait apparaitre comme règles générales (i) une différence de masse de 53.919 (± 0.001) u entre l'ion du peptide libre et celui

du complexe de fer associé, ainsi que (ii) une différence de rétention inférieure à 0.2 min entre ces deux espèces, un protocole a pu être envisagé pour le criblage non-ciblé des peptides chélateurs du fer(II) au sein d'un hydrolysat protéique.

Une étude différentielle de type métabolomique a été appliquée à l'échantillon analysé en absence (état 1) et en présence de fer (état 2), de manière à pointer les potentiels peptides chélateurs (*i.e.* les signaux diminuant de l'état 1 à l'état 2) et les potentiels complexes de fer(II) associés (*i.e.* les signaux augmentant de l'état 1 à l'état 2). Le protocole a été complété par des filtres qualitatifs ($\Delta$ m/z = 53.919 ± 0.001 u, $\Delta$ Tr < 0.2 min) pour extraire les paires d'ions candidates « peptide / complexe fer-peptide », puis par des filtres quantitatifs (valeurs seuils pour la diminution du peptide chélateur, l'augmentation du complexe et le RAC) pour mettre en lumière les peptides avec une capacité de chélation suffisante.

Ce protocole de criblage a été validé par identification de GGH, à la suite de l'analyse d'un hydrolysat protéique réel enrichi avec une faible concentration de ce peptide chélateur de référence ($C_{GGH}$ = 0.77 mg·L$^{-1}$). Enfin, l'application de ce protocole à un hydrolysat trypsique de caséines a fourni des résultats préliminaires, qui devront être confirmés par un séquençage $MS^2$ des peptides candidats.

# PARTIE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## 1. Conclusion

Face au besoin croissant de nouvelles molécules à visée thérapeutique ou nutraceutique, la valorisation des hydrolysats protéiques issus de déchets agroalimentaires ou d'agroressources est un enjeu stratégique. Pour que cette démarche soit économiquement viable, le criblage des peptides bioactifs contenus dans ces mélanges complexes doit être le plus efficace possible.

Dans le cas des peptides chélateurs de métaux, le criblage IMAC classique est plus performant que l'approche empirique. Cependant, sa mise en œuvre reste relativement complexe et n'est pas compatible avec un criblage à haut débit. De nouvelles approches sont donc nécessaires pour accélérer l'identification des peptides chélateurs de métaux.

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur les peptides chélateurs de fer pour leurs propriétés antioxydantes potentielles. Deux approches originales de criblage ont été testées : la première repose sur l'interaction du peptide avec des ions « fer » immobilisés (méthode IMAC-MS) et la seconde sur la détection MS du peptide libre et de son complexe de fer lors de l'analyse de l'incubat fer + peptide (méthode IP-RPLC-HRMS). Les formes ferrique et ferreuse étant toutes deux impliquées dans la formation intracellulaire des ROS (dont l'excès est responsable du stress oxydant), chacune des deux approches a été déclinée pour cribler d'une part les peptides chélateurs du fer(II), et d'autre part les peptides chélateurs du fer(III).

Dans un premier temps, nous présentons les conclusions concernant l'approche **IP-RPLC-HRMS**, cette dernière ayant permis l'avancée la plus significative.

**Dans le cas des peptides chélateurs du fer(II)**, l'approche IP-RPLC-HRMS a permis d'établir un protocole de criblage automatisé. En effet, l'analyse des incubats fer(II) + peptide a révélé deux paramètres invariants concernant le couple « peptide libre / complexe fer(II)-peptide » (*i.e.* $\Delta$ m/z et $\Delta$ Tr), pouvant être utilisés comme critères de sélection performants pour les peptides chélateurs. Un traitement différentiel de type métabolomique a d'abord été réalisé entre un échantillon analysé sans fer (état 1) et le même échantillon analysé en présence de fer (état 2), de manière à faire émerger les signaux diminuant de l'état 1 à l'état 2 (*i.e.* les potentiels peptides chélateurs) et ceux augmentant de l'état 1 à l'état 2 (*i.e.* les potentiels complexes de fer). Dans un deuxième temps, des filtres qualitatifs (*i.e.* $\Delta$ m/z et $\Delta$ Tr) ont été appliqués pour mettre en lumière les paires d'ions candidates « peptide / complexe fer(II)-peptide ». Enfin, des filtres quantitatifs ont permis de sélectionner les peptides présentant la meilleure capacité de chélation du fer(II).

Ce protocole IP-RPLC-HRMS a été validé en conditions réelles à l'aide d'un peptide chélateur de référence introduit à faible concentration dans un hydrolysat trypsique de caséines. Grâce à cette approche, il est donc envisageable de cribler et identifier à haut débit des peptides chélateurs du fer(II) dans un échantillon complexe.

Le **Tableau 29** compare ce protocole innovant avec les protocoles empirique et IMAC classique.

**Tableau 29.** Analyse critique des différentes approches de criblage.

| CRITERES | Protocole de criblage **EMPIRIQUE CLASSIQUE** | Protocole de criblage **IMAC CLASSIQUE** | Protocole de criblage **IP-RPLC-HRMS** |
|---|---|---|---|
| **Coût équipements de criblage** | + (UF, LC, HPLC: ≈ 100 kE) | + (LC, HPLC: ≈ 60 kE) | -- (LC-HRMS: > 300 kE ) |
| **Accessibilité équipements** | + (répandus) | + (répandus) | --- (encore peu répandu) |
| **Mise en œuvre** | --- (fractionnements multiples) | - (semi-empirique) | +++ (1 seule étape analytique) |
| **Durée totale** | --- (de l'ordre du mois) | - (de l'ordre de la semaine) | +++ (inférieure à la journée) |
| **Spécificité** | --- (aucune spécificité) | ++ (bonne spécificité) | +++ (spécificité élevée) |
| **Sensibilité** | - (détection peptides très concentrés ) | + (perte peptides peu concentrés) | +++ (pas de risque de perte) |
| **Efficacité** | --- (liste de peptides candidats) | +++ (liste de peptides chélateurs) | +++ (liste de peptides chélateurs ) |
| **Transposition purification** | +++ (transposition aisée) | ++ (fuite éventuelle des ions métalliques) | --- (non transposable) |
| **Surcoût séquençage** | --- (achat système MS/MS: ≈ 200 kE) | --- (achat système MS/MS: ≈ 200 kE ) | +++ (pas nécessaire si système hybride) |
| **Coût global équipements (criblage + séquençage)** | ≈ 300 kE | ≈ 300 kE | 300-500 kE |

Les objectifs initialement fixés sont atteints car le protocole IP-RPLC-HRMS est **(i) direct** avec une seule étape analytique pour criblage et séquençage (toutefois, si le signal du peptide d'intérêt est très peu intense, il ne sera pas sélectionné de manière automatique pour la fragmentation $MS^2$, ce qui nécessitera une relance), **(ii) rapide** avec une durée totale inférieure à la journée, **(iii) sensible** avec une limite de détection aux alentours de 1 $mg \cdot L^{-1}$ (par référence au tripeptide GGH), **(iv) robuste**, compte-tenu du fait que deux analyses de l'hydrolysat caséique espacées de plus d'un mois ont conduit à des listes de peptides candidats comparables et **(v) fiable**, puisque les motifs peptidiques fortement chélateurs sont en accord avec les mécanismes de complexation (di- et tripeptides avec Ha ou His en position C terminale). Par ailleurs, bien que le spectromètre de masse haute résolution soit un outil de criblage onéreux, le coût global intégrant criblage et séquençage est du même ordre de grandeur que pour les deux autres approches. Enfin, bien que cette nouvelle méthode ne soit pas transposable pour la purification, la connaissance de la séquence peptidique permettra d'orienter le procédé d'isolement.

**Dans le cas des peptides chélateurs du fer(III)**, les résultats obtenus par la méthode IP-RPLC-HRMS n'ont pas permis de mettre en place de façon simple un protocole de criblage automatisé. En effet, un nombre très restreint de peptides ont donné lieu à un complexe suffisamment fort pour être détecté (*i.e.* deux pentapeptides avec un motif à 3 résidus acides successifs), et il n'a donc pas été possible de définir de règles générales reliant le peptide libre à son complexe de fer(III). De plus, les deux complexes stables observés étant constitués de 3 unités peptidiques pour 3 atomes de fer (stœchiométrie 1:1), la différence de masse entre le peptide et son

complexe de fer(III) n'est pas prédictible, tout comme la différence de rétention entre ces deux espèces sur une phase chromatographique C18.

Dans un second temps, nous présentons les conclusions concernant l'approche **IMAC-MS**.

**Dans le cas des peptides chélateurs du fer(III)**, l'approche IMAC-MS devrait pouvoir être exploitée en vue d'un protocole de criblage automatisé. Comme démontré par diverses analyses physico-chimiques, la chromatographie IMAC-$Fe^{III}$ est fiable et robuste. En effet, les ions fer(III) sont immobilisés avec un excellent rendement (environ 70% de la capacité de charge théorique) et sont parfaitement stables au cours du temps. De plus, les phases mobiles volatiles contenant de l'acétate d'ammonium sont déjà couramment utilisées pour le fractionnement des phosphopeptides. Dans ces conditions, les phosphopeptides et peptides non phosphorylés avec des propriétés acides sont efficacement retenus. Un criblage manuel appliqué à un hydrolysat caséique a démontré le potentiel d'une démarche non-ciblée, grâce à un traitement différentiel des données HRMS acquises sur une colonne IMAC-$Fe^{III}$ et sur une colonne similaire non greffée en fer. Toutefois, cette approche n'est pas compatible avec les peptides de petite taille, y compris les tripeptides possédant un motif avec 3 résidus acides consécutifs. En effet, ceux-ci ne sont pas du tout retenus.

**Dans le cas des peptides chélateurs du fer(II)**, l'approche IMAC-MS n'est pas encore suffisamment optimisée pour un criblage fiable. En effet, la colonne IMAC-$Fe^{II}$ présente un faible niveau de fer immobilisé, de l'ordre de 10% de la capacité de charge théorique. Si les analyses comparatives menées lors de la phase de développement laissent supposer la nature ferreuse des ions immobilisés, ce point n'a pas pu être validé avec certitude par une méthode physico-chimique. De plus, les composés identifiés dans l'hydrolysat caséique comme de potentiels chélateurs du fer(II) ont montré un comportement inadapté en IMAC-$Fe^{III}$. Enfin, les peptides de petite taille possédant des motifs sélectionnés pour complexer le fer(II) ne montrent pas de rétention spécifique en IMAC-$Fe^{II}$.

## 2. Perspectives

**À court terme**, le protocole automatisé IP-RPLC-HRMS va être appliqué à divers hydrolysats protéiques pour cribler les peptides chélateurs du fer(II). Les filtres quantitatifs seront définis de manière à extraire les peptides possédant une excellente capacité de chélation. Un peptide d'intérêt trouvé en concentration importante au sein d'un hydrolysat apportera une vraie valeur ajoutée au coproduit protéique initial. Dans le cas où le peptide d'intérêt est présent en faible proportion dans le mélange complexe, il pourra être synthétisé par voie chimique, soit sous sa forme native, soit sous forme d'un analogue optimisé (voire d'un peptidomimétique). Dans ce cadre, on comprend l'intérêt de disposer d'une méthode de criblage extrêmement sensible. Les peptides identifiés à l'issu du protocole seront ensuite étudiés par pH-potentiométrie de manière à statuer sur leur capacité de complexation du fer(II).

**À moyen terme**, plusieurs pistes pourront être explorées dans le but de développer d'autres protocoles de criblage des peptides chélateurs de fer.

Un protocole IP-RPLC-HRMS est envisageable pour les peptides chélateurs du fer(III), selon une approche similaire à celle mise en place pour les peptides chélateurs du fer(II). Les peptides avec un motif à 3 résidus acides consécutifs (FDDDA, FDDDK, DDD, DED, EEE) forment un complexe trimérique de structure analogue, et celui-ci est suffisamment fort pour être détecté par IP-RPLC-HRMS dans le cas des deux pentapeptides FDDDA et FDDDK. L'étude d'un panel élargi de peptides connus comme étant de bons chélateurs du fer(III), et possédant des motifs autres que le motif à 3 résidus acides successifs, permettrait de statuer sur l'existence d'une structure unique pour les complexes fer(III)-peptide (*i.e.* la structure trimérique avec 3 atomes de fer).

Si cette hypothèse était confirmée, il serait possible par un calcul simple de remonter à la masse du peptide chélateur dès lors que le signal du complexe est détecté par le logiciel de métabolomique, à la suite du traitement différentiel appliqué sur l'échantillon analysé en présence et en absence de fer.

Dans le cas contraire, une autre approche serait toutefois envisageable. La diminution nette du signal d'un peptide entre l'échantillon seul et le même échantillon en présence de fer permettrait d'identifier aisément le peptide chélateur, sans qu'il soit nécessaire d'identifier le complexe ferrique correspondant. Cette démarche a été empiriquement validée en analysant l'hydrolysat trypsique de caséines sur une phase chromatographique C18 à l'aide d'un mélange eau/acétonitrile/TFA (résultats non présentés dans ce manuscrit). Ainsi, 4 phosphopeptides (identifiés comme les phosphopeptides n°1, n°2, n°3 et n°4 en **Annexe 4-1**) et 2 peptides non phosphorylés avec des propriétés acides (identifiés comme les peptides « acides » n°1 et n°2 en **Annexe 4-2**) ont effectivement montré une forte baisse de leur pic chromatographique en présence des ions fer(III). Pour le phosphopeptide n°1, le suivi UV à une longueur d'onde de 215 nm était même suffisamment évocateur pour constater la disparition quasi-complète de ce peptide.

Le profil isotopique des ions pourrait aussi être utilisé comme critère de sélection pour extraire les signaux attribuables aux complexes ferriques. Un paramétrage adéquat permettrait même de discriminer les complexes comprenant 1, 2 ou 3 atomes de fer.

Enfin, un agent d'appariement d'ions plus hydrophobe que le NFPA pourrait permettre d'obtenir une rétention voisine pour le peptide libre et son complexe de fer(III), ce qui faciliterait l'identification des couples « peptide / complexe fer(III)-peptide ».

Par ailleurs, un criblage automatisé des peptides chélateurs du fer(III) est raisonnablement envisageable par une approche IMAC-HRMS. L'analyse conjointe de l'échantillon sur IMAC-$Fe^{III}$ et sur une colonne similaire non chargée en fer permettrait de s'affranchir des interactions non-spécifiques avec les groupes IDA libres (*i.e.* non coordinés avec le fer sur la colonne IMAC-$Fe^{III}$). L'automatisation reposerait alors sur une analyse différentielle des données HRMS acquises sur les deux colonnes, grâce à un logiciel de métabolomique tel que XCMS. Dans ce cas, le traitement consisterait à identifier deux signaux identiques (m/z) d'aires

chromatographiques équivalentes, à des temps de rétention (Tr) différents. Cela se traduirait par la disparition d'un premier signal sur la colonne contrôle (au temps de rétention $Tr_1$) et l'apparition simultanée d'un deuxième signal sur la colonne IMAC-$Fe^{III}$ (au temps de rétention $Tr_2$, avec $Tr_2 > Tr_1$).

Enfin, le même type de protocole IMAC-HRMS pourrait théoriquement être mis en œuvre pour les peptides chélateurs du fer(II). Cependant, il faudra préalablement confirmer la nature ferreuse des ions immobilisés. La mise au point d'un test de spéciation du fer adapté à des solutions concentrées en EDTA est donc indispensable. Étant donné le faible niveau de chargement en fer de la colonne IMAC-$Fe^{II}$, l'efficacité de rétention devra aussi être validée par injection de peptides ou d'autres composés connus comme étant de bons complexants du fer(II). Quoiqu'il en soit, une approche automatisée IMAC-$Fe^{II}$-HRMS demanderait de réaliser systématiquement le contrôle IMAC-$Fe^{III}$-HRMS, en plus du contrôle sur la colonne non chargée en fer. En effet, cela permettrait de s'affranchir d'une oxydation éventuelle des ions ferreux en ions ferriques.

Pour conclure, des protocoles de criblage reposant sur des principes différents (IP-RPLC-HRMS et IMAC-HRMS) permettraient de disposer d'approches complémentaires pour identifier des peptides chélateurs de fer.

# LISTE DES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


[1] P. Bihouix et B. De Guillebon, *Quel futur pour les métaux?*, EDP Sciences. 2010.

[2] J. Silver, Éd., *Chemistry of Iron*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. doi: 10.1007/978-94-011-2140-8.

[3] T. Wu, C. Sun, et W. Ke, « Interpreting microbiologically assisted cracking with E e -pH diagrams », *Bioelectrochemistry*, vol. 120, p. 57-65, avr. 2018, doi: 10.1016/j.bioelechem.2017.11.007.

[4] M. Dubusc et Bianco, Pierre, « Le fer dans le milieu vivant », *Bulletin de l'Union des Physiciens*, n° 658, p. 195-203.

[5] J. I. Bullock et P. W. G. Simpson, « Effect of temperature on the protonation constants of 2,2':6',2"-terpyridyl and the stability constant of the bis(2,2':6',2"-terpyridyl)iron(II) cation », *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, vol. 77, n° 8, p. 1991-1997, janv. 1981, doi: 10.1039/F19817701991.

[6] H.-M. Huang, H.-B. Yang, X.-Y. Li, et F.-F. Ren, « Diammonium aqua-(ethyl-ene-diamine-tetra-acetato)iron(II) trihydrate », *Acta Cryst E*, vol. 65, n° 1, Art. n° 1, janv. 2009, doi: 10.1107/S1600536808042190.

[7] X. Solans, M. Font Altaba, et J. Garcia-Oricain, « Crystal structures of ethylenediaminetetraacetato metal complexes. V. Structures containing the [Fe(C10H12N2O8)(H2O)]− anion », *Acta Cryst C*, vol. 40, n° 4, Art. n° 4, avr. 1984, doi: 10.1107/S0108270184005151.

[8] Y. Mathieu, M. Miginiac-Maslow, et R. Remy, « Etude du role de la ferredoxine dans les transferts d'electrons et la photophosphorylation des chloroplastes d'epinard et de feve en aerobiose », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 205, n° 1, p. 95-101, avr. 1970, doi: 10.1016/0005-2728(70)90065-4.

[9] M. Miethke et M. A. Marahiel, « Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control », *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 71, n° 3, p. 413-451, sept. 2007, doi: 10.1128/MMBR.00012-07.

[10] A. G. Stewart, K. A. Hudson-Edwards, et W. E. Dubbin, « Effect of desferrioxamine B and Suwannee River fulvic acid on Fe(III) release and Cr(III) desorption from goethite », *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 178, p. 62-75, avr. 2016, doi: 10.1016/j.gca.2015.11.047.

[11] A. E. Martell et R. M. Smith, « Carboxylic Acids », in *Other Organic Ligands*, A. E. Martell et R. M. Smith, Éd. Boston, MA: Springer US, 1977, p. 1-171. doi: 10.1007/978-1-4757-1568-2_1.

[12] S. Omar, M. Feki, et N. Kaabachi, « Le métabolisme du fer: revue générale et récents développements (Iron metabolism, overview and recent insights) », *Ann Biol Clin*, vol. 64, n° 6, p. 523-34, 2006.

[13] D. Moussa, « Métabolisme du fer: implication de l'hepcidine dans ses pathologies », Université Mohammed-Souissi- Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat, 2013.

[14] O. Loréal, C. Pigeon, Y. Deugnier, et P. Brissot, « Métabolisme du fer (2000) », *Gastroenterol Clin Biol*, vol. 24, p. 56-61, 2000.

[15] E. Cadet, M. Gadenne, D. Capron, et J. Rochette, « Données récentes sur le métabolisme du fer : un état de transition », *La Revue de Médecine Interne*, vol. 26, n° 4, p. 315-324, avr. 2005, doi: 10.1016/j.revmed.2004.09.024.

[16] S. Narayanan *et al.*, « On the structure and chemistry of iron oxide cores in human heart and human spleen ferritins using graphene liquid cell electron microscopy », *Nanoscale*, vol. 11, n° 36, p. 16868-16878, 2019, doi: 10.1039/C9NR01541H.

[17] Y. Beguin, « Métabolisme du fer », *John Libbey Eurotext-Hématologie (symposium IUH)*, vol. 8, n° 1, mars 2002.

[18] O. Loréal, B. Courselaud, C. Pigeon, et P. Brissot, « Métabolisme du fer (2001) », *John Libbey Eurotext-Médecine thérapeutique (Revue Hémochromatose)*, vol. 7, n° 5, p. 340-345, mai 2001.
[19] O. Kakhlon et Z. I. Cabantchik, « The labile iron pool », *Free Radical Biol. Med.*, vol. 33, n° 8, p. 1037-1046, 2002.
[20] C. Beaumont, « Mécanismes moléculaires de l'homéostasie du fer », *médecine/sciences*, vol. 20, n° 1, p. 68-72, janv. 2004, doi: 10.1051/medsci/200420168.
[21] O. Loréal *et al.*, « Métabolisme du fer en 2012 », *Revue Francophone des Laboratoires*, vol. 2012, n° 442, p. 31-37, mai 2012, doi: 10.1016/S1773-035X(12)71455-7.
[22] C. Migdal et M. Serres, « Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant », *médecine/sciences*, vol. 27, n° 4, p. 405-412, avr. 2011, doi: 10.1051/medsci/2011274017.
[23] M. Patel et D. V. S. S. Ramavataram, « Non Transferrin Bound Iron: Nature, Manifestations and Analytical Approaches for Estimation », *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 27, n° 4, p. 322-332, oct. 2012, doi: 10.1007/s12291-012-0250-7.
[24] P. Bouizegarène, M.-P. Coulhon, J.-C. Deybach, D. Tchernitchko, et J. Lamoril, « Les hémochromatoses héréditaires », *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, vol. 21, n° 2, p. 65-78, avr. 2006, doi: 10.1016/j.immbio.2005.10.002.
[25] R. G. Pearson, « Hard and Soft Acids and Bases », *Surv. Prog. Chem.*, vol. 5, p. 1-51, 1969.
[26] R. G. Pearson, « Hard and soft acids and bases-The evolution of a chemical concept », *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 100, p. 403-425, 1990.
[27] R. Leuci, L. Brunetti, A. Laghezza, F. Loiodice, P. Tortorella, et L. Piemontese, « Importance of Biometals as Targets in Medicinal Chemistry: An Overview about the Role of Zinc (II) Chelating Agents », *Applied Sciences*, vol. 10, n° 12, p. 4118, juin 2020, doi: 10.3390/app10124118.
[28] I. Sóvágó et K. Ősz, « Metal ion selectivity of oligopeptides », *Dalton Trans.*, n° 32, p. 3841-3854, 2006, doi: 10.1039/B607515K.
[29] G. Wu, « Discovery and chemistry of amino acids (Chap. 1) », in *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition*, Boca Raton: CRC press, 2010, p. 1-32.
[30] I. Sóvágó, K. Várnagy, N. Lihi, et Á. Grenács, « Coordinating properties of peptides containing histidyl residues », *Coord. Chem. Rev.*, vol. 327-328, p. 43-54, nov. 2016, doi: 10.1016/j.ccr.2016.04.015.
[31] C. Harford et B. Sarkar, « Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties », *Acc. Chem. Res.*, vol. 30, n° 3, p. 123-130, mars 1997, doi: 10.1021/ar9501535.
[32] H. Sigel et R. B. Martin, « Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands », *Chem. Rev.*, vol. 82, n° 4, p. 385-426, août 1982, doi: 10.1021/cr00050a003.
[33] A. Jancsó, K. Selmeczi, P. Gizzi, N. V. Nagy, T. Gajda, et B. Henry, « The role of terminal amino group and histidine at the fourth position in the metal ion binding of oligopeptides revisited: Copper(II) and nickel(II) complexes of glycyl-glycyl-glycyl-histamine and its N-Boc protected derivative », *J. Inorg. Biochem.*, vol. 105, n° 1, p. 92-101, janv. 2011, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2010.09.004.
[34] M. Rowinska-Zyrek, D. Witkowska, S. Potocki, M. Remelli, et H. Kozlowski, « His-rich sequences – is plagiarism from nature a good idea? », *New J. Chem.*, vol. 37, n° 1, p. 58-70, 2013, doi: 10.1039/C2NJ40558J.
[35] Y. Lv, Q. Liu, X. Bao, W. Tang, B. Yang, et S. Guo, « Identification and Characteristics of Iron-Chelating Peptides from Soybean Protein Hydrolysates Using IMAC-$Fe^{3+}$ », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, n° 11, p. 4593-4597, juin 2009, doi: 10.1021/jf9000204.
[36] Y. Lv, X. Bao, H. Liu, J. Ren, et S. Guo, « Purification and characterization of caclium-binding soybean protein hydrolysates by Ca2+/Fe3+ immobilized metal affinity chromatography (IMAC) », *Food Chem.*, vol. 141, n° 3, p. 1645-1650, déc. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.113.

[37] O. Yamauchi, A. Odani, et M. Takani, « Metal–amino acid chemistry. Weak interactions and related functions of side chain groups », *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, n° 18, p. 3411-3421, 2002, doi: 10.1039/B202385G.
[38] V. B. Di Marco et G. G. Bombi, « Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in the study of metal–ligand solution equilibria », *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 25, n° 3, p. 347-379, mai 2006, doi: 10.1002/mas.20070.
[39] S. El Hajj *et al.*, « Application in Nutrition : Mineral-Binding (Chap. 19) », in *Biologically Active Peptides : from basic science to applications for human health*, F. Toldrá and J. Wu, Elsevier. [En ligne]. Disponible sur: https://www.elsevier.com/books/biologically-active-peptides/toldra/978-0-12-821389-6
[40] S. Aury, « Etude structurale et thermodynamique de la complexation de lanthanides (III) par des acides carboxyliques polyhydroxylés . », p. 381.
[41] H. Irving et R. J. P. Williams, « 637. The stability of transition-metal complexes », *J. Chem. Soc.*, n° 0, p. 3192-3210, janv. 1953, doi: 10.1039/JR9530003192.
[42] M. Lamshöft et B. Ivanova, « Protonation and coordination ability of small peptides – theoretical and experimental approaches for elucidation », *Journal of Coordination Chemistry*, vol. 64, n° 14, p. 2419-2442, juill. 2011, doi: 10.1080/00958972.2011.598926.
[43] W. Jiskoot et D. Crommelin, *Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals*, vol. 3. Springer Science and Business Media, 2005.
[44] C. Ho *et al.*, « Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications », *Clin Biochem Rev*, vol. 24, n° 1, p. 3-12, févr. 2003.
[45] M. J. Keith-Roach, « A review of recent trends in electrospray ionisation–mass spectrometry for the analysis of metal–organic ligand complexes », *Anal. Chim. Acta*, vol. 678, n° 2, p. 140-148, sept. 2010, doi: 10.1016/j.aca.2010.08.023.
[46] C. A. Schalley et P. B. Armentrout, Éd., *Modern mass spectrometry*. Berlin: Springer, 2003.
[47] P. Gizzi, B. Henry, P. Rubini, S. Giroux, et E. Wenger, « A multi-approach study of the interaction of the Cu(II) and Ni(II) ions with alanylglycylhistamine, a mimicking pseudopeptide of the serum albumine N-terminal residue », *J. Inorg. Biochem.*, vol. 99, n° 5, p. 1182-1192, mai 2005, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2005.02.018.
[48] M. Murariu, E. S. Dragan, et G. Drochioiu, « Model peptide-based system used for the investigation of metal ions binding to histidine-containing polypeptides », *Biopolymers*, vol. 93, n° 6, p. 497-508, 2010, doi: 10.1002/bip.21385.
[49] W. Wu, B. Li, H. Hou, H. Zhang, et X. Zhao, « Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode », *J. Funct. Foods*, vol. 35, p. 418-427, août 2017, doi: 10.1016/j.jff.2017.06.013.
[50] Y. Xuan, E. B. Scheuermann, A. R. Meda, H. Hayen, N. von Wirén, et G. Weber, « Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry », *J. Chromatogr. A*, vol. 1136, n° 1, p. 73-81, déc. 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.09.060.
[51] K. Połeć-Pawlak, R. Ruzik, et E. Lipiec, « Investigation of Cd(II), Pb(II) and Cu(I) complexation by glutathione and its component amino acids by ESI-MS and size exclusion chromatography coupled to ICP-MS and ESI-MS », *Talanta*, vol. 72, n° 4, p. 1564-1572, juin 2007, doi: 10.1016/j.talanta.2007.02.008.
[52] Q. Chen, L. Guo, F. Du, T. Chen, H. Hou, et B. Li, « The chelating peptide (GPAGPHGPPG) derived from Alaska pollock skin enhances calcium, zinc and iron transport in Caco-2 cells », *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 52, n° 5, p. 1283-1290, mai 2017, doi: 10.1111/ijfs.13396.
[53] H. Wu, Z. Liu, Y. Zhao, et M. Zeng, « Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (Engraulis japonicus) muscle protein », *Food Research International*, vol. 48, n° 2, p. 435-441, oct. 2012, doi: 10.1016/j.foodres.2012.04.013.

[54] L. de la Hoz, A. N. Ponezi, R. F. Milani, V. S. Nunes da Silva, A. Sonia de Souza, et M. T. Bertoldo-Pacheco, « Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides », *Food Chemistry*, vol. 142, p. 166-169, janv. 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.133.
[55] C. Torres-Fuentes, M. Alaiz, et J. Vioque, « Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides », *Food Chem.*, vol. 134, n° 3, p. 1585-1588, oct. 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.112.
[56] M. V. Chaud, C. Izumi, Z. Nahaal, T. Shuhama, M. de L. P. Bianchi, et O. de Freitas, « Iron Derivatives from Casein Hydrolysates as a Potential Source in the Treatment of Iron Deficiency », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, n° 4, p. 871-877, févr. 2002, doi: 10.1021/jf0111312.
[57] S. Bouhallab *et al.*, « Influence of Various Phosphopeptides of Caseins on Iron Absorption », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, n° 24, p. 7127-7130, nov. 2002, doi: 10.1021/jf025554v.
[58] N. Aît-oukhatar, S. Bouhallab, P. Arhan, J.-L. Maubois, M. Drosdowsky, et D. Bouglé, « Iron Tissue Storage and Hemoglobin Levels of Deficient Rats Repleted with Iron Bound to the Caseinophosphopeptide 1−25 of β-Casein », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, n° 7, p. 2786-2790, juill. 1999, doi: 10.1021/jf981018k.
[59] H.-M. Lin, S.-G. Deng, S.-B. Huang, Y.-J. Li, et R. Song, « The effect of ferrous-chelating hairtail peptides on iron deficiency and intestinal flora in rats: Anti-anemia activities of Fe(II)-FPH », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 96, n° 8, p. 2839-2844, juin 2016, doi: 10.1002/jsfa.7452.
[60] M. E. Caetano-Silva, M. T. Bertoldo-Pacheco, A. F. Paes-Leme, et F. M. Netto, « Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC–MS/MS », *Food Research International*, vol. 71, p. 132-139, mai 2015, doi: 10.1016/j.foodres.2015.01.008.
[61] L. Guo *et al.*, « Fractionation and identification of Alaska pollock skin collagen-derived mineral chelating peptides », *Food Chemistry*, vol. 173, p. 536-542, avr. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.055.
[62] L. Zhang, J. Li, et K. Zhou, « Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation », *Bioresource Technology*, vol. 101, n° 7, p. 2084-2089, avr. 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.078.
[63] Y. Lv, K. Wei, X. Meng, Y. Huang, T. Zhang, et Z. Li, « Separation and identification of iron-chelating peptides from defatted walnut flake by nanoLC-ESI–MS/MS and de novo sequencing », *Process Biochem.*, vol. 59, p. 223-228, août 2017, doi: 10.1016/j.procbio.2017.05.010.
[64] C. Wang, B. Li, et J. Ao, « Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn2+ and LC–MS/MS », *Food Chem.*, vol. 134, n° 2, p. 1231-1238, sept. 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.02.204.
[65] J. Carrasco-Castilla *et al.*, « Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates », *Food Chemistry*, vol. 135, n° 3, p. 1789-1795, déc. 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.016.
[66] S. Rivera-Mancía, I. Pérez-Neri, C. Ríos, L. Tristán-López, L. Rivera-Espinosa, et S. Montes, « The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases », *Chemico-Biological Interactions*, vol. 186, n° 2, p. 184-199, juill. 2010, doi: 10.1016/j.cbi.2010.04.010.
[67] M. Zarei, R. Ghanbari, N. Tajabadi, A. Abdul-Hamid, F. A. Bakar, et N. Saari, « Generation, Fractionation, and Characterization of Iron-Chelating Protein Hydrolysate from Palm Kernel Cake Proteins: Iron-chelating protein hydrolysate… », *Journal of Food Science*, vol. 81, n° 2, p. C341-C347, févr. 2016, doi: 10.1111/1750-3841.13200.
[68] S. Gallegos Tintoré *et al.*, « Antioxidant and Chelating Activity of Nontoxic *Jatropha curcas* L. Protein Hydrolysates Produced by *In Vitro* Digestion Using Pepsin and Pancreatin », *Journal of Chemistry*, vol. 2015, p. 1-9, 2015, doi: 10.1155/2015/190129.

[69] R. E. Cian, A. G. Garzón, D. B. Ancona, L. C. Guerrero, et S. R. Drago, « Chelating Properties of Peptides from Red Seaweed Pyropia columbina and Its Effect on Iron Bio-Accessibility », *Plant Foods for Human Nutrition*, vol. 71, n° 1, p. 96-101, mars 2016, doi: 10.1007/s11130-016-0533-x.

[70] C. Megías *et al.*, « Affinity Purification of Copper-Chelating Peptides from Sunflower Protein Hydrolysates », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, n° 16, p. 6509-6514, août 2007, doi: 10.1021/jf0712705.

[71] L.-S. Wang, J.-C. Huang, Y.-L. Chen, M. Huang, et G.-H. Zhou, « Identification and Characterization of Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Duck Meat », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, n° 13, p. 3437-3444, avr. 2015, doi: 10.1021/jf506120w.

[72] X. Li, X. Wang, D. Chen, et S. Chen, « Antioxidant Activity and Mechanism of Protocatechuic Acid in vitro », *FFHD*, vol. 1, n° 7, p. 232, juill. 2011, doi: 10.31989/ffhd.v1i7.127.

[73] C. Torres-Fuentes, M. Alaiz, et J. Vioque, « Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates », *Food Chem.*, vol. 129, n° 2, p. 485-490, nov. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.103.

[74] S. S. Kim, C.-B. Ahn, S. W. Moon, et J.-Y. Je, « Purification and antioxidant activities of peptides from sea squirt (Halocynthia roretzi) protein hydrolysates using pepsin hydrolysis », *Food Bioscience*, vol. 25, p. 128-133, oct. 2018, doi: 10.1016/j.fbio.2018.08.010.

[75] A. Jaiswal, R. Bajaj, B. Mann, et K. Lata, « Iron (II)-chelating activity of buffalo αS-casein hydrolysed by corolase PP, alcalase and flavourzyme », *Journal of Food Science and Technology*, nov. 2014, doi: 10.1007/s13197-014-1626-x.

[76] G. Csire, L. Canabady-Rochelle, M.-C. Averlant-Petit, K. Selmeczi, et L. Stefan, « Both metal-chelating and free radical-scavenging synthetic pentapeptides as efficient inhibitors of reactive oxygen species generation », *Metallomics*, 2020, doi: 10.1039/D0MT00103A.

[77] D. Blat, L. Weiner, M. B. H. Youdim, et M. Fridkin, « A Novel Iron-Chelating Derivative of the Neuroprotective Peptide NAPVSIPQ Shows Superior Antioxidant and Antineurodegenerative Capabilities », *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 51, n° 1, p. 126-134, janv. 2008, doi: 10.1021/jm070800l.

[78] A. Budimir, « Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy », *Acta Pharmaceutica*, vol. 61, n° 1, p. 1-14, janv. 2011, doi: 10.2478/v10007-011-0006-6.

[79] N. Lihi, M. Lukács, M. Raics, G. Szunyog, K. Várnagy, et C. Kállay, « The effect of carboxylate groups on the complexation of metal ion with oligopeptides – Potentiometric investigation », *Inorganica Chimica Acta*, vol. 472, p. 165-173, mars 2018, doi: 10.1016/j.ica.2017.07.032.

[80] D. A. D. Parry et J. M. Squire, *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers*. Gulf Professional Publishing, 2005.

[81] M. Walters, R. Esfandi, et A. Tsopmo, « Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption », *Foods*, vol. 7, n° 10, p. 172, oct. 2018, doi: 10.3390/foods7100172.

[82] E. C. Li-Chan, « Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients », *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 1, p. 28-37, févr. 2015, doi: 10.1016/j.cofs.2014.09.005.

[83] S. Chakrabarti, S. Guha, et K. Majumder, « Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities », *Nutrients*, vol. 10, n° 11, p. 1738, nov. 2018, doi: 10.3390/nu10111738.

[84] K. H. Sabeena Farvin *et al.*, « Antioxidant activity of Cod (Gadus morhua) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion », *Food Chemistry*, vol. 149, p. 326-334, avr. 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.03.075.

[85] L. Boudesocque, R. Kapel, C. Paris, P. Dhulster, I. Marc, et J.-H. Renault, « Concentration and selective fractionation of an antihypertensive peptide from an alfalfa white proteins hydrolysate by mixed ion-exchange centrifugal partition chromatography », *Journal of Chromatography B*, vol. 905, p. 23-30, sept. 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.07.034.

[86] R. Vilcacundo, C. Martínez-Villaluenga, et B. Hernández-Ledesma, « Release of dipeptidyl peptidase IV, α-amylase and α-glucosidase inhibitory peptides from quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion », *Journal of Functional Foods*, vol. 35, p. 531-539, août 2017, doi: 10.1016/j.jff.2017.06.024.
[87] S. Mäkinen, T. Streng, L. B. Larsen, A. Laine, et A. Pihlanto, « Angiotensin I-converting enzyme inhibitory and antihypertensive properties of potato and rapeseed protein-derived peptides », *Journal of Functional Foods*, vol. 25, p. 160-173, août 2016, doi: 10.1016/j.jff.2016.05.016.
[88] S. J. Rayaprolu *et al.*, « Purification and characterization of a peptide from soybean with cancer cell proliferation inhibition: RAYAPROLU et al. », *Journal of Food Biochemistry*, vol. 41, n° 4, p. e12374, août 2017, doi: 10.1111/jfbc.12374.
[89] D. Åsberg *et al.*, « The importance of ion-pairing in peptide purification by reversed-phase liquid chromatography », *Journal of Chromatography A*, vol. 1496, p. 80-91, mai 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.03.041.
[90] H. Agrawal, R. Joshi, et M. Gupta, « Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (Pennisetum glaucum) protein hydrolysate », *Food Chemistry*, vol. 204, p. 365-372, août 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.127.
[91] P. A. Harnedy, M. B. O'Keeffe, et R. J. FitzGerald, « Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga Palmaria palmata », *Food Chemistry*, vol. 172, p. 400-406, avr. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.083.
[92] A. Connolly, M. B. O'Keeffe, C. O. Piggott, A. B. Nongonierma, et R. J. FitzGerald, « Generation and identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from a brewers' spent grain protein isolate », *Food Chemistry*, vol. 176, p. 64-71, juin 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.12.027.
[93] X. Wang, H. Chen, X. Fu, S. Li, et J. Wei, « A novel antioxidant and ACE inhibitory peptide from rice bran protein: Biochemical characterization and molecular docking study », *LWT*, vol. 75, p. 93-99, janv. 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.047.
[94] H. Agrawal, R. Joshi, et M. Gupta, « Isolation and characterisation of enzymatic hydrolysed peptides with antioxidant activities from green tender sorghum », *LWT*, vol. 84, p. 608-616, oct. 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2017.06.036.
[95] L. You, M. Zhao, J. M. Regenstein, et J. Ren, « Purification and identification of antioxidative peptides from loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry », *Food Research International*, vol. 43, n° 4, p. 1167-1173, mai 2010, doi: 10.1016/j.foodres.2010.02.009.
[96] W. Liu *et al.*, « Isolation and identification of antioxidative peptides from pilot-scale black-bone silky fowl ( *Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle oligopeptides: Antioxidative peptides from Gallus *gallus domesticus* Brisson muscle oligopeptides », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 93, n° 11, p. 2782-2788, août 2013, doi: 10.1002/jsfa.6099.
[97] C. Harscoat-Schiavo *et al.*, « Hydrophilic properties as a new contribution for computer-aided identification of short peptides in complex mixtures », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 403, n° 7, p. 1939-1949, juin 2012, doi: 10.1007/s00216-012-5987-6.
[98] S. Le Maux, A. B. Nongonierma, et R. J. FitzGerald, « Improved short peptide identification using HILIC–MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence », *Food Chemistry*, vol. 173, p. 847-854, avr. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.10.104.
[99] R. Vásquez-Villanueva, M. L. Marina, et M. C. García, « Identification by hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry of peptides with antioxidant capacity in food residues », *Journal of Chromatography A*, vol. 1428, p. 185-192, janv. 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2015.07.032.
[100] R. Zenezini Chiozzi, A. L. Capriotti, C. Cavaliere, G. La Barbera, S. Piovesana, et A. Laganà, « Identification of three novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived from cauliflower by-products by multidimensional liquid chromatography and

bioinformatics », *Journal of Functional Foods*, vol. 27, p. 262-273, déc. 2016, doi: 10.1016/j.jff.2016.09.010.
[101] C. T. Mant et R. S. Hodges, « Mixed-mode hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography (HILIC/CEX) of peptides and proteins », *Journal of Separation Science*, vol. 31, n° 15, p. 2754-2773, août 2008, doi: 10.1002/jssc.200800243.
[102] P. J. Boersema, N. Divecha, A. J. R. Heck, et S. Mohammed, « Evaluation and Optimization of ZIC-HILIC-RP as an Alternative MudPIT Strategy », *Journal of Proteome Research*, vol. 6, n° 3, p. 937-946, mars 2007, doi: 10.1021/pr060589m.
[103] A. Saiga, S. Tanabe, et T. Nishimura, « Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, n° 12, p. 3661-3667, juin 2003, doi: 10.1021/jf021156g.
[104] N. Charoenphun, B. Cheirsilp, N. Sirinupong, et W. Youravong, « Calcium-binding peptides derived from tilapia (Oreochromis niloticus) protein hydrolysate », *Eur Food Res Technol*, vol. 236, n° 1, p. 57-63, janv. 2013, doi: 10.1007/s00217-012-1860-2.
[105] S. Piovesana *et al.*, « Recent trends and analytical challenges in plant bioactive peptide separation, identification and validation », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 410, n° 15, p. 3425-3444, juin 2018, doi: 10.1007/s00216-018-0852-x.
[106] V. S Vallabha et P. K. Tiku, « Antihypertensive Peptides Derived from Soy Protein by Fermentation », *Int J Pept Res Ther*, vol. 20, n° 2, p. 161-168, juin 2014, doi: 10.1007/s10989-013-9377-5.
[107] T. Furuta, Y. Miyabe, H. Yasui, Y. Kinoshita, et H. Kishimura, « Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Phycobiliproteins of Dulse Palmaria palmata », *Marine Drugs*, vol. 14, n° 2, Art. n° 2, févr. 2016, doi: 10.3390/md14020032.
[108] B. P. Singh et S. Vij, « Growth and bioactive peptides production potential of Lactobacillus plantarum strain C2 in soy milk: A LC-MS/MS based revelation for peptides biofunctionality », *LWT*, vol. 86, p. 293-301, déc. 2017, doi: 10.1016/j.lwt.2017.08.013.
[109] T. Sornwatana, K. Bangphoomi, S. Roytrakul, N. Wetprasit, K. Choowongkomon, et S. Ratanapo, « Chebulin: Terminalia chebula Retz. fruit-derived peptide with angiotensin-I–converting enzyme inhibitory activity », *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 62, n° 6, p. 746-753, 2015, doi: https://doi.org/10.1002/bab.1321.
[110] Q.-J. Yan, L.-H. Huang, Q. Sun, Z.-Q. Jiang, et X. Wu, « Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases », *Food Chemistry*, vol. 179, p. 290-295, juill. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.01.137.
[111] R. Soares, S. Mendonça, L. Í. de Castro, A. Menezes, et J. Arêas, « Major Peptides from Amaranth (Amaranthus cruentus) Protein Inhibit HMG-CoA Reductase Activity », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, n° 2, p. 4150-4160, févr. 2015, doi: 10.3390/ijms16024150.
[112] A. Waglay et S. Karboune, « Enzymatic generation of peptides from potato proteins by selected proteases and characterization of their structural properties », *Biotechnology Progress*, vol. 32, n° 2, p. 420-429, mars 2016, doi: 10.1002/btpr.2245.
[113] H. Ghorab, C. Lammi, A. Arnoldi, Z. Kabouche, et G. Aiello, « Proteomic analysis of sweet algerian apricot kernels (Prunus armeniaca L.) by combinatorial peptide ligand libraries and LC–MS/MS », *Food Chemistry*, vol. 239, p. 935-945, janv. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.054.
[114] M. Zhang et T.-H. Mu, « Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase under high hydrostatic pressure », *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 43, p. 92-101, oct. 2017, doi: 10.1016/j.ifset.2017.08.001.
[115] A. L. Capriotti *et al.*, « Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins », *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 44, p. 205-213, déc. 2015, doi: 10.1016/j.jfca.2015.08.007.

[116] B. L. White, T. H. Sanders, et J. P. Davis, « Potential ACE-inhibitory activity and nanoLC-MS/MS sequencing of peptides derived from aflatoxin contaminated peanut meal », *LWT - Food Science and Technology*, vol. 56, n° 2, p. 537-542, mai 2014, doi: 10.1016/j.lwt.2013.11.039.
[117] A. Jakubczyk, M. Karaś, U. Złotek, et U. Szymanowska, « Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (Phaseolus vulgaris L.) seeds », *Food Research International*, vol. 100, p. 489-496, oct. 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.07.046.
[118] J. K. Diedrich, A. F. M. Pinto, et J. R. Yates, « Energy dependence of HCD on peptide fragmentation: Stepped collisional energy finds the sweet spot », *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 24, n° 11, nov. 2013, doi: 10.1007/s13361-013-0709-7.
[119] R. Bruni, « Solving peptide sequencing as satisfiability », *Computers & Mathematics with Applications*, vol. 55, n° 5, p. 912-923, mars 2008, doi: 10.1016/j.camwa.2006.12.094.
[120] N. Shenar, N. Sommerer, J. Martinez, et C. Enjalbal, « Comparison of LID versus CID activation modes in tandem mass spectrometry of peptides », *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 44, n° 5, p. 621-632, 2009, doi: https://doi.org/10.1002/jms.1535.
[121] A. Guthals, K. R. Clauser, A. M. Frank, et N. Bandeira, « Sequencing-Grade De novo Analysis of MS/MS Triplets (CID/HCD/ETD) From Overlapping Peptides », *J Proteome Res*, vol. 12, n° 6, p. 2846-2857, juin 2013, doi: 10.1021/pr400173d.
[122] Y. Yan, A. J. Kusalik, et F.-X. Wu, « NovoExD: De novo Peptide Sequencing for ETD/ECD Spectra », *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*, vol. 14, n° 2, p. 337-344, avr. 2017, doi: 10.1109/TCBB.2015.2389813.
[123] A. M. Frank, M. M. Savitski, M. N. Nielsen, R. A. Zubarev, et P. A. Pevzner, « De Novo Peptide Sequencing and Identification with Precision Mass Spectrometry », *J Proteome Res*, vol. 6, n° 1, p. 114-123, janv. 2007, doi: 10.1021/pr060271u.
[124] B. Spengler, « De novo sequencing, peptide composition analysis, and composition-based sequencing: A new strategy employing accurate mass determination by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry », *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 15, n° 5, p. 703-714, mai 2004, doi: 10.1016/j.jasms.2004.01.007.
[125] S. H. Kim, J. Y. Lee, M. P. Balolong, J.-E. Kim, H.-D. Paik, et D.-K. Kang, « Identification and Characterization of a Novel Antioxidant Peptide from Bovine Skim Milk Fermented by Lactococcus lactis SL6 », *Food Sci. Anim. Resour.*, vol. 37, n° 3, p. 402-409, juin 2017, doi: 10.5851/kosfa.2017.37.3.402.
[126] J. Porath, « High-performance immobilized-metal-ion affinity chromatography of peptides and proteins », *J. Chromatogr. A*, vol. 443, p. 3-11, juin 1988, doi: 10.1016/S0021-9673(00)94778-2.
[127] Y. Nakagawa, T.-T. Yip, M. Belew, et J. Porath, « High-performance immobilized metal ion affinity chromatography of peptides: Analytical separation of biologically active synthetic peptides », *Analytical Biochemistry*, vol. 168, n° 1, p. 75-81, janv. 1988, doi: 10.1016/0003-2697(88)90012-7.
[128] L. M. Nuwaysir et J. T. Stults, « Electrospray ionization mass spectrometry of phosphopeptides isolated by on-line immobilized metal-ion affinity chromatography », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 4, n° 8, p. 662-669, août 1993, doi: 10.1016/1044-0305(93)85031-R.
[129] Y. Hu, S. Guo, X. Li, et X. Ren, « Comparative analysis of salt-responsive phosphoproteins in maize leaves using $Ti^{4+}$ -IMAC enrichment and ESI-Q-TOFMS: Proteomics and 2DE », *ELECTROPHORESIS*, vol. 34, n° 4, p. 485-492, févr. 2013, doi: 10.1002/elps.201200381.
[130] J. Wang, Y. Zhang, H. Jiang, Y. Cai, et X. Qian, « Phosphopeptide detection using automated online IMAC-capillary LC-ESI-MS/MS », *PROTEOMICS*, vol. 6, n° 2, p. 404-411, janv. 2006, doi: 10.1002/pmic.200500223.
[131] K. Moser et F. M. White, « Phosphoproteomic Analysis of Rat Liver by High Capacity IMAC and LC−MS/MS », *Journal of Proteome Research*, vol. 5, n° 1, p. 98-104, janv. 2006, doi: 10.1021/pr0503073.

[132] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, et G. Belfrage, « Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation », *Nature*, vol. 258, n° 5536, p. 598-599, déc. 1975, doi: 10.1038/258598a0.
[133] G. K. Bonn, K. Kalghatgi, W. C. Horne, et Cs. Horváth, « Rapid metal-interaction chromatography of proteins and peptides on micropellicular sorbents », *Chromatographia*, vol. 30, n° 9-10, p. 484-488, nov. 1990, doi: 10.1007/BF02269792.
[134] P. Burba, B. Jakubowski, R. Kuckuk, K. Küllmer, et K. G. Heumann, « Characterization of aquatic humic substances and their metal complexes by immobilized metal-chelate affinity chromatography on iron(III)-loaded ion exchangers », *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, vol. 368, n° 7, p. 689-696, nov. 2000, doi: 10.1007/s002160000565.
[135] C. A. Rodrigues, F. Reynaud, E. Stadler, et V. Drago, « Preparation, characterization, and chromatography properties of chitin modified with $FeCl_3$ », *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 22, n° 5, p. 761-769, janv. 1999, doi: 10.1081/JLC-100101697.
[136] L. C. L. de Aquino, H. R. T. de Sousa, E. A. Miranda, L. Vilela, et S. M. A. Bueno, « Evaluation of IDA-PEVA hollow fiber membrane metal ion affinity chromatography for purification of a histidine-tagged human proinsulin », *Journal of Chromatography B*, vol. 834, n° 1-2, p. 68-76, avr. 2006, doi: 10.1016/j.jchromb.2006.02.015.
[137] L. Ortiz-Martin, F. Benavente, S. Medina-Casanellas, E. Giménez, et V. Sanz-Nebot, « Study of immobilized metal affinity chromatography sorbents for the analysis of peptides by on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry: CE and CEC », *ELECTROPHORESIS*, vol. 36, n° 6, p. 962-970, mars 2015, doi: 10.1002/elps.201400374.
[138] B. Ruprecht, H. Koch, G. Medard, M. Mundt, B. Kuster, et S. Lemeer, « Comprehensive and Reproducible Phosphopeptide Enrichment Using Iron Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (Fe-IMAC) Columns », *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 14, n° 1, p. 205-215, janv. 2015, doi: 10.1074/mcp.M114.043109.
[139] L. Barron, M. O'Toole, D. Diamond, P. N. Nesterenko, et B. Paull, « Separation of transition metals on a poly-iminodiacetic acid grafted polymeric resin column with post-column reaction detection utilising a paired emitter–detector diode system », *Journal of Chromatography A*, vol. 1213, n° 1, p. 31-36, déc. 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2008.08.049.
[140] L. Guo, H. Hou, B. Li, Z. Zhang, S. Wang, et X. Zhao, « Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin », *Process Biochem.*, vol. 48, n° 5-6, p. 988-993, juin 2013, doi: 10.1016/j.procbio.2013.04.013.
[141] S. Biswas, A. Sarkar, et R. Misra, « Iron affinity gel and gallium immobilized metal affinity chromatographic technique for phosphopeptide enrichment: a comparative study », *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, vol. 31, n° 3, p. 639-646, mai 2017, doi: 10.1080/13102818.2017.1293492.
[142] J. G. Abelin *et al.*, « Complementary IMAC enrichment methods for HLA-associated phosphopeptide identification by mass spectrometry », *Nature Protocols*, vol. 10, n° 9, p. 1308-1318, août 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.086.
[143] W. P. Michalski, « Resolution of three forms of superoxide dismutase by immobilised metal affinity chromatography », *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 576, n° 2, p. 340-345, mai 1992, doi: 10.1016/0378-4347(92)80209-9.
[144] A. R. S. Ross, M. G. Ikonomou, et K. J. Orians, « Characterization of copper-complexing ligands in seawater using immobilized copper(II)-ion affinity chromatography and electrospray ionization mass spectrometry », *Marine Chemistry*, vol. 83, n° 1-2, p. 47-58, oct. 2003, doi: 10.1016/S0304-4203(03)00095-1.
[145] J. Gu et R. Codd, « The resolution of two clinical agents, bleomycin and desferrioxamine B, from a Streptomyces verticillus fermentation mixture using multi-dimensional immobilised metal ion affinity chromatography », *RSC Advances*, vol. 5, n° 5, p. 3443-3453, 2015, doi: 10.1039/C4RA09315A.
[146] A. V. C. Simionato, M. E. Silva-Stenico, S. M. Tsai, et E. Carrilho, « Evidences of siderophores synthesis by Grapevine Xylella fastidiosa, causal agent of pierce's disease, through

instrumental approaches », *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 21, n° 4, p. 635-641, 2010, doi: 10.1590/S0103-50532010000400008.
[147] G. L. Pavan, I. T. L. Bresolin, M. Borsoi-Ribeiro, M. Vijayalakshmi, et S. M. A. Bueno, « The effect of NaCl on the adsorption of human IgG onto CM-Asp–PEVA hollow fiber membrane-immobilized nickel and cobalt metal ions », *Adsorption*, vol. 20, n° 5-6, p. 677-688, août 2014, doi: 10.1007/s10450-014-9612-1.
[148] V. Gladilovich *et al.*, « Immobilized metal affinity chromatography on collapsed Langmuir-Blodgett iron(III) stearate films and iron(III) oxide nanoparticles for bottom-up phosphoproteomics », *Journal of Chromatography A*, vol. 1443, p. 181-190, avr. 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.03.044.
[149] J. J. Winzerling, P. Berna, et J. Porath, « How to use immobilized metal ion affinity chromatography », *Methods*, vol. 4, n° 1, p. 4-13, janv. 1992, doi: 10.1016/1046-2023(92)90052-A.
[150] L. D. Holmes et M. R. Schiller, « Immobilized Iron(III) Metal Affinity Chromatography for the Separation of Phosphorylated Macromolecules: Ligands and Applications », *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 20, n° 1, p. 123-142, janv. 1997, doi: 10.1080/10826079708010641.
[151] S. Li et C. Dass, « Iron(III)-Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography and Mass Spectrometry for the Purification and Characterization of Synthetic Phosphopeptides », *Analytical Biochemistry*, vol. 270, n° 1, p. 9-14, mai 1999, doi: 10.1006/abio.1999.4060.
[152] N. Ejje, C. Z. Soe, J. Gu, et R. Codd, « The variable hydroxamic acid siderophore metabolome of the marine actinomycete Salinispora tropica CNB-440 », *Metallomics*, vol. 5, n° 11, p. 1519, 2013, doi: 10.1039/c3mt00230f.
[153] N. Braich et R. Codd, « Immobilised metal affinity chromatography for the capture of hydroxamate-containing siderophores and other Fe(iii)-binding metabolites directly from bacterial culture supernatants », *The Analyst*, vol. 133, n° 7, p. 877, 2008, doi: 10.1039/b802355g.
[154] I. R. A. P. Bresolin, I. T. L. Bresolin, et A. Pessoa, « Purification of Anti-Interleukin-6 Monoclonal Antibody Using Precipitation and Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography », *Adsorption Science & Technology*, vol. 33, n° 2, p. 191-202, févr. 2015, doi: 10.1260/0263-6174.33.2.191.
[155] P. Hansen et G. Lindeberg, « Purification of tryptophan containing synthetic peptides by selective binding of the a-amino group to immobilised metal ions », p. 7, 1994.
[156] J. Lee *et al.*, « Mitochondrial Phosphoproteome Revealed by an Improved IMAC Method and MS/MS/MS*□S », p. 8, 2007.
[157] L. Sun *et al.*, « Separation and Characterization of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Saurida elongata Proteins Hydrolysate by IMAC-Ni2+ », *Marine Drugs*, vol. 15, n° 2, p. 29, févr. 2017, doi: 10.3390/md15020029.
[158] S. Wu, X. Feng, Y. Lu, Y. Lu, S. Liu, et Y. Tian, « Purification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from casein hydrolysate by IMAC-Ni2+ », *Amino Acids*, vol. 49, n° 10, p. 1787-1791, oct. 2017, doi: 10.1007/s00726-017-2475-5.
[159] N. Duhita, K. Hiwasa-Tanase, S. Yoshida, et H. Ezura, « Single-Step Purification of Native Miraculin Using Immobilized Metal-Affinity Chromatography », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, n° 12, p. 5148-5151, juin 2009, doi: 10.1021/jf9004065.
[160] S. Amiri, M. R. Mehrnia, S. Sobhanifard, F. Pourasgharian Roudsari, et S.-N. Hoseini, « Evaluation of agarose-entrapped magnetic nanoparticles influence on protein adsorption isotherm and kinetics using nickel-iminodiacetic acid ligand », *Separation and Purification Technology*, vol. 188, p. 423-430, nov. 2017, doi: 10.1016/j.seppur.2017.07.030.
[161] Z. He, J. S. Tan, O. M. Lai, et A. B. Ariff, « Optimization of conditions for the single step IMAC purification of miraculin from Synsepalum dulcificum », *Food Chemistry*, vol. 181, p. 19-24, août 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.166.

[162] O. González-Ortega et R. Guzmán, « Purification of Human Serum Immunoglobulins Using Immobilized Metal Affinity Chromatography with Ethylenediamine Triacetic Acid as Chelating Agent », *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 38, nº 1, p. 74-81, janv. 2015, doi: 10.1080/10826076.2014.883534.
[163] T. W. Hutchens et C. M. Li, « Estrogen receptor interaction with immobilized metals: Differential molecular recognition of Zn2+, Cu2+ and Ni2+ and separation of receptor isoforms », *Journal of Molecular Recognition*, vol. 1, nº 2, p. 80-92, avr. 1988, doi: 10.1002/jmr.300010206.
[164] S. Vançan, E. A. Miranda, et S. M. A. Bueno, « IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems », *Process Biochemistry*, vol. 37, nº 6, p. 573-579, janv. 2002, doi: 10.1016/S0032-9592(01)00242-4.
[165] H. Block *et al.*, « Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review », in *Methods in Enzymology*, vol. 463, R. R. Burgess et M. P. Deutscher, Éd. Academic Press, 2009, p. 439-473. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63027-5.
[166] J. Porath, « Immobilized Metal Affinity Chromatography », *Protein Expression and Purification*, vol. 3, nº 4, p. 263-281, août 1992.
[167] Z. El Rassi et C. Horvath, « Metal chelate-interaction chromatography of proteins with iminidoacetic acid-bonded stationary phases on silica support », *Journal of Chromatography*, nº 359, p. 241-253, 1986.
[168] A. E. Martell, R. J. Motekaitis, D. Chen, R. D. Hancock, et D. McManus, « Selection of new Fe(III)/Fe(II) chelating agents as catalysts for the oxidation of hydrogen sulfide to sulfur by air », *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 74, nº 10, p. 1872-1879, oct. 1996, doi: 10.1139/v96-210.
[169] H. Asanuma, A. Takemura, N. Toshima, et H. Hirai, « Adsorption of nitrogen monoxide by the chelate resin-immobilized iron(II) complex and its application for simultaneous removal of nitrogen monoxide and sulfur dioxide », *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 29, nº 11, p. 2267-2272, nov. 1990, doi: 10.1021/ie00107a011.
[170] J. Porath et B. Olin, « Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions », *Biochemistry*, vol. 22, nº 7, p. 1621-1630, mars 1983, doi: 10.1021/bi00276a015.
[171] G. K. Grimble, « The Significance of Peptides in Clinical Nutrition », *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 14, nº 1, p. 419-447, 1994, doi: 10.1146/annurev.nu.14.070194.002223.
[172] S. R. Hart, M. D. Waterfield, A. L. Burlingame, et R. Cramer, « Factors governing the solubilization of phosphopeptides retained on ferric NTA IMAC beads and their analysis by MALDI TOFMS », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 13, nº 9, p. 1042-1051, sept. 2002, doi: 10.1016/S1044-0305(02)00432-4.
[173] R. Belcher, « The application of chelate compounds in analytical chemistry », in *Analytical Chemistry–4*, Elsevier, 1973, p. 13-27. doi: 10.1016/B978-0-408-70463-2.50020-9.
[174] A. M. N. Silva, X. Kong, M. C. Parkin, R. Cammack, et R. C. Hider, « Iron(iii) citrate speciation in aqueous solution », *Dalton Trans.*, nº 40, p. 8616, 2009, doi: 10.1039/b910970f.
[175] H. Gowda *et al.*, « Interactive XCMS Online: Simplifying Advanced Metabolomic Data Processing and Subsequent Statistical Analyses », *Anal. Chem.*, vol. 86, nº 14, p. 6931-6939, juill. 2014, doi: 10.1021/ac500734c.
[176] A. Cappiello, G. Famiglini, L. Rossi, et M. Magnani, « Use of Nonvolatile Buffers in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Advantages of Capillary-Scale Particle Beam Interfacing », *Analytical Chemistry*, vol. 69, nº 24, p. 5136-5141, déc. 1997, doi: 10.1021/ac970765y.
[177] K. N. Petritis, P. Chaimbault, C. Elfakir, et M. Dreux, « Ion-pair reversed-phase liquid chromatography for determination of polar underivatized amino acids using perfluorinated carboxylic acids as ion pairing agent », *J. Chromatogr. A*, vol. 833, nº 2, p. 147-155, févr. 1999, doi: 10.1016/S0021-9673(98)01060-7.

[178] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, et M. Dreux, « Determination of 20 underivatized proteinic amino acids by ion-pairing chromatography and pneumatically assisted electrospray mass spectrometry », *J. Chromatogr. A*, vol. 855, n° 1, p. 191-202, sept. 1999, doi: 10.1016/S0021-9673(99)00685-8.
[179] M. de Person, A. Sevestre, P. Chaimbault, L. Perrot, F. Duchiron, et C. Elfakir, « Characterization of low-molecular weight peptides in champagne wine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry », *Anal. Chim. Acta*, vol. 520, n° 1-2, p. 149-158, août 2004, doi: 10.1016/j.aca.2004.03.094.
[180] L. L. S. Canabady-Rochelle, C. Harscoat-Schiavo, V. Kessler, A. Aymes, F. Fournier, et J.-M. Girardet, « Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods », *Food Chemistry*, vol. 183, p. 129-135, sept. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.147.
[181] J. Zhao *et al.*, « Carnosine protects cardiac myocytes against lipid peroxidation products », *Amino Acids*, vol. 51, n° 1, p. 123-138, janv. 2019, doi: 10.1007/s00726-018-2676-6.
[182] M. Lagarrigue, A. Bossée, C. Afonso, F. Fournier, B. Bellier, et J.-C. Tabet, « Diastereomeric differentiation of peptides with CuII and FeII complexation in an ion trap mass spectrometer », *J. Mass Spectrom.*, vol. 41, n° 8, p. 1073-1085, août 2006, doi: 10.1002/jms.1066.
[183] T. E. Lehmann et Y. Li, « Possible structural role of the disaccharide unit in Fe-bleomycin before and after oxygen activation », *J Antibiot*, vol. 65, n° 1, p. 25-33, janv. 2012, doi: 10.1038/ja.2011.103.
[184] K. Selmeczi *et al.*, « Nickel(II)-Dipeptidoamine-Based Tetrameric Complex: Structural Study in Solution and in Solid State », *Inorg. Chem.*, vol. 49, n° 18, p. 8222-8229, sept. 2010, doi: 10.1021/ic101167f.
[185] M. de Person, P. Chaimbault, et C. Elfakir, « Analysis of native amino acids by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry: comparative study between two sources and interfaces », *J. Mass Spectrom.*, vol. 43, n° 2, p. 204-215, févr. 2008, doi: 10.1002/jms.1287.
[186] J. Rossant-Lumbroso et L. Rossant, « Les anémies causes, symptômes et traitements », déc. 13, 2019. https://www.doctissimo.fr/html/sante/encyclopedie/sa_1560_anemies.htm (consulté le juin 24, 2018).
[187] « Substance active fer », *Vidal*, févr. 09, 2015. https://www.vidal.fr/substances/1481/fer/ (consulté le oct. 11, 2020).
[188] La rédaction de la revue prescrire, « Traitement oral d'une anémie par carence en fer chez les adultes », *La revue prescrire*, vol. 36, n° 390, p. 276-281, avr. 2016.
[189] M. Layrisse, « Prevention of Iron Deficiency », in *Nutrition Policy Implementation: Issues and Experience*, N. S. Scrimshaw et M. B. Wallerstein, Éd. Boston, MA: Springer US, 1982, p. 89-98. doi: 10.1007/978-1-4684-4091-1_6.
[190] L. Viatte et S. Vaulont, « L'hepcidine : un nouveau regard sur le métabolisme du fer », *Hepato-Gastro*, vol. 12, n° 3, p. 199-209, juin 2005.
[191] F. Tazawa *et al.*, « Neonatal hepatitis of non-familial form associated with fat and hemosiderin deposit in the liver of breast-fed Japanese infants: Dept. of Pediatrics, University of Akita, Akita, and University of Tohoku, Sendai », *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 22, n° 4, p. A498-A498, 1995, doi: 10.1016/0270-9139(95)95713-8.
[192] Y. Shizukuda, D. J. Tripodi, et D. R. Rosing, « Iron Overload or Oxidative Stress? Insight into a Mechanism of Early Cardiac Manifestations of Asymptomatic Hereditary Hemochromatosis Subjects with C282Y Homozygosity », *Journal of Cardiovascular Translational Research*, vol. 9, n° 4, p. 400-401, août 2016, doi: 10.1007/s12265-016-9704-2.
[193] L. Grange, I. Guichard, C. Berger, L. Garçon, V. Picard, et P. Cathébras, « Une nouvelle cause hématologique de surcharge martiale sévère », *La Revue de Médecine Interne*, vol. 39, p. A130-A131, juin 2018, doi: 10.1016/j.revmed.2018.03.048.

[194] T. Kanti Das, M. R. Wati, et K. Fatima-Shad, « Oxidative Stress Gated by Fenton and Haber Weiss Reactions and Its Association With Alzheimer's Disease », *Archives of Neuroscience*, vol. 2, n° 3, août 2014, doi: 10.5812/archneurosci.20078.
[195] A. Ayala, M. F. Muñoz, et S. Argüelles, « Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal », *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, p. 1-31, 2014, doi: 10.1155/2014/360438.
[196] B. Halliwell, « Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: What is its mechanism of action? », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 7, n° 6, p. 645-651, janv. 1989, doi: 10.1016/0891-5849(89)90145-7.
[197] W. H. Koppenol, « The Haber-Weiss cycle – 70 years later », *Redox Report*, vol. 6, n° 4, p. 229-234, août 2001, doi: 10.1179/135100001101536373.
[198] F. Von Haber et J. Weiss, « Über die Katalyse des Hydroperoxydes », *Naturwissenschaften*, n° 20, p. 948-950, 1932.
[199] J. L. Venero *et al.*, « Evidence for dopamine-derived hydroxyl radical formation in the nigrostriatal system in response to axotomy », *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 34, n° 1, p. 111-123, janv. 2003, doi: 10.1016/S0891-5849(02)01191-7.
[200] R. J. Castellani *et al.*, « Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease », *Ageing Research Reviews*, vol. 3, n° 3, p. 319-326, juill. 2004, doi: 10.1016/j.arr.2004.01.002.
[201] B. Lipinski et E. Pretorius, « Hydroxyl radical-modified fibrinogen as a marker of thrombosis: the role of iron », *Hematology*, vol. 17, n° 4, p. 241-247, juill. 2012, doi: 10.1179/1607845412Y.0000000004.
[202] M. Dizdaroglu et P. Jaruga, « Mechanisms of free radical-induced damage to DNA », *Free Radical Research*, vol. 46, n° 4, p. 382-419, avr. 2012, doi: 10.3109/10715762.2011.653969.
[203] T. Kanno, K. Nakamura, H. Ikai, K. Kikuchi, K. Sasaki, et Y. Niwano, « Literature review of the role of hydroxyl radicals in chemically-induced mutagenicity and carcinogenicity for the risk assessment of a disinfection system utilizing photolysis of hydrogen peroxide », *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, vol. 51, n° 1, p. 9-14, 2012, doi: 10.3164/jcbn.11-105.
[204] R. Girot, I. Hagège, J.-F. Deux, et F. Lionnet, « Traitement de la surcharge en fer dans les maladies hématologiques (hémochromatoses héréditaires exclues) », vol. 12, p. 13, 2006.
[205] Lencina Claiton L., Dassonville Alexandra, et Sonnet Pascal, « Molécules chélatrices du fer à visée antiprolifératives ». 2006. Consulté le: juin 25, 2018. [En ligne]. Disponible sur: https://listes.u-picardie.fr/wws/d_read/chimie.organique.therapeutique/chimiesynthese/chelateursantiproliferatifs.pdf
[206] S. Geissler, M. Hellwig, F. Markwardt, T. Henle, et M. Brandsch, « Synthesis and intestinal transport of the iron chelator maltosine in free and dipeptide form », *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 78, n° 1, p. 75-82, mai 2011, doi: 10.1016/j.ejpb.2010.12.032.
[207] M. Decaffmeyer, A. Thomas, et R. Brasseur, « Les médicaments peptidiques : mythe ou réalité ? », *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, p. 8, 2008.
[208] P. P. J. Da Silva et L. Meijer, « Recherche de substances naturelles à activité thérapeutique: Pierre Potier (1934-2006) », *médecine/sciences*, vol. 28, n° 5, p. 534-542, mai 2012, doi: 10.1051/medsci/2012285020.
[209] « Molécules bio-actives | Cluster Chimie ». http://www.cluster-chimie.fr/le-cluster-chimie/thematiques-de-recherches/molecules-bioactives (consulté le oct. 18, 2020).
[210] « Les peptides, une origine naturelle de médicaments innovants pour les patients | science action online ». https://www.scienceaction.asso.fr/ressources/videos/les-peptides-une-origine-naturelle-de-m%C3%A9dicaments-innovants-pour-les-patients (consulté le oct. 20, 2020).
[211] E. K. Kalra, « Nutraceutical-definition and introduction », *AAPS PharmSci*, vol. 5, n° 3, p. 27-28, sept. 2003, doi: 10.1208/ps050325.

[212] M. Calvani, A. Pasha, et C. Favre, « Nutraceutical Boom in Cancer: Inside the Labyrinth of Reactive Oxygen Species », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, n° 6, p. 1936, mars 2020, doi: 10.3390/ijms21061936.
[213] E. G. de Mejia et V. P. Dia, « The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells », *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 29, n° 3, p. 511-528, sept. 2010, doi: 10.1007/s10555-010-9241-4.
[214] N. J. Ayon et Division of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Missouri-Kansas City, 2464 Charlotte Street, Kansas City, MO 64108, USA, « Features, roles and chiral analyses of proteinogenic amino acids », *AIMS Molecular Science*, vol. 7, n° 3, p. 229-268, 2020, doi: 10.3934/molsci.2020011.
[215] D. Schwarzer, R. Finking, et M. A. Marahiel, « Nonribosomal peptides: from genes to products », *Natural Product Reports*, vol. 20, n° 3, p. 275, 2003, doi: 10.1039/b111145k.
[216] L. Canabady-Rochelle et K. Hedhili, « Peptides issus des procédés d'hydrolyse : Filières Industrielles », Parc Biocitech, Romainville, oct. 2012, p. 71.
[217] A. Zorzi, S. J. Middendorp, J. Wilbs, K. Deyle, et C. Heinis, « Acylated heptapeptide binds albumin with high affinity and application as tag furnishes long-acting peptides », *Nature Communications*, vol. 8, n° 1, déc. 2017, doi: 10.1038/ncomms16092.
[218] Z. Wang, « APD: the Antimicrobial Peptide Database », *Nucleic Acids Research*, vol. 32, n° 90001, p. 590D - 592, janv. 2004, doi: 10.1093/nar/gkh025.
[219] S.-S. Tang, Z. H. Prodhan, S. K. Biswas, C.-F. Le, et S. D. Sekaran, « Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification », *Phytochemistry*, vol. 154, p. 94-105, oct. 2018, doi: 10.1016/j.phytochem.2018.07.002.
[220] C. E. Salas, J. A. Badillo-Corona, G. Ramírez-Sotelo, et C. Oliver-Salvador, « Biologically Active and Antimicrobial Peptides from Plants », *BioMed Research International*, mars 01, 2015. https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/102129/ (consulté le oct. 23, 2020).
[221] A.- Rahman, Éd., *Studies in natural products chemistry*, vol. 62. 2019. Consulté le: oct. 23, 2020. [En ligne]. Disponible sur: http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=1870052
[222] D. D. Kitts et K. Weiler, « Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery », *Curr Pharm Des*, vol. 9, n° 16, p. 1309-1323, 2003, doi: 10.2174/1381612033454883.
[223] A. Sánchez et A. Vázquez, « Bioactive peptides: A review », *Food Qual. Saf.*, vol. 1, n° 1, p. 29-46, mars 2017, doi: 10.1093/fqs/fyx006.
[224] W. F. Broekaert, B. P. A. Cammue, M. F. C. De Bolle, K. Thevissen, G. W. De Samblanx, et R. W. Osborn, « Antimicrobial Peptides from Plants », *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 16, n° 3, p. 297-323, 1997, doi: 10.1080/713608148.
[225] Y. Ariyoshi, « Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins », *Trends in Food Science and Technology*, vol. 4, mai 1993.
[226] A. Pihlanto-Leppälä, « Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides », *Trends in Food Science and Technology*, vol. 11, p. 347-356, 2001.
[227] E. D. Marczak *et al.*, « New antihypertensive peptides isolated from rapeseed », *Peptides*, vol. 24, n° 6, p. 791-798, juin 2003, doi: 10.1016/S0196-9781(03)00174-8.
[228] C. Zioudrou, R. A. Streaty, et W. A. Klee, « Opioid peptides derived from food proteins », *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 254, n° 7, p. 2446-2449, 10 avril.
[229] M. Messina et S. Barnes, « The Role of Soy Products in Reducing Risk of Cancer », *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, vol. 83, n° 8, p. 541-546, avr. 1991, doi: 10.1093/jnci/83.8.541.
[230] F.-C. Wong, J. Xiao, S. Wang, K.-Y. Ee, et T.-T. Chai, « Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources », *Trends in Food Science & Technology*, vol. 99, p. 44-57, mai 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2020.02.012.

[231] R. Liu, L. Xing, Q. Fu, G. Zhou, et W. Zhang, « A Review of Antioxidant Peptides Derived from Meat Muscle and By-Products », *Antioxidants*, vol. 5, n° 3, p. 32, sept. 2016, doi: 10.3390/antiox5030032.
[232] C.-Z. Zhu, W.-G. Zhang, G.-H. Zhou, X.-L. Xu, Z.-L. Kang, et Y. Yin, « Isolation and Identification of Antioxidant Peptides from Jinhua Ham », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, n° 6, p. 1265-1271, févr. 2013, doi: 10.1021/jf3044764.
[233] S. Saidi, A. Deratani, M.-P. Belleville, et R. Ben Amar, « Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process », *Food Research International*, vol. 65, p. 329-336, nov. 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2014.09.023.
[234] P. A. Harnedy et R. J. FitzGerald, « Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review », *Journal of Functional Foods*, vol. 4, n° 1, p. 6-24, janv. 2012, doi: 10.1016/j.jff.2011.09.001.
[235] J.-E. Jin, C.-B. Ahn, et J.-Y. Je, « Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed ark shell (Scapharca subcrenata) », *Process Biochemistry*, vol. 72, p. 170-176, sept. 2018, doi: 10.1016/j.procbio.2018.06.001.
[236] O. Power, P. Jakeman, et R. J. FitzGerald, « Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides », *Amino Acids*, vol. 44, n° 3, p. 797-820, mars 2013, doi: 10.1007/s00726-012-1393-9.
[237] Y. W. Park et M. S. Nam, « Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review », *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, vol. 35, n° 6, p. 831-840, déc. 2015, doi: 10.5851/kosfa.2015.35.6.831.
[238] H. Korhonen, « Milk-derived bioactive peptides: From science to applications », *Journal of Functional Foods*, vol. 1, n° 2, p. 177-187, avr. 2009, doi: 10.1016/j.jff.2009.01.007.
[239] Z. F. Bhat, S. Kumar, et H. F. Bhat, « Bioactive peptides of animal origin: a review », *Journal of Food Science and Technology*, vol. 52, n° 9, p. 5377-5392, sept. 2015, doi: 10.1007/s13197-015-1731-5.
[240] I. Karkouch *et al.*, « Antioxidant, antityrosinase and antibiofilm activities of synthesized peptides derived from Vicia faba protein hydrolysate: A powerful agents in cosmetic application », *Industrial Crops and Products*, vol. 109, p. 310-319, déc. 2017, doi: 10.1016/j.indcrop.2017.08.025.
[241] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, et G. Subra, « Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis », *MOLECULAR BIOTECHNOLOGY*, vol. 33, p. 16, 2006.

# LISTE DES ANNEXES

**ANNEXE 1 :** anomalie du métabolisme martial

**ANNEXE 2 :** généralités sur les peptides actifs

**ANNEXE 3-1 :** étude bibliographique IMAC (peptides)

**ANNEXE 3-2 :** étude bibliographique IMAC (protéines)

**ANNEXE 3-3 :** étude bibliographique IMAC (autres composés)

**ANNEXE 4-1 :** identification MS de peptides d'intérêt dans l'hydrolysat trypsique de caséines (phosphopeptides)

**ANNEXE 4-2 :** identification MS de peptides d'intérêt dans l'hydrolysat trypsique de caséines (peptides non phosphorylés possédant des propriétés acides)

**ANNEXE 5 :** extrait fiche technique colonne ProPac IMAC-10

**ANNEXE 6 :** suivi des collectes et injections en IMAC

**ANNEXE 7 :** table des temps de rétention obtenus par IMAC-MS sur les peptides standards non phosphorylés

**ANNEXE 8 :** séquences des quatre protéines caséiques (source UniProtKB)

**ANNEXE 9 :** publication protocole de criblage IP-RPLC-HRMS (publication entière)

**ANNEXE 10 :** publication identification de sidérophores bactériens (abstract)

# ANNEXE 1 : anomalie du métabolisme martial

## 1. Carence en fer

Différentes situations sont susceptibles d'engendrer une carence martiale, aboutissant au final à l'anémie.

Les signes cliniques les plus courants d'un état anémique sont la fatigue, un teint pâle et un essoufflement plus prononcé à l'effort.

### 1.1. Anémie ferriprive

L'anémie ferriprive représente 50 % des différentes formes d'anémie, ce qui correspond à 15 % de la population mondiale atteinte. Elle est caractérisée par des globules rouges de petite taille, dits microcytaires, et un taux d'hémoglobine anormalement bas [186].

Une carence martiale peut avoir plusieurs causes :

#### 1.1.1. Cause alimentaire

Dans une grande majorité des cas, elle s'explique par une alimentation trop pauvre en fer ou bien par une fraction trop faible du fer héminique. Ce type de carence touche en priorité les pays en voie de développement, dans lesquels les féculents constituent le régime de base. En effet, comme cela a déjà été évoqué, le fer minéral est beaucoup moins bien absorbé que le fer d'origine animale. Une cause aggravante de la malabsorption du fer ferrique est la présence d'espèces donnant lieu à des chélates insolubles, tels que le calcium, les phosphates, les oxalates, les phytates, les tannins et les fibres alimentaires [12]. Par ailleurs, la prise de médicaments antiacides visant à réduire l'acidité gastrique a également un impact sur l'absorption du fer minéral dans le sens où elle diminue sa solubilité.

#### 1.1.2. Grossesse et hémorragies

L'augmentation des besoins en fer à l'occasion d'une grossesse, les hémorragies aigues ainsi que les saignements chroniques digestifs ou gynécologiques sont aussi des causes fréquentes d'anémie ferriprive.

#### 1.1.3. Cause inflammatoire et hyperthyroïdie

Un état inflammatoire ou une hyperthyroïdie peuvent également donner lieu à ce type d'affection, par action à distance des cytokines pro-inflammation et des hormones thyroïdiennes. Ces dernières impactent le système de régulation IRP/IRE précédemment évoqué (cf. **Étude bibliographique, I.2.4.3**), en inhibant la captation du fer et en stimulant le

stockage dans les macrophages. Une hyperferritinémie s'installe et entraine une baisse du fer disponible pour la synthèse des globules rouges. L'anémie inflammatoire est une complication très fréquente chez les patients atteints de maladies graves comme le cancer, des polyarthrites, des spondylarthrites et des infections chroniques.

#### 1.1.4. Cause génétique

De façon rare, l'affection anémique provient de la mutation génétique de l'IRE de la ferritine. Cette anomalie entraine une diminution de l'interaction IRP/IRE et conduit à un syndrome d'hyperferritinémie responsable de cataracte héréditaire.

Une autre forme rare mais sévère d'anémie ferriprive survient en cas d'élévation primitive de l'hepcidine, consécutivement à une tumeur à hepcidine ou une surexpression du gène. Un taux élevé en hepcidine entrainant la diminution conjointe de l'absorption digestive et de la sortie macrophagique, l'alimentation des cellules érythroïdes est fortement impactée.

### 1.2. Traitements de l'anémie ferriprive

Une anémie même légère doit être traitée avec rigueur car son aggravation potentielle peut entrainer des troubles cardiaques ou mettre en danger le bébé à naitre (risque de naissance prématurée et de poids faible).

En cas de carence d'origine alimentaire, le bon réflexe consiste à adapter son régime en augmentant la part du fer d'origine animale. De plus, l'absorption du fer minéral peut être améliorée en respectant l'acidité gastrique de l'estomac et en favorisant sa solubilisation grâce à l'acide ascorbique, les citrates et autres acides organiques [12].

En fonction de la gravité de l'anémie, deux types de traitements peuvent être appliqués pour remonter le niveau de fer.

#### 1.2.1. Traitement par transfusion sanguine

Lorsque le taux d'hémoglobine est très bas (inférieur à 8 $g \cdot dL^{-1}$), la transfusion sanguine est la première solution envisagée afin de récupérer rapidement une valeur correcte.

#### 1.2.2. Traitement par supplémentation en fer

Dans les autres cas, le traitement classique consiste en l'ingestion de sels ferreux par voie orale (sulfate ferreux, succinate ferreux, etc.) ou de sels ferriques par voie intraveineuse en cas de malabsorption (complexe hydroxyde ferrique-saccharose) [187] [188].

En plus de leur mauvais goût [54], les sels ferreux présentent plusieurs inconvénients majeurs, à savoir (i) une faible biodisponibité à cause de leur instabilité [189] (10 à 20 % de la dose

ingérée [187]), (ii) une mauvaise tolérance digestive [188] et (ii) une propension à générer des espèces réactives de l'oxygène [56] [60].

#### 1.2.3. Perspectives thérapeutiques

Deux voies principales sont actuellement explorées, à savoir :

1) les thérapies basées sur des éléments majeurs de la régulation de l'homéostasie ferrique, tels que l'hepcidine [13] [20]. Dans le cas des anémies consécutives à un cancer ou à des maladies inflammatoires chroniques, la surexpression de l'hepcidine est une cause avérée du déficit en fer. Par conséquent, l'utilisation d'antagonistes de l'hepcidine serait dans ce cas tout à fait pertinente [190] ;

2) la supplémentation martiale par voie orale sous forme de chélates [54] afin d'améliorer significativement la biodisponibilité du fer.

## 2. Surcharge en fer

Plusieurs anomalies du métabolisme martial peuvent induire une surcharge en fer extrêmement nocive pour l'organisme.

Quand les capacités de stockage au niveau du foie sont dépassées, le fer commence à s'accumuler dans certains organes comme le cœur, le rein ou le pancréas. En cas de surcharge anormale, la ferritine est dégradée en hémosidérine insoluble, créant des dépôts et *in fine* un renflement intracellulaire [191].

Non traitée, l'hémochromatose conduit à des lésions tissulaires graves (*i.e.* cirrhose, cancer du foie, cardiopathie, diabète, atteinte articulaire), conséquences de la surcharge systémique et d'un stress oxydant élevé concomitant [192].

### 2.1. Hémochromatose

On distingue deux types d'hémochromatose, la forme primitive d'origine génétique et la forme secondaire consécutive à une pathologie préexistante.

#### 2.1.1. Hémochromatose primitive

L'hémochromatose primitive est une pathologie héréditaire très fréquente puisqu'elle atteint 0.3 à 0.5 % de la population mondiale.

1) L'hémochromatose de type 1 est nettement majoritaire. Elle est due à une mutation affectant le gène de la glycoprotéine HFE. Dans ces circonstances, il n'y a pas d'interaction HFE/TfR1, ce qui inhibe l'entrée du fer plasmatique. Selon le modèle de

régulation de la crypte (cf. **Étude bibliographique, I.2.4.1**), l'entérocyte compense ce « déficit » en adoptant un comportement d'hyperabsorption du fer alimentaire ;

2) L'hémochromatose de type 2 ou hémochromatose juvénile est l'autre forme héréditaire. Elle est rare mais c'est la plus précoce et la plus sévère. Elle provient d'une mutation du gène de l'hémojuvéline, une protéine qui joue un rôle majeur dans le contrôle de l'expression de l'hepcidine, l'hormone de régulation. Cette anomalie conduit à un effondrement de l'hepcidine, allant de pair avec une hyperabsorption digestive et une hyperexportation macrophagique (cf. **Étude bibliographique, I.2.4.2**).

#### 2.1.2. Hémochromatose secondaire ou hémosidérose

L'hémochromatose secondaire est une affection développée en cas d'anémie chronique, que cette dernière soit caractérisée par une insuffisance de production ou une destruction excessive de globules rouges (anémie hémolytique) [193].

Ainsi, de nombreuses maladies développant au départ une anémie se compliquent *in fine* par une hémosidérose (thalassémie, anémie sidéroblastique, etc.). Dans le cas de l'anémie sidéroblastique par exemple, l'anomalie affecte initialement la protéine chargée de la sortie des groupes Fe-S de la mitochondrie (transporteur ABC7), induisant une accumulation du fer mitochondrial. Une fois l'anémie installée, une hémochromatose secondaire se met alors en place.

L'hémosidérose constitue le principal facteur de risque chez les patients fortement anémiés. Pour tenter d'augmenter le faible taux d'hémoglobine saine, l'organisme oriente de façon non contrôlée le métabolisme martial vers l'hyperabsorption digestive.

De surcroît, le traitement répété de l'anémie par transfusion sanguine aggrave l'hémosidérose, le fer apporté par le sang neuf se rajoutant au stock martial déjà conséquent.

Il se peut aussi que la transfusion soit la cause initiale de la surcharge en fer chez le patient fortement anémié.

### 2.2. Effet prooxydant du fer *in vivo*

Plusieurs métaux de transition, dont le fer, induisent *in vivo* la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [194] [195].

Le fer labile - intracellulaire (LIP) ou circulant (LPI/NTBI) - constitue la forme biologique du fer libre (cf. **Étude bibliographique, I.2.2.4**), active du point de vue redox et facilement « chélatable » [19] [20] [196].

### 2.2.1. Fonctionnement cellulaire normal

Selon un processus physiologique normal, la forme ferreuse $Fe^{II}$ du pool LIP catalyse la production intracellulaire des ROS à travers la chaine réactionnelle donnée en **Figure 1'**. Il s'agit respectivement du radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$, du peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$ et du radical hydroxyle $HO^{\bullet}$. Ce dernier est généré par la réaction de Fenton qui consiste en la réduction mono-électronique du peroxyde d'hydrogène, tel que proposé par Haber et Weiss en 1932 [197] [198].

Dans ce mécanisme, les ions ferreux $Fe^{2+}$ sont régénérés en continu à partir des ions ferriques $Fe^{3+}$ par différentes espèces réductrices, comme l'acide ascorbique (vitamine C), le glutathion ou bien encore la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD).

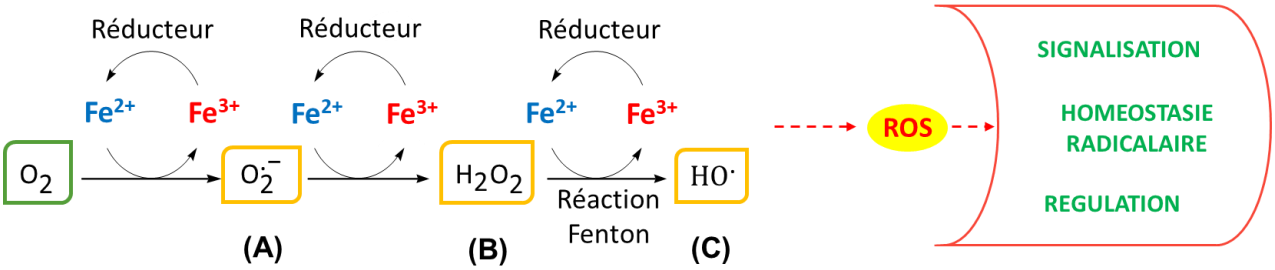



**Figure 1'.** Formation physiologique des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leurs contributions au fonctionnement cellulaire. (**A**) radical superoxyde, (**B**) peroxyde d'hydrogène et (**C**) radical hydroxyle.

Comme mentionné précédemment (cf. **Étude bibliographique, I.2.2.4**), les ROS sont impliqués dans la régulation et la signalisation cellulaires participant au maintien de l'homéostasie radicalaire [22]. Une perturbation de cette homéostasie induirait de nombreuses pathologies, d'où l'enjeu clinique de la compréhension fine des mécanismes d'action des ROS. Leur production doit donc être contrôlée de façon stricte pour préserver le fonctionnement cellulaire et éviter les dommages irréversibles.

### 2.2.2. Fonctionnement cellulaire en cas d'excès de fer

En cas de forte surcharge martiale - entrainant une saturation de la transferrine proche de 100 % – la fraction circulante NTBI habituellement inférieure à 1 µM augmente jusqu'à des concentrations plasmatiques comprises entre 1 µM et 10 µM [12] [16] [17]. L'entrée intracellulaire de la fraction NTBI n'étant pas régulée (cf. **Étude bibliographique, I.2.2.4**), le pool de fer labile LIP augmente de façon non contrôlée, engendrant un excès de fer prooxydant dans la cellule [12] [14] [23].

Si l'organisme ne parvient pas à rétablir la concentration initiale en fer, un déséquilibre de la balance "antioxydants"/"prooxydants" se produit en faveur de ces derniers, occasionnant alors une production excessive de ROS (**Figure 2'**).

Le radical hydroxyle, hautement réactif et très instable, attaque toutes les biomolécules environnantes selon différents mécanismes réactionnels (abstraction, addition, oxydation) [194] [195].

De surcroit, les ROS agissent sur le système de régulation IRP/IRE en stimulant la captation de fer circulant et en inhibant le stockage, ce qui aggrave encore les réactions de peroxydation [12].

Une hémochromatose est susceptible d'induire un stress oxydant durable responsable de désordres cellulaires graves comme des maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et des cancers [195] [199] [200] [201] [202] [203]. L'architecture des organes peut aussi être affectée par l'apparition de fibroses, notamment au niveau du foie, qui peut évoluer en cirrhose.

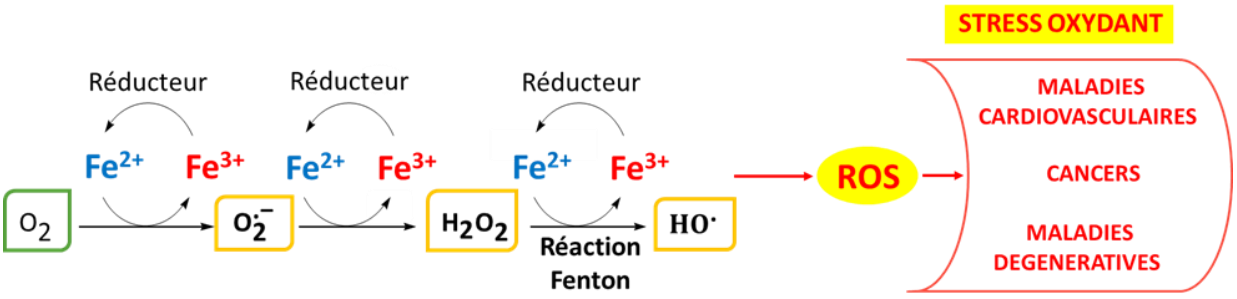



**Figure 2'.** Surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en présence d'un excès de fer intracellulaire et conséquences indésirables du stress oxydant.

### 2.3. Traitement de la surcharge en fer

Un indicateur simple et direct de la quantité de fer stockée dans l'organisme est la ferritine plasmatique. En condition normale, cette forme de ferritine contient une quantité de fer infinitésimale. Lors d'une surcharge, la transferrine arrive à saturation et le taux de fer dans la ferritine circulante augmente.

En cas de surcharge martiale, les traitements conventionnels consistent à éliminer l'excès de fer circulant de façon fréquente, soit par saignée, soit par chélation [204].

#### 2.3.1. Traitement par saignée

Une hémochromatose primitive est traitée en pratiquant des saignées abondantes et répétées pour abaisser significativement le taux de fer. En ce qui concerne les hémochromatoses secondaires, ce traitement n'est pas applicable chez les patients souffrant d'anémie liée à une érythropoïèse déficiente.

#### 2.3.2. Traitement par chélation

La thérapie par chélation est actuellement incontournable pour un grand nombre de

pathologies hématologiques impliquant un excès de fer.

C'est une solution très couteuse qui repose sur la séquestration du fer circulant - de nature ferrique - par administration lente de chélateurs, à l'aide de pompes. Le chélateur utilisé est un ligand de petite taille, naturel ou chimique, capable de se lier au cation métallique ciblé pour former un complexe de coordination stable, inactif, non toxique et soluble, éliminé ultérieurement par voie urinaire et/ou digestive. Le chélateur se caractérise par (i) sa denticité (nombre de liaisons de coordination partagées avec le centre métallique ; plus la denticité est grande, plus le complexe est stable), (ii) sa sélectivité vis-à-vis d'un élément métallique donné et un état d'oxydation donné, (iii) son mode d'administration (oral ou *per os*, parentéral, etc.) et (iv) son mode d'élimination (*i.e.* urinaire, digestif).

Au cours des 25 dernières années, plus de 1000 molécules ont été synthétisées ou isolées en vue de chélater le fer [205] : des sidérophores, de nombreux composés synthétiques comportant différents motifs chimiques chélateurs (arylhydrazone, thiosemicarbamazone, etc.).

Les formes pharmaceutiques les plus répandues et commercialisées à ce jour sont résumées dans le **Tableau 1'**. L'injection parentérale de desferrioxamine (trop peu biodisponible pour la voie *per os*) est le traitement le plus courant mais s'accompagne de nombreux effets secondaires [206].

**Tableau 1'.** Les principales formes thérapeutiques de chélateurs de fer.

| Molécule active | Nom commercial | Source | Voie administration | Denticité $M^{n+}$ | Référence |
|---|---|---|---|---|---|
| desferrioxamine | Desféral ® | sidérophore bactérien | parentérale | hexadendate $Fe^{3+}$ | [32], VIDAL 2015 |
| déféripronе | Ferriprox ®, Kelfer ® | synthèse chimique | orale | bidendate $Fe^{3+}$ | [32], [34], [17] |
| déférasirox | ICL 670, Exjade ® | synthèse chimique | orale | tridendate $Fe^{3+}$ | [32], VIDAL 2014 |

Les molécules chélatrices de fer développées et utilisées pour un usage clinique présentent dans la majorité des cas, une affinité spécifique pour le fer ferrique afin de réduire la chélation d'autres métaux divalents comme $Cu^{2+}$ et $Zn^{2+}$ [205].

### 2.3.3. Perspectives thérapeutiques

Actuellement, les recherches s'orientent dans plusieurs directions, dont :

1) les thérapies mettant à profit les molécules clés du métabolisme martial. En cas d'hémochromatose primitive, un traitement cohérent consisterait à accroitre le niveau d'hepcidine. Les travaux menés actuellement envisagent deux pistes, soit une supplémentation d'hepcidine de synthèse (ou d'agonistes synthétiques de l'hepcidine), soit une stimulation endogène de la production d'hepcidine hépatique. Dans le cas des

surcharges secondaires, l'administration d'hepcidine pourrait aussi s'avérer bénéfique [13] ;

2) la diminution de l'absorption intestinale à l'aide de molécules inhibitrices [13] ;

3) la recherche de nouveaux chélateurs spécifiques du fer pour :

▪ remplacer le traitement classique peu confortable avec la desferrioxamine (injection parentérale et effets indésirables) par de nouvelles stratégies *per os* [206] ;

▪ lutter contre le stress oxydant sans perturber l'homéostasie des autres éléments. En neutralisant la forme métallique « libre » intracellulaire, ces composés permettraient d'éviter la formation en excès des ROS. Ils pourraient aussi être utilisés comme traitement antiprolifératif dans le cas des cancers [205]. Les chélateurs en question devront posséder des propriétés physico-chimiques (*i.e.* lipophilie, état ionisation, masse moléculaire) compatibles avec une administration par voie orale (bonne absorption par le tractus gastro-intestinal) et une portée d'action au niveau intracellulaire (bonne aptitude à traverser les membranes).

# ANNEXE 2 : généralités sur les peptides actifs

En pharmaceutique, le réservoir des substances médicinales naturelles - principalement issues des plantes - commence à s'épuiser et n'est plus en mesure d'alimenter le marché des principes actifs au même niveau que par le passé [207] (entre 1980 et 2010, 80 % des médicaments classiques étaient issus, dérivés ou inspirés de petites molécules d'origine naturelle [208]). De surcroit, les traitements thérapeutiques innovants requièrent la mise au point de molécules très complexes, ce qui constitue un frein supplémentaire à la productivité [209]. Afin de pallier la baisse continue du nombre de composés actifs homologués, les industriels ont dû envisager des alternatives à la production classique des petites molécules [207].

Dans ce contexte, les peptides sont devenus une source essentielle de stratégies médicales [210] et des candidats prometteurs pour le secteur nutraceutique en plein essor [211] [212] [213].

Il sont utilisés comme principes actifs pour le traitement de diverses affections comme les désordres métaboliques (type diabète), les cancers hormono-dépendants (prostate, sein) ou la déficience de l'hormone de croissance [210]. Au début des années 2000, les peptides représentaient une part conséquente des 200 médicaments classiques les plus vendus au monde (20 %), et un nombre important était soit en phase de développement (600-700), soit en phase clinique (plus de 150) [207].

Un nombre grandissant d'études s'intéresse également au potentiel nutraceutique et thérapeutique des peptides bioactifs. Par exemple, la lunasine contenue dans diverses plantes alimentaires (soja, orge, blé) a révélé une action anticancéreuse très prometteuse grâce à une séquence peptidique de 9 acides aminés [213].

Après un rappel sur la structure des peptides, nous évoquerons leurs avantages et inconvénients en tant que molécule active *in vivo*. Nous évoquerons ensuite leurs modes de production.

## 1. Structure

La structure commune des peptides correspond à un enchainement linéaire de monomères sélectionnés parmi une liste de 20 acides aminés naturels (**Fig. 3'C**) [214]. Le tétrapeptide modèle montré en **Figure 3'B** illustre la nature de la liaison peptidique obtenue par condensation de 2 acides aminés de forme $NH_2$-CHR-COOH (**Fig. 3'A**).

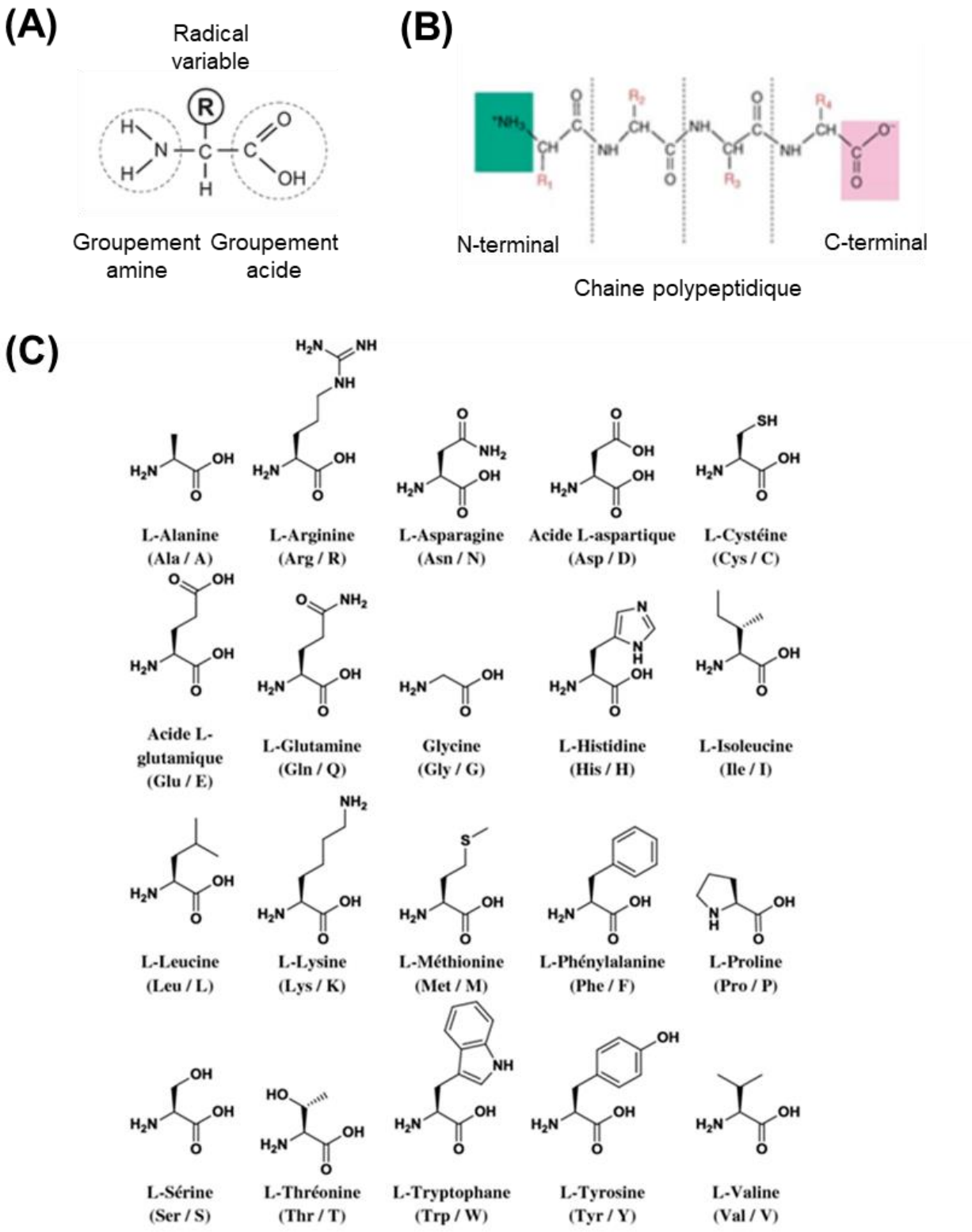



**Figure 3'.** **(A)** Structure générale d'un acide aminé avec son groupement amine ($NH_2$), son groupement acide carboxylique (COOH) et son groupe latéral variable R ; **(B)** Structure générale d'un tétrapeptide sous sa forme zwitterionique, avec sa fonction amine terminale protonée ($NH_3^+$) et sa fonction acide carboxylique terminale déprotonée ($COO^-$) et **(C)** Structures des 20 acides aminés protéinogènes (avec le code à 1 lettre et le code à 3 lettres).

### 1.1. Taille et diversité

Les peptides sont des entités chimiques de taille intermédiaire, situées entre les petites molécules qui constituent la principale source de médicaments sur le marché actuel et les macromolécules, telles que les anticorps [210]. On parlera d'oligopeptide lorsque le nombre de résidus acide aminé est inférieur à 10 et de polypeptide lorsque celui-ci est compris entre 10 et environ 100.

Chaque peptide étant caractérisé par une séquence propre, le nombre de combinaisons potentielles devient rapidement considérable. Sur une base théorique, le nombre total de peptides composés de 10 acides aminés dépasse ainsi 16680 milliards (décapeptides).

En marge des peptides ribosomiques linéaires, une très grande variété de peptides non-ribosomiques sont recensés chez les microorganismes. De petite taille, souvent cycliques ou cycliques branchés, et intégrant des acides aminés non protéinogènes, ces composés viennent encore ajouter à la diversité des composés peptidiques [215].

Il apparait donc intéressant de sonder cet extraordinaire réservoir de structures et de propriétés physico-chimiques pour rechercher de nouvelles activités biologiques [216].

### 1.2. Activité et comportement *in vivo*

Par comparaison avec les petites molécules thérapeutiques traditionnelles, les peptides présentent des avantages indéniables mais aussi des inconvénients majeurs qu'il convient de contourner [207].

#### 1.2.1. Points forts

1) Étant assimilés à la plus petite partie fonctionnelle d'une protéine, les peptides agissent avec beaucoup d'efficacité, de sélectivité et de spécificité sur les molécules cibles (Hummel *et al.,* 2006). Un tel niveau de performance est très difficilement atteignable avec une petite molécule de synthèse classique ;

2) Par ailleurs, ils n'engendrent qu'une très faible toxicité pour l'organisme, leurs produits de dégradation étant des acides aminés (Loffet, 2002) ;

3) De plus, les peptides s'accumulent peu au sein des tissus car ils sont rapidement éliminés du sang par les reins (principe de la clairance ou épuration rénale).

### 1.2.2. Points faibles

Les peptides ne répondent généralement pas à la règle des cinq (Lipinsky, 2001) qui permet de garantir l'efficacité d'une molécule *per os* lors des différentes étapes de la pharmacocinétique (ADME : absorption, distribution, métabolisme et excrétion). Idéalement, une molécule doit satisfaire à des critères physico-chimiques portant sur (i) sa taille, avec une masse moléculaire inférieure à 500 daltons, (ii) sa lipophilie, avec une valeur modérée du coefficient de partage octanol/eau (log P < 5) et (iii) sa capacité à former des liaisons hydrogène, avec un nombre maximal de sites donneurs égal à 5 (O-H, N-H) et un nombre maximal de sites accepteurs égal à 10 (O, N).

1) Les peptides étant quasiment non-absorbables par voie orale, cela implique des injections intraveineuses inconfortables pour le patient. Pour pallier ce désagrément, plusieurs stratégies ont été développées comme la protection du peptide par enrobage, permettant d'envisager des injections intraveineuses avec libération retardée (dans le but de diminuer la fréquence des injections) ou même simplement une administration par voie orale. De nouveaux modes d'injection parentéraux ont également été mis au point, via les muqueuses (nasales, pulmonaires) ou la peau ;

2) La clairance rénale est *à contrario* un inconvénient car elle engendre un faible temps de demi-vie pour les peptides (celui de l'insuline est de 4-5 minutes seulement). Afin d'allonger le temps de présence du peptide dans le système sanguin, une piste consiste à greffer le peptide à un ligand capable de se lier à une protéine sérique comme l'albumine [217] ;

3) Par ailleurs, les peptides sont fortement biodégradés par les peptidases (tractus gastro-intestinal, reins, foie et sérum), ce qui impacte à la fois leur rendement d'absorption et leur durée d'action dans l'organisme. Face à ce problème majeur, des stratégies de modification chimique ont été élaborées pour les protéger efficacement de l'action enzymatique [207].

## 2. Modes de production

L'identification de nouvelles activités biologiques requiert la production d'un large panel de séquences peptidiques.

La première voie consiste à exploiter les ressources du vivant pour générer de potentiels peptides bioactifs ; la deuxième voie consiste à synthétiser des librairies de peptides.

### 2.1. Peptides naturels

Les peptides naturels peuvent être obtenus par extraction à partir d'un organisme, ou bien de manière indirecte par protéolyse enzymatique.

### 2.1.1. Peptides extraits

1) Des peptides antimicrobiens (AMPs) sont produits par une très grande variété d'organismes – microorganismes (bactériocines), insectes, amphibiens, plantes, mammifères dont les humains - dans le but de se défendre contre les pathogènes [218]. Ces peptides, en tant qu'éléments clés de l'ancien système immunitaire inné, présentent une gamme étendue d'activités antimicrobiennes (antivirale, antibactérienne, antifongique et antiparasitique [219]). Les plantes, avec 360 peptides antimicrobiens recensés (« The AMP Database ») et un très grand nombre qui restent encore à découvrir, sont des candidats d'intérêt pour la production de conservateurs alimentaires et de nouveaux antibiotiques [219]. Il est en effet urgent de trouver des alternatives aux thérapies conventionnelles pour contrer l'augmentation croissante du nombre d'infections résistantes. Ces peptides sont produits dans tous les organes de la plante et appartiennent à plusieurs classes, dont les majoritaires sont les défensines, les cyclotides (peptides cycliques), les protéines de transfert des lipides et les thionines. L'ensemble des AMPs partagent toutefois un certain nombre de caractéristiques structurales, telles que (i) une grande quantité de glycine et cystéine, (ii) une grande majorité d'acides aminés cationiques, (iii) la présence de domaines hydrophobes et (iv) une longueur comprise entre 12 et 55 acides aminés [220]. La présence d'un grand nombre de cystéines a pour effet notable d'augmenter la stabilité de la structure en formant des ponts disulfures ;

2) Les peptides cycliques naturels sont présents chez les bactéries, les champignons, les algues et les plantes. Ces composés montrent un large spectre d'activités biologiques (anticancéreux, antimicrobiens, antiinflammatoires, etc.) et une extrême stabilité par rapport à leurs homologues linéaires [221]. De petite taille (souvent inférieure à 10 acides aminés), peu toxiques (vu leur nature peptidique) et par ailleurs hautement sélectifs pour leurs cibles, ils présentent toutes les qualités pour être valorisés comme agents thérapeutiques. Les peptides cycliques ont la particularité de pouvoir contenir un ou plusieurs acides aminés non protéinogènes ; c'est le cas de la tyrocidine, un décapeptide bactérien aux propriétés antibiotiques qui possède un résidu ornithine ;

3) Comme déjà évoqué dans cette **Annexe 2**, les propriétés chélatrices des sidérophores bactériens sont exploitées, dans le cadre médical, pour éliminer un excès de fer circulant.

### 2.1.2. Peptides de protéolyse enzymatique

Selon la définition établie au début des années 2000 (Kitts and Weiler, 2003),[222] les peptides bioactifs (BP) sont considérés comme des fragments protéiques spécifiques, généralement obtenus par voie enzymatique (par analogie avec le processus de digestion *in vivo* des protéines fonctionnelles), et présentant un impact positif sur le fonctionnement du corps humain et la santé [223].

En plus d'une activité hormonale, les BP montrent un large spectre de propriétés thérapeutiques, avec des actions antimicrobienne [224], antithrombotique [225], antihypertensive [226] [227], opioïde [228], anticancéreuse [229], immuno-modulatoire, de chélation des minéraux [49] [61] et antioxydante [230].

Afin de générer un très grand nombre de séquences peptidiques, les industriels mettent généralement en œuvre des protéases non spécifiques à large spectre (protéases acides, neutres ou basiques) [216]. Ce protocole conduit à des hydrolysats complexes contenant plus d'une centaine de peptides, parmi lesquels certains pourront présenter une activité d'intérêt. Classiquement, les BP sont caractérisés par (i) une taille comprise entre 2 et 20 acides aminés et par (ii) la présence d'acides aminés hydrophobes en plus de proline, lysine et arginine [223].

Par ailleurs, il est possible d'influer sur la variété des produits obtenus et sur les performances du procédé en jouant sur la spécificité de coupure (nature de la protéase) et sur les conditions opératoires (température, pH, durée d'hydrolyse).

Un large panel de ressources d'origines animale et végétale a déjà révélé la présence de BP, parmi lesquelles : les animaux d'élevage (poulet [231], porc [103] [232], canard [71]), les poissons (morue [84] [49], thon [233], anchois [53], goberge [61] [52]) et autres ressources marines (crustacés [234], ascidies [74], coquille d'arche [235]), le lait et les produits laitiers [236] [237] [238] [60] [226] [125] [239], les plantes comestibles (mais, soja, noisette, murier, noix, pois chiche [230] [62], haricot [65], noix [63], palmier [67]) et d'autres plantes (chanvre [230], euphorbe [68], fabacée [240]).

La production de BP apparait donc comme une excellente voie pour valoriser les nombreux coproduits de l'industrie alimentaire et de transformation d'agroressources.

### 2.2. Peptides de synthèse

L'approche classique consiste à synthétiser des peptides bioinspirés, en prenant comme modèle soit des fragments d'une protéine fonctionnelle, soit un peptide bioactif extrait d'un organisme. Par ailleurs, une approche émergente vise à concevoir de nouveaux peptides par modélisation *in silico* [207].

La synthèse en phase solide (SPS) est devenue depuis une vingtaine d'années la technique de choix pour produire des librairies peptidiques [241]. En effet, le protocole (i) est complètement automatisé, (ii) autorise la synthèse de nombreux peptides en parallèle et (iii) permet de faciliter grandement les étapes de purification. Sous réserve d'une optimisation parfaite des différentes étapes d'un cycle SPS (excellent rendement obligatoire) - protection du $NH_2$ de l'acide aminé à coupler, activation du COOH de l'acide aminé à coupler, protection des fonctions latérales du peptide greffé, déprotections - il est possible de fabriquer des peptides à longue chaine.

La traditionnelle synthèse en phase liquide est, quant à elle, beaucoup plus longue et fastidieuse mais permet de produire de bien plus grandes quantités de peptide, sans aucun problème de pureté.

### 2.2.1. Synthèse de peptides naturels

Les peptides naturels synthétisés (i.e. contenant des acides aminés protéinogènes et des liaisons amide classiques) sont criblés sur des tests d'activité biologique. Les peptides d'intérêt identifiés sont ensuite :

1) Soit utilisés sous cette forme dans l'optique d'une administration par voie parentérale (injection intraveineuse, etc.) ou bien par voie orale avec une protection adéquate (enrobage, etc.) ;

2) Soit modifiés chimiquement dans l'optique d'une administration par voie orale classique.

### 2.2.2. Synthèse de peptides modifiés et peptidomimétiques

La modification chimique d'un peptide natif a pour objectif de le protéger contre l'action des peptidases, rendant ainsi possible son utilisation *per os*.

La stratégie la plus courante est de modifier les parties C et N terminales (par N-acétylation, ou N-amidation par exemple) pour éviter l'action des exopeptidases.

Une autre approche consiste à produire des analogues optimisés conservant les propriétés bioactives du peptide natif, (i) en remplaçant certains résidus par des acides aminés moins sensibles à la dégradation (comme l'acide aminé D ou des acides aminés non naturels), (ii) ou en produisant un dérivé cyclisé beaucoup plus stable.

Enfin, une stratégie pointue vise à produire des peptidomimétiques, c'est-à-dire des petites molécules actives construites sur le modèle du peptide natif et uniquement à partir d'acides aminés non naturels.

# ANNEXE 3-1 : étude bibliographique IMAC (peptides)

## Peptides non phosphorylés, phosphopeptides, acides aminés

**Classification des acides aminés selon leur dureté (HSAB)**

Base molle de Lewis: **C (Cys), F (Phe), M (Met)**
Base intermédiaire de Lewis: **H (His), N (Asn), Q (Gln), W (Trp)**
Base dure de Lewis: **D (Asp), E (Glu), K (Lys), R (Arg), S (Ser), T (Thr), Y (Tyr), C*, M*, S*, T*, Y***
Non classé: **G (Gly), P (Pro), A (Ala), V (Val), L (Leu), I (Ile)**

*** : C*, M*, S*, T* et Y*** correspondent à cystéine-, méthionine-, sérine-, thréonine- et tyrosine O-phosphate

**Légende**

**M II:** Cu II / Ni II / Co II / Zn II
**IDA:** acide iminodiacétique
**NTA:** acide nitrilotriacétique
**SDVB:** styrène-divinylbenzène
**PVA:** alcool polyvinylique

**"/"** optimisation d'un paramètre (plusieurs tests)
**"+"** plusieurs paramètres simultanément (1 seul test)
**"→"** plusieurs paramètres séquentiellement (1 seul test)
**"NC"** non communiqué dans la publication

**élution:** C (X) = élution par COMPETITION (agent compétiteur)
P = élution par PROTONATION

**MS/MS:** instrumentation (nombre total d'étapes pour l'identification, dont IMAC)

Acide DUR / Acide INTER / Acide MOU — Base DURE / Base INTER / Base MOLLE

**Peptides non phosphorylés**

| n° | type | gel | poreux | agent (denticité) | métal | groupes donneurs VISES par les auteurs | PARAMETRES IMAC: pH equilibage | pH binding | pH élution | élution | MS/MS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 64 | colonne | chitosane | oui | IDA (3) | Zn II | R, Q, K, S, C, L + I (COOH, CO) | 6 | 8 | 6 | C (NH3) | LC-ESI (3) |
| 159 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Cu II | C, -NH2, SH | 2 | 8.2 | 2 | P | FI-ESI (2) |
| 63 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Fe III | E (COOH), D (COOH), H (imid), S* (phosph), C | 5.5 | 6.5 | 8.5 | C (phosph) | LC-ESI (3) |
| 35 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Fe III | E, D / DED, EEE | 5.5 | 7 | 8 | C (phosph) | Maldi (4) |
| 36 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Fe III / Ca II | E, D, Q, K, P | 5.5 | 7 | 8.1 | C (phosph) | Maldi (3) |
| 60 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Fe III | D, E | 5.5 | 8 | 8 | C (phosph) | LC-ESI (3) |
| 54 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Fe III | H, K, R, G | 3.6 | 4.4 | 4.5 | C (phosph) | non |
| 168 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Cu II / Ni II | NH2 en alpha (primaire), W (non spécifique) | 5/.../11 | 5/.../11 | 5/.../11 | C (phosph+borate) | LC-PD (?) |
| | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Ni II | nb: pour peptide sans H, ni C | 8.5 | 8.5 | 8.5 | C (phosph+borate+NH3) | |
| 250 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Cu II / Ni II | NH2 en alpha (primaire) | 5/.../11 | 5/.../11 | 5/.../11 | C (phosph+borate) | LC-PD (?) |
| | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Cu II | nb: pour peptide sans H, ni W | 7.5 | 7.5 | 7.5 → 5 | P + C (phosph+borate) | |
| | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Ni II | | 8.5 | 8.5 | 8.5 | C (phosph+borate+NH3) | |
| 156 | colonne | silice | oui | NTA (4) | Ni II | H | 7.4 | 7.4 | 7.4 | C (imid) / P | online CE-ESI (2) |
| | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Cu II | | | | | | |
| | colonne | SDVB | oui | IDA (3) | Cu II | | | | | | |
| 251 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Co II / Ni II | H, M: H-(X)n-H, H-(X)n-M, M-(X)n-H [x: 0 à 12 ] nb: pas C par contre | 7.4 | 7.4 | NC | C (EDTA) [NaCl: 0.5M] | LC-ESI (?) |
| 169 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Ni II | H, M, Y, P, I, L | 6.8 | 6.8 | 4 | P | LC-ESI (?) |
| 97 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Fe II | NC (pas de groupe spécifiquement visé) | 6.0 | 6.0 | NC | C (EDTA) | LC-ESI (3) |
| 61 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Fe II | NC (pas de groupe spécifiquement visé) | 7.6 | 7.6 | 3 | P | LC-ESI (3) |
| 49 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Fe II | NC (pas de groupe spécifiquement visé) | 5.0 | 5.0 | 8 | C (OH- ) | LC-ESI (3) |
| 170 | batch | agarose magn | oui | IDA (3) | Ni II | NC | NC | 7.5 | 0 | P | Maldi (?) |

**Peptides phosphorylés**

| n° | type | gel | poreux | agent (denticité) | métal | groupes donneurs VISES par les auteurs | PARAMETRES IMAC: pH equilibage | pH binding | pH élution | élution | MS/MS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 84 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Fe III | phosphate (S*, Y*) | 3.5 (2.9) | 3.5 (2.9) | 3.5 → 10.5 | C (OH- + NH3) | online IMAC-ESI (1) |
| 85 | colonne | SDVB | oui | IDA (3) | Fe III | phosphate (S*) | pas fait | 3 | 4.5 | C (phosph + NH3) | online LC-ESI (2) |
| 151 | batch | PVA | oui | phosphate | Ti IV | phosphate (T*, S*, Y*, C*, M*) | NC | 2.5 | 11.91 | C (OH- + NH3) | LC-ESI (2) |
| 86 | colonne | SDVB | oui | IDA (3) | Fe III | phosphate (S*, T*) | 3.5 | < 3.4 | 8 | C (phosph) | LC-ESI (2) |
| 87 | batch | SDVB | oui | IDA (3) | Fe III | phosphate | < 3.4 | 3 | 0.8 | C(TFA) | LC-ESI (2) |
| 88 | colonne | SDVB | non | poly IDA (3) | Fe III | phosphate | 2.5 | 2 | ? | C (OH- + NH3) | LC-ESI (2) |
| 89 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Fe III | phosphate (Y*) | 3.3 (2.9) | 3.3 (2.9) | 8.7 | C (OH- + NH3) | LC-ESI (2) |
| 90 | colonne | silice | non | IDA (3) | Fe III | phosphate | 6 | 2.5 | 6 | C (phosphosérine) | non |
| 91 | colonne | agarose | oui | NTA (4) | Fe III | phosphate | < 2.9 | chargés secs | 7 | C (phosph) | LC-ESI (2) |
| | colonne | agarose | oui | ? | Ga III | phosphate | < 3.0 | chargés secs | 7 | C (phosph) | LC-ESI (2) |
| 92 | colonne | SDVB | oui | IDA (3) | Fe III | phosphate | < 3.9 | < 3.9 | 2 | C (ascorbate) | online LC-ESI (2) |
| | colonne | silice | ? | NTA (4) | | | | | | | |
| 93 | spin tube | agarose | oui | NTA (4) | Fe III | phosphate (S*, T*, Y*, H*) | 2.0 | 2.0 | NC | C (base) | LC-ESI (2) |
| | spin tube | nanoparticule | ? | oxyde | Fe III | | | | | | |
| | spin tube | film | ? | 2 stéarate (2*1=2) | Fe III | | | | | | |

**Acides aminés**

| n° | type | gel | poreux | agent (denticité) | métal | groupes donneurs VISES par les auteurs | PARAMETRES IMAC: pH equilibage | pH binding | pH élution | élution | MS/MS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 252 | batch | agarose | oui | IDA (3) | Fe III | phénol (Y), indole (W) | 5.5 | 5.5 | NC | NC | non |
| | batch | agarose | oui | IDA (3) | Fe III | phénol (Y), indole (W) | 8.0 | 8.0 | NC | NC | non |

# ANNEXE 3-2 : étude bibliographique IMAC (protéines)

## Protéines non phosphorylées, protéines taggées histidine, phosphoprotéines

**Classification des acides aminés selon leur dureté (HSAB)**

Base molle de Lewis: **C (Cys), F (Phe), M (Met)**
Base intermédiaire de Lewis: **H (His), N (Asn), Q (Gln), W (Trp)**
Base dure de Lewis: **D (Asp), E (Glu), K (Lys), R (Arg), S (Ser), T (Thr), Y (Tyr), C*, M*, S*, T*, Y***
Non classé: **G (Gly), P (Pro), A (Ala), V (Val), L (Leu), I (Ile)**

*** : C*, M*, S*, T* et Y*** correspondent à cystéine-, méthionine-, sérine-, thréonine- et tyrosine O-phosphate

**Légende**

**M II:** Cu II / Ni II / Co II / Zn II
**IDA:** acide iminodiacétique
**NTA:** acide nitrilotriacétique
**SDVB:** styrène-divinylbenzène
**PVA:** alcool polyvinylique

**"/"** optimisation d'un paramètre (plusieurs tests)
**"+"** plusieurs paramètres simultanément (1 seul test)
**"→"** plusieurs paramètres séquentiellement (1 seul test)
**"NC"** non communiqué dans la publication

**élution:** C (X) = élution par COMPETITION (agent compétiteur)
P = élution par PROTONATION

**MS/MS:** instrumentation (nombre total d'étapes pour l'identification, dont IMAC)

Acide DUR / Acide INTER / Acide MOU — Base DURE / Base INTER / Base MOLLE

**Protéines**

| n° | type | gel | poreux | agent (denticité) | métal | groupes donneurs VISES par les auteurs | PARAMETRES IMAC: pH equilibage | pH binding | pH élution | élution | MS/MS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 158 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Cu II | C, H, W | 7.2 | 7.2 | 7.2 → 7.8 | C (OH-) + C (NH3) | non |
| 90 | colonne | silice1/silice2 | oui/**non** | IDA (3) | Ni II | C, H, W | NC | NC | 6 | C (phosph) + dimin ionic inter | non |
| | colonne | silice1/silice2 | oui/**non** | IDA (3) | Co II | C, H, W | NC | NC | 7 | C (phosph) + dimin ionic inter | non |
| 172 | batch+col | agarose | oui | IDA (3) | Ni II | H | 7 | 7 | 7 | C (imidazole) | non |
| 167 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | M II | H | 7 | 7 | 7 | C (imidazole) | non |
| | colonne | agarose | oui | IDA (3) | M II | | 6 | 6 | 6 | C ( imidazole) | non |
| 171 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Ni II | H | 7.2 | 7.2 | 7.2 → 4 | P | non |
| 174 | colonne | agarose | oui | TED (5) | Cu II | H | 7 | 7 | 7 | C (imidazole) | non |
| | colonne | agarose | oui | TED (5) | Cu II | H | 7 | 7 | 7 → 4 | P | non |
| 173 | colonne | agarose | oui | NTA (4) | Ni II | H | 7 | 7 | 8 | C (imidazole) | non |
| 175 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | M II | H, C | 7 | 7 | 7 →3.6 | P | non |
| | colonne | agarose | oui | IDA (3) | M II | | 7 | 7 | 7 | C (imidazole) | non |
| 162 | colonne | PEVA | oui | CM-Asp (4) | Ni II / Co II | C, H, W | 7 | 7 | 7 | C (imidazole) | non |
| 251 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Co II / Ni II | H, M | 7.4 | 7.4 | 7.4 | C (EDTA) | LC-ESI (?) |
| 176 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | M II | NC | 7 | 7 | 7 → 4 | P | non |
| | colonne | agarose | oui | IDA (3) | M II | NC | 7 | 7 | 7 → 6 → 5 → 4 | P | non |
| | colonne | agarose | oui | IDA (3) | M II | NC | 7 | 7 | 7 | C (imidazole) | non |
| 253 | colonne | SDVB | oui | IDA (3) | Cu II / **Ni II** | NC | 6.5 | 6.5 | 6.5 | C (phosph) + dimin ionic inter | non |

**Protéines taggées histidine**

| n° | type | gel | poreux | agent (denticité) | métal | groupes donneurs VISES par les auteurs | PARAMETRES IMAC: pH equilibage | pH binding | pH élution | élution | MS/MS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 155 | colonne | PEVA | oui | IDA (3) | M II | tag 6 HIS | 8 | 8 | 8 | C (imidazole) | non |
| | | agarose | oui | IDA (3) | Ni II | tag 6 HIS | 8 | 8 | 8 | C (imidazole) | non |
| 254 | batch + col | hydrogel PAAA | oui | 2 COOH (2*1=2) | Ni II | tag 6 HIS | 8 | 8 | 8 | C (imidazole) | non |
| 255 | batch + col | agarose | oui | NTA (4) | Ni II | tag 6 HIS | 7.4 | 6 | 6 | C (imidazole) | non |
| | batch + col | agarose | oui | CM-Asp (4) | Co II | | 7 | 7 | 7 | C (imidazole) | non |
| 256 | batch | silice magn | oui | IDA (3) | Ni II | tag 6 HIS | 7 | 7 | NC | C (imidazole) | non |
| 253 | colonne | SDVB | oui | IDA (3) | Cu II / **Ni II** | tag 6 HIS | 8 | 8 | 8 | C (imidazole) | non |

**Protéines phosphorylées**

| n° | type | gel | poreux | agent (denticité) | métal | groupes donneurs VISES par les auteurs | PARAMETRES IMAC: pH equilibage | pH binding | pH élution | élution | MS/MS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 252 | batch | agarose | oui | IDA (3) | Fe III | phosphate | 5.5 | 5.5 | NC | NC | non |
| | batch | agarose | oui | IDA (3) | Fe III | phosphate | 8.0 | 8.0 | NC | NC | non |

# ANNEXE 3-3 : étude bibliographique IMAC (autres composés)

**Classification des acides aminés selon leur dureté (HSAB)**

Base molle de Lewis: **C (Cys), F (Phe), M (Met)**
Base intermédiaire de Lewis: **H (His), N (Asn), Q (Gln), W (Trp)**
Base dure de Lewis: **D (Asp), E (Glu), K (Lys), R (Arg), S (Ser), T (Thr), Y (Tyr), C*, M*, S*, T*, Y***
Non classé: **G (Gly), P (Pro), A (Ala), V (Val), L (Leu), I (Ile)**

*** : C*, M*, S*, T* et Y*** correspondent à cystéine-, méthionine-, sérine-, thréonine- et tyrosine O-phosphate

**Légende**

**M II:** Cu II / Ni II / Co II / Zn II
**IDA:** acide iminodiacétique
**NTA:** acide nitrilotriacétique
**SDVB:** styrène-divinylbenzène
**PVA:** alcool polyvinylique

**"/"** optimisation d'un paramètre (plusieurs tests)
**"+"** plusieurs paramètres simultanément (1 seul test)
**"→"** plusieurs paramètres séquentiellement (1 seul test)
**"NC"** non communiqué dans la publication

**élution: C (X) =** élution par COMPETITION (agent compétiteur)
**P =** élution par PROTONATION

**MS/MS:** instrumentation (nombre total d'étapes pour l'identification, dont IMAC)

Acide DUR / Base DURE
Acide INTER / Base INTER
Acide MOU / Base MOLLE

**Ligands synthétiques avec imidazole**

| n° | type | gel | poreux | agent (denticité) | métal | groupes donneurs VISES par les auteurs | PARAMETRES IMAC pH equilibage | pH binding | pH élution | élution | MS/MS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 257 | non greffé | solution | NC | NTA (4) | Ni II | imidazole (1/2/6 unités par ligand) | NC | 6.75 | NC | NC | non |
| | batch | agarose | oui | NTA (4) | Ni II | imidazole (1/2/6 unités par ligand) | NC | 7.33 | NC | NC | non |

**Métabolites bactériens (dont sidérophores)**

| n° | type | gel | poreux | agent (denticité) | métal | groupes donneurs VISES par les auteurs | PARAMETRES IMAC pH equilibage | pH binding | pH élution | élution | MS/MS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 161 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Fe III | catecholate, hydroxamate, phénolique, carboxylate | 7.4 - 7.6 | 7.4-7.6 | 7.4 → 7.6 | C (EDTA) | LC-ESI (2) |
| 160 | colonne | agarose | oui | penta (5) + IDA (3) | Yb III + Cu II | 3 hydroxamate (DFOB) + imid/pyrimidine/NH2(BLM) | 9 | 9 | 9 → 4-5 | P | LC-ESI (2) |
| 165 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Ni II | hydroxamate | 9 | 9 | 5.5 | P | LC-ESI (2) |
| 166 | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Ni II | hydroxamate | 8 | 8 | 8 | C (imidazole) | non |
| | colonne | agarose | oui | IDA (3) | Ni II | hydroxamate | 8 | 9 | 5.7 | P | non |

**Substances humiques**

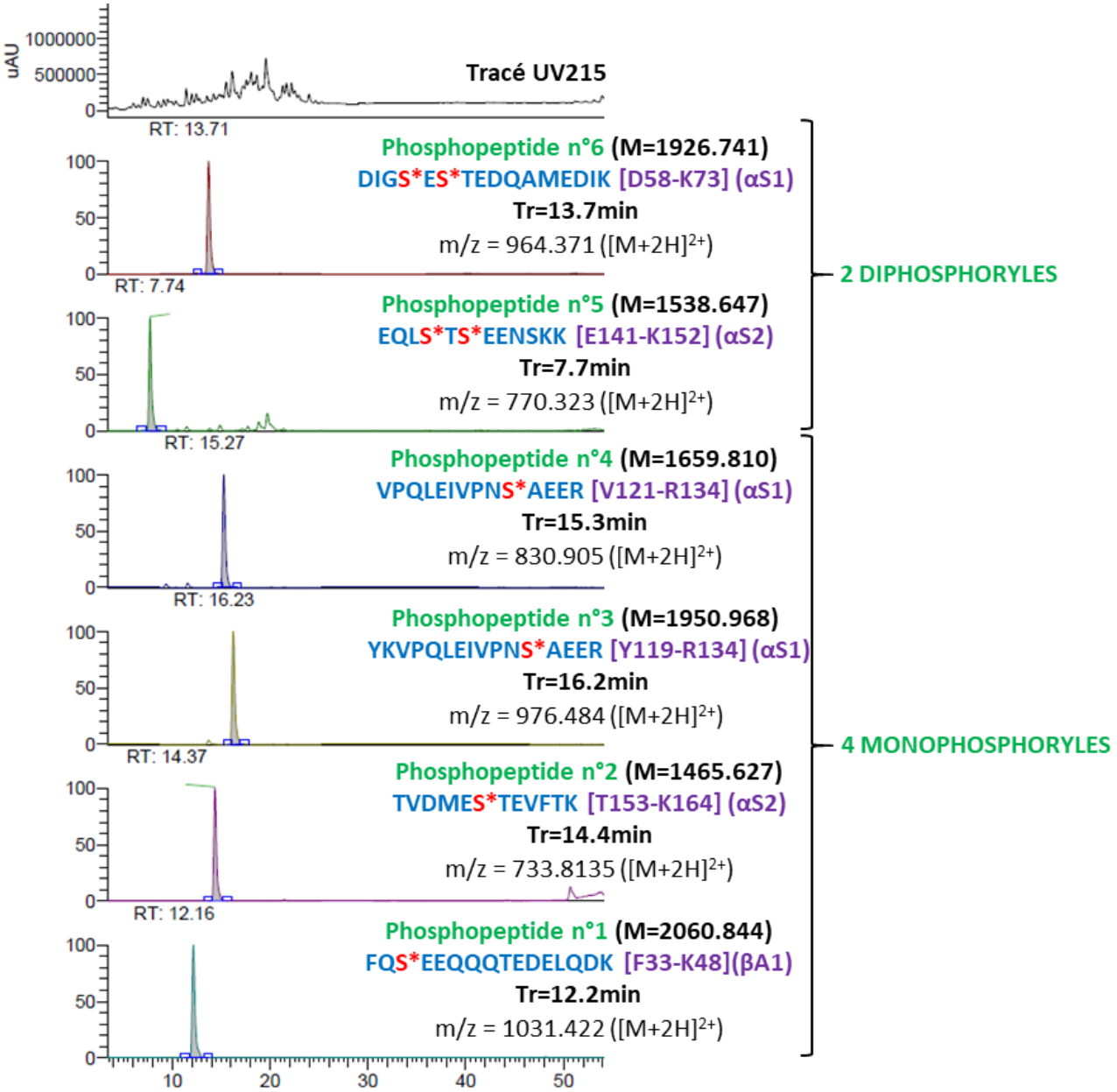
| n° | type | gel | poreux | agent (denticité) | métal | groupes donneurs VISES par les auteurs | PARAMETRES IMAC pH equilibage | pH binding | pH élution | élution | MS/MS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 153 | col (hte P) | cellulose | oui | HYPHAN (3) | Fe III | acides humiques / fulviques | 4 | NC | 5 → 12 | C (OH-) | non |
| | col (basse P) | cellulose | oui | HYPHAN (3) | Fe III | acides humiques / fulviques | 4 | NC | 4 →12 | C (OH-) | non |
| | colonne | SDVB | oui | IDA (3) | Fe III | acides humiques / fulviques | 4 | NC | 4 → 12 | C (OH-) | online ICP (?) |

**Composés phénoliques**

| n° | type | gel | poreux | agent (denticité) | métal | groupes donneurs VISES par les auteurs | PARAMETRES IMAC pH equilibage | pH binding | pH élution | élution | MS/MS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 154 | colonne | chitine | oui | NH2 | Fe III (Fe II) | noyau aroma avec 2 OH (catechol), 3 OH (pyrogallol) | NC | NC | NC | hydrophobie | non |

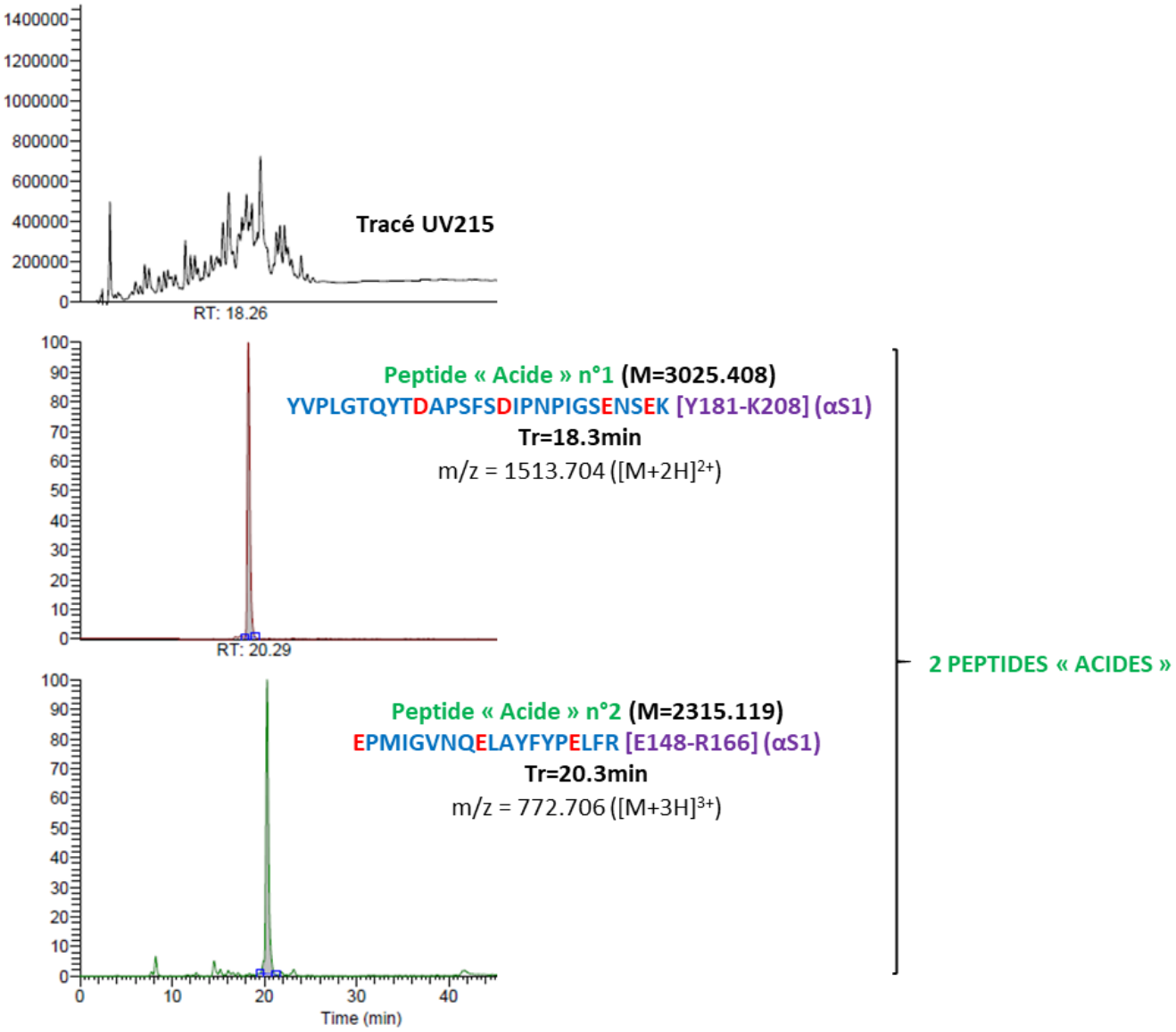
# ANNEXE 4-1 : identification MS de peptides d'intérêt dans l'hydrolysat trypsique de caséines

Peptides phosphorylés



# ANNEXE 4-2 : identification MS de peptides d'intérêt dans l'hydrolysat trypsique de caséines

Peptides non phosphorylés possédant des propriétés acides



# ANNEXE 5 : extrait fiche technique colonne ProPac IMAC-10



### 3.3. Charging the Column: IRON, GALLIUM, ZIRCONIUM

*3.3.1. Selecting Metal of Choice*

Once the column is loaded with your metal of choice, we do not recommend reloading the column with a different metal.

*3.3.2. Testing the Column*

Once the column is loaded with metal, the isocratic Quality Assurance test cannot be performed. Do not run the Lot Validation Quality Assurance test unless you plan on using the column in the copper form.

*3.3.3. Pumping Metal Solution*

If you plan on running the metal solution through your pump, we recommend flushing the lines with DI water prior to rinsing with metal solution. Also, rinse lines with DI water, then EDTA solution following metal loading.

*3.3.4. Mobile Phase Preparation*

| | |
|---|---|
| Solution A: | 20 mM formic acid |
| Solution B: | 20 mM formic acid titrated to pH 10 with ammonium hydroxide |
| Solution C: | 25 mM ferric chloride + 100mM acetic acid |
| Solution D | 50 mM EDTA+0.5M NaCl pH 4.0 |

| | |
|---|---|
| RINSE: | Rinse the column with mobile phase A for 3 column volumes. |
| CHARGE: | Charge the column with 3 column volumes of mobile phase C. |
| RINSE: | Rinse the column with 20 column volumes of mobile phase A. |

Prepare the metal solution by dissolving the metal chloride in glacial acetic acid then diluting to volume.
Once the column is charged, it can be used without subsequent re-charging. Columns may be used for up to three months without re-charging. If column performance is compromised then the column should be cleaned, according to the method described in Section 4.4. Before cleaning the column, use 30 column volumes of solution D to strip the column of metal. After cleaning, re-charge the column with the above protocol. Equilibrate the column with solution A until the UV baseline stabilizes (approximately one hour).

*3.3.5. Stripping the Metal Off the Column*

Strip the column with 30 column volumes of solution D (see section 3.3.4)
Flush the system and column with 10 column volumes of solution A (of section 3.3.4) or 10 mL whatever is greater to remove residual EDTA.

 © 2012 Thermo Fisher Scientific 

# ANNEXE 6 : suivi des collectes et injections en IMAC

## IMAC-Fe$^{III}$

(X $^{ICP-OES}$: fraction X mesurée par ICP-OES)

| Date | Conditions inertes | Fractions collecte cinétique (Nb $_{frac}$ * Vol $_{frac}$ = Vol $_{total}$) ou batch (Vol $_{total}$) + Injections échantillons | | | | Période utilisation du greffage |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | COLLECTES CHARGEMENT | | COLLECTES STRIPPING | | |
| | | CC Chargement | CRC Rinçage Chargement | CS Stripping | CRS Rinçage Stripping | |
| 12/03/19 | non | - | - | ..... | | |
| 13/03/19 | non | 25 injections sur GREFFAGE ≥ 100 % (2 ligands de référence + 17 peptides + 4 blancs + 2 hydrolysats) | | | | 1 mois |
| 14/03/19 | non | | | | | |
| 15/03/19 | non | | | | | |
| 20/03/19 | non | | | | | |
| 21/03/19 | non | | | | | |
| 3/04/19 | non | | | | | |
| 4/04/19 | non | | | | | |
| 5/04/19 | non | | | | | |
| 9/04/19 | non | ..... | | 4 * 0.1 $^{ICP-OES}$ + 2 * 0.4 + 1 * 0.8 + 3 * 1 = 5 mL | 10 mL | |
| | non | 1 injection sur SUPPORT STRIPPE (1 hydrolysat) | | | | |
| 10/04/19 | non | 6 * 0.1 $^{ICP-OES}$ + 2 * 0.2 = 1 mL | 2 * 2 = 4 mL | ..... | | |
| 11/04/19 | non | 42 injections sur GREFFAGE ≥ 68 % (2 ligands de référence + 31 peptides + 9 hydrolysats) | | | | 1 mois |
| 6/05/19 | non | | | | | |
| 7/05/19 | non | | | | | |
| 9/05/19 | non | | | | | |
| | non | ..... | | 5 mL $^{ICP-OES}$ | 10 mL | |
| | non | 1 mL | 4 mL | ..... | | |
| | non | 0 injection sur GREFFAGE = 83 % | | | | ZERO |
| | non | ..... | | 5 mL $^{ICP-OES}$ | 10 mL | |
| | non | 1 mL $^{ICP-OES}$ | 4 mL $^{ICP-OES}$ | ..... | | |
| 13/05/19 | non | 2 injections sur GREFFAGE ≥ 69 % (2 hydrolysats) | | | | 4 jours |
| 14/05/19 | non | ..... | | 5 mL $^{ICP-OES}$ | 10 mL $^{ICP-OES}$ | |
| | non | 1 injection sur SUPPORT STRIPPE (1 hydrolysat) | | | | |

## IMAC-Fe$^{II}$

(X $^{ICP-OES}$: fraction X mesurée par ICP-OES)

| Date | Conditions inertes | Fractions collecte cinétique (Nb $_{frac}$ * Vol $_{frac}$ = Vol $_{total}$) ou batch (Vol $_{total}$) + Injections échantillons | | | | Période utilisation du greffage |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | COLLECTES CHARGEMENT | | COLLECTES STRIPPING | | |
| | | CC Chargement | CRC Rinçage Chargement | CS Stripping | CRS Rinçage Stripping | |
| 12/03/19 | non | - | - | ..... | | |
| 13/03/19 | non | 14 injections sur GREFFAGE ≥ 30 % (2 ligands de référence + 8 peptides + 1 blanc + 3 hydrolysats) | | | | 1 mois |
| 14/03/19 | non | | | | | |
| 15/03/19 | non | | | | | |
| 20/03/19 | non | | | | | |
| 21/03/19 | non | | | | | |
| 3/04/19 | non | | | | | |
| 4/04/19 | non | | | | | |
| 5/04/19 | non | | | | | |
| 9/04/19 | non | ..... | | 4 * 0.1 $^{ICP-OES}$ + 2 * 0.4 + 1 * 0.8 + 3 * 1 = 5 mL | 10 mL | |
| | non | 1 injection sur SUPPORT STRIPPE (1 hydrolysat) | | | | |
| 10/04/19 | oui | 6 * 0.1 $^{ICP-OES}$ + 2 * 0.2 = 1 mL | 2 * 2 = 4 mL | ..... | | |
| 11/04/19 | oui | 42 injections sur GREFFAGE ≥ 10 % (2 ligands de référence + 31 peptides + 9 hydrolysats) | | | | 1 mois |
| 6/05/19 | oui | | | | | |
| 7/05/19 | oui | | | | | |
| 9/05/19 | oui | | | | | |
| | oui | ..... | | 5 mL $^{ICP-OES}$ | 10 mL | |
| | oui | 1 mL | 4 mL | ..... | | |
| | oui | 0 injection sur GREFFAGE = 16 % | | | | ZERO |
| | oui | ..... | | 5 mL $^{ICP-OES}$ | 10 mL | |
| | oui | 1 mL $^{ICP-OES}$ | 4 mL $^{ICP-OES}$ | ..... | | |
| 13/05/19 | oui | 2 injections sur GREFFAGE ≥ 13 % (2 hydrolysats) | | | | 4 jours |
| 14/05/19 | oui | ..... | | 5 mL $^{ICP-OES}$ | 10 mL $^{ICP-OES}$ | |
| | oui | 1 injection sur SUPPORT STRIPPE (1 hydrolysat) | | | | |

# ANNEXE 7 : table des temps de rétention obtenus par IMAC-MS sur les peptides standards non phosphorylés

**Tr (min) des peptides supposés complexants du fer(II) :**

élution par gradient de pH décroissant (pH 7.4 - pH 3.0) sur les 3 supports testés.

| Peptide | IMAC-$Fe^{II}$ | IMAC-$Fe^{III}$ | Support nu (IDA) |
|---|---|---|---|
| HI | 2.1 | 3.1 | 2.0 |
| HF | 2.0 | 3.2 | 1.9 |
| HK | 18.0 | 18.3 | 18.2 |
| HW | 1.9 | 3.6 | 2.0 |
| HH | 2.0 | 4.0 | 2.2 |
| CC | 2.1 | 2.8 | 2.3 |
| βAH | 2.2 | 4.7 | 2.5 |
| DTH | 1.8 | 1.9 | 1.8 |
| DSH | 1.7 | 1.7 | 1.8 |
| DAH | 1.8 | 1.8 | 1.7 |
| DMH | 1.9 | 1.8 | 1.9 |
| EAH | 1.9 | 1.8 | 1.9 |
| GGH | 2.4 | 5.1 | 2.7 |
| RCH | 19.0 | 18.9 | 19.2 |
| GNH | 2.3 | 4.8 | 2.3 |
| CAH | 2.3 | 3.5 | 2.4 |
| RTH | 19.1 | 19.0 | 19.3 |
| HGH | 2.5 | 4.5 | 2.6 |
| HHH | 2.4 | 5.0 | 2.5 |
| GGHa | 13.5 | 13.9 | 14.0 |
| LAN | 1.9 | 2.5 | 1.9 |
| IAN | 2.0 | 2.6 | 2.1 |
| NCS | 2.2 | 3.6 | 2.3 |
| NLS | 2.3 | 3.5 | 2.4 |
| CAC | 2.2 | 3.7 | 2.2 |
| CAAC | 2.3 | 3.8 | 2.5 |

**Tr (min) des peptides supposés complexants du fer(III) :**

élution par gradient de pH croissant (pH 3.0 - pH 9.0) sur les 3 supports testés.

| Peptide | IMAC-$Fe^{III}$ | IMAC-$Fe^{II}$ | Support nu (IDA) |
|---|---|---|---|
| DED | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| RYN | 17.5 | 17.0 | 17.8 |
| RKR | 19.5 | 19.4 | 19.3 |
| RQR | 19.5 | 19.3 | 19.5 |
| KYS | 14.0 | 13.9 | 14.1 |

# ANNEXE 8 : séquences des quatre protéines caséiques (source UniProtKB)

Localisation des 4 séquences candidates après criblage IP-RPLC-HRMS des peptides chélateurs du fer(II) appliqué à l'hydrolysat trypsique de caséines :

en vert les séquences en accord avec une hydrolyse trypsique (coupure après un résidu R ou K)

en rouge les séquences en désaccord avec une hydrolyse trypsique (coupure après un résidu autre que R ou K)

### Caséine beta (M monoisotopique = 23568.311)

RELEELNVPG EIVESLSSSE ESITRINKKI EKFQSEEQQQ TEDELQDKIH PFAQTQSLVY PFPGPIPNSL PQNIPPLTQT PVVVPPFLQP EVMGVSKVKE AMAPKHKEMP FPKYPVEPFT ESQSLTLTDV ENLHLPLPLL QSWMHQPHQP LPPTVMFPPQ SVLSLSQSKV LPVPQKAVPY PQRDMPIQAF LLYQEPVLGP VRGPFPIIV

RELEELNVPG EIVESLSSSE ESITRINKKI EKFQSEEQQQ TEDELQDKIH PFAQTQSLVY PFPGPIPNSL PQNIPPLTQT PVVVPPFLQP EVMGVSKVKE AMAPKHKEMP FPKYPVEPFT ESQSLTLTDV ENLHLPLPLL QSWMHQPHQP LPPTVMFPPQ SVLSLSQSKV LPVPQKAVPY PQRDMPIQAF LLYQEPVLGP VRGPFPIIV

### Caséine alpha S1 (M monoisotopique = 22960.472)

RPKHPIKHQG LPQEVLNENL LRFFVAPFPE VFGKEKVNEL SKDIGSESTE DQAMEDIKQM EAESISSSEE IVPNSVEQKH IQKEDVPSER YLGYLEQLLR LKKYKVPQLE IVPNSAEERL HSMKEGIHAQ QKEPMIGVNQ ELAYFYPELF RQFYQLDAYP SGAWYYVPLG TQYTDAPSFS DIPNPIGSEN SEKTTMPLW

RPKHPIKHQG LPQEVLNENL LRFFVAPFPE VFGKEKVNEL SKDIGSESTE DQAMEDIKQM EAESISSSEE IVPNSVEQKH IQKEDVPSER YLGYLEQLLR LKKYKVPQLE IVPNSAEERL HSMKEGIHAQ QKEPMIGVNQ ELAYFYPELF RQFYQLDAYP SGAWYYVPLG TQYTDAPSFS DIPNPIGSEN SEKTTMPLW

### Caséine alpha S2 (M monoisotopique = 24333.343)

KNTMEHVSSS EESIISQETY KQEKNMAINP SKENLCSTFC KEVVRNANEE EYSIGSSSEE SAEVATEEVK ITVDDKHYQK ALNEINQFYQ KFPQYLQYLY QGPIVLNPWD QVKRNAVPIT PTLNREQLST SEENSKKTVD MESTEVFTKK TKLTEEEKNR LNFLKKISQR YQKFALPQYL KTVYQHQKAM KPWIQPKTKV IPYVRYL

KNTMEHVSSS EESIISQETY KQEKNMAINP SKENLCSTFC KEVVRNANEE EYSIGSSSEE SAEVATEEVK ITVDDKHYQK ALNEINQFYQ KFPQYLQYLY QGPIVLNPWD QVKRNAVPIT PTLNREQLST SEENSKKTVD MESTEVFTKK TKLTEEEKNR LNFLKKISQR YQKFALPQYL KTVYQHQKAM KPWIQPKTKV IPYVRYL

KNTMEHVSSS EESIISQETY KQEKNMAINP SKENLCSTFC KEVVRNANEE EYSIGSSSEE SAEVATEEVK ITVDDKHYQK ALNEINQFYQ KFPQYLQYLY QGPIVLNPWD QVKRNAVPIT PTLNREQLST SEENSKKTVD MESTEVFTKK TKLTEEEKNR LNFLKKISQR YQKFALPQYL KTVYQHQKAM KPWIQPKTKV IPYVRYL

### Caséine kappa (M monoisotopique = 18962.584)

QEQNQEQPIR CEKDERFFSD KIAKYIPIQY VLSRYPSYGL NYYQQKPVAL INNQFLPYPY YAKPAAVRSP AQILQWQVLS NTVPAKSCQA QPTTMARHPH PHLSFMAIPP KKNQDKTEIP TINTIASGEP TSTPTTEAVE STVATLEDSP EVIESPPEIN TVQVTSTA

# ANNEXE 9 : publication protocole de criblage IP-RPLC-HRMS

Analytical and Bioanalytical Chemistry
https://doi.org/10.1007/s00216-020-03037-1

PAPER IN FOREFRONT

## Metabolomics approach based on LC-HRMS for the fast screening of iron(II)-chelating peptides in protein hydrolysates

Cédric Paris[1,2] · Katalin Selmeczi[3] · Bruno Ebel[4] · Loic Stefan[5] · Gizella Csire[3,5] · Céline Cakir-Kiefer[6] · Stéphane Desobry[1] · Laetitia Canabady-Rochelle[4] · Patrick Chaimbault[7]

Received: 5 September 2020 / Revised: 21 October 2020 / Accepted: 28 October 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

**Abstract**
Production of iron-chelating peptides from protein hydrolysates requires robust and adequate screening methods to optimize their purification and subsequently valorize their potential antioxidant properties. An original methodology was developed for direct and sensitive screening of iron(II)-chelating peptides based on ion-pair reverse phase liquid chromatography (IP-RPLC) coupled to high-resolution mass spectrometry (HRMS). Peptide mixture was first added to iron(II) solution to form iron(II)-peptide complexes. Then IP-RPLC-HRMS analysis was conducted on this iron-peptide mixture and on the iron-free peptide solution for comparative mass spectra analysis. This protocol, initially applied to a range of low molecular weight standard peptides, allowed detection of $[(\text{Peptide-H})+^{56}Fe^{II}]^+$ complex ion for iron(II)-chelating peptides (GGH, EAH, DAH, βAH, DMH, DTH, DSH). GGH was added in complex peptide mixtures and targeted analysis of $[(\text{GGH-H})+^{56}Fe^{II}]^+$ complex showed a limit of detection (LOD) below 0.77 mg $L^{-1}$ of GGH. This protocol was finally tested in combination with metabolomics software and additional digital processing for non-targeted search for iron(II)-chelating peptides. Applicability of this new screening methodology has been validated by detection of GGH as iron(II)-chelating peptide when added at 0.77 mg $L^{-1}$ in casein hydrolysate.

**Keywords** Iron (II) · Metal-chelating peptides · Direct screening · Online LC-MS method · Protein hydrolysates

## Introduction

Study and follow-up of reactive oxygen species (ROS) level in living organisms is currently a hot topic. ROS are playing important roles as regulatory agents. For example, homeostasis of nitric oxide pool in case of cardiovascular diseases is essential to fight against oxidative stress and inflammation. However, it is common knowledge that ROS excess induces oxidative damages leading to many pathologies such as cancers or neurodegenerative diseases.

Among the mechanisms leading to ROS in cells, iron(II) is well known to catalyze their production including highly reactive free radical $HO^{\bullet}$ through the Fenton reaction (1). In case of iron overload, uncontrolled increase in pro-oxidant iron(II) level in intracellular labile iron pool (LIP) causes oxidative stress [1, 2].

Sequestration of transition metals [3], and more particularly iron(II), by chelating peptides is one of the promising ways to limit ROS proliferation in cells. Indeed, these peptides are able to slow down ROS production by inhibiting redox activity of metal ions [4]. Thus, antioxidant peptides appear of great interest for applications in the field of pathologies related to oxidative stress [5]. Enzymatic protein hydrolysates are widely used since the last two decades for production of bioactive peptides with health-related functional properties [6]. The high complexity of these kinds of hydrolysates containing up to hundreds of peptides represents a challenge for both identification and purification of bioactive peptides usually present at low concentration [7].

✉ Cédric Paris
cedric.paris@univ-lorraine.fr

✉ Laetitia Canabady-Rochelle
laetitia.canabady-rochelle@univ-lorraine.fr

1 Université de Lorraine, LIBio, 54000 Nancy, France
2 Université de Lorraine, PASM, 54000 Nancy, France
3 Université de Lorraine, CNRS, L2CM, 54000 Nancy, France
4 Université de Lorraine, CNRS, LRGP, 54000 Nancy, France
5 Université de Lorraine, CNRS, LCPM, 54000 Nancy, France
6 Université de Lorraine, INRAE, URAFPA, 54000 Nancy, France
7 Université de Lorraine, LCP-A2MC, 57000 Metz, France

Published online: 02 January 2021

Bioinformatics-driven approach recently emerged for prediction of bioactive peptide sequences; however, it currently suffers from a lack of knowledge concerning the structure-activity relationship [8]. Consequently, usual characterization of bioactive peptides is mainly based on a tedious and time-consuming empirical approach comprising repeated cycles of activity-guided steps of purification until their final identification by mass spectrometry (Fig. 1a) [7, 8].

Several alternatives have been considered to reveal and purify antioxidant compounds in complex mixtures. In particular, online methods combining separative step with free radical scavenging test have been implemented to highlight (poly)phenolic compounds and peptides exhibiting antioxidant properties [9–12]. Nevertheless, this methodology requires high chromatographic resolutions to avoid co-elution for an accurate characterization by mass spectrometry in a second step.

Direct screenings of metal chelators can be achieved using their ability to complex metal ions. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), based on interaction between ligands in mobile phase and immobilized metal ion [13], has often been used to fractionate peptides and improve gastrointestinal absorption of many elements [14–18]. Thus, copper(II) [18–20] or iron(II)-chelating peptides [21, 22] have been purified by this way and, subsequently, identified by LC-MS/MS. However, use of non-volatile mobile phases in standard IMAC necessarily imposes an additional desalting step before MS identification (Fig. 1b). Moreover, the number of free chelating sites remaining for peptide complexation after the immobilization of the transition metal ion on stationary phase (i.e., 2 or 3 free sites depending on the commonly used chelating agents) [23] constitutes a potential bias to confirm peptides' chelating ability. Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) has been largely reported for studying many metal-organic ligand complexes, not only for their speciation but also to access their stoichiometry [24, 25]. The ESI-MS technique is also widely used to study interactions between small synthetic peptides and metal ions and validate the composition of complexes in solution [26–28]. Another work described identification of iron(II)-peptide complexes by ESI-MS after their isolation by IMAC [21]. However, all of the approaches described above imply multi-step and time-consuming protocols and none of them allows a direct screening of iron(II)-chelating peptides.

The aim of the present work was to develop a rapid, simple, and sensitive LC-MS protocol for direct screening of potential iron(II)-chelating antioxidant peptides in complex hydrolysates (Fig. 1c). This protocol is based on a differential LC-HRMS analysis between a protein hydrolysate (control) and the same hydrolysate after incubation with iron(II). This new approach should drastically draw down total duration for highlighting relevant iron(II)-chelating peptides compared to the empirical approach (1 month or more: see Fig. 1a) and to the protocol based on IMAC (1 week or more: see Fig. 1b).

Development was carried out on a fairly large panel of standard peptides, exhibiting sizes of 2 to 10 amino acids and varied sequences. However, the choice of model peptides was intentionally oriented along three criteria. First, we selected a large part of peptides with at least one histidine residue because this specific amino acid is well known for its ability to complex many transition metals. Second, since the main application of antioxidant chelating peptides is their use as oral drugs against oxidative stress, we focused more particularly on di- and tripeptides believed to be bioavailable [29]. Third, peptides containing a motif with three successive acidic residues (D, E)—well known for chelating iron(III)—were also selected to demonstrate the potential specificity of complexation with iron(II).

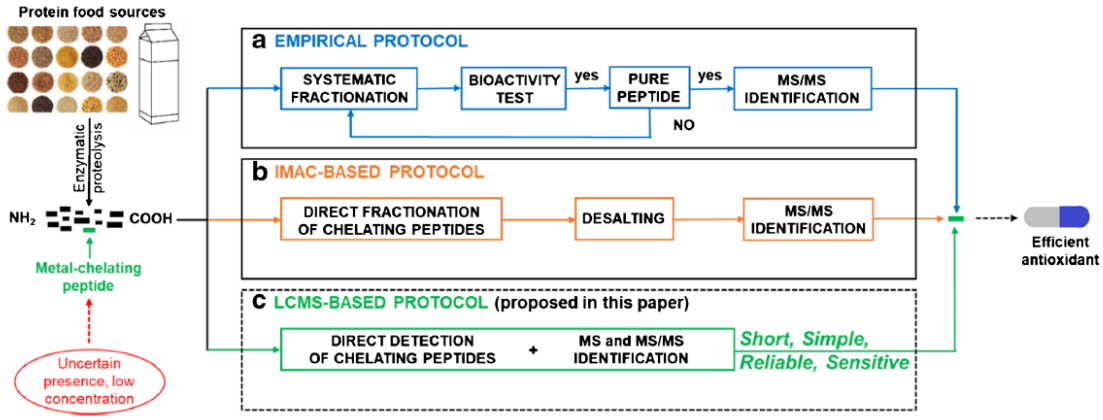



**Fig. 1** Overview of screening methods for metal-chelating peptides in protein hydrolysates. **a** The usual multi-step empirical protocol, **b** the three-step protocol based on immobilized metal affinity chromatography (IMAC) followed by an offline MS step, and **c** the proposed single-step direct protocol based on LC-MS

## Experimental section

### Chemicals and reagents

Majority of synthetic peptides used were purchased from GeneCust (Boynes, France): GGH, NCS, CAH, DAH, HGH, IKP, EAH, DSH, DDD, DTH, DED, DMH, EEE, HHH, IKW, RKR, RQR, WWW, YPISL, HHHHHH, and LLPHHADADY. Their purity degree was greater than 95%. The two peptides γECG (glutathione) and βAH (carnosine) were purchased from Sigma-Aldrich and showed a purity greater than 98%. FDDDK and FDDDA standard peptides were synthetized internally with a purity degree of 98% [30]. Pure stock solutions of peptides were prepared at 10 g $L^{-1}$ in water, except for WWW prepared in a 1:1 methanol/water mixture. Chromatographic eluents were prepared with LC-MS grade methanol (≥ 99.9%), ultra-pure water, and nonafluoropentanoic acid (NFPA, 97%).

### Hydrolysates

A mixture of standard peptides assimilated to a synthetic hydrolysate was built comprising the following 13 peptides, namely γECG, NCS, IKP, DDD, DED, EEE, HHH, IKW, RKR, RQR, YPISL, HHHHHH, and LLPHHADADY. Fifty microliters of each stock solution (10 g $L^{-1}$) was pooled to provide a mixture at 0.77 g $L^{-1}$ in each peptide. This mixture was then diluted by 10 with water to obtain synthetic hydrolysate at 0.077 g $L^{-1}$ of each peptide corresponding to a total concentration of peptide equal to 1 g $L^{-1}$ (Electronic Supplementary Material (ESM) Table S1).

Tryptic casein hydrolysate was prepared at a total peptide concentration of 1 g $L^{-1}$. Sodium caseinate from bovine milk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was solubilized at 5 g $L^{-1}$ in 50 mM sodium bicarbonate, pH 8.0. L-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone-treated trypsin (EC 3.4.21.4) from bovine pancreas (10,000 $N_{\alpha}$-benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride or BAEE units·$mg^{-1}$ enzyme; Sigma-Aldrich) was added at 50 μg $mL^{-1}$. After hydrolysis at 37 °C under gentle shaking for 2 h, the reaction was stopped by lowering the pH to around 2.0 with trifluoroacetic acid. Salt-free hydrolysate was then centrifuged at 10,000*g* for 2 min at 4 °C, and finally, freeze-dried and stored at − 20 °C.

### Study of the iron(II)-peptide complex formation

To work in biologically relevant conditions, iron solutions were prepared as acetate solutions mimicking intracellular labile iron pool in which iron is in a free chelatable and redox-active form [1, 31].

Iron(II) solution was prepared with a 4-fold excess of acetate as iron(II) (25 mM)/acetate (100 mM). Iron(II) chloride ($FeCl_2$) was initially dissolved in glacial acetic acid before its dilution in pure water (pH = 2.7). The solution was then filtrated twice. Iron(III) solution was prepared similarly using iron(III) chloride ($FeCl_3$) (pH = 1.9). All complexation tests were carried out at room atmosphere.

Two control samples were prepared for each complexation test: the first one in absence of iron and the other one with iron(III), under strictly identical concentration conditions than in the presence of iron(II).

#### Complexation by pure peptide

The complexation studies were first carried out for each peptide individually. The stock solution of each peptide (10 g $L^{-1}$, 300 μL) was first diluted with pure water (100 μL) to get a peptide solution at 7.5 g $L^{-1}$ (400 μL). The pH was adjusted, if necessary, just below pH 3.0 with 0.1 M HCl, to optimize further solubilization of iron salt. Then, previously prepared solution of iron(II) acetate (25 mM, 100 μL) was added to the former peptide solution (7.5 g $L^{-1}$, 400 μL) to get the final reaction mixture (500 μL).

The pH was finally adjusted around pH 3.0 using aqueous ammonia (0.25%, w/v) as suggested by Silva et al [32]. The peptide to iron concentration ratio comprised between 1 for the longest peptide (LLPHHADADY) and 5.4 for the shortest one (βAH) (ESM Table S2).

#### Complexation in hydrolysates

The complexation studies were similarly carried out with either the synthetic or tryptic casein hydrolysates. First, the hydrolysate (461.5 μL) and the GGH peptide solution ($C_{GGH}$, 38.5 μL) were mixed for 30 s to get the final peptide solution (500 μL). Different concentrations of GGH were used, i.e., 1 g $L^{-1}$, 0.1 g $L^{-1}$, and 0.01 g $L^{-1}$. In the GGH-spiked hydrolysates, the pH values were adjusted below pH 3.0 with 0.1 M HCl. Then, iron(II) acetate solution (25 mM, 100 μL) was added to 400 μL of the hydrolysate enriched in GGH to get the final reaction mixture (500 μL). The pH value was finally adjusted around 3.0 with aqueous ammonia (0.25%, w/v) (ESM Table S3).

### Flow injection ESI-HRMS

ESI-HRMS analyses in flow injection were realized on a UHPLC-MS system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) consisting in a quaternary U3000 solvent delivery pump connected to a photodiode array detector (PDA) and a LTQ-Orbitrap™ hybrid mass spectrometer. The sample was injected using a T-junction at 10 μL $min^{-1}$ in the chromatographic mobile phase pumped at 0.2 mL $min^{-1}$. The mobile phase was composed of a 1:1 mixture of (A) aqueous solution of NFPA (5 mM) and (B) methanol. MS analyses were carried out in ESI-positive mode ($ESI^+$). The electrospray voltage was

+ 4.5 kV. The capillary temperature was 300 °C. Sheath, auxiliary, and sweep gas flows were set at 40, 5, and 5 (arbitrary units), respectively. Capillary voltage was 46 V. The tube lens, split lens, and front lens voltages were 112 V, − 70 V, and − 6.25 V, respectively. Ion optics parameters used were previously optimized by automatic tuning using highly stable iron(III)-desferrioxamine complex solution at 0.1 g $L^{-1}$ infused in mobile phase (A/B: 50/50) at a flow rate of 5 μL $min^{-1}$. Full scan MS spectra were performed at high resolution ($R = 60{,}000$ at $m/z$ 400) on the Orbitrap™ analyzer from 120 to 2000 $m/z$ to obtain the exact masses of the peptides and iron(II)-peptide complexes. Raw data were processed using the XCALIBUR™ software program (version 2.1, http://www.thermoscientific.com).

### IP-RPLC-ESI-HRMS

Experiments were carried out on the UHPLC-MS system previously described ("Flow injection ESI-HRMS" section) using the same MS parameters. Sixteen microliters of samples was injected onto a $C_{18}$ Alltima reverse phase column (150 × 2.1 mm, 5 μm—Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) equipped with a $C_{18}$ Alltima pre-column (7.5 × 2.1 mm, 5 μm) placed in the oven at 25 °C. The flow rate was 0.2 mL $min^{-1}$ and mobile phases consisted in a mixture of (A) aqueous solution of NFPA (5 mM) and (B) methanol in gradient elution mode.

A short separation program was developed for simple samples analysis (i.e., study of the complexation of pure peptides) in 21 min. A linear gradient was applied from 5 to 98% of B for 10 min. A longer separation program of 36 min was performed for the analysis of hydrolysates. In this case, a linear gradient was applied from 5 to 98% of B for 25 min.

### Data processing

The LC-HRMS raw data were pre-processed using the XCMS online platform (https://xcmsonline.scripps.edu). A two-group comparison analysis was performed between samples incubated with iron(II) and their corresponding iron-free control sample [33]. In practice, raw data of triplicates were subjected to the pairwise experiment using the "HPLC-Orbitrap II" standard parameter setting method for feature detection, retention time correction, alignment of chromatographic peaks, and statistic treatment. Peak detection was run with CentWave method (Δ $m/z = 2.5$ ppm, peak width (10–60), signal to noise threshold = 10). Retention time correction was achieved with the obiwarp method and alignment with the following parameters (minfrac = 0.5, bw = 5, mzwid = 0.015). The Welch's $t$ test (unequal variance) was used as statistical test method ($p$ value < 0.05). The whole data processing is discussed in the "Automated data processing using a metabolomics-like strategy" section.

## Results and discussion

Rapid and direct screening of relevant iron(II)-chelating antioxidant peptides in complex hydrolysates (Fig. 1c) by LC-MS is based on two essential points:

i. The method should discriminate peptides by their iron(II)-chelating ability. The most interesting chelators are supposed to form strong complexes with iron(II) in solution; moreover, the use of ESI-MS has proven its relevance for the observation of stable non-covalent species [25, 34].
ii. The method should reveal the better iron(II) chelators even in complex protein hydrolysates. Use of a selective LC method compatible with mass spectrometry makes it possible to distinguish the possible isomers and isobars. Nevertheless, integrity of iron(II)-ligand complex must be preserved along the LC separation to achieve its detection by ESI-MS.

Additionally, to allow a rapid screening of chelating peptides in complex mixtures, i.e., protein hydrolysates, the huge amount of data collected during the LC-MS run requires an automated processing.

### Detection of the iron(II)-peptide complexes by ESI-HRMS

The screening of iron-chelating peptides is based on a differential LC-HRMS analysis between an iron-free control sample and the same protein hydrolysate incubated with iron(II). Thus, to provide accurate results, iron(II)-peptide complex must not only be detected in ESI-MS but also be preserved during the LC separation. Developed in the early 2000s, ion-pair reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry (IP-RPLC-MS) using perfluorinated carboxylic acids is effective for the separation of underivatized amino acids [35, 36] and small peptides [37] in positive ion mode. A prerequisite was to ensure that iron(II)-peptide complexes are effectively detectable by $ESI^+$-HRMS in such mobile phases. Therefore, the first step was to infuse peptides in LC conditions. Thus, infusion was conducted at 10 μL $min^{-1}$ in the LC flow (0.2 mL.$min^{-1}$), with nonafluoropentanoic acid (NFPA) as ion-pairing agent (for the experimental details, see "Flow injection ESI-HRMS" section). All standard peptides were first infused without any exposure to iron(II) and mass spectra were compared with those obtained from the same peptides put into contact with iron(II) as described by Wu et al [21]. The results presented in Fig. 2 for carnosine (βAH) and RKR (both described in the literature as $Fe^{II}$ chelators [15, 38, 39]), and WWW illustrate the typical behavior of peptides toward iron(II). For the 25 standard peptides evaluated, mass spectra show a set of new mass peaks for samples in contact with $Fe^{II}$ (Table 1) attributable to the monocharged

**Table 1** Retention times and observed masses obtained from the IP-RPLC-ESI$^+$-HRMS analysis (short time gradient) for the free peptides and their iron(II) complex. RAC values are calculated according to Eq. 1

| Peptide | Free peptide | | | Iron(II) complex | | RAC (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mass (u) | $[M+H]^+$ *m/z* | Ret. time (min) | $[(M-H)+^{56}Fe]^+$ *m/z* | Ret. time (min) | |
| CAH | 329.113 | 330.121 | 10.4 | 384.040 | 10.4 | 82 |
| GGH | 269.111 | 270.119 | 10.1 | 324.038 | 10.3 | 55 |
| EAH | 355.148 | 356.156 | 10.1 | 410.075 | 10.2 | 36 |
| DAH | 341.132 | 342.140 | 10.1 | 396.059 | 10.2 | 23 |
| βAH | 226.105 | 227.113 | 10.1 | 281.032 | 10.3 | 18 |
| DMH | 401.135 | 402.143 | 10.5 | 456.063 | 10.4 | 17 |
| DTH | 371.143 | 372.151 | 10.1 | 426.070 | 10.3 | 13 |
| DSH | 357.127 | 358.135 | 10.0 | 412.054 | 10.2 | 11 |
| FDDDK | 638.252 | 639.260 | 10.5 | 693.179 | 10.4 | 7 |
| FDDDA | 581.195 | 582.203 | 9.9 | 636.122 | 10.2 | 3.5 |
| HGH | 349.147 | 350.155 | 10.9 | 404.074 | 10.7 | 2 |
| IKP | 356.241 | 357.249 | 10.8 | 411.168 | 10.6 | 1 |
| LLPHHADADY | 1150.541 | 1151.549 | 11.1 | 1205.469 | 11.0 | 0.8 |
| RQR | 458.269 | 459.277 | 10.8 | 513.196 | 10.7 | 0.7 |
| HHH | 429.186 | 430.194 | 11.2 | 484.113 | 10.9 | 0.3 |
| HHHHHH | 840.363 | 841.371 | 11.4 | 895.291 | 11.4 | 0.3 |
| RKR | 458.306 | 459.314 | 11.2 | 513.233 | 11.0 | 0.1 |
| WWW | 576.247 | 577.255 | 11.9 | 631.174 | 11.8 | 0.1 |
| YPISL | 591.325 | 592.333 | 11.3 | 646.252 | 11.1 | 0.1 |
| EEE | 405.135 | 406.143 | 8.4 | 460.062 | nd | <0.1 |
| DED | 377.106 | 378.114 | 7.7 | 432.033 | nd | <0.1 |
| DDD | 363.090 | 364.098 | 7.3 | 418.017 | nd | <0.1 |
| γECG | 307.082 | 308.090 | 7.3 | 362.009 | nd | <0.1 |
| NCS | 322.093 | 323.101 | 8.0 | 377.020 | nd | <0.1 |
| IKW | 445.267 | 446.275 | 11.3 | 500.194 | nd | <0.1 |

ion $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ as described by Lagarrigue et al. [40]. In all cases, the main peak is shifted by + 53.919 u with respect to the protonated peptide $[M+H]^+$ (Fig. 2), corresponding to the complexation of $^{56}$Fe (55.935 u) by the peptide (55.935–2 × 1.008 = 53.919). Evidence of iron complex formation is reinforced by the isotopic pattern which is in good agreement with the natural relative abundances of $^{54}$Fe (5.85%) and $^{56}$Fe (91.75%). A series of control experiments was carried out with iron(III) to exclude potential oxidation of ferrous ion to ferric ion under ESI$^+$ conditions. Noteworthy, standard peptides incubated with iron(III) show the formation of complex ions $[(M-2H)+Fe^{III}]^+$ which cannot be confused with $[(M-H)+Fe^{II}]^+$ observed after exposure to iron(II). Whatever the standard peptide incubated with iron(II), formation of complex ion $[(M-2H)+Fe^{III}]^+$ was never observed meaning that the iron(II) complex is stable enough to prevent its oxidation.

Positive results of this preliminary set of experiments are essential for development of our future LC-MS protocol for the direct screening of relevant iron(II)-chelating antioxidant peptides in complex hydrolysates. Iron complex formation is not only confirmed by detection of monocharged ion $[(M-H)+Fe^{II}]^+$ in ESI$^+$-MS but formed complexes are also stable in the LC mobile phase of the chosen chromatographic system (IP-RPLC with NFPA as ion-pairing agent). Interestingly, complexation with a weakly chelating peptide such as WWW [41] under ESI-MS conditions was favorable enough to detect the corresponding iron(II) salt. The discrimination of this kind of peptides will be discuss later.

## Evaluation of IP-RPLC for the screening of iron(II)-chelating peptides by ESI-HRMS

Reversed phase ion-pair liquid chromatography coupled to mass spectrometry (RP-IPLC-MS) using perfluorinated carboxylic acids has been widely used for separation of amino acids and small hydrophilic peptides. Deperson et al. even showed that addition of nonafluoropentanoic acid in mobile phase provides sensitivities of detection comparable to formic or acetic acids commonly used in mass spectrometry [42]. However, the behavior toward retention of metal-peptide

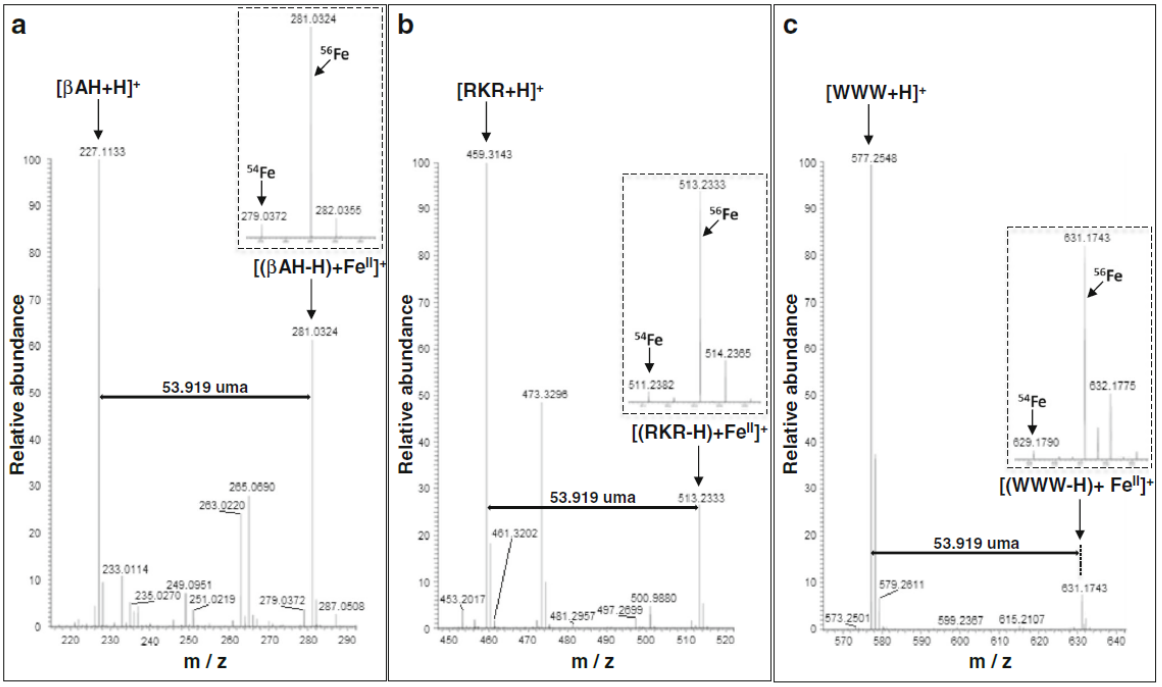



**Fig. 2** ESI-HR mass spectra obtained by flow injection analysis in the presence of iron(II) for **a** βAH, **b** RKR, and **c** WWW. The isotopic pattern of each complex $[(M\text{-}H)+Fe^{II}]^+$ detailed in the dashed inset showing relative contribution of $^{54}Fe$ and $^{56}Fe$

complexes needs to be evaluated and compared to the retention of the free peptide in a view of a differential LC screening. Therefore, IP-RPLC method was first tested on each solution of individual iron(II)-peptide complex before being transposed to hydrolysates. A 21-min short program in gradient elution was applied to separate standard peptides (see details in "Complexation by pure peptide" and "IP-RPLC-ESI-HRMS" sections). The results obtained for 25 model peptides are presented in Table 1.

The retention times of the free peptides and their corresponding iron(II) complexes do not differ by more than ± 0.2 min. Figures 3 a1 and b1 show that GGH, DAH, and their respective iron(II) complexes are co-eluted meaning also that the $[M+H]^+$ ion of the free peptide and the corresponding $[M\text{-}H+^{56}Fe^{II}]^+$ ion of the complex can be observed on the same mass spectrum (Figs. 3a2 and b2). For six peptides (EEE, DED, DDD, γECG, NCS, and IKW), retention time of complexes could not be determined, showing a very poor affinity for iron(II). For the other 21 peptides, the $[(M\text{-}H)+^{56}Fe^{II}]^+$, ion was always detected even for weak chelators as already observed with WWW in section "Detection of the iron(II)-peptide complexes by ESI-HRMS." However, the signal of the $[(M\text{-}H)+^{56}Fe^{II}]^+$ ion is more intense for strong iron(II) chelators.

These results demonstrate that IP-RPLC is suitable for a fast LC-ESI-HRMS screening method of iron(II)-chelating peptides. Two co-eluted chromatographic peaks separated by 0.2 min at the most and exhibiting a mass difference of 53.919 (± 0.001) u between their ion currents might indicate the presence of an iron(II)-chelating peptide. However, their relative intensity needs to be discussed to discriminate peptides of high interest (strong chelators) from the others (weak chelators).

## Effect of the iron to peptide ratio on the complex formation

### The relative abundance of the complex

To compare chelating performance of each peptides, their relative abundance of complex (RAC) was defined as the ratio of chromatographic peak area of $[(M\text{-}H)+^{56}Fe^{II}]^+$ ion ($A_{Complex}$) to $[M+H]^+$ ion of the free peptide ($A_{peptide}$) expressed as a percentage (Eq. 1).

$$RAC = \frac{A_{Complex}}{A_{Peptide}} \times 100 \quad (1)$$

Thus, the higher the intensity of the $[(M\text{-}H)+^{56}Fe^{II}]^+$ peak in the mass spectrum, the higher the RAC value. Looking at Table 1, three categories of peptides emerge based on their RAC.

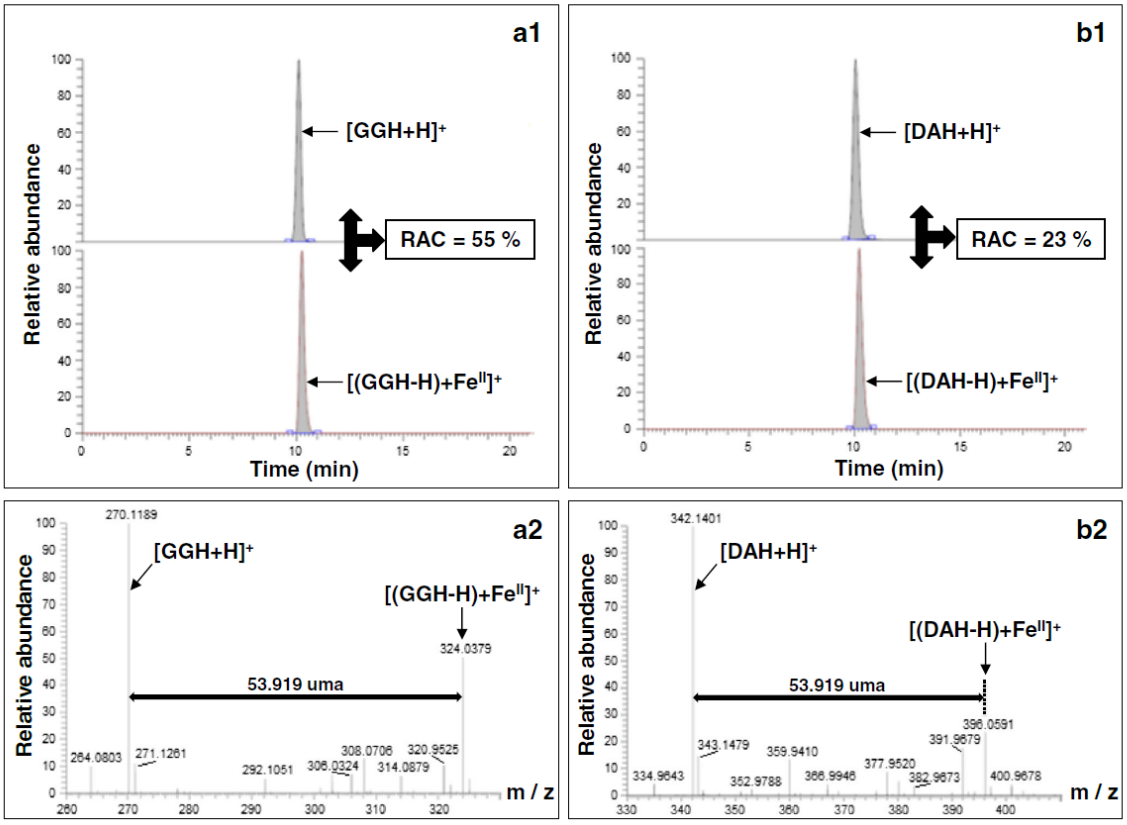



**Fig. 3** Results of the IP-RPLC-ESI+-HRMS analysis of GGH and DAH. The chromatographic profiles (extracted ion chromatograms of the $[M+H]^+$ and $[(M-H)+Fe^{II}]^+$) are shown in **a1** for GGH and **b1** for DAH, and the corresponding HRMS spectrum in **a2** and **b2** respectively. The relative abundance of complex (RAC) is calculated according Eq. 1

i. A first set of ten peptides emerges with a RAC higher than 10% (from 11% for DSH to 82% for CAH) indicating a significant stability of the $[M-H+^{56}Fe^{II}]^+$ complexes during the LC run. Interestingly, all of these tripeptides contain a C-terminal histidine. A tridentate coordination mode involving the terminal $NH_2$, imidazole ring, and terminal $COO^-$ has already been observed with other metals [43] and could explain this high stability of complexes formed between iron(II) and peptide containing histidine in position 3. According to the concept of hard and soft acid base (HSAB) [44], iron(II), as an intermediate Lewis acid, forms more stable coordination complexes with Lewis bases classified as intermediate such as imidazole ring of histidine or terminal $NH_2$. Furthermore, a positive correlation between histidine content and iron-chelating activity has already been observed in purified subfractions of chickpea protein hydrolysates by Torres-Fuentes et al. in 2012 [19]. It is therefore not surprising that these tripeptides were revealed as the best iron(II) chelators by the proposed method.

ii. At the opposite, because of very weak complex ion signal, RAC value cannot be calculated for the 6 peptides having practically no affinity for iron(II), namely EEE, DED, DDD, γECG, NCS, and IKW. Seven peptides can be added to the list with a RAC value of less than 1%, considered insufficient for an iron(II)-chelating peptide of interest. The tripeptide WWW is in this category with a RAC of 0.1%, whereas intensity of its $[M-H+^{56}Fe^{II}]^+$ ion in infusion was higher with a RAC value of 8% (based on the mass spectrum in Fig. 2c). This result is in agreement with the fact that only strong coordination complexes can be easily detected after the LC process contrary to weak ones [25].

iii. The last group, presenting an intermediate behavior, is composed of four peptides having their RAC values between 1 and 10%, namely FDDDK, FDDDA, HGH, and IKP. Interestingly, the tripeptide DDD did not complex iron(II), while the pentapeptides FDDDK and FDDDA gave a moderately stable

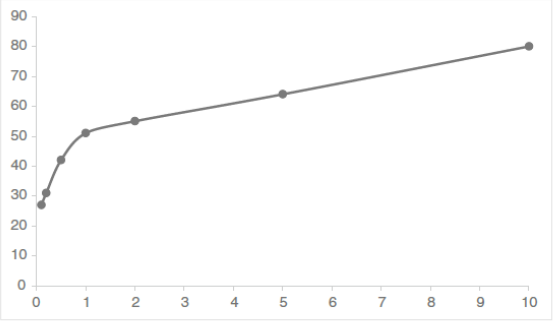



**Fig. 4** Evolution of the relative abundance of complex (RAC) for GGH as a function of the iron(II) to peptide ratio

complex with RACs of 7% and 3.5%, respectively. It seems that additional Phe at the N-terminal of the triacidic backbone may give rise to weak interactions with iron(II) (d-π interaction [45]).

These results show that iron(II)-chelating ability may be evaluated from relative abundance of complex (RAC). However, it is worth examining more deeply this factor to use it as a discriminating parameter. This includes definition of relevant threshold value. Indeed, the crucial question is the possible dependence of the RAC values on the starting conditions of the chelate formation, precisely on the iron(II) to peptide concentration ratio.

### Effect of [iron]/[peptide] ratio on the RAC

We studied influence of initial iron(II) to peptide concentration ratio on final RAC value. Due to its high RAC value, the tripeptide GGH was selected to carry out this study rather than carnosine (CAH has been left aside due to its possible dimerization via oxidation of cysteine residue).

The first set of experiment was conducted using a fixed 1 mM concentration of iron(II). The concentration ratio varied from a 10-fold excess in peptide to a 10-fold excess of iron. The results on the RAC of GGH are presented in Fig. 4. Curve shows two trends: first, with an iron(II) deficiency (excess of peptide), the RAC value increases rapidly until the ratio [$Fe^{II}$]/[peptide] reaches 1. In this area, iron(II) is quickly sequestered to form the chelate. Secondly, in excess of iron(II), the curve increases slowly because complexation reaction is almost complete. The primary conclusion to be drawn from this curve is that the RAC value fluctuates less in excess than in iron deficiency, even if its value depends on [$Fe^{II}$]/[peptide] ratio. Thus, it would be much better to form chelates in excess of iron(II) during sample preparation.

To assess a potential matrix effect, a second set of experiments was performed with GGH added to mixtures of increased complexity, respectively, a synthetic hydrolysate composed of non-chelating peptides and a tryptic casein hydrolysate (Table 2). For hydrolysates, an IP-RPLC method of 36 min was applied to improve small peptide separation in

**Table 2** Values of the parameters used for the screening of peptides in protein hydrolysates (triplicate analysis). *Nd*, not determined (below the limit of detection or no signal for [(M-H)+$^{56}Fe^{II}$]$^+$)

| Peptide | Matrix | [peptide] (μM) | [$Fe^{II}$]/[peptide] | Retention times (min) peptide /iron(II) complex | RAC (%) | Up factor | Down factor |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| γECG | Synthetic hydrolysate | 190 | 26 | 10.5/10.5 | < 0.5 | 0.7 ± 0.2 | 0.95 ± 0.08 |
| NCS | | 180 | 28 | 11.2/Nd | Nd | Nd | 1.2 ± 0.2 |
| IKP | | 160 | 31 | 19.0/19.0 | 1.4 ± 0.3 | 7.6 ± 2.7 | 1.01 ± 0.06 |
| DDD | | 160 | 31 | 10.2/Nd | Nd | Nd | 0.94 ± 0.08 |
| DED | | 150 | 33 | 10.8/Nd | Nd | Nd | 0.9 ± 0.1 |
| EEE | | 140 | 36 | 12.4/Nd | Nd | Nd | 0.9 ± 0.3 |
| HHH | | 130 | 38 | 19.8/19.8 | 1.21 ± 0.03 | 6.3 ± 1.1 | 1.01 ± 0.02 |
| IKW | | 130 | 38 | 20.6/20.6 | < 0.5 | 8.2 ± 3.5 | 1.0 ± 0.1 |
| RKR | | 120 | 42 | 20.0/20.0 | < 0.5 | 18.9 ± 7.1 | 0.97 ± 0.05 |
| RQR | | 120 | 42 | 19.3/19.3 | < 0.5 | 7.5 ± 1.5 | 0.97 ± 0.08 |
| YPISL | | 100 | 50 | 20.6/20.6 | < 0.5 | 11.1 ± 3.3 | 1.0 ± 0.1 |
| HHHHH | | 70 | 71 | 21.1/21.1 | < 0.5 | 4.0 ± 2.2 | 0.9 ± 0.2 |
| LLPHHADADY | | 50 | 100 | 20.2/20.2 | < 0.5 | 4.1 ± 1.5 | 1.0 ± 0.1 |
| GGH | | 231 | 22 | 17.2/17.4 | 115 ± 1 | 82 ± 14 | 1.84 ± 0.01 |
| | | 23.1 | 220 | | 159 ± 8 | 38 ± 5 | 1.65 ± 0.05 |
| | | 2.31 | 2200 | | 125 ± 14 | 20 ± 7 | 1.0 ± 0.1 |
| | Casein hydrolysate | 231 | 22 | 17.2/17.4 | 126 ± 3 | 85 ± 5 | 2.25 ± 0.05 |
| | | 23.1 | 220 | | 279 ± 3 | 56 ± 6 | 6.36 ± 0.21 |
| | | 2.31 | 2200 | | 281 ± 10 | 61 ± 20 | 10.46 ± 0.66 |

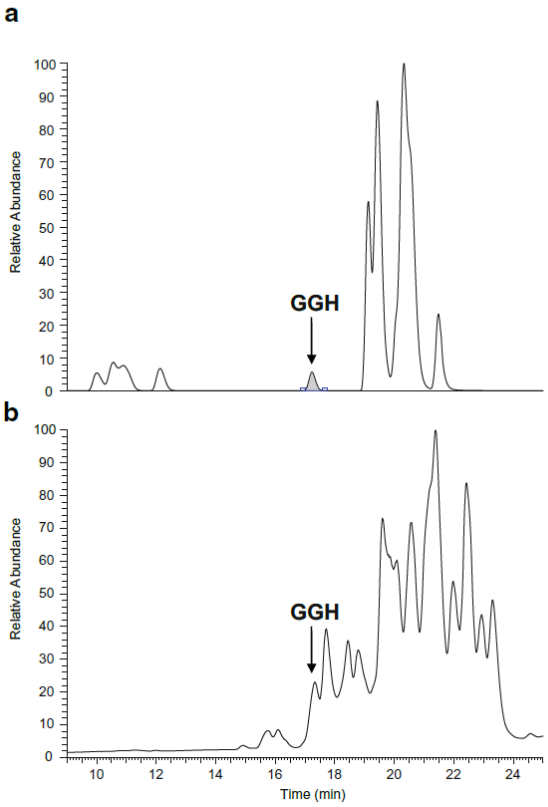



**Fig. 5** IP-RPLC-ESI-HRMS (long time gradient) total ion current chromatogram of the hydrolysates spiked with GGH at 77 mg $L^{-1}$. **a** Synthetic hydrolysate and **b** Casein tryptic hydrolysate

complex mixtures (see details in "IP-RPLC-ESI-HRMS" section) especially GGH, which does not co-elute with any other peptide in the synthetic hydrolysate (Fig. 5a). In these new chromatographic conditions, the differences of retention time for the complex compared to the free peptide are still below 0.2 min.

Each hydrolysate was injected without incubation with iron(II) (control sample) and after incubation with iron(II) in excess. In the case of the synthetic hydrolysate, the RAC are less than 0.8% in the control sample for all the peptides, including GGH. After contact with iron(II), GGH is the only peptide with a significant increasing value of its RAC, outreaching 100% whatever the [FeII]/[GGH] ratio tested. The same tendencies are observed for the casein tryptic hydrolysate (Fig. 5b and Table 2).

### Combination of up and downregulation factors

As previously seen, determination of RAC does not require exploring the results of a control sample obtained without $Fe^{II}$ contact. Nevertheless, another interesting approach to screen metal ion chelators is precisely to compare the same sample incubated, or not, with iron(II). A potential candidate to iron chelation must necessarily provide an increase of the $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ peak, while, in the same time, the $[M+H]^+$ peak must conversely decrease. Two parameters can be calculated to express these concomitant events. The upregulation factor of the complex is expressed as the ratio of chromatographic peak area of $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ in incubation reported to control sample (Eq. 2):

$$\text{Up factor} = \frac{A_{\text{Complex (incubation)}}}{A_{\text{Complex (control)}}} \quad (2)$$

In control samples, no complex should be detected and corresponding peak area ($A_{\text{Complex (control)}}$) is expected equal to zero. As a result, RAC and up factor cannot be determined. However, in control samples, a weak residual signal is often detected (and automatically integrated by the MS software) for the complex ion at the retention time of the corresponding free peptide ± 0.2 min. A probable assumption is that iron(II)

is released by weak chelator peptides, samples after samples, maintaining a trace level of metal ion in the LC-MS system. Nevertheless, calculation of up factor is then possible and its value must be compared to corresponding down factor.

The down factor is expressed as the ratio of the chromatographic peak area of the $[M+H]^+$ ion in the control reported to incubated sample (Eq. 3):

$$\text{Down factor} = \frac{A_{\text{Peptide (control)}}}{A_{\text{peptide (incubation)}}} \quad (3)$$

In this approach, both factors increase together in the presence of iron(II)-chelating peptides. Indeed, for a chelating species, the appearance of the $[(M\text{-}H)+^{56}Fe^{II}]^+$ is correlated to concomitant disappearance of $[M+H]^+$. This is precisely what was observed in Table 2 for synthetic hydrolysate. Even if some peptides display a slight increase in their up factor, their down factor shows no significant change in the chromatographic peak area of the $[M+H]^+$ ion (down factor = 1). GGH is the only one showing the right tendencies with an increasing value of both factors. Thus, even if up and down factors measure different ionic species with most likely unequal sensitivity, the upregulation of the $[M\text{-}H+^{56}Fe^{II}]^+$ peak together with the downregulation of the $[M+H]^+$ peak can be associated to the RAC as filters for the future screening of iron(II)-chelating peptides by LC-ESI-HRMS.

## Automated data processing using a metabolomics-like strategy

The first part of the work has shown the technical feasibility of a screening test for highlighting iron(II)-chelating peptides by IP-RPLC-ESI-HRMS in hydrolysates. First, it was possible to detect

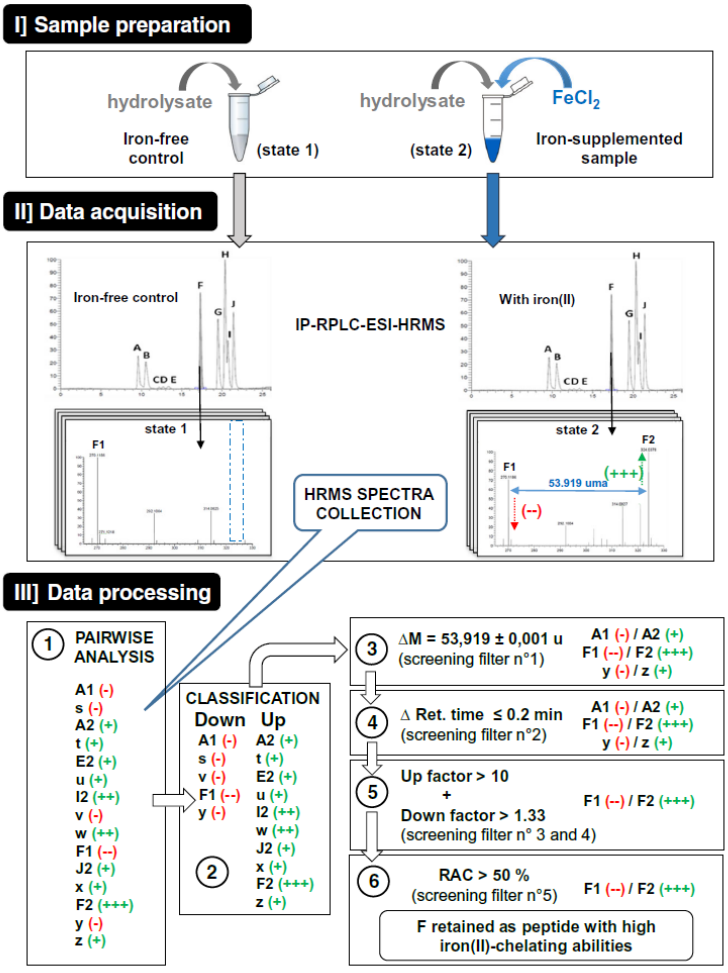



**Fig. 6** Detailed overview of the non-targeted protocol combining a differential IP-RPLC-ESI-HRMS analysis and a metabolomics-like data processing for the screening of peptides with high iron(II)-chelating abilities. Peptide code: peptides B, C, and D do not have any chelating property, E and J are weak chelators, A is of average strength, and F is strong. Compounds s to z are potential impurities

by MS the iron(II)-peptide complex with a systematic offset by + 53.919 u with respect to free peptide ion. Second, it was observed that a given peptide and its associated iron(II)-complex have retention times in IP-RPLC whose difference does not exceed 0.2 min. Together, both parameters evidence the formation of an iron(II) complex without providing any information about the complexation efficiency. This can be achieved through correlation between both up and down factors, and the RAC after the comparison of samples put into contact or not with iron(II). Nevertheless, in a protein hydrolysate, the large amount of collected data readily put a brake to manual processing. Consequently, a metabolomics-like approach has been evaluated for an automated processing of the IP-RPLC-ESI-HRMS data. Figure 6 provides an overview of final screening process and automated data processing.

The first step (step I) of screening is sample generation. The hydrolysate is put into contact with iron(II) (state 2) for later comparison with the same hydrolysate without any contact with iron (control sample—state 1). Both samples are injected into the LC-ESI-HRMS system (step II). Two independent data sets of high-resolution mass spectra are collected and submitted to the automated data process (step III). Step III comprises several levels. Thanks to metabolomics XCMS software, based on the variation of chromatographic areas, a list of up- and downregulated MS signals is extracted (step III-①). Up- and downregulated signals are separated to constitute two different lists thanks to MATLAB (step III-②). Obviously, the $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ are expected in the list of the upregulated signals (marked with + in Fig. 6), whereas the corresponding free peptides $[M+H]^+$ are expected in the downregulated list (marked with -). An optional step could be performed by eliminating downregulated features (potential peptides) whose area does not meet minimum area criterion set for state 1 (control).

Then, some filters can be applied to highlight peptides of interest. The two first filters are qualitative applying expected accurate shift of 53.919 ± 0.001 u (step III-③) and a maximum difference less than 0.2 min for retention time between the free peptide and its corresponding iron(II) complex (step III-④).

Table 3 summarizes the results obtained on the synthetic and the casein hydrolysates spiked with GGH at 28.6 μM or 2.86 μM following the pairwise analysis step. The number of down- and upregulated signals looks impressive (step III-①) even for simple synthetic hydrolysate, but applying the two first qualitative filters (step III-③ and ④), this number drops significantly. Starting from a little bit less than two thousand, only 22 signals remain after applying the mass and the retention time filters. The same goes for the casein hydrolysate with only slightly more than 40 signals remaining. As expected, signals corresponding to GGH and its iron(II) complex belong to the list.

Quantitative filters are then applied to discriminate relevant chelating peptides through the correlation between up and down factors (step III-⑤), and the RAC (step III-⑥). In our example, we applied a fold up superior to 10 and a fold down of 1.3 followed by a filtration with a RAC value higher than 50% (the chromatographic area of the $[(M-H)+^{56}Fe^{II}]^+$ ion representing in this case at least one-half of the area measured for the $[M+H]^+$ ion). However, each experimenter can move the cursor of each quantitative parameter depending on its own interest (to obtain weaker or stronger chelators). After the last step, only two signals remain in the synthetic hydrolysate, and after a careful examination, both signals are belonging to GGH. The first one is the monoisotopic $[GGH+H]^+$ at *m/z* 270.119 and the second one is the second isotopic peak of $[GGH+H]^+$ at *m/z* 271.122 due to the natural abundance of $^{13}C$. The same tendencies were observed for casein hydrolysate spiked with GGH (Table 3). GGH also appeared as lead peptide on RAC criterion even at very low concentration (2.86 μM). Casein hydrolysate presents a few additional signals after the last filter was applied, compared to synthetic hydrolysate. Those signals are certainly due to unknown iron(II)-chelating casein peptides whose structure will be determined in the future.

Lastly, all filtering procedures are detailed gradually in Table 3 to figure out progression in data processing. The whole process could of course be achieved in one step involving a pivot table.

**Table 3** Results of the step-by-step data processing presented in Fig. 6 for the hydrolysates spiked with GGH at 7.7 mg $L^{-1}$ (28.6 μM), and at 0.77 mg $L^{-1}$ (2.86 μM)

| Hydrolysate | $C_{GGH}$ (mg $L^{-1}$) | Number of significant features | Number of remaining candidate ion pairs | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Pairwise analysis ① | Mass offset ② | Retention time offset ③ | Up + down factors ④ | RAC ⑤ |
| Synthetic | 7.7 | 1662 (354 d[a] + 1308 u[b]) | 36 (1)* | 22 | 7 | 2 |
| Casein | 7.7 | 1885 (1071 d + 814 u) | 67 (23)* | 43 | 36 | 9 |
| | 0.77 | 1330 (578 d + 752 u) | 47 (43)* | 42 | 33 | 6 |

[a] d: feature significantly downregulated between the control (without iron) and the test with iron(II)

[b] u: feature significantly upregulated between the control (without iron) and the test with iron(II)

*Rank of GGH and its complex (270.1189–324.0379) according to the *p* value (Welch's *t* test)

## Conclusion

The main goal of this work was to set up an innovative integrated protocol for direct and sensitive screening of peptides with high iron(II)-chelating abilities in complex mixtures. A methodology based on IP-RPLC-ESI-HRMS using NFPA as ion paring reagent was developed for highlighting these stable complexes. A simple pairwise analysis between control samples and samples put in contact with $Fe^{II}$ followed by an adequate data filtering made possible the detection of effective iron(II) chelators in more or less complex mixtures such as casein tryptic hydrolysate, even at very low concentration (few μM). This new analytical approach represents a significant progress over conventional techniques (empirical protocol and protocol based on IMAC) for detection of iron(II)-chelating peptides. This method is simple (easy sample preparation followed by a single analytical step) and rapid (the entire protocol takes only few hours to highlight candidates compared to few months for empirical approach). It is also highly sensitive and directly provides structural information thanks to online MS detection. Finally, once peptides of interest have been identified in some hydrolysates, it is much easier to focus on their purification. The perspective of this work is its extension to new applications for highlighting new peptide candidates—and thus new drug and nutraceutical candidates—in complex mixtures such as other protein hydrolysates. In addition to their potential benefit against oxidative stress, iron(II)-chelating peptides can also be used for iron fortification. Indeed, iron chelates are considered an excellent alternative to poor bioavailable ferrous salts [21, 46]. This approach could be obviously extended to other metal chelation and completed by tandem mass spectrometry experiments for structural elucidation as suggested by the first experiments carried out on GGH used as model in this work (ESM Fig. S1).

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s00216-020-03037-1.

**Acknowledgments** The authors acknowledge support of the "Laboratory of engineering of Biomolecules" and of the "Laboratory Reactions and Chemical Engineering" by the "Impact Biomolecules" project of the "Lorraine Université d'Excellence" (Investissements d'avenir – ANR-15-IDEX-04-LUE).

**Authors' contributions** CP performed and designed the different experiments. CP and PC wrote the manuscript. KS provided scientific support on the complexation part and thoroughly corrected the manuscript. BE performed calculations on MATLAB software. LS and GC synthetized two standard peptides. CCK provided the casein tryptic hydrolysate. SD, LCR, PC, and KS supervised the global research. All authors critically reviewed the manuscript.

**Data availability** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available (currently in progress in our establishment) but are available from the corresponding author on reasonable request.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interest.

## References

1. Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool. Free Radic Biol Med. 2002;33(8):1037–46.
2. Patel M, Ramavataram DVSS. Non transferrin bound iron: nature, manifestations and analytical approaches for estimation. Indian J Clin Biochem. 2012;27(4):322–32.
3. Liu R, Xing L, Fu Q, Zhou G, Zhang W. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. Antioxidants. 2016;5(3):32.
4. Walters M, Esfandi R, Tsopmo A. Potential of food hydrolyzed proteins and peptides to chelate iron or calcium and enhance their absorption. Foods. 2018;7(10):172.
5. Hepel M, Andreescu S. Oxidative stress and human health. In: Hepel M, Andreescu S, editors. Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy Volume 2. ACS Symposium Series 1200; 2015. p. 1–33.
6. Sánchez A, Vázquez A. Bioactive peptides: a review. Food Qual Saf. 2017;1(1):29–46.
7. Chakrabarti S, Guha S, Majumder K. Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities. Nutrients. 2018;10(11):1738.
8. Li-Chan EC. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. Curr Opin Food Sci. 2015;1:28–37.
9. Ding X-P, Wang X-T, Chen L-L, Guo Q, Wang H, Qi J, et al. On-line high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray ionization–mass spectrometry–chemiluminescence assay of radical scavengers in Epimedium. J Chromatogr A. 2011;1218(9):1227–35.
10. Raudonis R, Bumblauskiene L, Jakstas V, Pukalskas A, Janulis V. Optimization and validation of post-column assay for screening of radical scavengers in herbal raw materials and herbal preparations. J Chromatogr A. 2010;1217(49):7690–8.
11. Koleva II, Niederländer HAG, van Beek TA. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. Anal Chem. 2000;72(10):2323–8.
12. Kim SH, Lee JY, Balolong MP, Kim J-E, Paik H-D, Kang D-K. Identification and characterization of a novel antioxidant peptide from bovine skim milk fermented by Lactococcus lactis SL6. Food Sci Anim Resour. 2017;37(3):402–9.
13. Porath J. High-performance immobilized-metal-ion affinity chromatography of peptides and proteins. J Chromatogr A. 1988;443:3–11.
14. Lv Y, Wei K, Meng X, Huang Y, Zhang T, Li Z. Separation and identification of iron-chelating peptides from defatted walnut flake by nanoLC-ESI–MS/MS and de novo sequencing. Process Biochem. 2017;59:223–8.
15. Wang C, Li B, Ao J. Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn2+ and LC–MS/MS. Food Chem. 2012;134(2):1231–8.
16. Lv Y, Bao X, Liu H, Ren J, Guo S. Purification and characterization of calcium-binding soybean protein hydrolysates by Ca2+/Fe3+ immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Food Chem. 2013;141(3):1645–50.
17. Caetano-Silva ME, Alves RC, Lucena GN, Frem RCG, Bertoldo-Pacheco MT, Lima-Pallone JA, et al. Synthesis of whey peptide-

iron complexes: influence of using different iron precursor compounds. Food Res Int. 2017;101:73–81.
18. Megías C, Pedroche J, Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F, et al. Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. J Agric Food Chem. 2007;55(16):6509–14.
19. Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. Food Chem. 2012;134(3):1585–8.
20. Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. Affinity purification and characterisation of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. Food Chem. 2011;129(2):485–90.
21. Wu W, Li B, Hou H, Zhang H, Zhao X. Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode. J Funct Foods. 2017;35:418–27.
22. Guo L, Hou H, Li B, Zhang Z, Wang S, Zhao X. Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin. Process Biochem. 2013;48(5–6):988–93.
23. Gutiérrez R, Martín del Valle EM, Galán MA. Immobilized metal-ion affinity chromatography: status and trends. Sep Purif Rev. 2007;36(1):71–111.
24. Marco VBD, Bombi GG. Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in the study of metal–ligand solution equilibria. Mass Spectrom Rev. 2006;25(3):347–79.
25. Keith-Roach MJ. A review of recent trends in electrospray ionisation–mass spectrometry for the analysis of metal–organic ligand complexes. Anal Chim Acta. 2010;678(2):140–8.
26. Gizzi P, Henry B, Rubini P, Giroux S, Wenger E. A multi-approach study of the interaction of the Cu(II) and Ni(II) ions with alanylglycylhistamine, a mimicking pseudopeptide of the serum albumine N-terminal residue. J Inorg Biochem. 2005;99(5):1182–92.
27. Jancsó A, Selmeczi K, Gizzi P, Nagy NV, Gajda T, Henry B. The role of terminal amino group and histidine at the fourth position in the metal ion binding of oligopeptides revisited: copper(II) and nickel(II) complexes of glycyl-glycyl-glycyl-histamine and its N-Boc protected derivative. J Inorg Biochem. 2011;105(1):92–101.
28. Selmeczi K, Gizzi P, Champmartin D, Rubini P, Aubert E, Dahaoui S, et al. Nickel(II)-dipeptidoamine-based tetrameric complex: structural study in solution and in solid state. Inorg Chem. 2010;49(18):8222–9.
29. Grimble GK. The significance of peptides in clinical nutrition. Annu Rev Nutr. 1994;14(1):419–47.
30. Csire G, Canabady-Rochelle L, Averlant-Petit M-C, Selmeczi K, Stefan L. Both metal-chelating and free radical-scavenging synthetic pentapeptides as efficient inhibitors of reactive oxygen species generation. Metallomics. 2020. https://doi.org/10.1039/D0MT00103A.
31. Halliwell B. Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action? Free Radic Biol Med. 1989;7(6):645–51.
32. Silva AMN, Kong X, Parkin MC, Cammack R, Hider RC. Iron(iii) citrate speciation in aqueous solution. Dalton Trans. 2009;40:8616.
33. Gowda H, Ivanisevic J, Johnson CH, Kurczy ME, Benton HP, Rinehart D, et al. Interactive XCMS online: simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses. Anal Chem. 2014;86(14):6931–9.
34. Xuan Y, Scheuermann EB, Meda AR, Hayen H, von Wirén N, Weber G. Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. J Chromatogr A. 2006;1136(1):73–81.
35. Petritis KN, Chaimbault P, Elfakir C, Dreux M. Ion-pair reversed-phase liquid chromatography for determination of polar underivatized amino acids using perfluorinated carboxylic acids as ion pairing agent. J Chromatogr A. 1999;833(2):147–55.
36. Chaimbault P, Petritis K, Elfakir C, Dreux M. Determination of 20 underivatized proteinic amino acids by ion-pairing chromatography and pneumatically assisted electrospray mass spectrometry. J Chromatogr A. 1999;855(1):191–202.
37. de Person M, Sevestre A, Chaimbault P, Perrot L, Duchiron F, Elfakir C. Characterization of low-molecular weight peptides in champagne wine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta. 2004;520(1–2):149–58.
38. Canabady-Rochelle LLS, Harscoat-Schiavo C, Kessler V, Aymes A, Fournier F, Girardet J-M. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: revisited methods. Food Chem. 2015;183:129–35.
39. Zhao J, Posa DK, Kumar V, Hoetker D, Kumar A, Ganesan S, et al. Carnosine protects cardiac myocytes against lipid peroxidation products. Amino Acids. 2019;51(1):123–38.
40. Lagarrigue M, Bossée A, Afonso C, Fournier F, Bellier B, Tabet J-C. Diastereomeric differentiation of peptides with CuII and FeII complexation in an ion trap mass spectrometer. J Mass Spectrom. 2006;41(8):1073–85.
41. Yamauchi O, Odani A, Takani M. Metal–amino acid chemistry. Weak interactions and related functions of side chain groups. Dalton Trans. 2002;18:3411–21.
42. de Person M, Chaimbault P, Elfakir C. Analysis of native amino acids by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry: comparative study between two sources and interfaces. J Mass Spectrom. 2008;43(2):204–15.
43. Sóvágó I, Várnagy K, Lihi N, Grenács Á. Coordinating properties of peptides containing histidyl residues. Coord Chem Rev. 2016;327–328:43–54.
44. Pearson RG. Hard and soft acids and bases. Surv Prog Chem. 1969;5:1–51.
45. Sóvágó I, Ősz K. Metal ion selectivity of oligopeptides. Dalton Trans. 2006;32:3841–54.
46. de la Hoz L, Ponezi AN, Milani RF, Nunes da Silva VS, Sonia de Souza A, Bertoldo-Pacheco MT. Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides. Food Chem. 2014;142:166–9.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Cédric Paris** is Research Engineer at the University of Lorraine (France). He is the manager of the Platform of Structural and Metabolomics Analyses (PASM) dedicated to the analysis of biomolecules in the fields of food sciences, agronomy, plant sciences, soils, and environment. His Ph.D. thesis (2017–2020) focused on the development of non-targeted methods for screening iron-chelating peptides by mass spectrometry.



**Katalin Selmeczi** works as a teacher-researcher at the Lorraine Laboratory of Molecular Chemistry (L2CM) of the University of Lorraine (Nancy, France). Her current research interests are biological coordination chemistry, transition-metal complexes of peptides and macrocyclic compounds, applications of coordination chemistry in enzyme-active site mimetics and medicine.



**Gizella Csire** is currently working at the University of Lorraine (Nancy, France) in the L2CM laboratory as a postdoctoral fellow. She has experience in the special field of analytical chemistry: equilibrium studies and structure analysis of metal-peptide complexes.



**Bruno Ebel** is Associate Professor at Reactions and Chemical Engineering Laboratory (LRGP), at the University of Lorraine (Nancy, France). He works specifically on multivariate data analysis in biotechnology.



**Céline Cakir-Kiefer** is Assistant Professor in Food Biochemistry at the University of Lorraine (Nancy, France) and in charge of the Master in Nutrition and Food Sciences. Her field of research focuses on bioactive peptides and more particularly the interactions between metals and milk proteins. The objective is to study the site of interaction of metallic trace elements.



**Loic Stefan** is a CNRS researcher working at the Laboratory of Macromolecular Physical Chemistry (Nancy, France). He specialized in biomimetic self-assembly processes based on DNA and peptide derivatives, from fundamental research and molecular design to applications. His current research focuses on the use of peptides and peptide derivatives to develop both innovative soft materials (gels) and antioxidant metal-binding peptides.



**Stéphane Desobry** is Full Professor at the University of Lorraine (Nancy, France). He is coordinator of the "Impact Biomolecules" project that brings together 140 researchers from 17 laboratories.



**Laetitia Canabady-Rochelle** is CNRS Research Scientist (Bioprocesses-Biomolecules axis, LRGP) at the University of Lorraine (Nancy, France). Her research focuses on production, screening, and separation of metal-chelating peptides (MCP) in hydrolysates for various applications. Representative of the MCP work package (LUE IMPACT Biomolecules project), she is the co-chairwoman of the 1st international conference on "Metal-Binding Peptides: Methodologies & Application", Nancy, France, July 2021.



**Patrick Chaimbault** started an academic career in 2002 after holding positions of laboratory manager in the pharmaceutical industry. He was promoted to Full Professor at the University of Lorraine in November 2008 where he teaches and conducts research in analytical chemistry (Metz, France). His field of expertise is centered on the coupling of separative techniques with mass spectrometry applied to the characterization of complex biological samples.

# ANNEXE 10 : publication identification de sidérophores bactériens

TITLE: Mineral weathering ability of Collimonas pratensis PMB3(1) involves a Malleobactin-mediated iron acquisition system

Running title: Mineral weathering role of Malleobactin

AUTHORS: Laura Picard[1,2], Cédric Paris[3,4], Tiphaine Dhalleine[1], Emmanuelle Morin[1], Philippe Oger[5], Marie-Pierre Turpault[2], Stéphane Uroz1[2]

[1] Université de Lorraine, INRAE, UMR1136 « Interactions Arbres-Microorganismes », F-54280 Champenoux, France

[2] INRAE, UR1138 « Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers », F-54280 Champenoux, France

[3] Université de Lorraine, EA 4367 « Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules », Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA), F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

[4] Plateau d'Analyse Structurale et Métabolomique (PASM) - SF4242 EFABA, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

[5] Université de Lyon, INSA de Lyon, CNRS UMR 5240 « Microbiologie, Adaptation et Pathogénie », F-69621, Villeurbanne France

* Corresponding author: Mailing address:

Université de Lorraine, INRAE, UMR 1136 "Interactions Arbres Microorganismes", 54280 Champenoux, France. Phone: +33 (0)3 83 39 40 81, Fax: +33 (0)3 83 39 40 69. E-mail: stephane.uroz@inrae.fr.

SUMMARY

Mineral weathering (MW) by microorganisms is considered to occur through a succession of molecular mechanisms based on acidification and chelation. While the role of acidification is established, the role of siderophores is difficult to disentangle from the effect of the acidification. To decipher the role of siderophores in MW, we used the effective MW bacterial strain Collimonas pratensis strain PMB3(1). Our bioinformatic analyses permitted to identify a single non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) responsible for siderophore biosynthesis in its genome. By combining iron-chelating assays, targeted mutagenesis and chemical analyses (HPLC and LC-ESI-HRMS), we identified the siderophore produced by strain PMB3(1) as malleobactin X and how its production depends on the concentration of available iron. Comparison with the genome sequences of other collimonads evidenced that malleobactin production seems to be a relatively conserved functional trait, though some collimonads harbored other siderophore synthesis systems. We also revealed by comparing the wild-type strain and its mutant impaired in the production of malleobactin that the ability to produce this siderophore is essential to allow the dissolution of hematite under non-acidifying conditions. This study represents the first characterization of the siderophore produced by collimonads and its role in mineral weathering.

Key words: Collimonas pratensis PMB3(1); mineral weathering; siderophore; malleobactine; hematite

# RESUME THESE FRANÇAIS

**Développement de nouvelles approches analytiques pour le criblage de peptides chélateurs de fer**

Face au besoin croissant de nouvelles molécules bioactives d'origine naturelle, les coproduits de l'industrie alimentaire et de transformation d'agroressources constituent une ressource stratégique à exploiter. En effet, l'hydrolyse enzymatique de protéines végétales ou animales permet de générer une grande variété de séquences peptidiques avec des propriétés biologiques potentielles : antihypertensive, antithrombotique, anticancéreuse, opioïde, antimicrobienne. Malgré le potentiel bioactif de certains peptides, leur présence incertaine et leur faible concentration au sein d'un hydrolysat protéique (mélange complexe constitué d'une dizaine à parfois plus d'une centaine de peptides) limitent leur purification et leur exploitation. Aussi, les peptides bioactifs pourraient être criblés préalablement à toute phase séparative afin de n'engager l'étape de séparation qu'en cas d'activité avérée.

Le pouvoir antioxydant est un terme générique qui regroupe divers mécanismes chimiques tels que l'activité anti-radicalaire, l'inhibition de la peroxydation des lipides, ou encore la chélation de métaux. En chélatant les métaux de transition naturellement présents *in vivo* (fer, cuivre), les peptides chélateurs pourraient être utilisés comme antioxydants indirects et agir ainsi contre le stress oxydant.

L'objectif principal de cette thèse est de développer des méthodes originales de criblage à haut débit des peptides chélateurs de fer présents dans des hydrolysats peptidiques. A terme, ces méthodes pourraient être appliquées à tous types de mélanges peptidiques complexes.

La première approche développée met en œuvre la chromatographie d'affinité pour ions métalliques immobilisés (IMAC). Cette technique est incontournable pour purifier des peptides chélateurs de métaux au sein des hydrolysats. Grâce à la spécificité d'interaction entre un métal donné – immobilisé sur la phase stationnaire IMAC – et des motifs complexants déterminés, il est possible d'identifier sélectivement les composés chélateurs présents dans des mélanges complexes. Notre objectif étant de parvenir à une détection rapide de ces molécules d'intérêt, nous avons réalisé un couplage en ligne avec la spectrométrie de masse (MS).

La deuxième stratégie consiste à évaluer la formation des complexes fer-peptide en solution. Dans ce cas, tous les sites accepteurs d'électrons du métal sont accessibles (au contraire de la technique IMAC qui présente un biais potentiel de ce point de vue) et, d'autre part, les conditions de solubilisation peuvent simuler le milieu visé (*i.e.* le milieu intracellulaire). Par ailleurs, l'observation de la forme complexée avec le fer ($Fe^{II}$ ou $Fe^{III}$) fournit une preuve directe et irréfutable de la capacité de chélation d'un peptide. Ainsi, la mise en évidence d'un peptide chélateur peut être réalisée par détection concomitante de sa forme libre (peptide seul) et de sa forme complexée (fer-peptide). Dans cette approche, la spectrométrie de masse – de par sa sensibilité et sa spécificité – est une technique de choix pour réaliser le criblage souhaité.

Après avoir été testés sur des peptides des synthèse (sous forme pure et en mélange), les deux protocoles ont été appliqués à un hydrolysat protéique réel. Les résultats préliminaires obtenus sont prometteurs et permettent d'envisager, à court terme, le criblage automatisé de divers hydrolysats réels, pour la recherche de peptides chélateurs du fer(II) et du fer(III).

**Mots clés** : peptides chélateurs de fer, criblage direct, méthode LC-MS en ligne, chromatographie d'affinité pour métal immobilisé (IMAC), analyse différentielle de spectres de masse, hydrolysats protéiques.

# RESUME THESE ANGLAIS

**Development of new analytical methods for the screening of iron-chelating peptides**

Faced with the growing need for new bioactive compounds of natural origin, by-products from the agro-food industry and the processing of agro-resources constitute a strategic resource to be exploited. In fact, the enzymatic hydrolysis of plant or animal proteins makes it possible to generate a wide variety of peptide sequences with potential biological properties: antihypertensive, antithrombotic, anticancer, opioid, antimicrobial. Despite the bioactive potential of certain peptides, their uncertain presence and their low concentration in a protein hydrolysate (a complex mixture sometimes made up of more than a hundred peptides) limit their purification and use. Also, bioactive peptides could be screened before their purification in order to initiate the separation step only if activity is proven.

Antioxidant power is a generic term which groups together various chemical mechanisms such as anti-free radical activity, inhibition of lipid peroxidation, or even metal chelation. By chelating the transition metals naturally present *in vivo* (iron, copper), the chelating peptides could be used as indirect antioxidants and thus act against oxidative stress.

The main objective of this PhD thesis is to develop original methods for high throughput screening of iron-chelating peptides present in protein hydrolysates. Ultimately, these methods could be applied to all types of complex peptide mixtures.

The first approach is based on immobilized metal affinity chromatography (IMAC). IMAC is a reference technique for purifying metal-chelating peptides in hydrolysates. Thanks to the specificity of interaction between a given metal – immobilized on the stationary phase IMAC – and determined complexing groups, it is possible to selectively identify the chelators present in complex mixtures. Our objective being to achieve a rapid detection of these molecules of interest, we carried out an on-line coupling with mass spectrometry (MS).

The second strategy consists of evaluating the formation of iron-peptide complexes in solution. In this case, all the electron acceptor sites of the metal are accessible (unlike the IMAC technique which presents a potential bias from this point of view) and, on the other hand, the solubilization conditions can simulate the target medium (*i.e.* the intracellular medium). In addition, the observation of the peptidic form complexed with iron ($Fe^{II}$ or $Fe^{III}$) provides direct and irrefutable proof of the chelating capacity of a peptide. Thus, the identification of a chelating peptide can be carried out by the concomitant detection of its free form (peptide) and of its complexed form (iron-peptide). In this approach, mass spectrometry – thanks to its sensitivity and its specificity - is a technique of choice for carrying out the desired screening.

After having been tested on synthetic peptides (pure solutions and mixture), the two protocols were applied to a real protein hydrolysate. The preliminary results are promising and make it possible to envisage, in the short term, the automated screening of various real hydrolysates for the search for iron(II)- and iron(III)-chelating peptides.

**Keywords:** iron-chelating peptides, direct screening, online LC-MS method, immobilized-metal affinity chromatography (IMAC), differential analysis of mass spectra, protein hydrolysates.