

Université de Montréal

Étude sur l'utilisation de liquides ioniques à base imidazolium pour l'extraction sélective
de phosphopeptides

par

Samantha Hertz SANON

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.) en chimie

Avril 2013

© Samantha H. SANON, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
Étude sur l'utilisation de liquides ioniques à base imidazolium pour l'extraction sélective
de phosphopeptides

Présenté par :
Samantha Hertz SANON

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Dominic Rochefort
Président-rapporteur

Dr. Andreea R. Schmitzer
Directrice de recherche

Dr. Karen C. Waldron
Co-directrice de recherche

Dr. William Lubell
Membre du jury

Our destiny is not written for us, but by us.

Barack Obama

*A mes parents,
mes frère et sœur
et mon mari Richardson Junior*

Sommaire

La phosphorylation des protéines constitue l'une des plus importantes modifications post-traductionnelles (PTMs) et intervient dans de multiples processus physiologiques tels, la croissance, la différenciation cellulaire, l'apoptose, *etc.* En dépit de son importance, l'analyse des phosphoprotéines demeure une tâche difficile en raison de leur nature dynamique (car la phosphorylation des protéines est un processus réversible) et de leur faible abondance relative. En effet, la détermination des sites de phosphorylation est souvent difficile car les phosphopeptides sont souvent difficiles à détecter par des méthodes d'analyse chromatographique classique et par spectrométrie de masse (MS).

De récentes études ont démontré que les nombreuses méthodes d'enrichissement de phosphopeptides existantes ne sont pas complètes, et que le nombre total de phosphopeptides détectés ne chevauchent pas complètement ces méthodes. C'est pour cela qu'il existe une nécessité de combler les lacunes des méthodes d'enrichissement existantes afin d'avoir des analyses phosphoprotéomiques plus complètes.

Dans cette étude, nous avons utilisé les liquides ioniques (LI), plus particulièrement les sels d'imidazolium, comme une technique d'enrichissement alternative, dans le but de favoriser une extraction sélective de phosphopeptides présents en solution. Les sels d'imidazolium ont donc été utilisés en raison de leurs propriétés physico-chimiques "facilement" ajustables selon la nature des substituants sur le noyau imidazolium et la nature de l'anion.

Les sels de monoimidazolium et de bis-imidazolium possédant respectivement des chaînes linéaires à 4, 12 et 16 atomes de carbone et ayant différents anions ont été synthétisés et utilisés pour effectuer des extractions liquide-liquide et solide-liquide des phosphopeptides en solution. Dans un premier temps, des extractions liquide-liquide ont été réalisées en utilisant un liquide ionique (LI) ayant une chaîne linéaire de 4 atomes de carbone. Ces extractions réalisées avec le bis(trifluoromethanesulfonyl) amide de 3-butyl-1-methylimidazolium (BMIM-NTf₂) et l'hexafluorophosphate de 3-butyl-1-methylimidazolium (BMIM-PF₆) n'ont pas montré une extraction notable du PPS comparativement au PN. Dans un deuxième temps, des extractions solide-liquide ont été réalisées en fonctionnalisant des particules solides avec des sels d'imidazolium possédant des chaînes linéaires de 12 ou 16 atomes de carbone. Ces extractions ont été faites en utilisant un phosphopentapeptide Ac-Ile-pTyr-Gly-Glu-Phe-NH₂ (PPS) en présence de 2 analogues acides non-phosphorylés. Il a été démontré que les sels d'imidazolium à chaîne C12 étaient meilleurs pour extraire le PPS que les deux autres peptides PN (Ac-Ile-Tyr-Gly-Glu-Phe-NH₂) et PE (Ac-Glu-Tyr-Gly-Glu-Phe-NH₂)

L'électrophorèse capillaire (CE) et la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) ont été utilisées pour quantifier le mélange des trois peptides avant et après extraction ; dans le but de mesurer la sélectivité et l'efficacité d'extraction de ces peptides par rapport à la composition chimique du liquide ionique utilisé.

Mots-clés : Protéines/ Phosphorylation/ Modifications post-traductionnelles (PTMs)/ peptides/ Phosphopeptide/ Synthèse/ Sels d'imidazolium/ Extraction liquide-

liquide/ Extraction solide-liquide/ Électrophorèse capillaire (CE)/ Chromatographie
liquide à haute performance couplée à la masse (LC-MS).

Abstract

Protein phosphorylation is one of the most important post-translational modifications because it is involved in multiple physiological processes such as growth, differentiation, apoptosis, *etc.* Despite its importance, the analysis of phosphoproteins remains a difficult task due to their dynamic nature (phosphorylation of proteins is a reversible process) and their low abundance. Indeed, the determination of phosphorylation sites is difficult because phosphopeptides are often difficult to detect by conventional chromatographic analysis and by mass spectrometric (MS) methods.

Recent studies have shown that the existing methods of enrichment of phosphopeptides are not complete, and the total number of phosphopeptides detected does not overlap completely with those detected by these methods. The gaps in existing enrichment methods need to be filled in order to have more complete phosphoproteomic analyses. In the current study, ionic liquids (IL), specifically imidazolium salts, have been used in an alternative enrichment technique with potential for selective extraction of phosphopeptides from solution. Imidazolium salts were chosen because their physicochemical properties are readily adjustable depending on the nature of the substituent attached to the imidazolium core and the counter-anion.

Monoimidazolium and bis-imidazolium salts with linear chains having respectively 4, 12, and 16 carbon atoms and with different anions were synthesized and used to carry out liquid-liquid and solid-liquid extractions of a phosphorylated peptide from a solution. At first, liquid-liquid extractions were carried out using an ionic liquid (IL) with a linear chain of 4 carbon atoms. These extractions performed with bis (trifluoromethanesulfonyl) amide 3-butyl-1-methylimidazolium (BMIM-NTf₂) and hexafluorophosphate 3-butyl-1-

methylimidazolium (BMIM-PF₆) did not show a considerable extraction of PPS comparatively to the PN. Secondly, solid-liquid extractions were done by first functionalizing solid-phase particles with the imidazolium salts. The extractions were carried out using the phosphopeptide Ac-pTyr-Ile-Gly-Glu-Phe-NH₂ (PPS) and its acidic non-phosphorylated analogues. It has been shown that the C₁₂ chain imidazolium salts were better to extract PPS than the other two peptides PN (Ac-Ile-Tyr-Gly-Glu-Phe-NH₂) and PE (Ac-Glu-Tyr-Gly-Glu-Phe-NH₂).

The extraction efficiency of these peptides was estimated by capillary electrophoresis (CE) and high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS).

Key words: Proteins/ Phosphorylation/ Post-translational modifications (PTMs)/ peptides/ Phosphopeptide/ Synthesis/ Imidazolium salts/ Liquid-liquid extraction/ Solid-liquid extraction/ Capillary Electrophoresis (CE)/ High Performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS).

Table des matières

Sommaire	i
Abstract	iv
Table des matières.....	vi
Liste des figures	x
Liste des tableaux.....	xiv
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xviii
1. Introduction	1
1.0. Phosphorylation des protéines.....	2
1.1. Enrichissement par chromatographie d'affinité à base de l'ion métallique immobilisé (IMAC).....	6
1.2. Enrichissement par la chromatographie d'affinité à base d'un oxyde métallique (MOAC).....	8
1.3. Chromatographie échangeuse d'ion (Ion exchange chromatography).....	9
1.4. Extraction de biomolécules par les liquides ioniques	10
1.5. Les sels d'imidazolium et les liquides ioniques	12
1.6. Techniques analytiques utilisées	16
3.2.1. Électrophorèse capillaire	16
3.2.1. Chromatographie liquide à haute performance	17

2. Partie expérimentale.....	19
2.1. Produits chimiques.....	20
2.2. Préparation des solutions analytiques.....	20
2.3. Électrophorèse capillaire (CE).....	21
2.4. Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur de masse simple quadripôle (LC-MS).....	21
2.5. Synthèses des LI et des sels d'imidazoliums.....	22
2.6. Extraction liquide-liquide.....	22
2.7. Extraction solide-liquide.....	24
2.7.1. Extraction solide-liquide en utilisant des embouts de pipette de microextraction contenant une phase stationnaire C ₁₈	24
2.7.2. Extraction solide-liquide en utilisant une résine échangeuse d'anions.....	26
3. Résultats et discussion.....	27
3.1. Extraction liquide-liquide.....	28
3.1.1. Extraction de peptides avec l'hexafluorophosphate de 1-butyl-3-méthylimidazolium (BMIM-PF ₆).....	29
3.1.2. A la recherche de l'étalon interne.....	39
3.1.3. Effet du mode d'agitation.....	43
3.2. Extraction solide-liquide.....	45
3.2.1. Extraction sur phase solide.....	46
3.2.2. Extraction avec une résine échangeuse d'anions.....	54

4. Conclusion.....	56
5. Annexe	61
2.8. Spectrométrie RMN 1D	62
2.8.1. Synthèse de l'hexafluorophosphate de 3-butyl-1-méthylimidazolium.....	62
2.8.2. Synthèse du bis (trifluoromethanesulfonyl)amide de 3-butyl-1-méthylimidazolium.....	63
2.8.3. Synthèse du 1,1'-méthylènediimidazole	64
2.8.4. Synthèse du bis-bromure de 3-dodécyl-bis-imidazolium.....	64
2.8.5. Synthèse du bis-tétrafluoroborate de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium	65
2.8.6. Synthèse du bis-(trifluoromethanesulfonyl)amide de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium.....	66
2.8.7. Synthèse du bis-hexafluorophosphate de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium.....	67
2.8.8. Synthèse du bis-triflate de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium.....	67
2.8.9. Synthèse du bis-bromure de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium ²³	68
2.8.10. Synthèse du bis-tétrafluoroborate de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium.	69
2.8.11. Synthèse du bis-(trifluoromethanesulfonyl)amide de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium.....	70

2.8.12. Synthèse du bis-hexafluorophosphate de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium	71
2.8.13. Synthèse du bis-triflate de 3-hexadécyl-bis-imidazolium	72

Liste des figures

- Figure 1.1** Nombre de publications se rapportant à la phosphorylation des protéines jusqu'en 2011. Figure adaptée de la référence 10. (Mots clés : protein phosphorylation, Sci Finder)
- Figure 1.2** Isolation de phosphopeptides par le IMAC et le MOAC (Le garnissage de la colonne est différent pour les deux techniques. Figure adaptée de la référence 18.
- Figure 1.3** Mécanisme de complexation proposé pour l'extraction de l'ADN double brin par le cation butylmethyl imidazolium (BMIM⁺). Figure adaptée de la référence 29.²⁹
- Figure 1.4** Structures des différents cations et anions des liquides ioniques.
- Figure 1.5** Diverses applications des liquides ioniques.
- Figure 1.6** Représentation des différents peptides utilisés dans cette étude sous leur forme anionique.
- Figure 2.1** Extraction liquide-liquide en utilisant l'hexafluorophosphate de 3-butyl-1-méthylimidazolium et le bis-(trifluorométhanesulfonyl)amide de 3-butyl-1-méthylimidazolium. CE : Capillary electrophoresis dans 30 mM de tampon phosphate pH= 7
- Figure 2.2** Procédure de modification et extraction des peptides avec un embout contenant une phase stationnaire C₁₈.
- Figure 3.1** Électropherogrammes des peptides PN (131 µM) et PPS (128 µM) dans la

solution de départ

- Figure 3.2** Structure chimique de l'hexafluorophosphate de 1-butyl-3-méthylimidazolium (BMIM-PF₆).
- Figure 3.3** Électrophérommes des phases aqueuses et liquide ionique obtenus par CE lors de l'extraction des peptides.
- Figure 3.4** Chromatogramme et spectres de masse du PPS et l'ion hexafluorophosphate provenant de la phase aqueuse lors de l'extraction.
- Figure 3.5** Détermination de la solubilité des deux liquides ioniques dans 100 µL d'eau. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type pour n=3 injections.
- Figure 3.6** Électrophéromme du mélange de 2 peptides PN et PPS de concentration respective de 68 µM et 64 µM avant extraction.
- Figure 3.7** Influence de différentes durées d'agitation lors de l'extraction du mélange des 2 peptides PPS (64 µM) et du PN (68 µM) se trouvant dans la phase aqueuse avec le BMIM-NTf₂. Chaque valeur de la hauteur représente la moyenne de 2 injections CE d'une même solution pour le premier point de données et la moyenne de 3 injections CE pour les autres points.
- Figure 3.8** Aire moyenne du pic du peptide restant en phase aqueuse en fonction du volume du LI pour démontrer l'effet de la quantité de BMIM-NTf₂. Les barres d'erreur représentent l'écart-type pour n=3 injections.
- Figure 3.9** Électrophérommes des différents étalons internes (EI) testés (pic 2) lors de l'extraction du PN (36 µM, pic 3) et du PPS (38 µM, pic 4) par le

BMIM-NTf₂ (pic 1).

Figure 3.10 Taux de l'extraction des étalons internes par le BMIM-NTf₂. L'aire moyenne représente l'aire de l'étalon interne dans la phase aqueuse après mélange / extraction jusqu'à 20 h. Le point à 0 h représente l'aire du pic (proportionnelle à la concentration) avant ajout du BMIM-NTf₂. Les barres d'erreur représentent l'écart-type pour n=3 injections.

Figure 3.11 Extraction des peptides en présence du TAME (a), et avec le TAME ajouté à la fin de l'extraction (b). Les barres d'erreur représentent l'écart-type pour n=3 injections.

Figure 3.12 Effet de l'agitation du vortex (a) et du bain à ultrason (b) sur l'extraction 2 peptides. Les barres d'erreur représentent l'écart-type pour n = 3 injections.

Figure 3.13 Électrophérogramme des 3 peptides avant extraction.

Figure 3.14 Photo d'un embout de pipette de type OMIX de 20 µL de volume contenant une phase stationnaire C₁₈ présente dans les 5 premiers millimètres de l'embout.

Figure 3.15 Électrophérogrammes d'une extraction type du mélange de 3 peptides PN (pic 1), PE (pic 2), PPS (pic 3) (possédant chacun approximativement 50 µM) en fonction de la quantité de C₁₂C₁₂DIM -TfO (dans 50 µL DMF) déposé sur la phase stationnaire C₁₈ de l'embout.

Figure 3.16 Extraction type du mélange des 3 peptides PN (47 µM), PE (57 µM), PPS (42 µM) avec une quantité croissante de C₁₂C₁₂DIM -TfO (dans 50 µL

DMF) utilisée pour fonctionnaliser la phase C₁₈ dans l'embout de pipette.
(Analyses des peptides par CE).

Liste des tableaux

- Tableau 3.1** Effet de la longueur de la chaîne alkyle du sel d'imidazolium et de l'anion sur l'extraction des 3 peptides dans un mélange lorsque l'embout a été fonctionnalisé avec 10 mg de sels de diimidazolium (dans 50 μ L de DMF) (Analyse des peptides par CE).
- Tableau 3.2** Comparaison de l'extraction des peptides individuellement ou dans un mélange de 3 peptides pour le sel C₁₂C₁₂DIM (10 mg dans 50 μ L de DMF) en fonction du contre ion. (Analyse des peptides par LC-MS)
- Tableau 3.3** Étude de la répétabilité des extractions du mélange des 3 peptides en utilisant un embout non-fonctionnalisé et ensuite un embout fonctionnalisé avec 10 mg de C₁₂C₁₂DIM -NTf₂ dissouts dans 50 μ L de DMF
- Tableau 3.4** Extraction du mélange des 3 peptides (possédant chacun approximativement 50 μ M chacun) en utilisant 120 mg de résine échangeuse d'anions (Dowex 1 x 8).

Liste des abréviations

[D ₆]-DMSO	Diméthylsulfoxyde deutéré
Ac	Acétyl
ACN	Acétonitrile
AF	Acide formique
BIM	Bis-imidazole
BMIM-NTf ₂	Bis (trifluoromethanesulfonyl)amide de 3-butyl-1-methylimidazolium
BMIM-PF ₆	Hexafluorophosphate de 3-butyl-1-methylimidazolium
C ₁₈	Colonne octadécyle
calc.	Calculé
CE	Électrophorèse capillaire
CZE ou FSCE	Électrophorèse capillaire en solution libre
d	doublet
d.e.	Diamètre externe
d.i.	Diamètre interne
DAD	Détecteur à barettes de diodes
dd	doublet de doublets
C ₁₂ C ₁₂ DIM-BF ₄	Bis-tetrafluoroborate de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium
C ₁₂ C ₁₂ DIM-NTf ₂	Bis-(trifluoromethanesulfonyl)amide de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium

C ₁₂ C ₁₂ DIM-PF ₆	Bis-hexafluorophosphate de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium
C ₁₂ C ₁₂ DIM-TfO	Bis-triflate de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium
C ₁₆ C ₁₆ DIM-BF ₄	Bis-tetrafluoroborate de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium
C ₁₆ C ₁₆ DIM-NTf ₂	Bis-(trifluoromethanesulfonyl)amide de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium.
C ₁₆ C ₁₆ DIM-PF ₆	Bis-hexafluorophosphate de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium
C ₁₆ C ₁₆ DIM -TfO	Bis-triflate de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium
DMF	Diméthylformamide
EI	Étalon interne
ESI	Ionisation par nébullisation electrospray
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IMAC	Chromatographie d'affinité à base de l'ion métallique immobilisé
J	Constante de couplage en hertz
LI	Liquide ionique
LiNTf ₂	Bis (trifluoromethanesulfonyl) amide de lithium
Me	Méthyl
MOAC	Chromatographie d'affinité à base d'un oxyde métallique
PE	Ac-Glu-Tyr-Gly-Glu-Phe-NH ₂
PN	Ac-Ile-Tyr-Gly-Glu-Phe-NH ₂
PPS	Ac-Ile-pTyr-Gly-Glu-Phe-NH ₂
PTMs	Modification post-traductionnelles
q	Quadruplet

quint	Quintuplet
Rdt.	Rendement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet
sex	Sextuplet
SM-HR	Spectrométrie de masse à haute résolution
t	Triplet
t.a	Température ambiante
TAME	<i>N</i> _α - <i>p</i> -Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride
T _f	Température de fusion
Tf ₂ O	Anhydride trifluorométhane sulfonique
TFA	Acide trifluoroacétique
TfO ⁻ ou CF ₃ SO ₃ ⁻	Ion triflate
tt	triplet de triplets
V	Différence de potentiel appliquée
δ	déplacement chimique

Remerciements

Je remercie tout d'abord ma directrice Andreea R. Schmitzer et co-directrice de recherche Karen C. Waldron, qui m'ont confié ce projet. Je les remercie de m'avoir soutenue, encadrée et encouragée durant toute la durée de ma maîtrise. Je voudrais aussi les remercier pour l'ambiance qu'elles ont su instaurer dans leurs laboratoires, d'avoir partagé leurs connaissances, et de s'être montrées disponibles pour l'avancement du projet.

Je ne saurais oublier les membres des deux groupes de recherche, je veux parler de Golfam, Denis, Fatma, Antoine, Kevin (du groupe Waldron). Les membres du groupe Schmitzer : Dat, Vincent, Marc, Christine, Vanessa, Paul, Mathieu, Josée, Audrey et Salim et Claude pour l'ambiance et les papotages qui m'ont permis de découvrir leurs belles qualités.

Je remercie également les membres du groupe Rochefort pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble (célébration des anniversaires, dîners de fin d'année avec le groupe Waldron *etc.*)

Mes remerciements s'adressent à toutes les personnes de tous les services communs (spectroscopie de masse, RMN) et aussi au personnel des salles de TP qui m'ont prêté main forte durant ma maîtrise.

Mes remerciements vont aussi aux membres du jury qui ont accepté de juger mon travail.

Je voudrais surtout remercier mes parents Martha et Ernst pour les encouragements donnés, leur support indéfectible, et leur amour inconditionnel. Mes sœur et frère Maer et Lentzkie pour leur précieuse aide, leur appui et d'avoir tout pu compter sur eux...

Finalement il me reste une personne à remercier. Bien entendu, il s'agit de la personne qui partage désormais ma vie, ma moitié Richardson Junior. Je le remercie infiniment pour son précieux soutien et ses encouragements inestimables.

1. Introduction

1.0. Phosphorylation des protéines

Les cellules vivantes de l'organisme reposent sur un grand nombre de processus moléculaires dynamiques interdépendants qui gouvernent la croissance cellulaire, la reproduction et la survie. Ces processus biologiques relativement complexes, sont régis par des protéines, lesquelles interagissent de façon dynamique entre elles, et avec d'autres molécules telles les phospholipides, les hydrates de carbone et les acides nucléiques *etc.* L'activité de la cellule est non seulement déterminée par le taux de biosynthèse des protéines et leur dégradation, mais aussi les modifications chimiques non-covalentes d'un ou plusieurs acides aminés.¹ Et ces modifications portent le nom de modifications post-traductionnelles (PTMs).

Communément appelées «*commutateurs cellulaires*», les PTMs constituent un des moyens les plus puissants pour modifier les propriétés physico-chimiques des protéines. Parmi celles-ci se trouvent le repliement, la modification chimique et l'activité. Par ailleurs, ces modifications dans les propriétés des protéines engendrent un certain nombre de conséquences comme le changement de l'activité enzymatique, l'état d'oligomérisation, l'interaction avec d'autres protéines, la localisation sub-cellulaire et le temps de demi-vie. Elles entraînent aussi l'apparition de beaucoup de maladies comme le cancer, le diabète, les maladies cardio-vasculaires *etc.*^{2,3}

¹ a) Jensen, O. N.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, 8, 33–41. b) Oliveira, A.P.; Sauer, U.; *FEMS Yeast Res.* **2012**, 12, 104-117.

² Kobir, A.; Shi, L.; Boskovic, A.; Grangeasse, C.; Franjevic, D.; Mijakovic, I.; *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1810, 989-994.

³ Kamath, K. S.; Vasavada, M. S.; Srivastava, S., *J. Proteomics*, **2011**, 75, 127-144.

Dans les cellules eucaryotes, il existe plus de 300 PTMs. Parmi les PTMs les plus courantes se trouvent: la phosphorylation, le ϵ -NH₂-acetylation, la S-méthylation, la glycosylation, la lipidation, l'ubiquitinylation *etc.*^{1,4}

Depuis l'isolement en 1932 de la phosphosérine dans la vitelline par Levene et Lipmann, la phosphorylation des protéines est devenue une des PTMs les plus fréquemment observées et étudiées.⁵ Cependant, la phosphorylation peut-être réversible ou irréversible. Elle est dite réversible lors de l'addition d'un groupement phosphate sur le squelette protéique et irréversible lors du clivage protéolytique du signal peptidique.³ Actuellement, la majorité des processus physiologiques tels la croissance cellulaire, les voies de signalisation, la différenciation cellulaire et l'apoptose sont régulés par la phosphorylation réversible. L'équilibre entre l'activation et la désactivation des voies de signalisation est non seulement dirigé par la phosphorylation des kinases, mais aussi par des processus de déphosphorylation des phosphatases.⁶ Cependant, sa dérégulation favorise l'apparition de certaines maladies comme la maladie de l'Alzheimer, le cancer, le diabète *etc.*

Les phosphoprotéines peuvent être classées en quatre groupes chez les eucaryotes selon l'acide aminé portant la PTM :

- a. Les O-phosphates (thréonine, sérine et tyrosine)
- b. Les N-phosphates (arginine, histidine, lysine)
- c. Les S-phosphates (cystéine)

⁴ a) Zhao, J.; *Cell. Mol. Life Sci.*, **2007**, 64, 3017-3033. b) Linder, M. E.; Deschenes, R. J.; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, 8, 74-84. c) Charollais, J.; Van der Goot, G.; *Mol. Membr. Biol.*, **2009**, 26, 55-66. d) Boutin, J. A.; *Cell. Signal.*, **1997**, 9, 15-35. e) Veger, A.; Perdomo, J.; Crossley, M.; *EMBO*, **2003**, 4, 137-142.

⁵ Paradela, A. ; Albar, J. P. ; *J. Proteome Res.*, **2008**, 7, 1809-1818.

⁶ Bononi, A.; Agnoletto, C.; DeMarchi, E.; Marchi, S.; Patergnani, S.; Bonora, M.; Giorgi, C.; Missiroli, S.; Poletti, F.; Rimessi, A.; Pinton, P. ; *Enzyme research*, **2011**, 1-26.

d. Les Acylphosphates (acide aspartique et acide glutamique)

Récemment, l'attention a été portée sur les *O*-phosphates à cause de leur stabilité chimique dans les milieux acide et neutre, les rendant par conséquent plus aptes à être étudiés.^{7,8} En dépit du fait que seulement 30 % des protéines sont phosphorylées chez les mammifères, la phosphorylation demeure un processus sub-stoechiométrique, dans le sens que ce ne sont pas toutes les protéines qui restent dans leur état phosphorylé.⁷⁻⁹

Bien que la phosphorylation des protéines a été découverte il y a plus de 100 ans, peu de sites de phosphorylation ont été cartographiés lorsque les diverses technologies d'analyse du protéome ont été développées. De toute évidence, le nombre d'études rapportées sur la phosphorylation des protéines a considérablement augmenté depuis les années 1990 (Figure 1.1). Plus particulièrement, la stratégie basée sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), a ouvert la porte à l'analyse complète de protéome des organismes entiers et par conséquent, à l'analyse globale du phosphoprotéome.

⁷ a) Bond, A. E; Row, P. E; Dudley, E.; *Phytochemistry*, **2011**, 72, 975-996. b) Eyrich, B.; Sickmann, A.; Zahedi, R. P.; *Proteomics*, **2011**, 11, 554-570.

⁸ Macek, B.; Mijakovic, I.; *Proteomics*, **2011**, 11, 3002-3011.

⁹ a) Kapková P.; Lattová, E.; Perreault, H.; *Anal Chem*, **2006**, 78, 7027-7033. b) Hu, J.; Zhao, Y.-F.; Li, Y.-M.; *Phosphorus Sulfur*, **2008**, 183, 249-252.

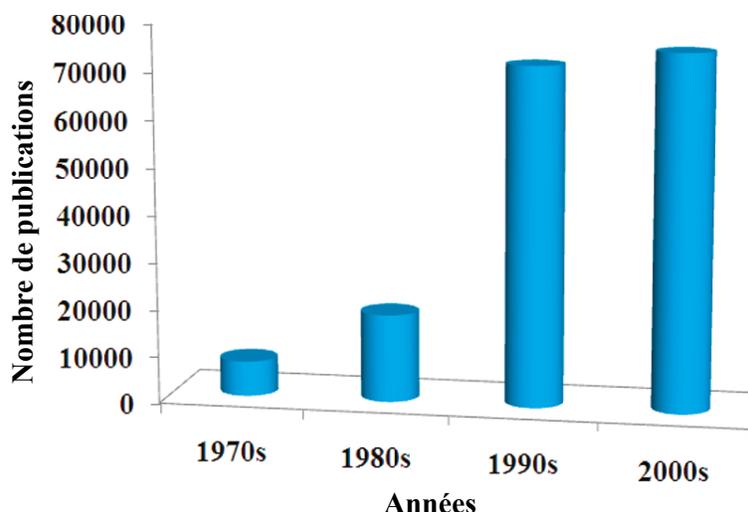


Figure 1.1. Nombre de publications se rapportant à la phosphorylation des protéines jusqu'en 2011. Figure adaptée de la référence 10. (Mots clés : protein phosphorylation, Sci Finder)¹⁰

Actuellement, des milliers de sites de phosphorylation peuvent être régulièrement détectés dans une seule expérience phosphoprotéomique.^{10,11} Cependant, les phosphoprotéines et/ou phosphopeptides doivent être enrichis par rapport au total des composants cellulaires avant analyse par spectrométrie de masse (MS).^{7b}

Dans le passé, l'analyse de la phosphorylation a été faite principalement par radiomarquage avec ³²P ou ³³P associé à l'électrophorèse capillaire; et le radioséquençage d'Edman a été utilisé pour l'identification et la localisation de l'acide aminé modifié.¹² De nos jours, avec les multiples avancées dans la préparation de l'échantillon / séparation, l'enrichissement, et l'analyse des données; les approches protéomiques en utilisant la MS,

¹⁰ Wang, F.; Song, C.; Cheng, K.; Jiang, X.; Ye, M.; Zou, H.; *Anal. Chem.* **2011**, 83, 8078–8085.

¹¹ a) Eng, J. K.; McCormack, A. L.; Yates, J. R. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **1994**, 5, 976–989. b) Washburn, M. P.; Wolters, D.; Yates, J. R. *Nat. Biotechnol.*, **2001**, 19, 242–247. c) Wolters, D. A.; Washburn, M. P.; Yates, J. R.; *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5683–5690.

¹² a) MacDonald, J. A.; Mackey, A. J.; Pearson, W. R.; Haystead, T. A., *Mol. Cell Proteomics* **2002**, 1, 314–322. b) Bendt, A. K.; Burkovski, A.; Schaffer, S.; Bott, M.; Farwick, M.; Hermann, T.; *Proteomics* **2003**, 3, 1637–1646. c) Roepstorff, P.; Kristiansen, K., *Biomed. Mass Spectrom.* **1974**, 1, 231–236

ont conduit à l'identification et à la quantification relative de centaines voire des milliers de sites de phosphorylation dans un seul échantillon allant jusqu'à des limites de détection femtomolaires ou même attomolaires.¹³

Durant ces dernières années, des efforts considérables ont été accomplis pour développer des méthodes permettant d'isoler sélectivement les phosphopeptides qui proviennent des phosphoprotéines. Parmi celles-ci se trouvent : l'immunoprécipitation, la chromatographie d'affinité, la chromatographie échangeuse d'ions ("ion exchange chromatography"), la chromatographie d'affinité à base de l'ion métallique immobilisé (IMAC) et finalement la chromatographie d'affinité avec un oxyde métallique (MOAC). Ces trois dernières techniques présentées dans les prochaines sections seront utilisées à l'avenir pour une analyse comparative avec la méthode qui sera présentée dans le mémoire.

1.1. Enrichissement par chromatographie d'affinité à base de l'ion métallique immobilisé (IMAC)

En 1975, Porath et. *al* ont introduit un nouveau type de chromatographie connu sous le nom de chromatographie d'affinité à base de l'ion métallique immobilisé (IMAC).¹⁴

¹³ a) Ballif, B. A., Villen, J., Beausoleil, S. A., Schwartz, D.; Gygi, S. P., *Mol. Cell Proteomics* **2004**, *3*, 1093–1101. b) Beausoleil, S. A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J. E.; Villen, J.; Li, J.; Cohn, M. A.; Cantley, L. C.; Gygi, S. P.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 12130–12135. c) Beausoleil, S. A., Villen, J., Gerber, S. A., Rush, J., Gygi, S. P., *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1285–1292. d) Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J. ; Ross, M. M.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; White, F. M.; *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 301–305. e) Pinkse, M. W.; Mohammed, S.; Gouw, J. W.; Van Breukelen, B.; Vos, H. R.; Heck, A. J. R.; *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 687–697. f) Pinkse, M. W.; Uitto, P. M.; Hilhorst, M. J.; Ooms, B.; Heck, A. J.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3935–3943.

¹⁴ Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G., *Nature*, **1975**, *258*, 598-599.

Le IMAC emploie une matrice composée de résines contenant des ions métalliques. Ces derniers favorisent la coordination avec les groupements donneurs d'électrons à la surface de la protéine. Les ions métalliques les plus communément utilisés sont: Cu (II), Ni (II), Zn (II), Co (II), Fe (II), qui sont des accepteurs d'électrons et peuvent être considérés comme des acides de Lewis. Les atomes donneurs d'électrons comme N, S, O présents dans les composés chélatants et attachés au support chromatographique, sont capables de former des chélates métalliques, lesquels peuvent être bidentates, tridentates *etc.*, dépendamment du nombre de liaisons de coordination occupées. Le reste des sites de coordination métalliques sont normalement occupés par des molécules d'eau et qui peuvent être échangées avec des groupements électrodonneurs issus de la protéine.¹⁵

Le IMAC présente un manque de spécificité comparativement aux autres techniques d'enrichissement des phosphopeptides. Par exemple, les peptides acides et ceux qui contiennent l'histidine sont beaucoup plus enrichis que les phosphopeptides, et cet enrichissement supprime la détection des phosphopeptides par la spectrométrie de masse (MS). La faible spécificité de l' IMAC, peut aussi être due aux groupements chélateurs qui non seulement lient les groupements phosphates mais aussi les groupements carboxylique et amino des peptides. De plus, l'inachèvement et les réactions secondaires lors de la dérivation, compliquent souvent l'analyse par MS et l'interprétation des données, ce qui conduit à une sensibilité diminuée.¹⁶

¹⁵ Gaberc-Porekar V.; Menart, V.; *J. Biochem. Biophys. Methods* , **2001**, 49, 335–360

¹⁶ Han, G., Ye, M., Zou, H., *Analyst*, **2008**, 133, 1128–1138.

1.2. Enrichissement par la chromatographie d'affinité à base d'un oxyde métallique (MOAC)

Le MOAC constitue l'une des approches les plus puissantes et les plus prometteuses qui sont apparues ces dernières années permettant d'isoler sélectivement les phosphopeptides provenant des phosphoprotéines. Cette technique tire profit de l'affinité particulière des oxydes métalliques (TiO_2) pour les groupements phosphates. Les avantages de ces oxydes métalliques comprennent une large capacité d'adsorption, une grande stabilité chimique lorsqu'ils sont utilisés dans des conditions de pH extrêmes et des propriétés amphotériques d'échange d'ions.^{17a} Cependant les gros phosphopeptides ne peuvent être enrichis par le MOAC à cause de leur encombrement stérique et des absorbants minéraux qui sont le plus souvent incompatibles.

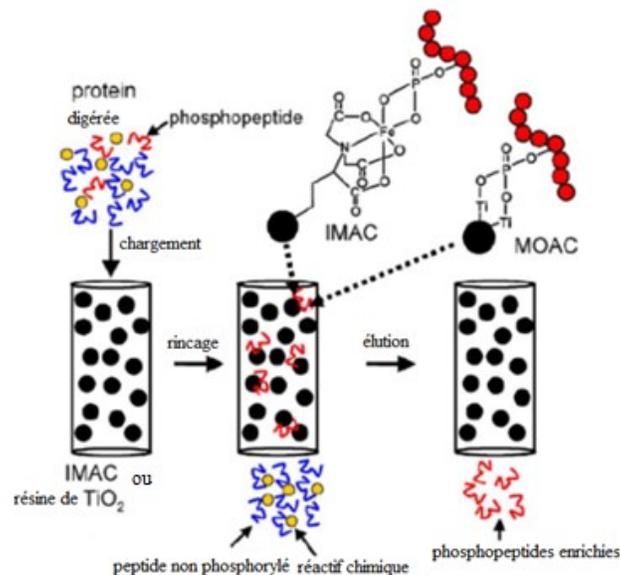


Figure 1.2. Isolation de phosphopeptides par le IMAC et le MOAC (Le garnissage de la colonne est différent pour les deux techniques. Figure adaptée de la référence 18).¹⁸

¹⁷ a) Leitner, A.; Sturm, M.; Lindner, W.; *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 703, 19-30. b) Leitner, A.; *Trends in Analytical Chemistry*, **2010**, 29, 177-185.

¹⁸ Dunn, J. D.; Reid, G. E.; Bruening, M. L.; *Mass Spectrom. Rev.*, **2010**, 29, 29-54

1.3. Chromatographie échangeuse d'ion (Ion exchange chromatography)

Bien que le principe de la chromatographie échangeuse d'ions soit connu pendant plus de 60 ans, ce n'est que récemment qu'il a été adopté pour le préfractionnement des phosphopeptides.¹⁹ La chromatographie échangeuse d'ions permet de séparer les ions de même signe par élution sur une colonne remplie de résine qui peut être anionique ou cationique. Une résine anionique permet d'échanger les peptides chargés positivement de façon réversible, tandis qu'une résine cationique échange les peptides chargés négativement de façon réversible.

Il est à noter que l'application parallèle des deux méthodes de chromatographie échangeuse d'ions est utilisée pour augmenter le nombre de phosphopeptides identifiés. La chromatographie échangeuse de cations conduit à l'identification de plus de phosphopeptides alcalins avec un pI supérieur à 4 tandis que la chromatographie échangeuse d'anions aboutit à l'identification de plus de phosphopeptides acides avec un $pI < 4$.^{17b, 20}

En dépit de tout cela, toutes ces méthodes conduisent à des extractions non-spécifiques des acides aminés acides et à un chevauchement entre les identifications obtenues avec les méthodes actuelles. C'est pour cela qu'il existe un besoin de combler les failles des méthodes d'enrichissement existantes, dans le but d'obtenir des analyses phosphoprotéomiques plus complètes.

À cet effet, des liquides ioniques et plus particulièrement des sels d'imidazolium ont été étudiés comme une alternative afin d'exploiter une interaction spécifique du cation

¹⁹a) Beausoleil S.A, Jedrychowski M, Schwartz D., Elias J.E., Villén J, Li, J. X., Cohn, M. A., Cantley, L. C., Gygi, S. P., *Proc Natl Acad Sci*, **2004**, 101,12130–12135. b) Nühse, T.S., Stensballe, A., Jensen, O.N., Peck, S.C, *Plant Cell*, **2004**, 16:2394–2405

²⁰ Fila, J.; Honys, D., *Amino Acids*, **2012**, 43, 1025–1047

imidazolium avec les groupements phosphates des phosphopeptides, permettant de les extraire sélectivement à partir d'un mélange de peptides.

1.4. Extraction de biomolécules par les liquides ioniques

L'hypothèse sur la possibilité d'utiliser les liquides ioniques (LI) pour l'enrichissement des phosphopeptides, fut basée sur les études des extractions des biomolécules telles les acides aminés, les protéines et les composés organiques précédemment décrites dans la littérature.²¹ En effet, le noyau imidazole, constitue une unité structurelle qui se retrouve sur le site actif de nombreuses protéines et acides nucléiques. Celui-ci joue également un rôle essentiel dans la fonction biologique de ces macromolécules lorsqu'il se retrouve sur sa forme protonnée ou non-protonnée.^{22,23} Par exemple, la présence de cation imidazolium dans un lipide peut être favorable pour la complexation de l'ADN; de même, de nombreux polyamines ou polyamines ont montré l'efficacité de ces cations imidazolium dans la thérapie génique non virale.^{23,24} Par conséquent, par analogie avec le cation imidazolium et aux multiples possibilités qu'offrait le cation imidazolium, le groupe Schmitzer a développé des sels N, N'-dialkylméthylènediimidazolium. Dans cette étude, le groupe Schmitzer a démontré que

²¹ a) Shimojo, K.; Goto, M.; *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 5039. b) Visser, A. E.; Swatloski, R. P.; Reichert, W.M.; Mayton, R. ; Sheff, S.; Wierzbicki, A.; Davis, J. H.; Rogers, R. D.; *Chem. Comm.*, **2001**, 135. c) Luo, H. M.; Dai, S.; Bonnesen, P.V.; *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 2773. d) Smirnova, S. V.; Torocheshnikova, I. I.; Formanovsky, A. A.; Pletnev, I.V.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, 378, 1369. e) Du, Z.; Yu, Y. L.; Wang, J.-H.; *Chemistry A European Journal*, **2007**, 13, 2130.

²² a) Atwood, J. L.; Davies, J. E. D.; MacNicol, D. D.; Vögtle, F. «*Comprehensive Supramolecular Chemistry*» Vol. 11, Pergamon, Oxford, **1996**. b) Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A.; «*Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*», Wiley, New York, **2000**.

²³ Pardin, C.; Leclercq, L.; Schmitzer, A. R.; *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 4686-4692

²⁴ a) Mével, M.; Breuzard, G.; Yaouanc, J.-J.; Clément, J. C.; Lehn, P.; Pichon, C.; Jaffrès, P.-A.; Midoux, P.; *Chem BioChem*, **2008**, 9, 1462 –1471. b) Midoux, P.; Pichon, C.; Yaouanc, J.-J.; Jaffrès, P.-A.; *Br. J. Pharmacol.*, **2009**, 157, 166-178.

ces sels N, N'-dialkylméthylènediimidazolium pouvaient former des vésicules multicouches qui possédaient des charges positives à leur surface, qui leur permettaient d'interagir avec l'ADN.²³ Ils ont aussi constaté que le cation bis-imidazolium était essentiel dans l'orientation des chaînes alkyles.

Il en est de même de la benzophénone qui (couramment utilisée comme filtre UV dans les produits cosmétiques et qui peut être absorbée par la peau) a été détectée dans des échantillons d'urine en utilisant l'hexafluorophosphate de 1-hexyl-3-méthylimidazolium [C₆MIM⁺] [PF₆⁻], par une technique basée sur une microextraction d'une seule goutte.²⁵ L'amphétamine et la nikéthamide ont été extraites avec l'acétate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium [C₂MIM⁺] [OAc⁻] d'un échantillon d'urine. Il a d'ailleurs été prouvé que ce LI, montrait une meilleure capacité d'extraction que les solvants organiques traditionnels.²⁶

Comme l'extraction des protéines par les LI a toujours été réalisée à l'aide d'un agent d'extraction concomitant,²⁷ Wang et al ont étudié l'hexafluorophosphate de 3-butyl-1-méthylimidazolium (BMIM-PF₆) pour extraire directement l'ADN double brin. Dans leur recherche, ils ont mis en évidence par la RMN ³¹P et le FT-IR les interactions qui existaient dans la phase aqueuse et à l'interface eau/LI entre le cation imidazolium et les groupements phosphates. Ces interactions favorisaient donc la méthanèse d'anions et le passage de l'ADN dans la phase LI.^{28,29}

²⁵ Vidal L.; Chisvert A.; Canals A.; Salvador A.; *J. Chromatogr. A* **2007**, 1174, 95-103

²⁶ Lei Z. G.; Chen, B.H.; Li, C.Y. *Chem Eng Sci.*, **2007**, 62, 3940-3950

²⁷ Shimojo, K.; Nakashima, K.; Kamiya, N.; Goto, M.; *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 2.

²⁸ Cheng, D.-H.; Chen, X.-W; Shu, Y.; Wang, J.-H.; *Talanta*, **2008**, 75, 1270–1278.

²⁹ Wang, J. H.; Cheng, D.H; Chen, X. W; Du, Z., Fang, Z. L.; *Anal Chem.*, **2007**, 79:620–625

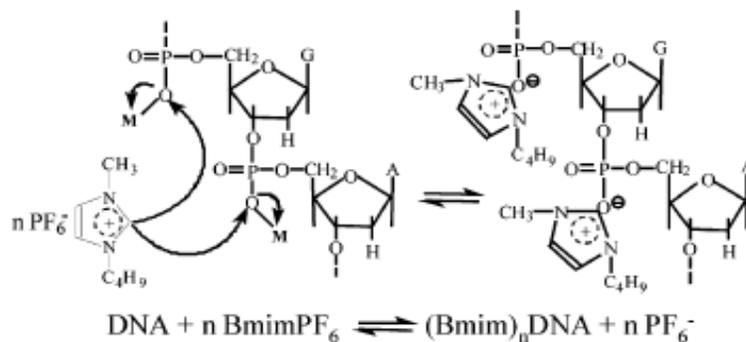
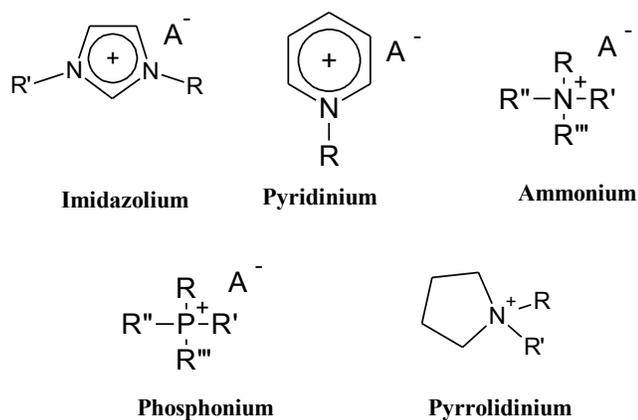


Figure 1.3. Mécanisme de complexation proposé pour l'extraction de l'ADN double brin par le cation butylmethyl imidazolium (BMIM⁺). Figure adaptée de la référence 29²⁹

1.5. Les sels d'imidazolium et les liquides ioniques

Les sels d'imidazolium constituent l'une des familles les plus populaires de la classe des liquides ioniques (Figure 1.4).³⁰



R, R', R'', R''' = alkyl, aryl

A⁻ = BF₄⁻, PF₆⁻, CF₃SO₃⁻, Cl⁻, Br⁻, Ntf₂⁻

Figure 1.4. Structures des différents cations et anions des liquides ioniques.

³⁰ Dupont, J.; *J.Braz.Chem.Soc.*, **2004**, 15, 341-350.

Il faut préciser que le terme « *liquide ionique* » (LI) a été introduit dans le but de les distinguer des sels fondus classiques (NH₄F-HF, les halogénures d'alkylpyridinium *etc.*) et en raison de leur point de fusion généralement inférieur à 100°C. Cette démarcation un peu arbitraire entre les points de fusion des liquides ioniques et des sels fondus, a été aisément acceptée par la communauté scientifique car les liquides ioniques possèdent des propriétés physico-chimiques et catalytiques uniques.³¹

Dans les années 90, il a été démontré que les LIs possédaient un état d'ordre avancé. En effet, les liquides ioniques sont décrits comme des entités supramoléculaires en phase solide, liquide et gaz. Ils possèdent des propriétés physico-chimiques uniques comme une haute stabilité thermique c'est-à-dire qu'ils ne se dégradent pas facilement et ont une faible viscosité.³² En étant liquides à température ambiante, ils ont une pression de vapeur négligeable ce qui signifie qu'ils ne dégagent de composés volatiles organiques qu'à une très haute température, contrairement aux solvants organiques classiques (acétone, dichlorométhane, *etc.*).³³ Ces propriétés leur permettent d'être utilisés comme solvants "verts" pour la synthèse organique ou pour la catalyse. De plus, ils sont facilement recyclables et sont donc associés à la chimie verte.^{32b} Par ailleurs, les liquides ioniques d'un point de vue physico-chimique sont loin d'un solvant moléculaire classique. En effet leurs propriétés physico-chimiques varient selon les substituants rattachés au noyau imidazolium et la nature du contre ion.^{27,29} Leurs applications variées dans différents domaines (synthèse organique et organométallique, lubrifiants, phase

³¹ Tao G.; He L.; Liu W.; Xu L.; Xiong W.; Wang T.; Kou Y.; *Green Chem.*, **2006**, 8, 639–646

³² Trilla, M. ; Pleixats, R.; Parella, T.; Blanc, C.; Dieudonné, P.; Guari, Y.; Wong Chi Man, M.; *Langmuir*, **2008**, 24, 259-265. b) Clark, J.H; *Green Chem.*, **1999**, 1, 1-8.

³³ Stepnowski, P.; Storoniak, P.; *Environ .Sci. & Pollut. Res.*, **2005**, 12, 199-204.

stationnaires en chromatographie) ²⁷ leur donnent un haut potentiel en chimie (Figure 1.5).

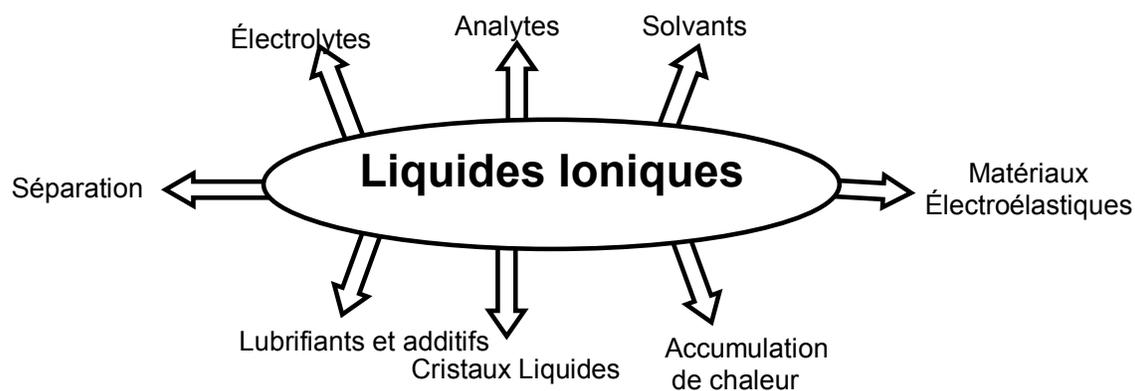


Figure 1.5. Diverses applications des liquides ioniques.

L'objectif poursuivi dans ce projet a été de développer de nouveaux LI afin d'extraire sélectivement un phosphopeptide (PPS : Ac-Ile-pTyr-Gly-Glu-Phe-NH₂) d'une solution, en présence d'analogues peptidiques non-phosphorylés (PN : Ac-Ile-Tyr-Gly-Glu-Phe-NH₂ et PE: Ac-Glu-Tyr-Gly-Glu-Phe-NH₂). (Figure 1.6) Le phosphopeptide PPS possède un groupement phosphate sur l'acide aminé tyrosine et un acide aminé acide (l'acide glutamique), tandis que ses analogues acides non-phosphorylés soient le PN et le PE possèdent respectivement un ou deux acides glutamiques.

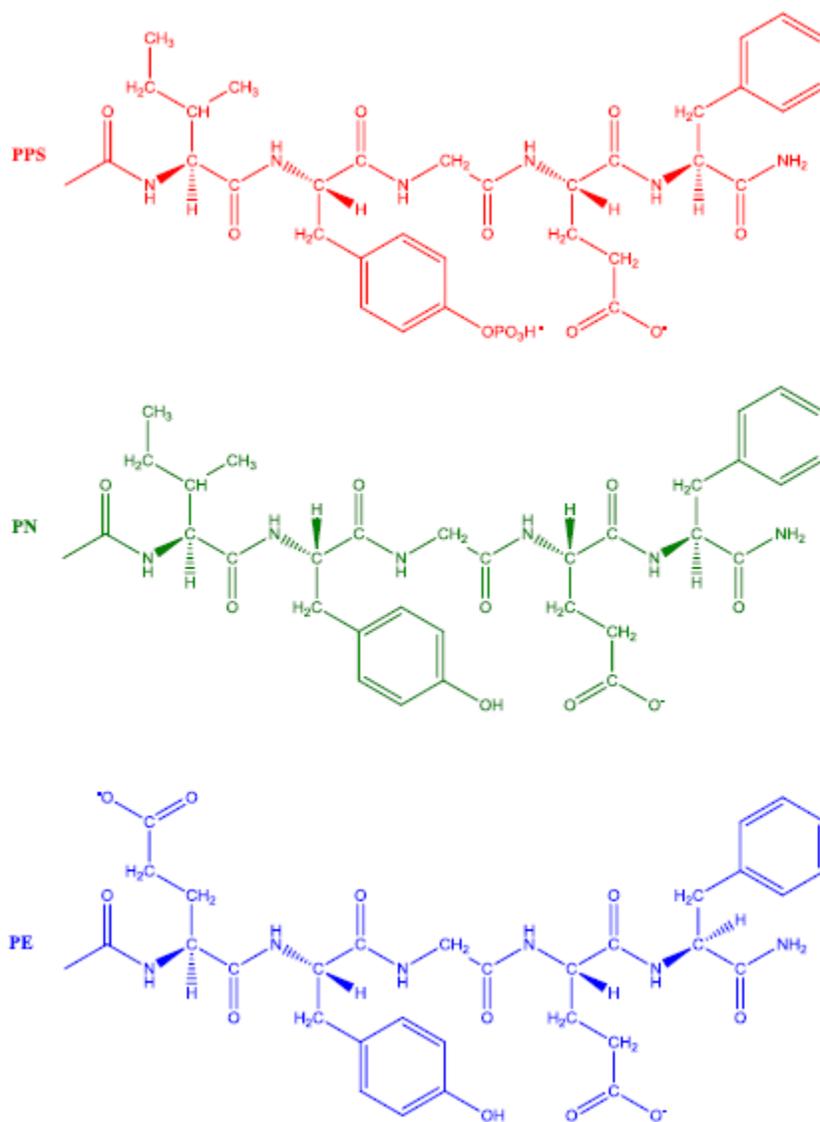


Figure 1.6. Représentation des différents peptides utilisés dans cette étude sous leur forme anionique.

L'approche utilisée a été divisée en trois parties :

a. Synthèse des différents sels d'imidazolium

- b. **Étude de l'extraction liquide-liquide** en utilisant l'hexafluorophosphate de 3-butyl-1-méthylimidazolium (BMIM-PF₆) et le bis (trifluoromethanesulfonyl)amide de 3-butyl-1-méthylimidazolium (BMIM-NTf₂).
- c. **Étude de l'extraction solide-liquide** en immobilisant des sels d'imidazolium sur une phase stationnaire C₁₈ et en comparant les résultats obtenus avec une méthode d'enrichissement sur résine échangeuse d'anions.

L'efficacité de l'extraction liquide-liquide et solide-liquide a été déterminée en utilisant des techniques analytiques permettant de détecter et de séparer simultanément les trois peptides qui se trouvaient dans la phase aqueuse après extraction avec le liquide ionique (LI). Les méthodes qui ont été utilisées sont l'électrophorèse capillaire (CE) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). En HPLC, la séparation des molécules se fait selon leur hydrophobicité, tandis qu'en CE, elle se fait selon leur rapport charge sur rayon hydraté (q/r).

d.

1.6. Techniques analytiques utilisées

3.2.1. Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (CE), une technique de séparation complémentaire à l'HPLC. Elle est souvent utilisée pour les séparations des petits ions, des peptides, des protéines et des acides nucléiques. Elle possède de nombreux avantages comme une haute efficacité, de temps d'analyse courts, et de faibles quantités d'échantillon nécessaires pour une grande variété d'applications. De plus, cette technique s'effectue en milieu aqueux moins coûteux et moins toxiques que les solvants organiques utilisés en

HPLC^{34,35} La migration des composés en CE est basée sur sa mobilité électrophorétique. Cependant, l'une des limitations du CE est sa faible limite de détection pour les solutions très diluées. Celle-ci provient des dimensions des capillaires qui restreignent le parcours optique et la capacité de charge du système.

Les trois peptides qui ont été utilisés dans ce projet sont tous les trois porteurs de charge négative, ce qui veut dire qu'ils migrent plus lentement que le flux électroosmotique. À pH 7, le PN, qui est le plus petit des peptides, possède une seule charge négative qui provient de l'acide glutamique, et sortira en premier. Le PE, possède quant à lui deux charges négatives provenant des deux acides glutamiques et sera donc élué en deuxième. En dépit du fait que le PPS possède deux charges négatives, lesquelles sont dues aux groupements phosphate (présents sur la tyrosine) et acide de l'acide glutamique, il est le dernier peptide à éluer parce qu'il est plus négatif que le PE.

En CE, la détection des analytes s'effectue directement à travers le capillaire de silice dénudé de sa gaine flexible grâce à un détecteur UV. Compte tenu du faible parcours optique (75 µm) à travers le capillaire, cette méthode de détection est moins sensible que pour le HPLC. Les 3 peptides utilisés dans ce projet ont le même coefficient d'absorption molaire. Par conséquent, l'aire du pic du peptide est proportionnelle à l'absorbance et est représentative de la concentration du peptide qui sera utilisée à des fins de quantification.

3.2.1. Chromatographie liquide à haute performance

³⁴ Harris, D. C, «*Quantitative Chemical Analysis*», W.H. Freeman and Company United States of America, **2007**, p.603.

³⁵ a) Nerurkar, M.M., et al, *J. Pham. Biomed. Anal.*, **1997**. 15, 945-950. b) Prata, C., et al., *Electrophoresis*, **2001**, 22: p. 4129-4138. c) Watzig, H. and S. Gunter, *Clin Chem Lab Med*, **2003**, 41, 724-738.

La chromatographie liquide à haute performance communément désignée par HPLC, est une technique analytique qui permet d'identifier et de quantifier les composés en solution dans un mélange. Son principe s'appuie sur l'équilibre des solutés présents dans les phases stationnaire et mobile.

Il faut souligner que la CE et la LC-MS ont été utilisées pour la quantification des peptides avant et après interaction avec les LI.

2. Partie expérimentale

2.1. Produits chimiques

Le PPS et le PN proviennent de la compagnie Bachem AG, Switzerland. Le PE a été acheté chez Genscript-*The biology, CRO*. Le H-Phe-Tyr-OH et le H-Phe-Arg-OH ont été achetés chez Bachem California *Inc.* Le *N* α -*p*-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME), le sodium phosphate monobasique hydrate, la résine échangeuse d'anion (le Dowex 1x8) ont été obtenus chez Sigma Aldrich (Oakville, Canada), et le sodium phosphate dibasique provient de Fisher Scientific (St-Laurent, Canada).

Les réactifs utilisés pour les synthèses ont été achetés avec une pureté chimique au moins supérieure à 97 % et ont été utilisés sans purification préalable.

L'eau purifiée a été obtenue avec un système de filtration/deionisation d'eau MilliQ de Millipore (Etobicoke, Canada).

Toute la verrerie a été stockée dans une étuve à 60°C, utilisée dès sa sortie pour effectuer les synthèses.

2.2. Préparation des solutions analytiques

La solution de tampon phosphate de sodium 30 mM à pH 7 a été élaborée avec du Na₂HPO₄ et du NaH₂PO₄.H₂O, préparée dans l'eau pure Milli-Q, et gardée au frigo (4 °C). Les tampons ont été filtrés avec des filtres de nylon ayant des pores d'un diamètre de 0.2 μ m. Les solutions de peptides ont été préparées dans de l'eau pure Milli-Q aux concentrations données dans la section 3, et stockées dans le congélateur à -20 °C.

2.3. Électrophorèse capillaire (CE)

Les instruments de CE qui ont été utilisés sont en tout premier lieu le Agilent *Technologies G1600A*, équipé d'un détecteur à barrette de diodes (DAD), et contrôlé par ChemStation Agilent, et en second lieu, le *P/ACE MDQ CE* de la compagnie Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), contrôlé par Karat (version 7.0) de Beckman.

Pour toutes les expériences CE, le capillaire de silice fondue (Polymicro Technologies) qui a été utilisé, avait un diamètre interne (d.i.) de 75 µm et un diamètre externe (d.e.) de 363 µm. Le capillaire possédait une longueur totale variant entre 43.2 et 46 cm; et une longueur au détecteur de 10 cm de moins. La détection a été faite dans tous les cas, à 200 nm.

Avant chaque analyse, le capillaire a été nettoyé avec du NaOH 0.1 M pour un minimum de 2 min, de l'eau pure Milli-Q pendant 2 min et avec le tampon de séparation durant 3 min. Les injections qui ont été effectuées sont de type hydrodynamique, où l'échantillon a été injecté pendant 3.2 s à une pression de 0.5 psi, qui correspondait à un volume d'injection de 19 nL lorsque le Beckman était utilisé. Et lorsque le Agilent était utilisé, l'échantillon a été injecté durant 5 secondes à une pression de 50 mbar correspondant à un volume d'injection de 44 nL.

2.4. Chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur de masse simple quadripôle (LC-MS)

L'appareillage LCMS (*Agilent Technologies 1200 Series*), contrôlé par le logiciel HP ChemStation (version B.04.01, Agilent) était muni d'un détecteur d'absorption DAD

ainsi qu'un détecteur de masse simple quadripôle (MSD, Agilent Technologies) ayant un voltage de 30 kV a été utilisé. La gamme de balayage utilisée par le détecteur de masse variait entre 100 et 1000 m/z.

Le volume d'injection a été programmé à 5 μ L. La colonne YMC-Pack ODSA (YMC Europe GMBH) de dimension 100 mm x 4.6 mm a été utilisée.

La séparation a été effectuée avec un débit de la phase mobile de 0.5 mL/ min où l'éluant B (ACN: 0.1% AF) augmentait de 5 à 90 % dans les premiers 8 min puis était maintenu à 90 % jusqu'à 13 min, finalement à 5% 13.5 min.

2.5. Synthèses des LI et des sels d'imidazoliums

Les LI et les sels d'imidazoliums ont été synthétisés selon la procédure décrite dans la littérature.^{23, 36} La caractérisation des molécules se trouvent en annexe.

2.6. Extraction liquide-liquide

À partir des LI synthétisés, on a procédé à l'extraction liquide-liquide. Pour cela, un mélange des 2 peptides PPS et PN (40 μ L de volume total) ayant chacun une concentration approximative de 60 μ M a été préparé dans de l'eau milli-Q et quantifié par CE pour avoir l'aire des pics au « point zéro » c'est-à-dire leur quantité avant extraction. Par la suite cette solution de peptides a été mélangée avec les LI pour effectuer l'extraction et le mélange résultant a été agité en utilisant différents types de méthodes :

³⁶ Samsam, S.; Leclercq, L.; Schmitzer, A. R.; *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113, 9493-9498.

agitation douce avec un shaker, un vortex, et un bain à ultrason. Le mélange LI-peptides a été ensuite centrifugé pour une période 5 min dans le but de séparer la phase aqueuse de la phase LI. Finalement, la phase aqueuse a été analysée par CE, dans le but de déduire la quantité de peptides restant en solution selon l'aire des pics c'est-à-dire la proportion non-extraite. (Figure 2.1)

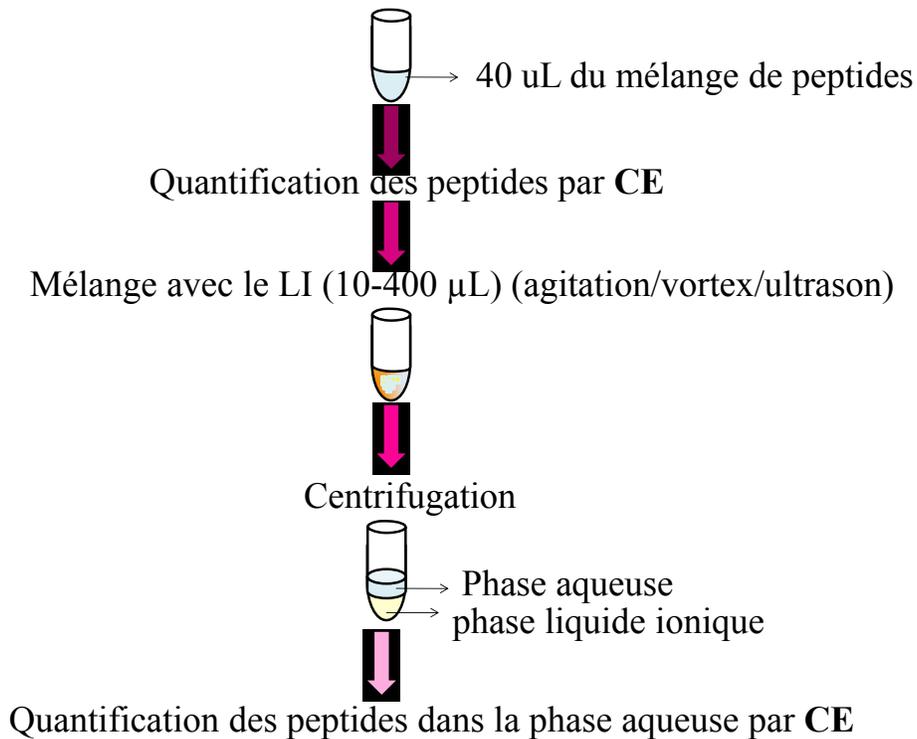


Figure 2.1. Extraction liquide-liquide en utilisant l'hexafluorophosphate de 3-butyl-1-méthylimidazolium et le bis-(trifluorométhanesulfonyl)amide de 3-butyl-1-méthylimidazolium. CE : Capillary electrophoresis dans 30 mM de tampon phosphate pH= 7

2.7. Extraction solide-liquide

2.7.1. Extraction solide-liquide en utilisant des embouts de pipette de microextraction contenant une phase stationnaire C₁₈

L'adsorption des sels d'imidazolium sur une phase C₁₈ a été employée dans le but de faire une extraction solide-liquide. La première étape de cette extraction consiste à hydrater durant 1 min l'embout de pipette avec une solution de 50 % (v/v) ACN: H₂O, en vue d'activer les chaînes C₁₈ de la phase stationnaire. Ensuite l'embout a été équilibré avec une solution de 50% (v/v) DMF : H₂O (le solvant des sels d'imidazoliums). La phase stationnaire C₁₈ a été ensuite fonctionnalisée avec les différents sels de bis-imidazolium en refoulant la solution de sels d'imidazoliums plusieurs fois à travers la phase C₁₈ (Figure 2.2). L'embout de pipette fonctionnalisé, a été ensuite rincé avec de l'eau pure dans le but d'enlever l'excès de sels d'imidazolium qui n'ont pas été adsorbés par la phase stationnaire. L'embout a été ensuite conditionné avec une solution de 0.1% d'acide formique (AF, le solvant des peptides) dans le but de garder les peptides protonnés. Ensuite 100 µL du mélange des trois peptides (PPS, PN et PE) dans 0.1% AF ayant approximativement chacun 40 µM ont été aspirés à travers l'embout fonctionnalisé, au moins douze fois. La solution aqueuse restante a été analysée par CE. Le contenu en peptides de cette solution (mesuré par l'aire des peptides) a été comparé à la solution de peptides avant de faire l'extraction (donnant le « point zéro ») et à une autre solution de peptides qui a subi une extraction avec un embout de pipette de C₁₈ non fonctionnalisé.

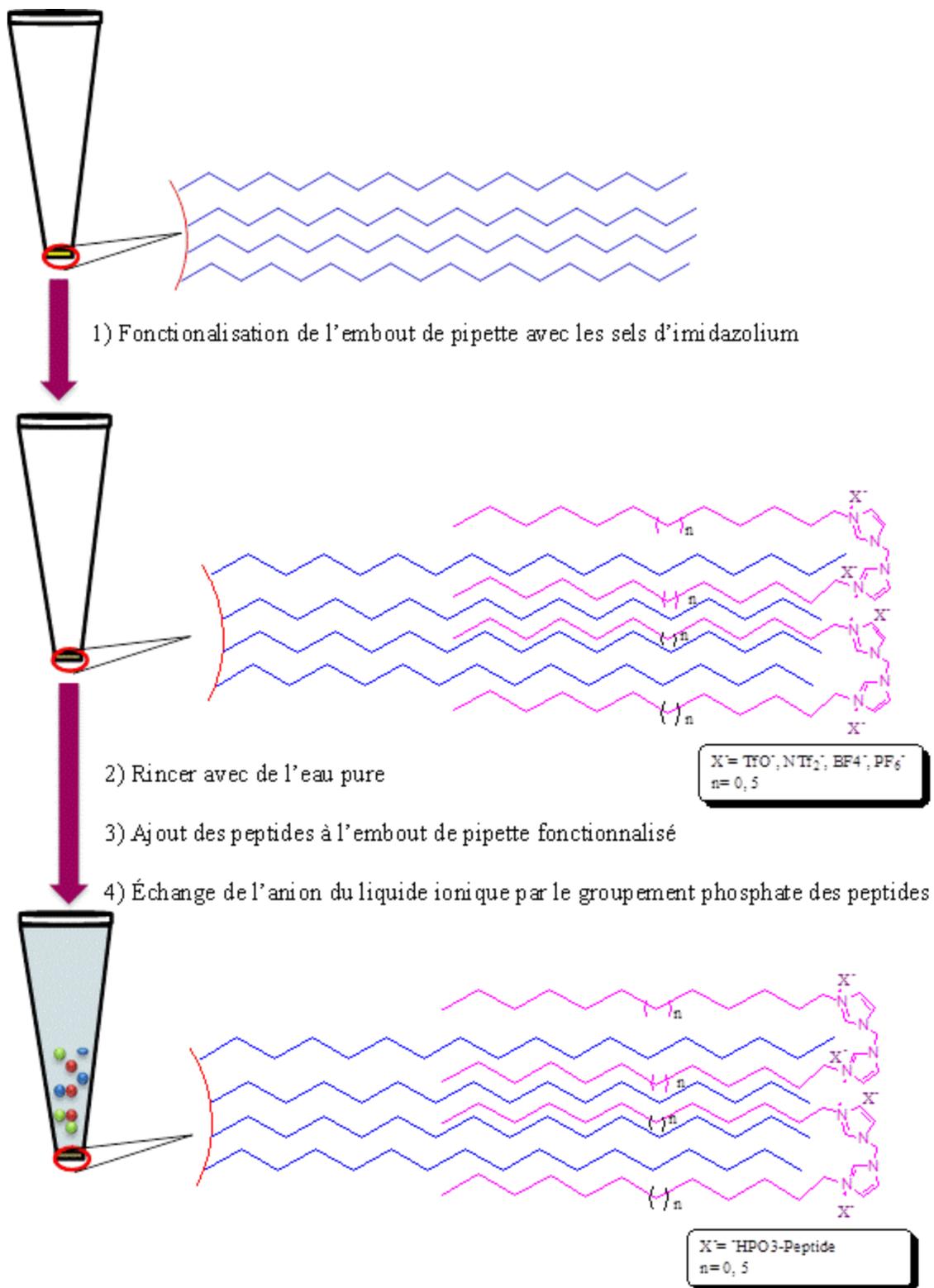


Figure 2.2. Procédure de modification et extraction des peptides avec un embout contenant une phase stationnaire C_{18}

2.7.2. Extraction solide-liquide en utilisant une résine échangeuse d'anions

Pour comparaison avec l'extraction solide-liquide réalisée avec les embouts de pipette contenant une phase stationnaire C18 fonctionnalisée avec un sel de bis-imidazolium, une extraction solide-liquide sur une résine échangeuse d'anions a été effectuée. La procédure utilisée ici est semblable à celle utilisée dans l'extraction liquide-liquide. Dans un tube microcentrifuge, 200 μ L du mélange des trois peptides dans 0.1% AF ayant approximativement chacun 50 μ M, ont été agités puis quantifiés par LC-MS (aire des pics des peptides) pour avoir le « point zéro » c'est-à-dire leur quantité initiale avant extraction. Par la suite, cette solution de peptides a été mélangée avec 120 mg de résine échangeuse d'anions (Dowex 1x8, Sigma Aldrich), préalablement conditionnée. La résine a été conditionnée à la forme OH⁻ avec une solution de 2 moles/L de NaOH, suivi d'un lavage à l'eau déionisée. Le mélange résine/ solution de peptides résultant a été agité avec un agitateur (BEA Enprotech Corp KS10 Rotator) durant 30 min, puis centrifugé pour une période 5 min (à 4 rpm) dans le but de séparer la phase aqueuse de la résine. La phase aqueuse contenant les peptides non retenus sur la résine, a été analysée par LC-MS, dans le but de déduire la proportion de peptides restante en solution après extraction par la résine.

3. Résultats et discussion

3.1. Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est le deuxième processus de séparation le plus important, après la distillation dans les industries chimiques. Elle repose sur le transfert des solutés vers une autre phase immiscible dépendamment de la différence de solubilité. Fréquemment employée à cause de sa simplicité, son faible coût et sa facilité de mise en oeuvre, l'extraction liquide-liquide constitue une méthode de choix pour isoler l'analyte d'intérêt d'une matrice complexe.^{37,38} De plus, le choix du solvant d'extraction est primordial pour augmenter l'efficacité d'extraction de l'analyte.

Récemment, un intérêt considérable a été manifesté pour les liquides ioniques en raison de leurs propriétés uniques et fascinantes. Effectivement, ces propriétés comme la facilité de dissoudre une grande quantité de composés organiques, organométalliques et inorganiques, la forte prédominance des forces coulombiennes résultant de la quasi-absence de toute pression de vapeur importante, font d'eux un solvant de choix, particulièrement pour l'extraction liquide-liquide.³⁹ Pour ces raisons, nous proposons l'utilisation des LI pour extraire sélectivement des phosphopeptides partir d'un mélange complexe contenant de nombreux types de peptides.

³⁷ . Silvestre, C. I. C.; Santos, J. L. M; Lima, J. L. F.C; Zagatto, E. A.G.; *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 652, 54–65.

³⁸ a) Mazzola, P. G.; Lopes, A.; M.; Hasmann, F. A; Jozala A.; F; Penna T. C.V; Magalhaes, P.; O.; Rangel-Yagui, C. O.;Pessoa, A. Jr.; *J Chem Technol Biotechnol*, **2008**, 83, 143-157. b) Chen, Y.; Guo, Z.; Wang, X.; Qiu C.; *J. Chromatogr. A* , **2008**, 1184, 191–219

³⁹ a) Huddleston, J. G.; Willauer, H. D.; Swatloski, R. P.; Visser A. E. ; Rogers R. D. *Chem. Commun.*, **1998**, 1765. b) Handy, S. T.; *Chemistry: A European Journal*, **2003**, 9, 2938.

3.1.1. Extraction de peptides avec l'hexafluorophosphate de 1-butyl-3-méthylimidazolium (BMIM-PF₆)

Dans un premier temps, les deux peptides PPS et PN ont été étudiés. Des solutions de ceux-ci possèdent chacune une concentration approximative de 130 µM. Une injection en HPLC de chaque solution de peptide individuel en solution a permis de connaître l'aire et la hauteur du pic de la solution de départ, ainsi que le temps de rétention spécifique de chaque peptide (Figure 3.1). Ces solutions de départ, également appelées points zéros, ont été utilisées pour savoir quelle quantité de PPS et de PN a été extraite par le BMIM-PF₆.

Le tampon de séparation qui a été utilisé tout au long de cette étude, est le tampon phosphate 30 mM à pH 7. À ce pH, le PPS est porteur de deux charges négatives provenant du groupement phosphate de la tyrosine et du groupement acide l'acide glutamique, tandis que le PN possède une charge négative qui provient de l'acide glutamique. Lorsque le voltage de 20 kV était appliqué, ces peptides ont été chacun entraînés vers la cathode par le flux électroosmotique. Le PN, le peptide ayant le plus faible rapport charge sur masse, a migré le plus rapidement tandis que le PPS ayant le plus grand rapport charge sur masse est sorti en dernier. Les électrophérogrammes du « point zéro » révèlent un maximum d'absorption de 56 et 67 mAU pour respectivement le PN et le PPS.

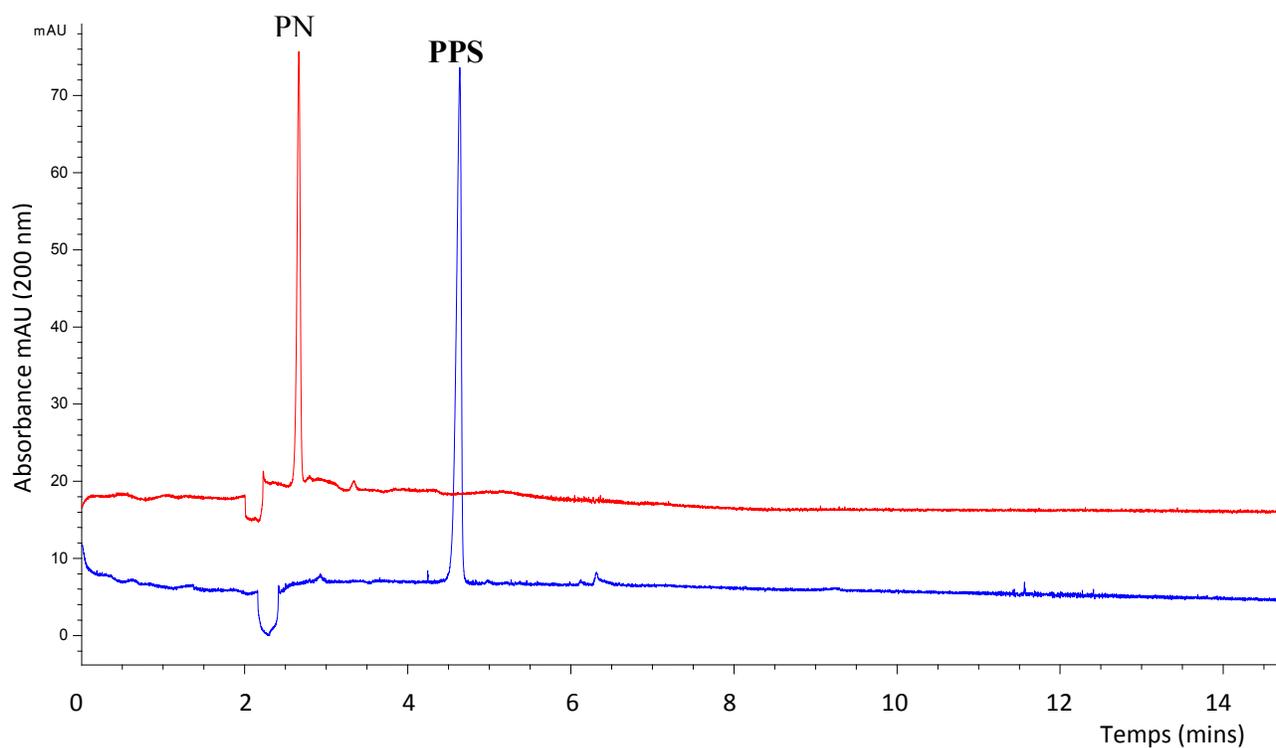


Figure 3.1. Électrophérogrammes des peptides PN (131 μM) et PPS (128 μM) dans la solution de départ.

Comme les chercheurs Wang et al. avaient démontré que l'ADN double brin pouvait être extrait par le BMIM-PF₆,²⁹ ce même liquide ionique, connu pour être insoluble dans l'eau, a été utilisé pour l'extraction individuelle du PN et du PPS.

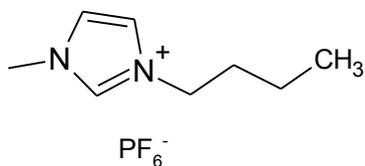


Figure 3.2. Structure chimique de l'hexafluorophosphate de 1-butyl-3-méthylimidazolium (BMIM-PF₆)

Suite à cette extraction, les phases aqueuse et liquide ionique ont été analysées par CE en vue de déterminer quelle quantité de peptides a été extraite. Une analyse des électrophérogrammes obtenus révèle qu'aucune trace du PPS ni du PN n'a été décelée dans les phases aqueuse et liquide ionique analysées, ceci étant peut-être dû au fait que la limite de détection en CE n'était pas assez basse. En effet, les maxima d'absorption des électrophérogrammes des peptides standards ne dépassaient pas les 67 mAU tandis que ceux de la phase liquide ionique et de la phase aqueuse avoisinaient les 2000 mAU. Ces maxima d'absorption étaient dus au cation butylmethylimidazolium du BMIM-PF₆ qui se retrouvait dans la phase aqueuse; le liquide ionique qui était réputé être immiscible avec l'eau s'est révélé y être partiellement miscible (Figure 3.3).

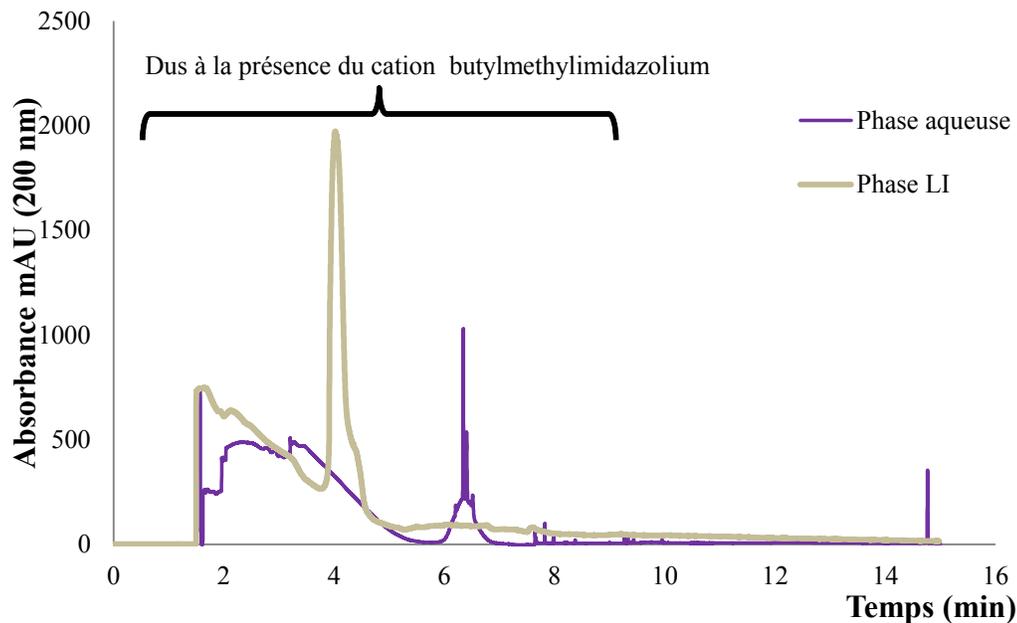


Figure 3.3. Électrophérogrammes des phases aqueuses et liquide ionique obtenus par CE lors de l'extraction des peptides.

Ensuite une analyse par LC-MS des phases aqueuse et liquide ionique ayant servi à l'extraction du PPS, s'est avérée nécessaire afin de détecter la présence du

phosphopeptide qui ne pouvait pas être détectée par CE. Lorsque la phase aqueuse a été analysée par LC-MS en mode négatif, les pics du PPS et de l'anion hexafluorophosphate ont été détectés. Cependant, le pic du PF_6^- beaucoup plus intense sur le spectre de masse, atteignant 2 ordres de grandeurs de plus que le pic du PPS. (Figure 3.4).

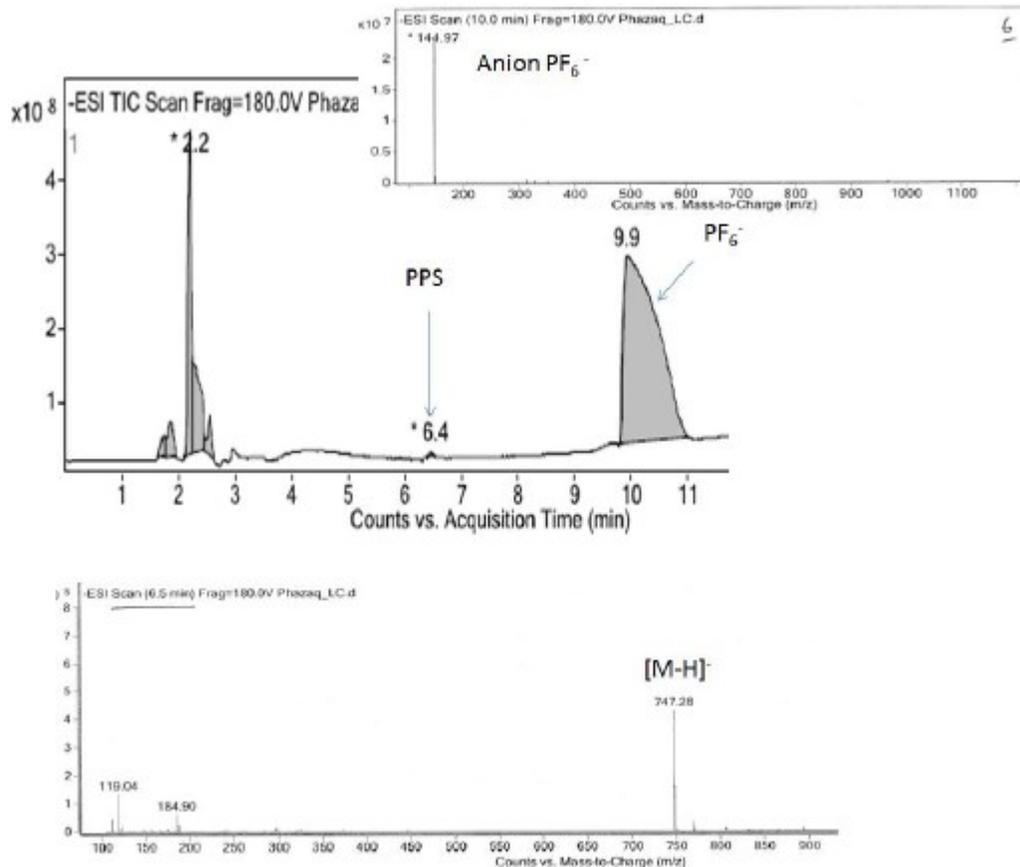


Figure 3.4. Chromatogramme et spectres de masse du PPS et l'ion hexafluorophosphate provenant de la phase aqueuse lors de l'extraction.

En constatant que dans la figure 3.3 il y avait beaucoup d'absorption du cation butylméthylimidazolium dans l'électrophérogramme qui masquait le pic du peptide, une étude sur la solubilité des liquides ioniques dans l'eau a été faite. Cette étude a été

réalisée en augmentant au fur et à mesure la quantité de LI dans 100 μL d'eau, en agitant le mélange résultant, en le centrifugeant puis en analysant la phase aqueuse surnageante.

Il est nécessaire de mentionner que chaque point de donnée représente 3 injections CE dans le but d'obtenir une bonne reproductibilité. De plus, au lieu de reporter directement les concentrations du BMIM-NTf₂ et du BMIM-PF₆ sur l'axe des Y, les aires moyennes du pic du cation imidazolium dans la phase aqueuse ont été de préférence utilisées, car celles-ci sont directement proportionnelles aux concentrations injectées lorsqu'un détecteur d'absorption photométrique est utilisé (Figure 3.5). Cette étude a aussi révélé que le BMIM-PF₆ était très soluble dans l'eau contrairement au BMIM-NTf₂, et ceci même à 1 μL de BMIM-PF₆. (1:100 v/v LI : H₂O)

Comme il a été démontré que le BMIM-PF₆ était très soluble dans l'eau, le BMIM-NTf₂ a donc été utilisé pour faire l'extraction du mélange des 2 peptides possédant chacun une concentration approximative de 67 μM . Cette extraction a été faite en utilisant une agitation douce à l'aide d'un agitateur de type Burrell Wrist Action Shaker et en variant le temps d'extraction de 1 à 18 h. Un « point zéro » (analyse des aires de pics) où les peptides n'ont subi aucune extraction, a également été considéré. (Figure 3.6)

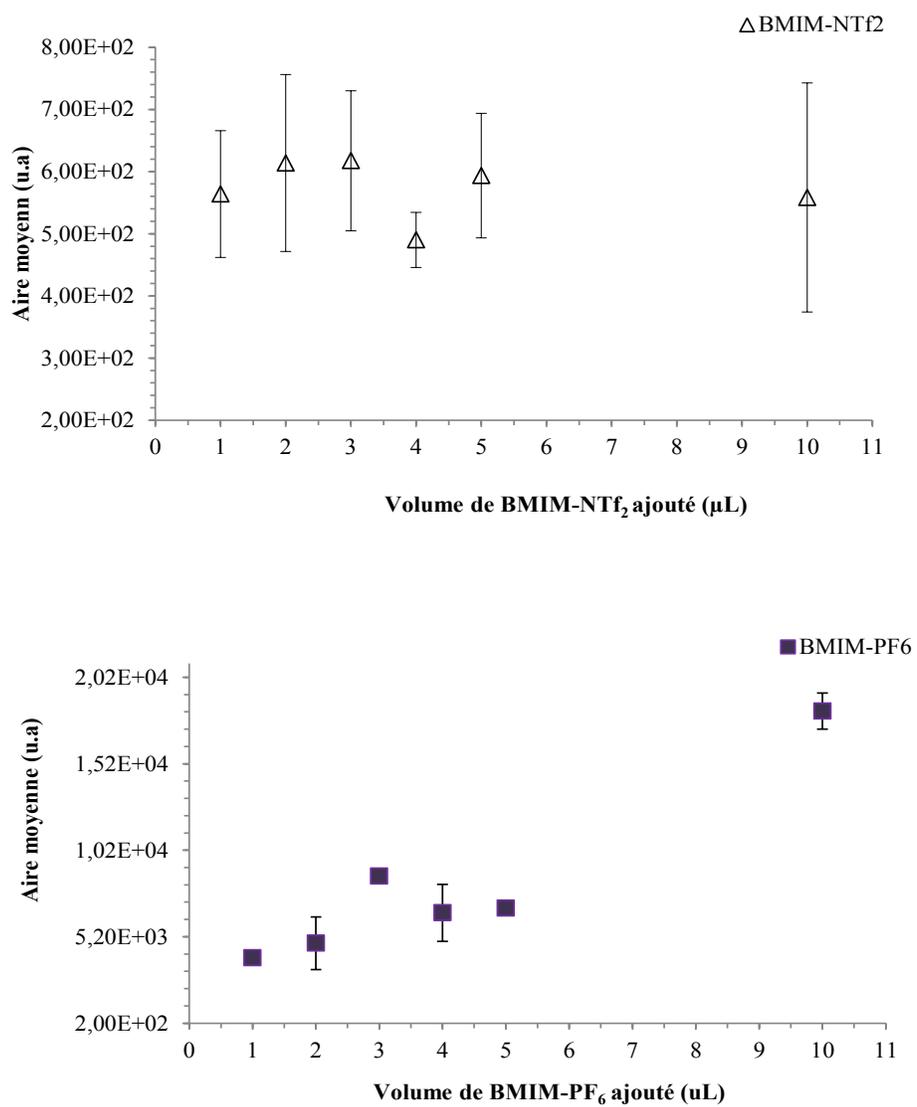


Figure 3.5. Détermination de la solubilité des deux liquides ioniques dans 100 μL d'eau. Les barres d'erreur représentent l'écart-type pour n=3 injections.

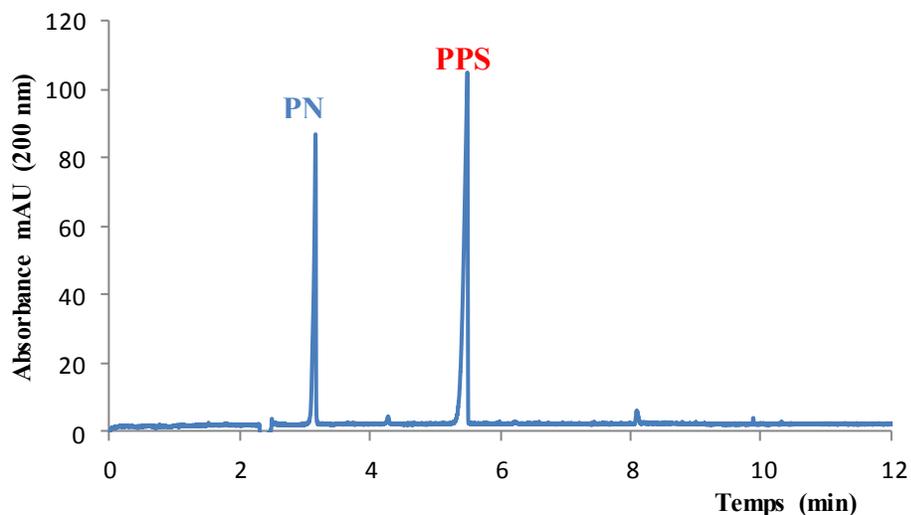


Figure 3.6. Électropherogramme du mélange de 2 peptides PN et PPS de concentration respective de 68 μM et 64 μM avant extraction

Pour réaliser l'extraction, 200 μL de solution de peptides (PPS, 64 μM et PN, 68 μM) ont été ajoutés à 100 μL de BMIM-NTf₂. Le mélange (peptides + LI) a été agité, centrifugé, puis la phase aqueuse prélevée et analysée par CE. L'efficacité de l'extraction des peptides par le BMIM-NTf₂ a été calculée en utilisant l'équation 1 :

$$E_E = \frac{\text{Hauteur du pic du peptide}^{\text{"point zéro"}} - \text{Hauteur du pic du peptide}_{\text{après}}}{\text{Hauteur du pic du peptide}^{\text{"point zéro"}}} \times 100 \quad (1)^{40}$$

Cette efficacité a été calculée en soustrayant la hauteur moyenne du pic de peptide restant dans la phase aqueuse après extraction de la hauteur moyenne du pic du peptide avant extraction et en divisant le tout par la hauteur moyenne du pic du peptide avant extraction. Dans cette étude, les hauteurs moyennes ont été utilisées à la place des aires en raison de l'élargissement des aires des pics de peptides. Cet élargissement était dû à la contamination de la paroi du capillaire par le cation butylméthylimidazolium qui formait

⁴⁰ Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E.; Halvorsen, T. G.; *J. Chromatograph. A*, **2000**, 902, 91-105.

une paire d'ions avec les groupements silanols négatifs. Ainsi, le flux électroosmotique diminuait, ce qui entraînait une plus lente migration des 2 peptides, et donc l'élargissement de leurs pics.⁴¹

Selon la figure 3.7, lorsque le temps d'extraction par agitation a été augmenté à 18h, la hauteur du pic du peptide a diminué. Ceci correspond à une diminution de la quantité PPS dans la phase aqueuse de 33% et à une diminution de la quantité de PN dans la phase aqueuse de 47%. Cela signifie que le PPS n'était pas extrait sélectivement par rapport au PN.

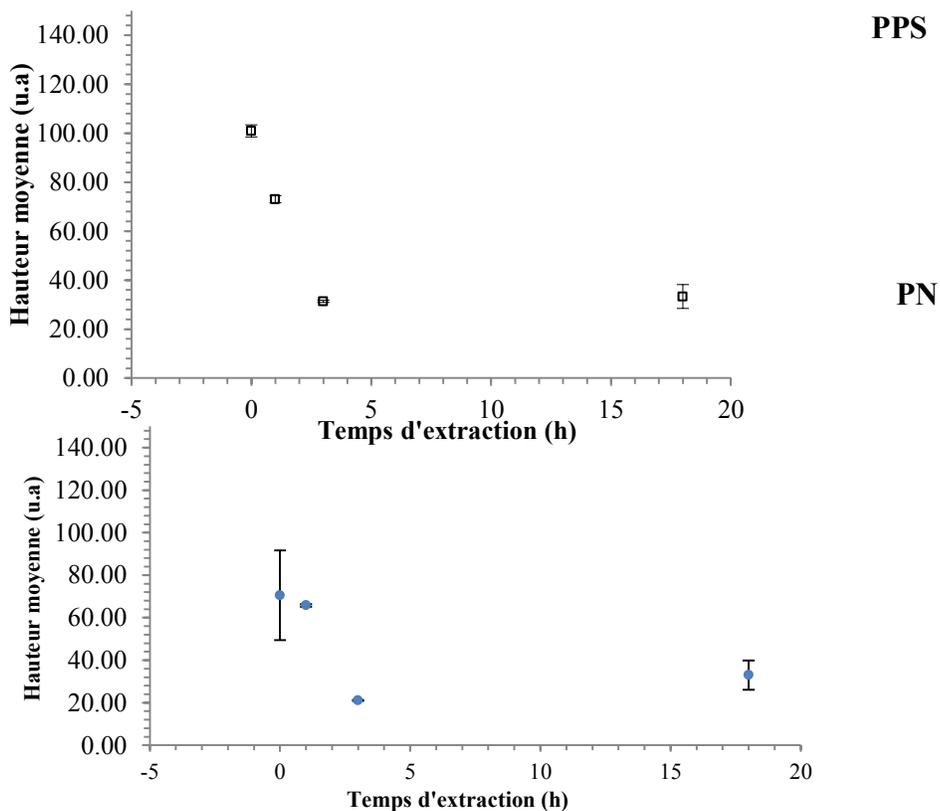


Figure 3.7. Influence de différentes durées d'agitation lors de l'extraction mélange des 2 peptides PPS (64 μM) et du PN (68 μM) se trouvant dans la phase aqueuse par le BMIM-NTf₂. Chaque valeur de la hauteur représente la moyenne de 2 injections CE d'une même solution pour le premier point de données et la moyenne de 3 injections CE pour les autres points.

⁴¹ Jiang, T-F.; Gu, Y-L.; Liang, B.; Li, J-B.; Shi, Y-P.; Ou, Q-Y., *Anal. Chim. Acta* **2003**, 479,249.

En effet, la figure 3.7 montre qu'un meilleur taux d'extraction a été obtenu pour le PPS que pour le PN lors d'une agitation de 18 h, car il y avait moins de PPS restant après l'extraction que dans la phase aqueuse de départ. Par conséquent, une investigation sur la quantité de BMIM-NTf₂ pouvant extraire sélectivement le PPS à partir d'un volume fixe (200 µL) de la solution aqueuse de deux peptides a été faite. Il faut noter que ces extractions ont été réalisées en gardant le même temps d'agitation (18 h), et en considérant l'aire moyenne du pic du peptide restant dans la phase aqueuse après extraction avec les différents volumes de LI (Figure 3.8) car les aires des pics des peptides étaient plus reproductibles que les hauteurs. Mais malheureusement, au lieu de voir une diminution de la quantité de PPS dans la phase aqueuse lors de l'extraction par le BMIM-NTf₂, une augmentation a été de préférence observée. Ceci est possiblement dû au fait que les temps de migration du PN et du PPS augmentaient entre chaque injection. Par conséquent, une augmentation de l'aire des pics des peptides a été aussi observée. De même nous avons aussi observé que la hauteur des pics augmentait entre les injections, mais la raison pour laquelle elle augmentait n'était jamais trouvée.

Nous avons essayé de faire une correction à ce problème de quantification en faisant le rapport de l'aire du pic divisé par le temps de migration du pic, mais malheureusement le même comportement a été observé (un gain d'aire ou de hauteur pour chaque peptide). Sachant qu'on ne pouvait pas créer de la masse d'un tel peptide dans la phase aqueuse, on a déduit qu'il y avait une erreur quelque part dans l'analyse par CE, une erreur instrumentale. Possiblement, l'augmentation de la quantité de peptides vue par CE ne serait pas aussi prononcée si le point zéro avait été pris au début de l'analyse.

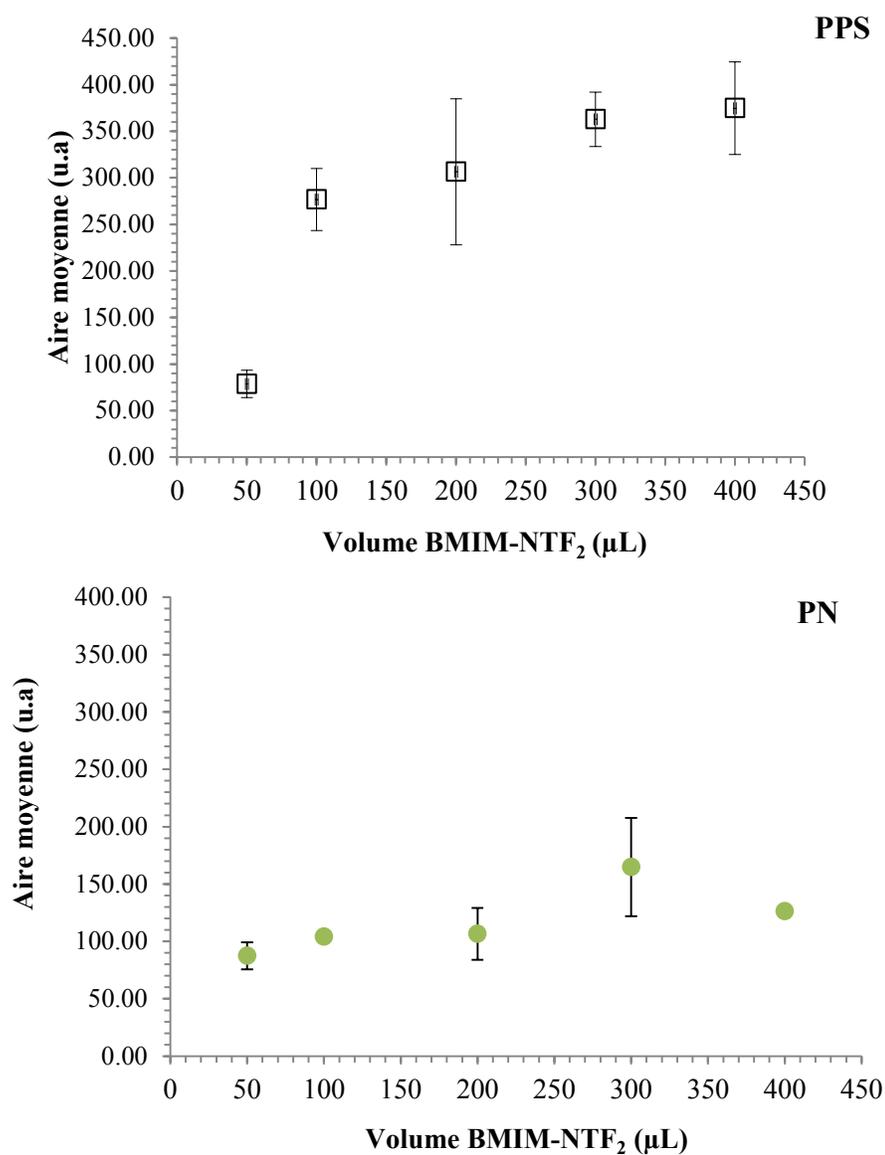


Figure 3.8. Aire moyenne du pic du peptide restant en phase aqueuse en fonction du volume du LI pour démontrer l'effet de la quantité de BMIM-NTf₂. Les barres d'erreur représentent l'écart-type pour n=3 injections.

3.1.2. A la recherche de l'étalon interne...

Pour minimiser la variabilité observée dans les temps d'élution et dans les aires de pic des peptides après extraction par le BMIM-NTf₂, l'utilisation d'un étalon interne (EI) s'est avérée nécessaire. Un étalon interne est un composé qui possède des caractéristiques physico-chimiques similaires à l'analyte d'intérêt, mais qui affiche une réponse distincte pouvant le distinguer de l'analyte.⁴² Dans cette étude, 3 composés ont été testés comme EI dans le but d'améliorer la reproductibilité de l'aire du pic des peptides et donc la quantification des peptides après extraction avec le LI. Une exigence supplémentaire pour le choix de l'EI, est de ne pas avoir interaction avec le BMIM-NTf₂. Ainsi les espèces choisies devraient être cationiques au pH auquel on effectue l'extraction.

Les EI qui ont été testés sont : le H-Phe-Tyr-OH (5.4 Mm, pI= 5.52), le H-Phe-Arg-OH (2.4 mM, pI= 9.75) et le TAME (*N* α -*p*-Tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride) (3.2 Mm, pI= 10.5). Quand ces EI ont été chacun mis en présence du BMIM-NTf₂ et des 2 peptides, il a été constaté sur tous les électrophérogrammes que l'ion BMIM⁺ sortait en premier (tm= 1.4 min) car ce petit cation avait la plus grande mobilité électrophorétique en solution (Figure. 3.9). Les composés EI testés sortaient après le BMIM⁺ du LI à cause de leurs plus faibles mobilités électrophorétiques.

Il a été observé que lorsque le H-Phe-Tyr-OH était ajouté, une co-élution du pic du PN et du H-Phe-Tyr-OH a été remarquée (Figure. 3.9), ce qui signifie que le H-Phe-Tyr-OH avait le même rapport masse sur charge, et donc une même mobilité électrophorétique que le peptide PN. Par conséquent le H-Phe-Tyr-OH ne constituait pas l'EI idéal.

⁴² Bronsema, K. J.; Bischoff, R.; Van de Merbel, N. C.; *J Chromatogr. B*, **2012**, 893-894, 1-14

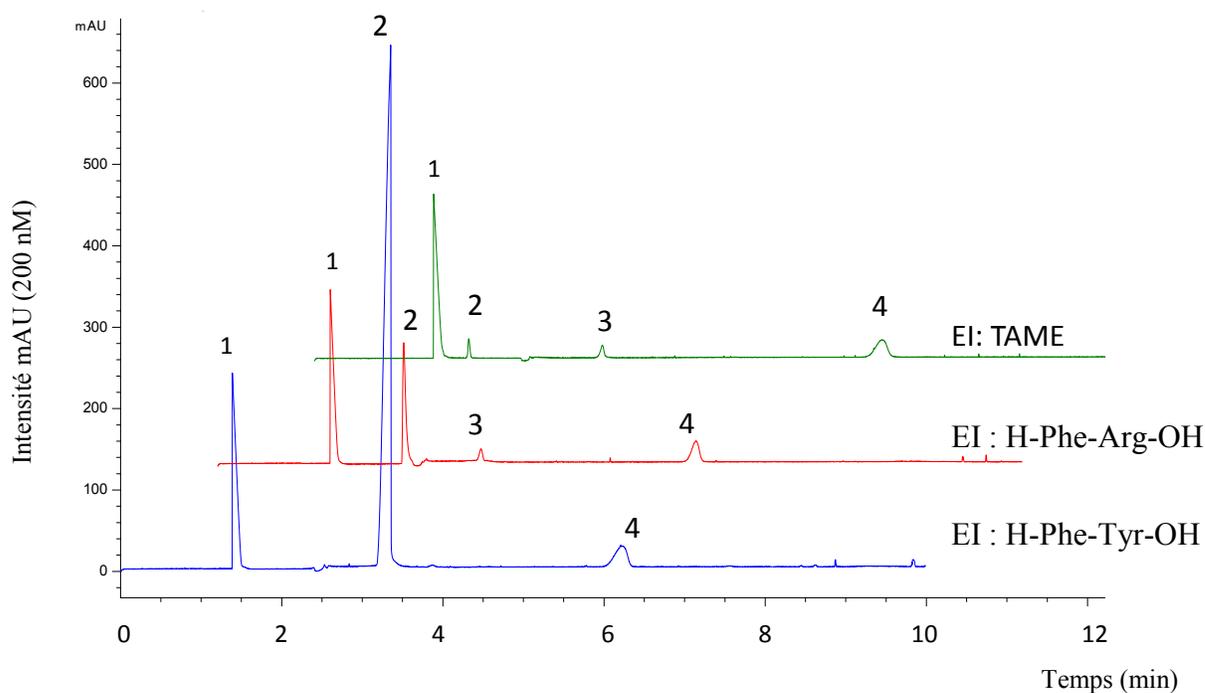


Figure 3.9. Électrophérogrammes des différents étalons internes (EI) testés (pic 2) lors de l'extraction du PN (36 μM , pic 3) et de PPS (38 μM , pic 4) par le BMIM-NTf₂ (pic 1).

Pour pouvoir faire un choix entre les deux potentiels EI restants, le pourcentage d'extraction de ces composés avec le BMIM-NTf₂ a été étudié. Dans cette étude, la solution peptidique a été remplacée par une solution aqueuse sans peptides (40 μL) et cette solution a été agitée à des temps d'extraction variant entre 1 et 19 h. Les aires moyennes des pics du TAME et du H-Phe-Arg-OH avant (« point zéro ») et après extraction par le BMIM-NTf₂ ont été analysées. Il a été constaté que lorsque l'extraction avait été faite en présence du H-Phe-Arg-OH, une interaction a été observée car le H-Phe-Arg-OH pouvait également être extrait par le LI (Figure. 3.10). Par conséquent selon ces résultats, le TAME semblait être le meilleur choix pour l'EI.

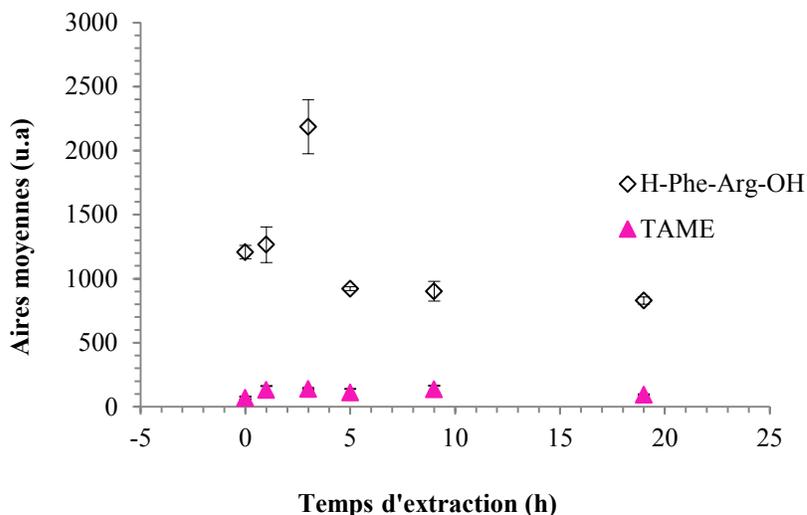


Figure 3.10. Taux de l'extraction des étalons internes par le BMIM-NTf₂. L'aire moyenne représente l'aire de l'étalon interne dans la phase aqueuse après mélange / extraction jusqu'à 20 h. Le point à 0 h représente l'aire du pic (proportionnelle à la concentration) avant ajout du BMIM-NTf₂. Les barres d'erreur représentent l'écart-type pour n=3 injections.

Comme le TAME représentait l'EI de choix, des extractions subséquentes ont été faites avec celui-ci. Au début, les extractions ont été faites en ajoutant le TAME à la solution des 2 peptides afin que l'EI soit soumis aux mêmes conditions d'extraction. Malheureusement, le TAME était beaucoup plus extrait que le PPS (97% vs 34% respectivement) pour une raison inconnue (figure 3.11a).

Pour éviter cette interaction indésirable avec le LI, le TAME a été ensuite ajouté après que les peptides aient été extraits par le BMIM-NTf₂ avec l'intention d'améliorer la reproductibilité des aires de pics due aux variations dans le volume injecté en CE (figure 3.11b). Malheureusement ce changement dans le mode d'ajout de l'EI n'a produit aucune différence notable dans les résultats de l'extraction des peptides. En conséquence, l'ajout de l'EI aux solutions n'était plus fait.

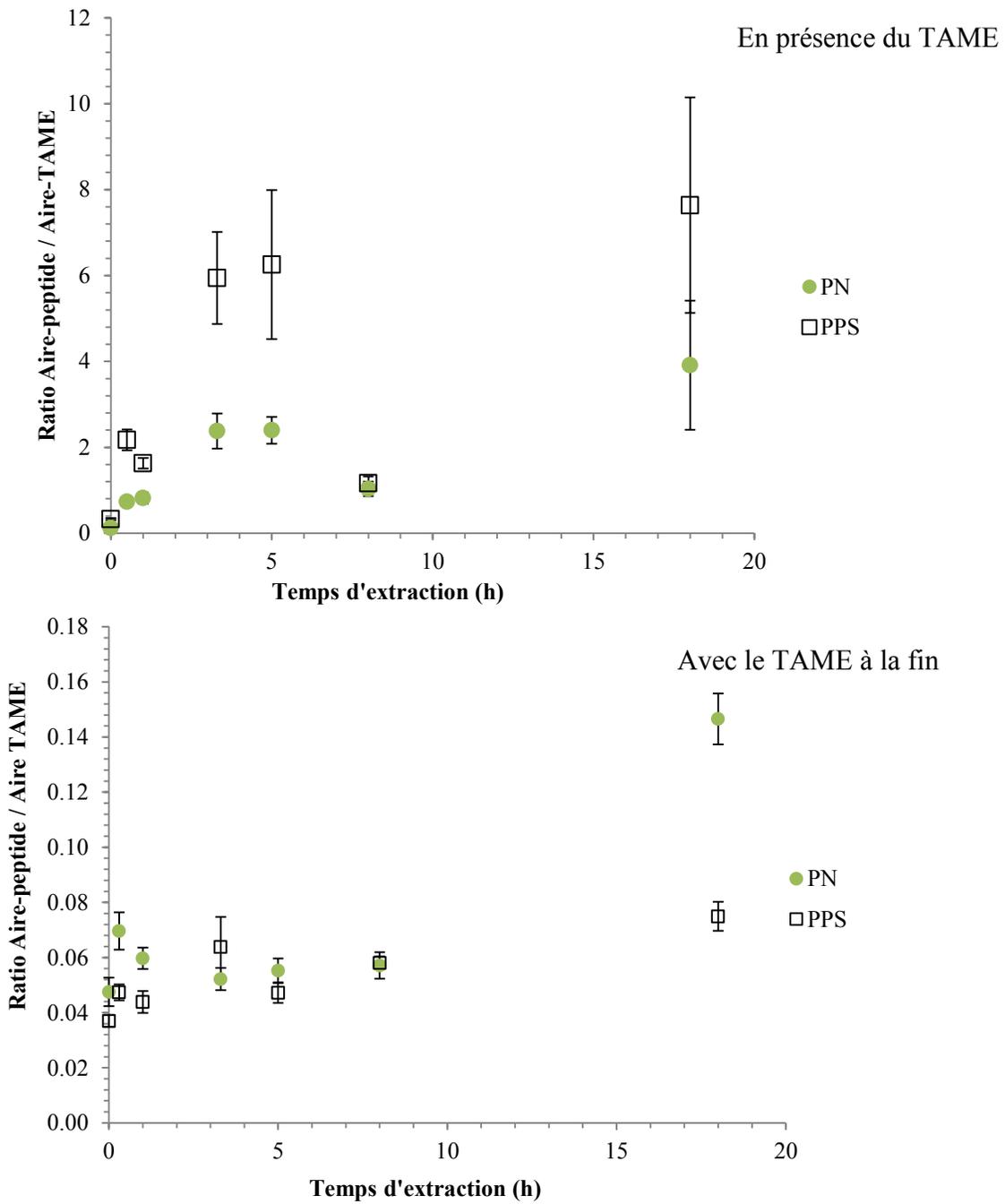


Figure 3.11. Extraction des peptides en présence du TAME (a), et avec le TAME ajouté à la fin de l'extraction (b). Les barres d'erreur représentent l'écart-type pour n=3 injections.

3.1.3. Effet du mode d'agitation

Un autre paramètre a été considéré également lors de l'extraction des peptides. Il s'agit du mode d'agitation. Dans cette étude, deux modes d'agitation ont été comparés: l'agitation à l'aide au vortex (considérée comme une agitation physique très vigoureuse) et à l'aide du bain à ultrasons à 1 °C (agitation douce pouvant agiter directement les molécules en solution). La température du bain ultrasons a été maintenue à 1 °C dans le but de minimiser la variation de température provenant de la sonication.

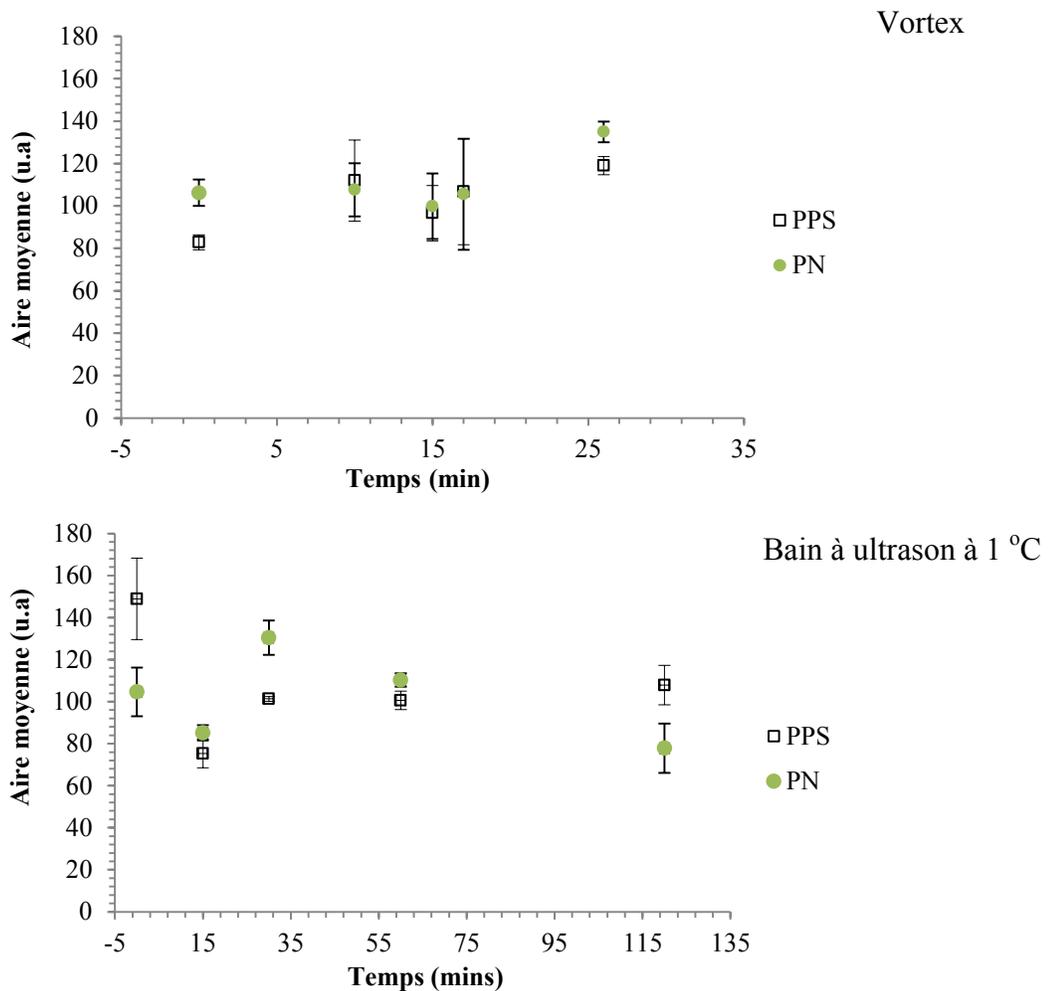
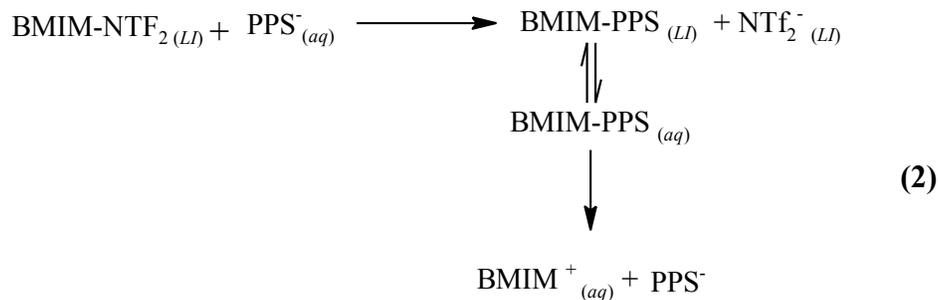


Figure 3.12. Effet de l'agitation du vortex (a) et du bain à ultrason (b) sur l'extraction 2 peptides. Les barres d'erreur représentent l'écart-type pour n = 3 injections.

Selon les résultats montrés à la figure 3.12, aucune extraction n'a été notée lorsque les peptides ont été agités par vortex. Par contre, lorsque l'agitation a été réalisée au bain à ultrasons à 1 °C, une extraction de 49 % du PPS a été observée dans les 15 premières minutes, comparativement au PN qui a été extrait à 19 % (voir équation 1 pour le calcul de l'efficacité de l'extraction à partir des aires de pic). Cette méthode d'agitation au bain à ultrason n'a donc pas été retenue pour la suite.

Le mécanisme d'extraction proposé du PPS par le BMIM-NTf₂ suppose que le cation BMIM⁺ interagit de manière électrostatique avec le groupement phosphate du peptide par un mécanisme d'échange d'ions et par la suite, le complexe BMIM-PPS passe dans la phase LI, ce qui se traduit par une extraction rapide durant les premières minutes. Une fois le maximum de PPS ayant été extrait par le BMIM-NTf₂ dans la phase liquide ionique, le complexe BMIM-PPS peut également être soluble dans la phase aqueuse, avec une certaine constante de partage entre les deux phases. De là, une stabilisation de la pente de l'extraction, se traduisant par un retour à l'équilibre du PPS dans la phase aqueuse est observée (équation 2)



En somme, lorsque l'extraction liquide-liquide a été réalisée avec le BMIM-PF₆ et BMIM-NTf₂, il a été observé que le BMIM-PF₆ était trop soluble dans l'eau et que le

BMIM-NTf₂, immiscible avec l'eau, ne montrait pas une extraction appréciable du PPS comparativement au PN. C'est pour cela, que l'extraction solide-liquide a été investiguée par la suite.

3.2. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est une technique de séparation qui permet d'extraire sur une phase solide, un composé présent en solution ou en phase gazeuse au départ. Traditionnellement, l'extraction solide-liquide est utilisée pour enrichir les composés organiques peu volatiles en faisant l'adsorption sur une phase solide suivie d'une élution dans un très faible volume d'un solvant approprié. Durant un quart de siècle, différentes approches ont été utilisées pour l'extraction de composés semi-organiques. Parmi lesquelles se trouvent : l'extraction sur phase solide (SPE), la microextraction sur phase solide (SPME), et la chromatographie d'affinité.

L'extraction sur phase solide est devenue l'une des techniques de purification les plus utilisées en sciences naturelles et sciences de la vie, plus particulièrement en analyse environnementale.⁴³ Le principe de l'extraction solide-liquide repose sur le partage des composés entre la phase liquide (l'analyte), et la phase stationnaire C₁₈ (l'absorbant).

La SPE est devenue depuis quelques années, une technique efficace pour la préparation d'échantillons. De nos jours, cette technique est utilisée pour purifier et concentrer les analytes d'un échantillon avant son analyse.

⁴³ a) Sigma Aldrich. Guide to solid phase extraction. Consulté le 30 juillet 2012. Disponible sur: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/.../4538.pdf>. b) Wells, M.J.M; Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, 2003, p.1-189. c) Subden, R. E.; Brown, R. G.; Noble, A. C.; *J. Chromatogr.*, 1978, 166, 310 .

Il faut souligner que lorsque le mélange des 3 peptides a été analysé au « point zéro », l'électrophérogramme a montré que le PE a élué après le PN. (Figure 3.13) Ceci est dû au fait qu'à pH 7, le PE possède deux charges négatives par conséquent il sera moins susceptible d'être entraîné par le flux électroosmotique que le PN qui est simplement chargé. Le PPS quant à lui, est le dernier des peptides à éluer parce qu'il est plus négatif que le PE à pH 7.

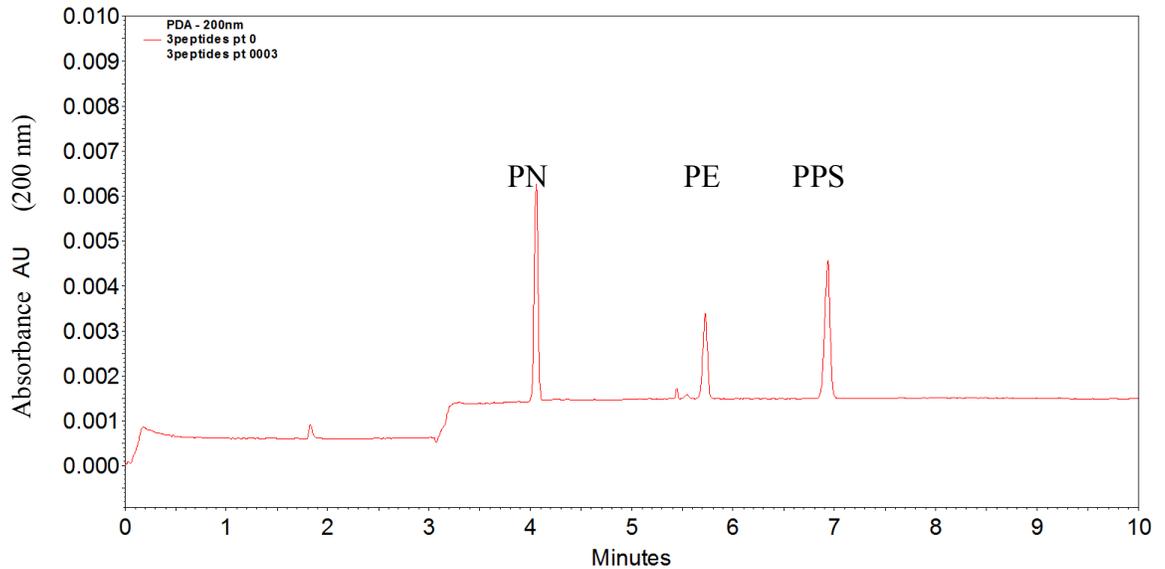


Figure 3.13. Électrophérogramme des 3 peptides avant extraction.

3.2.1. Extraction sur phase solide

Dans cette étude, les peptides ont été extraits sur une phase stationnaire C_{18} fonctionnalisée avec des sels de bis-imidazolium alkylés.

Le processus d'extraction sur phase solide de notre étude se divisait en 4 étapes :

- 1- Conditionnement de la cartouche contenant la phase stationnaire :⁴⁴ durant cette étape, la cartouche a été hydratée avec un solvant organique dans le but d'activer les sites de rétention où se dérouleraient les interactions moléculaires. Dans ce cas-ci, la cartouche a été conditionnée avec du DMF, solvant dans lequel sont dissouts les sels d'imidazolium.
- 2- Fonctionnalisation de la phase stationnaire par les sels de bis-imidazolium: ceci s'est fait grâce aux interactions de Van der Waals entre les chaînes C₁₈ de la phase stationnaire et les chaînes alkyles des sels d'imidazolium.
- 3- Lavage de la phase stationnaire : cette étape a pour but d'éliminer l'excès de sels bis-imidazolium non-adsorbé par la phase stationnaire.
- 4- Chargement du mélange des 3 peptides sur la phase stationnaire fonctionnalisée. Une fois que les peptides ont été retenus par la phase stationnaire, une analyse par CE ou HPLC-MS du mélange des peptides restant dans l'échantillon a été faite.

L'extraction SPE a été faite en utilisant des sels de bis-imidazolium adsorbé sur les particules C₁₈.

Comme le groupe Schmitzer avait démontré précédemment que les sels *N,N'*dialkylméthylènediimidazolium bromure et triflate pouvaient interagir sélectivement avec l'ADN double brin, nous avons voulu exploiter cette interaction pour favoriser l'interaction des chaînes alkylés des sels de bis-imidazolium avec les chaînes C₁₈ de la phase stationnaire de l'embout de pipette.

⁴⁴Humbert, L.; *Ann Toxicol Anal* **2010**, 22, 61-68

Lors de cette extraction, des embouts de pipette de type OMIX (Agilent Technologies, Figure 3.14) contenant des phases C_{18} monolithiques, ont été employés. En effet, ces embouts de pipettes de 100 μL sont capables de lier chacun au moins 80 μg de peptides, possèdent une grande capacité de liaison et un débit élevé.



Figure 3.14. Photo d'un embout de pipette de type OMIX de 20 μL de volume contenant une phase stationnaire C_{18} présente dans les 5 premiers millimètres de l'embout.

Pour commencer l'étude d'extraction sur phase solide, un mélange standard de 3 peptides (PN, PE et PPS) dans 0.1 % FA a été analysé par CE (i.e., le « point zéro »), puis une extraction a été faite sur la phase stationnaire C_{18} non-fonctionnalisée (i.e., le contrôle) dans le but de connaître le degré de l'extraction de la phase C_{18} des trois peptides plus particulièrement le PPS par rapport au PN et au PE. Ensuite, l'extraction des peptides a été faite avec un embout de pipette qui avait été fonctionnalisé avec une quantité variable de sels d'imidazolium (2, 5 ou 10 mg dissouts dans 50 μL DMF). La figure 3.15 montre les électropherogrammes qui ont été obtenus en utilisant les quantités variables de bis-triflate de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium ($C_{12}C_{12}DIM^-TfO$) pour la fonctionnalisation de la phase C_{18} lors d'une extraction du mélange des peptides. Ces électropherogrammes montrés ci-dessous sont semblables à ceux obtenus lorsque les autres sels d'imidazolium ont été utilisés pour les tests d'extraction des trois peptides.

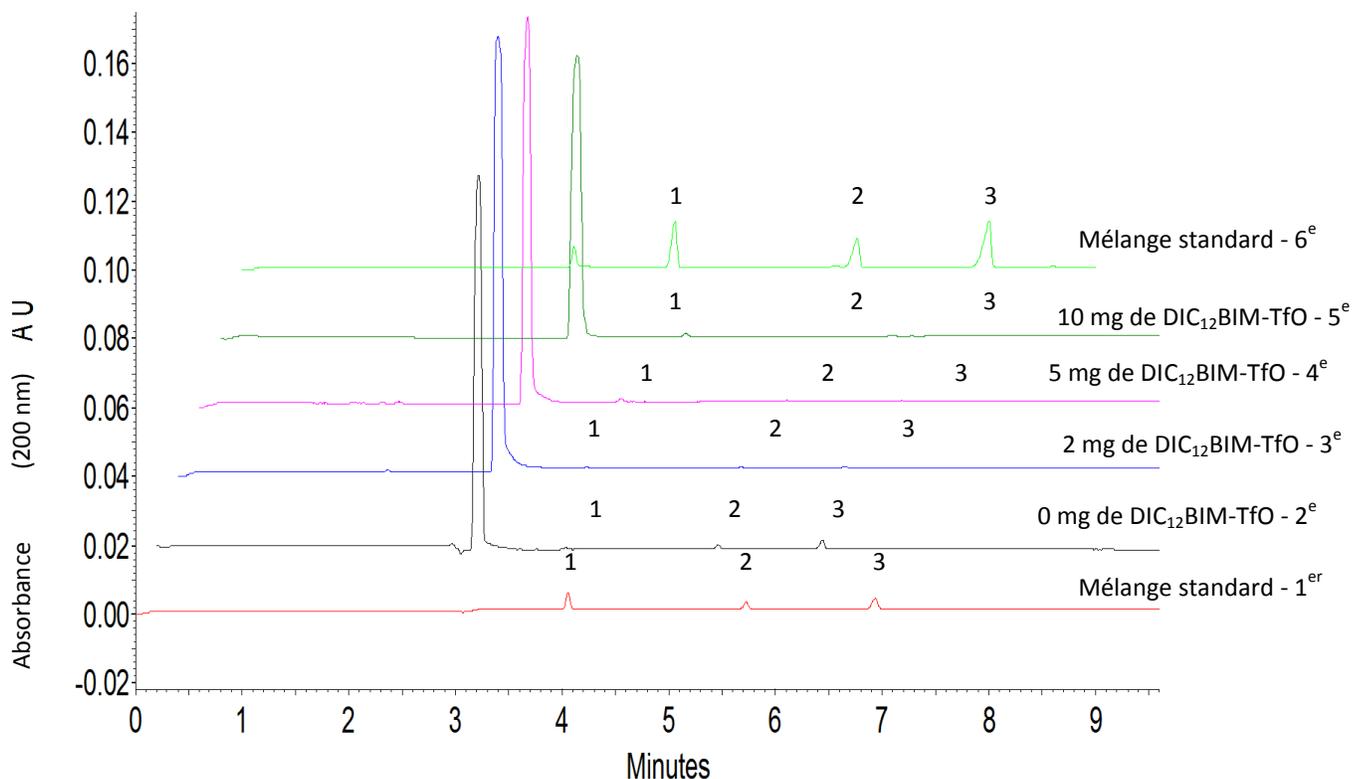


Figure 3.15. Électrophérogammes d’une extraction-type du mélange de 3 peptides PN (pic 1), PE (pic 2), PPS (pic 3) (possédant chacun approximativement 50 μ M) en fonction de la quantité de $C_{12}C_{12}DIM$ -TfO (dans 50 μ L DMF) déposé sur la phase stationnaire C_{18} de l’embout.

Le 1^{er} électrophérogamme de la figure 3.15 représente le « point zéro », le point où les 3 peptides n’ont subi aucune extraction afin de relier l’aire de chaque pic à une concentration connue. Dans le 2^{ème} électrophérogamme (0 mg de $C_{12}C_{12}DIM$ -TfO), le premier pic à 3 min représente le pic du DMF, le solvant de conditionnement qui absorbait bien à $\lambda=200$ nm, lorsque l’embout n’a pas été fonctionnalisé par les sels d’imidazolium.

Contrairement au pic de DMF dans les électrophérogammes 1 et 2, le premier pic apparu à 3 min dans les autres électrophérogammes était non seulement dû au DMF, mais aussi aux traces de sel d’imidazolium malgré les étapes de rinçage. C’est une

explication raisonnable car quand la quantité d'imidazolium augmentait au fur et à mesure lors de la fonctionnalisation du C₁₈, l'aire sous le pic à 3 min augmentait aussi.

La figure 3.16 est un exemple typique des résultats de l'extraction du mélange des 3 peptides (chacun ayant une concentration approximative de 50 µM) lorsque les embouts de pipette de type OMIX C₁₈ ont été utilisés. C'est-à-dire que les autres sels d'imidazolium testés avaient les mêmes tendances. La figure 3.16 montre le pourcentage d'extraction de chacun des peptides en fonction de la quantité croissante de C₁₂C₁₂DIM - TfO, par rapport à la concentration du départ (le « point zéro »). Le pourcentage d'extraction a été calculé à l'aide de l'équation 1.

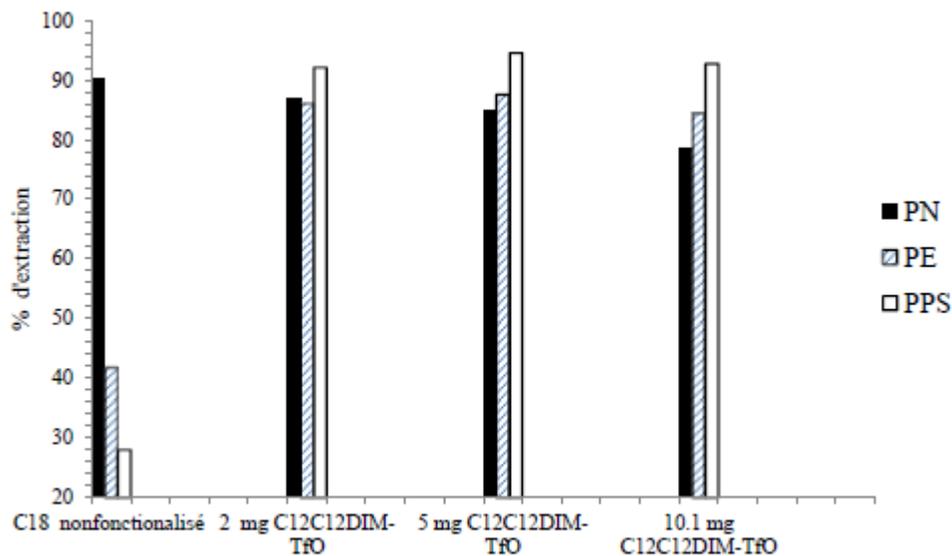


Figure 3.16. Extraction type du mélange des 3 peptides PN (47 µM), PE (57 µM), PPS (42 µM) avec une quantité croissante de C₁₂C₁₂DIM –TfO (dans 50 µL DMF) utilisée pour fonctionnaliser la phase C₁₈ dans l'embout de pipette. (Analyses des peptides par CE)

Lorsque les peptides ont été extraits avec le C₁₈ non fonctionnalisé par le sel d'imidazolium, il a été constaté que le PN était beaucoup plus extrait que le PPS et le PE (Figure 3.16). Cette forte extraction était due à l'adsorption du PN hydrophobe par les chaînes C₁₈ de la phase stationnaire de l'embout, par l'intermédiaire des forces de Van

der Waals existant entre les chaînes. Le PPS et le PE, étant moins hydrophobes à cause des groupements acides de l'acide glutamique et du groupement phosphate de la tyrosine, étaient moins retenus par la phase C₁₈ et donc moins extraits. Cette forte extraction du PN par l'embout non-fonctionnalisé a été aussi observée lorsque les 3 peptides ont été extraits avec les autres sels d'imidazolium.

Selon la figure 3.16, le PPS était extrait de façon légèrement plus sélective lorsque l'embout était fonctionnalisé avec 10 mg de C₁₂C₁₂DIM -TfO par rapport aux embouts fonctionnalisés avec 2 et 5 mg de ce même sel. Il faut par contre admettre que l'erreur approximative sur les valeurs d'extraction est supérieure que $\pm 5\%$. Par la suite, lorsque tous les autres sels d'imidazolium ont été testés, il a été remarqué qu'effectivement 10 mg dans 50 μ L DMF représentaient la meilleure quantité de sels d'imidazolium pouvant extraire le PPS du mélange des 3 peptides. Au-delà de cette quantité, il y avait une précipitation du sel d'imidazolium dans l'embout de pipette.

Le tableau 3.1 montre l'influence sur l'extraction des peptides lorsque l'embout a été fonctionnalisé avec des chaînes alkyles en C₁₂ avec les différents anions, et lorsque l'embout a été fonctionnalisé avec des chaînes alkyles C₁₆ possédant les mêmes anions que ceux utilisés avec les sels d'imidazolium ayant des chaînes alkyles en C₁₂. Il faut mentionner que ces analyses ont été réalisées par CE.

Tableau 3.1. Effet de la longueur de la chaîne alkyle du sel d'imidazolium et de l'anion sur l'extraction des 3 peptides dans un mélange lorsque l'embout a été fonctionnalisé avec 10 mg de sels de diimidazolium (dans 50 μ L de DMF) (Analyse des peptides par CE).



n = 12, 16

X = TfO, NTf₂, BF₄, PF₆

Contre-anions	C ₁₂ C ₁₂ DIM			C ₁₆ C ₁₆ DIM		
	% PN extrait	%PE extrait	%PPS extrait	% PN extrait	%PE extrait	%PPS extrait
TfO	79	84	93	90	76	96
BF ₄	52	73	93	62	68	84
PF ₆	-4	1	56	89	78	87
NTf ₂	30	28	38	40	42	48

Sachant que la quantité maximale de sels de diimidazolium pouvant extraire sélectivement le PPS était de 10 mg par CE, des analyses par LC-MS ont été réalisées pour corroborer quelques analyses. Seuls les sels d'imidazolium C₁₂C₁₂DIM ont été utilisés car ils démontraient une extraction beaucoup plus sélective pour le PPS par rapport à C₁₆C₁₆DIM. Dans les études faites en LC-MS, les peptides ont été extraits à partir d'un mélange de 3 peptides ou à partir d'une solution contenant un peptide à la fois. Les résultats démontrent que lorsque le PN était seul en solution, lors de l'extraction avec l'embout non-fonctionnalisé, il était totalement extrait comparativement au PPS qui était juste extrait à 65 % (Tableau 3.2).

Tableau 3.2. Comparaison de l'extraction des peptides individuellement ou dans un mélange de 3 peptides pour le sel C₁₂C₁₂DIM (10 mg dans 50 µL de DMF) en fonction du contre ion. (Analyse des peptides par LC-MS)

	% PN extrait*		% PE extrait*		% PPS extrait*	
	dans un mélange	seul	dans un mélange	seul	dans un mélange	seul
C ₁₈ non-fonctionnalisé	43	100	90	32	43	56
10 mg C ₁₂ C ₁₂ DIM-TfO	63	87	61	97	84	98
10 mg C ₁₂ C ₁₂ DIM-NTf ₂	2	37	18	39	22	52
10 mg C ₁₂ C ₁₂ DIM-BF ₄	84	59	79	80	93	97
10 mg C ₁₂ C ₁₂ DIM-PF ₆	79	62	86	87	92	85

*Erreur relative varie entre 2 et 10 % pour 2 injections en LC-MS

En comparant les sels d'imidazolium qui ont servi à faire l'extraction du mélange de 3 peptides (Tableau 3.2), deux d'entre eux se sont révélés très prometteurs : le C₁₂C₁₂DIM -TfO et le C₁₂C₁₂DIM -BF₄. Les résultats démontrent que le C₁₂C₁₂DIM -TfO pouvait extraire 1.56 fois plus de PPS que de PN et 1.61 fois plus de PPS que de PE lorsque tous les peptides se trouvaient dans un mélange. Le C₁₂C₁₂DIM -BF₄ ne pouvait extraire que 1.35 fois plus de PPS que de PN et de PE lorsque les 3 peptides se trouvaient dans un mélange. Il semblerait que le pouvoir d'extraction des sels d'imidazolium soit fonction de la masse totale de peptides en solution. Il est probable que la capacité d'absorption quand on est dans un mélange de peptides soit dépassé, et que l'extraction d'un peptide à la fois, a été plus efficace.

Pour qu'une méthode analytique soit fiable, il est important que ses résultats soient reproductibles. Afin de vérifier la répétabilité de la méthode d'extraction de

peptides utilisant les sels d'imidazolium, une extraction du mélange des 3 peptides a été faite en utilisant l'embout non-fonctionnalisé et fonctionnalisé par le C₁₂C₁₂DIM -NTf₂.

Il a été constaté que lorsque le mélange des 3 peptides extraits par le C₁₈ non-fonctionnalisé, a été analysé par LC-MS, le PE était beaucoup plus extrait que le PN et le PPS. Ceci est peut-être dû à plusieurs facteurs comme le débit avec lequel les 3 peptides sont passés à travers les embouts (Tableau 3.3). Lorsque l'embout de pipette a été fonctionnalisé avec le C₁₂C₁₂DIM -NTf₂, le PE était beaucoup plus extrait que le PPS et son pourcentage d'extraction présentait une moins grande variabilité étant donné son faible écart-type. Cette erreur provient probablement du débit utilisé lorsque les peptides étaient extraits et de la légère variation dans la quantité de C₁₂C₁₂DIM -NTf₂ qui était utilisée.

Tableau 3.3. Étude de la répétabilité des extractions du mélange des 3 peptides en utilisant un embout non-fonctionnalisé et ensuite un embout fonctionnalisé avec 10 mg de C₁₂C₁₂DIM -NTf₂ dissouts dans 50 µL de DMF ^a

	% PN extrait	% PE extrait	% PPS extrait
C ₁₈ non-fonctionnalisé	35(13)	91(7)	20(1)
C ₁₂ C ₁₂ DIM-NTf ₂	12(2)	24(6)	23(13)

^a Les chiffres entre parenthèses représentent l'écart-type pour 4 extractions, i-e les extractions ont été faites avec 4 embouts de pipettes.

3.2.2. Extraction avec une résine échangeuse d'anions

Dans le but de vérifier l'efficacité de la méthode qui a été développée précédemment en utilisant des sels d'imidazolium, une étude portant sur l'utilisation d'une résine fortement basique, pouvant extraire les peptides a été réalisée. En examinant le tableau 3.4, il a été constaté que les 3 peptides et plus particulièrement le PPS était

beaucoup plus extrait par la résine échangeuse d'anions que par les embouts C₁₈ fonctionnalisé et non-fonctionnalisé. Ceci est dû au fait que le PPS était l'ion le plus négatif du mélange des 3 peptides, par conséquent il était beaucoup plus extrait que les 2 autres peptides. Cependant cette extraction n'était pas vraiment sélective car les peptides PPS, PE, étaient extraits à un pourcentage presque égal. Ceci montre donc que la méthode d'enrichissement en utilisant un sel d'imidazolium adsorbé sur un embout de pipette contenant une phase stationnaire C₁₈ était plus sélective de l'extraction du PPS.

Tableau 3.4. Extraction du mélange des 3 peptides (possédant chacun approximativement 50 µM chacun) en utilisant 120 mg de résine échangeuse d'anions (Dowex 1 x 8).

Quantité de résine échangeuse d'anions (g)	PN % extrait*	PE % extrait*	PPS % extrait*
0,12002	87	98	99
0,12004	81	95	99
0,12039	87	98	100

*Erreur relative varie entre 3.8 et 8.2% pour 3 injections en LC-MS

4. Conclusion

L'objectif poursuivi dans ce projet de recherche était de développer de nouveaux liquides ioniques dans le but d'extraire sélectivement un phosphopeptide, le PPS d'une solution en présence de 2 peptides analogues non-phosphorylés (le PN et le PE). Pour y arriver, des sels de méthylimidazolium et de bis-imidazolium possédant respectivement des chaînes linéaires à 4, 12 et 16 atomes de carbone et ayant différents anions ont été synthétisés. Les sels de méthylimidazolium plus particulièrement l'hexfluorophosphate de 3-butyl-1-méthylimidazolium (BMIM-PF₆) et le bis (trifluorométhanesulfonyl) amide de 3-butyl-1-méthylimidazolium (BMIM-NTf₂) ont été utilisés pour effectuer des extractions liquide-liquide.

Les extractions liquide-liquide ont d'abord été effectuées avec le BMIM-PF₆. Lors de ces extractions, il a été remarqué que le BMIM-PF₆, liquide ionique réputé immiscible dans l'eau, était en fait très soluble dans l'eau. Afin de vérifier la limite de solubilité de ce LI, des tests de solubilité ont été effectués. Il a été constaté que pour une même quantité de LI, le BMIM-PF₆ se révélait être beaucoup plus soluble dans 100 µL d'eau que le BMIM-NTf₂, et cela même à 1 µL de BMIM-PF₆.

Ensuite le BMIM-NTf₂ a été utilisé pour faire les extractions liquide-liquide en considérant d'abord le temps d'agitation comme une variable. Il a été remarqué que 18 h représentaient la durée de temps maximal pour extraire sélectivement le PPS. Une deuxième variable a été ensuite considérée : il s'agit du volume maximal de BMIM-NTf₂ pouvant extraire le PPS et le PN, mais malheureusement lors de ces extractions, une augmentation de l'aire du pic a été observée. Cette augmentation était sûrement due à une erreur qui s'est glissée quelque part dans l'analyse, car on ne pouvait pas créer des peptides dans la phase aqueuse.

Afin de minimiser la variabilité observée dans les temps d'élution et dans les aires de pic des peptides après extraction par le BMIM-NTf₂, un étalon interne a dû être utilisé. Parmi les trois composés qui ont été testés comme EI potentiel, le TAME s'est avéré être le meilleur EI, car il ne se faisait ni extraire, ni ne co-éluit avec les autres pics des analytes présents en solution.

Dans ce projet, l'effet de l'agitation lors de l'extraction a été également considéré. En effet, deux modes d'agitation ont été utilisés. Il a été remarqué que lorsque les peptides ont été agités à l'aide du vortex, aucune extraction n'a été observée. Par contre lorsque les peptides ont été agités avec le bain à ultrason, une extraction de 49 % du PPS a été observée dans les 15^{es} minutes de l'extraction contrairement au PN qui a été extrait de 19 %.

Une deuxième technique d'extraction de peptides a été considérée dans ce projet de recherche, il s'agit de l'extraction solide-liquide en utilisant une phase stationnaire C₁₈ se trouvant dans un embout de pipette de type OMIX. Cette méthode a été par la suite comparée avec une méthode d'enrichissement sur résine échangeuse d'anions. L'extraction solide-liquide qui utilisait une phase stationnaire immobilisée dans un embout de pipette de type OMIX, a été faite en utilisant une quantité croissante de sels de diimidazoliums à chaînes linéaires C₁₂ et C₁₆ et en utilisant une phase stationnaire non-fonctionnalisée. Il a été remarqué pour tous les sels d'imidazolium, que le PN était beaucoup plus extrait que les autres peptides lorsque l'embout n'était pas fonctionnalisé. De même il a été observé que 10 mg de sels d'imidazolium pouvaient extraire le maximum de peptides en solution aqueuse.

Dans cette étude, deux sels d'imidazoliums se sont distingués. Il s'agit du C₁₂C₁₂DIM -TfO et du C₁₆C₁₆DIM -TfO. Ces sels d'imidazoliums pouvaient extraire beaucoup plus de PPS comparativement aux autres sels d'imidazoliums, mais cette extraction n'était pas vraiment sélective des extractions du PE et PN. De plus, il a été observé que lorsque l'embout a été fonctionnalisé avec du C₁₂C₁₂DIM -PF₆, le PPS était beaucoup plus extrait que les deux autres peptides.

Comme les sels d'imidazolium à chaîne C₁₂ étaient meilleurs, ils ont été utilisés pour fonctionnaliser les embouts de pipette et analyser les phases aqueuses restantes par LC-MS. Deux sels d'imidazolium se sont révélés prometteurs, le C₁₂C₁₂DIM -TfO et le C₁₂C₁₂DIM -BF₄. Le C₁₂C₁₂DIM -TfO pouvait extraire 1.56 fois plus de PPS que de PN et 1.61 fois plus de PPS que de PE lorsque tous les peptides se trouvaient dans un mélange, tandis que le C₁₂C₁₂DIM -BF₄ ne pouvait extraire que 1.35 fois plus de PPS que de PN et de PE.

La répétabilité de la méthode d'extraction a été vérifiée en utilisant le LC-MS et quatre embouts de pipette fonctionnalisés avec du C₁₂C₁₂DIM -NTf₂. Lorsque l'embout de pipette a été fonctionnalisé avec le C₁₂C₁₂DIM -NTf₂, le PE était beaucoup plus extrait que le PPS et son pourcentage d'extraction présentait une moins grande variabilité à cause de son faible écart-type.

Afin de vérifier l'efficacité de la méthode qui a été développée précédemment en utilisant des sels d'imidazolium, une étude portant sur l'utilisation d'une résine fortement basique, pouvant extraire les peptides a été réalisée. Il a été montré que l'extraction n'était pas vraiment sélective car les 2 peptides PPS et PE étaient extraits à un pourcentage presque égal.

Le but principal de ce projet était de développer de nouveaux liquides ioniques afin d'extraire sélectivement un phosphopeptide (PPS) d'une solution, en présence d'analogues peptidiques non-phosphorylés (PN et PE). Les forces et faiblesses rencontrées dans ce projet permettent d'établir d'autres objectifs secondaires, pour faire avancer ce projet. Les méthodes d'extractions développées à ce point-ci du projet ne permettent pas vraiment d'extraire sélectivement le PPS. Les directions futures peuvent être basées sur l'amélioration de la méthode d'extraction des phosphoprotéines par les LI. Les autres perspectives seraient de réaliser l'extraction de phosphoprotéines comme l'ovalbumine en utilisant des embouts de pipette de type OMIX fonctionnalisés avec des sels de N, N'-Dialkylméthylènediimidazolium ou encore l'extraction de digestats protéolytiques en utilisant les sels de N, N'-Dialkylméthylènediimidazolium greffés sur des nanoparticules d'or.

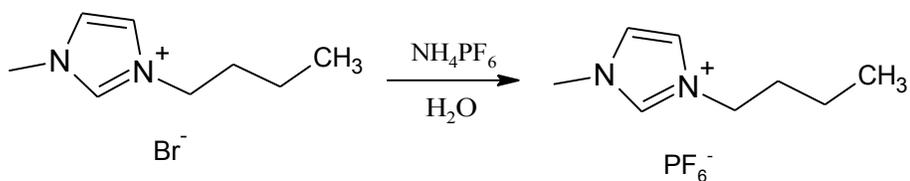
5. Annexe

2.8. Spectrométrie RMN 1D

Les spectres RMN ont été enregistrés sur des spectromètres BRUKER Avance AV300 et Avance AVII 400. Les spectres RMN ^1H (300 MHz ou 400 MHz) et ^{13}C (75 ou 100 MHz) sont référencés par rapport au TMS en utilisant le signal résiduel du solvant deutéré. Tous les spectres RMN ont été enregistrés à 25°C et les déplacements chimiques (δ) des signaux sont exprimés en ppm. Les caractéristiques spectroscopiques sont présentées de la manière suivante : δ (m, J, nombre de noyaux, attribution), avec δ : déplacement chimique, m : multiplicité et J : constante de couplage (en Hz).

Les abréviations utilisées pour les multiplicités des signaux RMN sont les suivantes : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, sex = sextuplet, dd = doublet de doublets.

2.8.1. Synthèse de l'hexafluorophosphate de 3-butyl-1-methylimidazolium



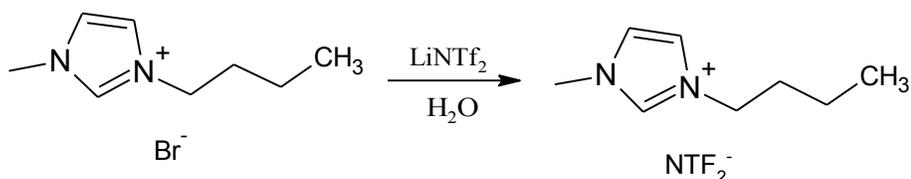
Dans un ballon de 100 mL, du bromure de 3-butyl-1-methylimidazolium (45.6 mmol) et de l'hexafluorophosphate d'ammonium (45.6 mmol) ont été dissouts dans 30 mL d'eau puis agités durant 2 h à température ambiante. Le mélange réactionnel a été extrait 2 fois avec du dichlorométhane (15 mL) puis lavé 3 fois avec de l'eau. Ensuite le mélange réactionnel a été séché sur du MgSO_4 durant 1.5 h, filtré, évaporé, puis mis sous vide durant 72 h. (Rdt = 89%)

RMN ¹H (CD₃OD 400 MHz): δ (ppm) 8.98 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 4.24 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.95 (s, 3H), 1.86 (quint, 2H, *J* = 7.5 Hz), 1.35 (sex, 2H, *J* = 7.5 Hz), 0.95 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz).

RMN ¹³C (CD₃OD 100 MHz): δ (ppm) 137.99, 124.81, 123.42, 50.33, 36.39, 30.01, 20.25, 13.69.

HR-MS(ESI): m/z calc pour C₈H₁₅N₂⁺ [M]⁺: 139.1229 ; trouvé:139.1235

2.8.2. Synthèse du bis (trifluoromethanesulfonyl)amide de 3-butyl-1-methylimidazolium



Le protocole employé dans la synthèse 2.8.1 est le même qui a été utilisé lors de cette synthèse. (Rdt= 92%)

RMN ¹H (CD₃OD 400 MHz): δ (ppm) 8.98 (s, 1H), 7.59 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz), 7.52 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 4.21 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.93 (s, 3H), 1.88 (quint, 2H, *J* = 7.5 Hz), 1.40 (sex, 2H, *J* = 7.4 Hz), 0.9 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz)

RMN ¹³C (CD₃OD 100 MHz): δ (ppm) 137.44, 124.76, 123.48, 50.50, 36.40, 32.86, 20.22, 13.55.

HR-MS(ESI): m/z calc pour C₈H₁₅N₂⁺ [M]⁺: 139.1229 ; trouvé:139.1233

2.8.3. Synthèse du 1,1'-méthylènediimidazole



Dans un ballon de 200 mL, l'imidazole (133.0 mmol) a été solubilisé dans du diméthylformamide (90 mL), traité avec du NaH (325.2 mmol) suivi du bromochlorométhane (201 mmol). Le mélange réactionnel a été agité durant 4 heures, et concentré sous vide (poudre pâteuse marron). Le produit brut a été purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt / CH₃OH / NH₄OH : 9: 0.9: 0.1) pour donner une poudre jaune. (Rdt. = 97 %)

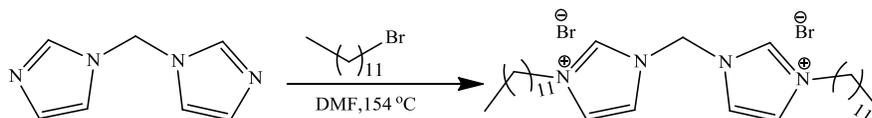
RMN ¹H (D₂O 400 MHz): δ (ppm) 8.13 (s, 2H). 7.38 (s, 2H), 7.14 (s, 2H), 6.36 (s, 2H).

RMN ¹³C (D₂O 75 MHz): δ (ppm) 137.58, 127.83, 119.72, 56,57.

HR-MS(ESI): m/z calc pour C₇H₉N₄⁺ [M + H]⁺: 149,0822; trouvé: 149,0809

T_f: 92 - 129°C.

2.8.4. Synthèse du bis-bromure de 3-dodécyl-bis-imidazolium



Dans un ballon de 100 mL muni d'un agitateur magnétique, du 1-bromododecane (27.3 mmol) a été ajouté à du bis-imidazole (56.7 mmol) préalablement dissouts dans du diméthylformamide (15 mL). Le mélange réactionnel a été agité durant 72 heures à 154 °C. Le mélange a été filtré, puis lavé avec du diethylether jusqu'à l'obtention d'un solide blanc. (Rdt. = 48%)

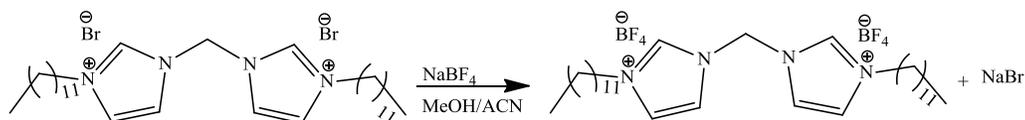
RMN ¹H ([D₆]-DMSO 400 MHz): δ (ppm) 9.80 (s, 2H), 8.21 (s, 2H), 7.93 (s, 2H), 6.81 (s, 2H), 4.21 (t, 4H, *J* = 6.9 Hz), 1.78 (t, 4H, *J* = 7.1 Hz), 1.21 (m, 36H), 0.82 (t, 6H, *J* = 5.6 Hz).

RMN ¹³C ([D₆]-DMSO 75 MHz): δ (ppm) 137.54, 123.05, 122.16, 57.84, 49.29, 34.10, 31.30, 29.10, 29.01, 28.97, 28.85, 28.72, 28.42, 25.49, 22.10, 13.96.

HR-MS(ESI): *m/z* calc pour C₃₁H₅₈N₄²⁺ [M]²⁺: 243.2325; trouvé: 243.2328.

T_f > 200 °C

2.8.5. Synthèse du bis-tétrafluoroborate de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium



Dans un ballon de 100 mL muni d'un agitateur magnétique du dibromure de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium (1.60 mmol) et du tétrafluoroborate de sodium (9.3 mmol) ont été dissouts dans un mélange de dichlorométhane et de méthanol (1 :1 v/v). Le mélange réactionnel a été agité durant 30 minutes à température ambiante, puis lavé avec de l'eau puis séché avec du MgSO₄. La solution a été ensuite concentrée sous vide puis caractérisée (Rdt. = 76 %).

RMN ¹H (CD₃CN 400 MHz): δ (ppm) 9.17 (s, 2H), 7.79 (d, 2H, *J* = 1.9 Hz), 7.51 (d, 2H, *J* = 1.8 Hz); 6.55 (s, 2H), 4.19 (t, 4H, *J* = 7.8 Hz), 1.87 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 1.30 (s, 36H), 0,90 (t, 6H, *J* = 6.6 Hz).

RMN ¹³C (CD₃CN 100 MHz): δ (ppm) 137.92, 124.35, 123.31, 59.35, 51.12, 49.81, 34.13, 32.57, 30.28, 30.20, 30.17, 30.01, 29.55, 26.60, 23.33, 14.32.

HR-MS(ESI): m/z calc pour $C_{31}H_{58}N_{42}^+$ [M]²⁺: 243.2325; trouvé: 243.2332

T_f > 220°C

2.8.6. Synthèse du bis-(trifluoromethanesulfonyl)amide de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium



Le protocole employé dans la synthèse 2.8.5 est le même qui a été utilisé lors de cette synthèse. (Rdt. = 81 %).

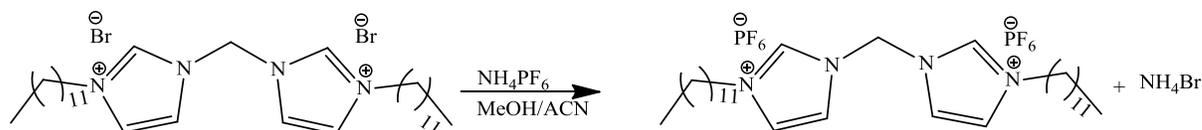
RMN ¹H (CD₃CN 400 MHz): δ (ppm) 8.79 (s, 2H), 7.61 (d, 2H, *J* = 1.7 Hz), 7.51 (d, 2H, *J* = 1.5 Hz), 6.37 (s, 2H), 4.19 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz), 1.86 (t, 4H, *J* = 5.4 Hz), 1.30 (s, 36H), 0.93 (t, 6H, *J* = 6.3 Hz).

RMN ¹³C (CD₃CN 100 MHz): δ (ppm) 137.52, 124.59, 123.25, 59.67, 51.19, 34.14, 32.58, 31.31, 30.34, 30.29, 30.19, 30.03, 29.56, 26.61, 23.34, 14.31.

HR-MS(ESI): m/z calc pour $C_{31}H_{58}N_{42}^+$ [M]²⁺: 243.2325; trouvé: 243.2334

T_f > 220°C

2.8.7. Synthèse du bis-hexafluorophosphate de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium



Le protocole employé dans la synthèse 2.8.5 est le même qui a été utilisé lors de cette synthèse. (Rdt. = 63 %).

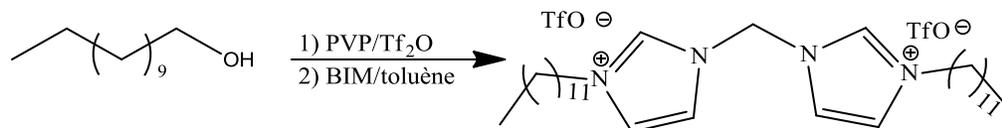
RMN ¹H (CD₃CN 300 MHz): δ (ppm) 8,79 (s, 2H), 7.61 (d, 2H, *J* = 1.9 Hz), 7.51 (d, 2H, *J* = 1.7 Hz), 6.38 (s, 2H), 4.19 (t, 4H, *J* = 9.8 Hz), 1.86 (t, 4H, *J* = 9.3 Hz), 1.30 (s, 36H), 0.91 (t, 6H, *J* = 8.6 Hz).

RMN ¹³C (CD₃CN 100 MHz): δ (ppm) 137.51, 124.58, 123.25, 59.67, 51.17, 32.58, 30.34, 30.30, 30.26, 30.20, 30.04, 30.01, 29.56, 26.61, 23.33, 14.33.

HR-MS(ESI): *m/z* calc pour C₃₁H₅₈N₄²⁺ [M]²⁺: 243.2325; trouvé: 243.2330

T_f > 220°C

2.8.8. Synthèse du bis-triflate de 3-dodécyl-1-méthylènediimidazolium



Dans un ballon de 50 mL muni d'un agitateur magnétique, du dodécane-1-ol (5.4 mmol) et de la polyvinylpyridine (6.21 mmol) ont été ajoutés à une solution de dichlorométhane (50 mL). La solution a été refroidie à 0 °C et de l'anhydride trifluorométhane sulfonique a

été ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel a été agité durant 2 heures de 0 °C à température ambiante puis filtré. Le sel de polyvinylpyridium triflate a été lavé avec du dichlorométhane puis filtré. Le filtrat a été transvasé dans une ampoule à extraction, lavé avec une solution saturée de NaHCO₃, séché sur du sulfate de magnésium et concentré sous vide (huile jaunâtre). Le bis-imidazole (2.7 mmol) a été ajouté dans le ballon, lequel contenait préalablement de l'acétonitrile. Ensuite, la solution a été chauffée à 85°C durant une nuit, puis concentrée sous vide. (Rdt. = 76 %).

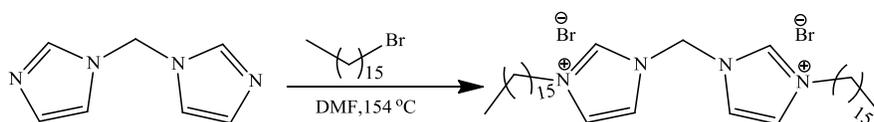
RMN ¹H (CD₃OD 400 MHz): δ (ppm) 9.37 (s, 2H), 7.95 (s, 2H), 7.89 (s, 2H), 6.58 (s, 2H), 4.20 (t, 4H, *J* = 7.2 Hz), 1.78 (t, 4H, *J* = 6.9 Hz), 1.24 (s, 36H), 0.85 (t, 6H, *J* = 6.6 Hz).

RMN ¹³C ([D₆]-DMSO 75 MHz): δ (ppm) 137.01, 122.70, 121.75, 56.72, 48.84, 30.90, 28.72, 28.70, 28.63, 28.61, 28.60, 28.56, 28.52, 25.07, 21.70, 13.52.

HR-MS(ESI): m/z calc pour C₃₁H₅₈N₄²⁺ [M]²⁺: 243.2325; trouvé: 243.2322.

T_f > 220°C

2.8.9. Synthèse du bis-bromure de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium²³



Le protocole employé dans la synthèse 2.8.4 est le même qui a été utilisé lors de cette synthèse. (Rdt. = 37 %)

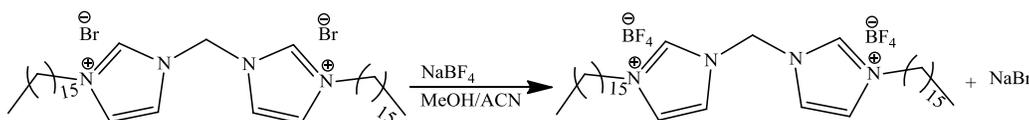
RMN ^1H (CD_3OD 400 MHz): δ (ppm) (s, 2H), 8.00 (d, 2H, $J = 1.7$ Hz), 7.80 (d, 2H, $J = 1.9$ Hz), 6.78 (s, 2H), 4.29 (t, 4H, $J = 7.5$ Hz), 1.95 (t, 4H, $J = 6.2$ Hz), 1.28 (s, 52H), 0.90 (t, 6H, $J = 6.4$ Hz).

RMN ^{13}C (CD_3OD 100 MHz): δ (ppm) 130.45, 124.81, 123.52, 59.96, 51.56, 46.60, 35.95, 33.08, 30.87, 30.83, 30.80, 30.77, 30.69, 30.55, 30.48, 30.15, 27.37, 27.33, 23.74, 14.45.

HR-MS(ESI): m/z calc pour $\text{C}_{39}\text{H}_{74}\text{N}_{42}^+ [\text{M}]^{2+}$: 299.2951; trouvé: 299.2964.

$T_f > 220$ °C

2.8.10. Synthèse du bis-tétrafluoroborate de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium



Le protocole employé dans la synthèse 2.8.5 est le même qui a été utilisé lors de cette synthèse. (Rdt. = 54 %).

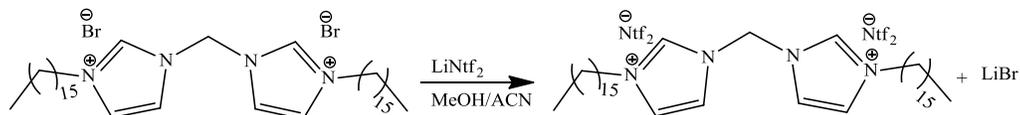
RMN ^1H (CD_3CN 400 MHz): δ (ppm) 8.94 (s, 2H), 7.70 (d, 2H, $J = 1.8$ Hz), 7.51 (d, 2H, $J = 1.8$ Hz); 6.55 (s, 2H), 4.19 (t, 4H, $J = 7.5$ Hz), 1.87 (t, 4H, $J = 7.0$ Hz), 1.30 (s, 52H), 0,90 (t, 6H, $J = 6.6$ Hz)

RMN ^{13}C (CD_3CN 100 MHz): δ (ppm) 137.77, 124.48, 123.30, 59.58, 51.17, 36.70, 32.59, 32.34, 30.35, 30.31, 30.24, 30.21, 30.04, 30.02, 29.57, 29.40, 29.01, 26.62, 23.34, 14.34.

HR-MS(ESI): m/z calc pour $\text{C}_{39}\text{H}_{74}\text{N}_{42}^+ [\text{M}]^{2+}$: 299.2951; trouvé: 299.2958.

$T_f > 220$ °C

2.8.11. Synthèse du bis-(trifluoromethanesulfonyl)amide de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium



Le protocole employé dans la synthèse 2.8.5 est le même qui a été utilisé lors de cette synthèse. (Rdt. = 100 %).

RMN ¹H (CD₃CN 400 MHz): δ (ppm) 8.77 (s, 2H), 7.62 (d, 2H, *J* = 1.9 Hz), 7.52 (d, 2H, *J* = 1.8 Hz), 6.38 (s, 2H), 4.19 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz), 1.96 (t, 4H, *J* = 7.0 Hz), 1.30 (s, 52H), 0.91 (t, 6H, *J* = 6.6 Hz).

RMN ¹³C (CD₃CN 100 MHz): δ (ppm) 137.49, 124.60, 123.26, 59.68, 54.30, 51.19, 39.85, 32.59, 30.35, 30.31, 30.29, 30.25, 30.21, 30.16, 30.13, 30.04, 29.57, 26.62, 23.34, 14.34.

HR-MS(ESI): *m/z* calc pour C₃₉H₇₄N₄⁺ [M]²⁺: 299.2951; trouvé: 299.2962

T_f > 220 °C

2.8.12. Synthèse du bis-hexafluorophosphate de 3-hexadécyl-1-méthylènediimidazolium



Le protocole employé dans la synthèse 2.8.5 est le même qui a été utilisé lors de cette synthèse. (Rdt. = 100 %).

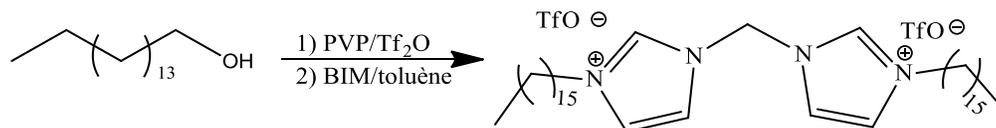
RMN ¹H (CD₃CN 300 MHz): δ (ppm) 8,79 (s, 2H), 7.61 (d, 2H, *J* = 1.8 Hz), 7.51 (d, 2H, *J* = 1.7 Hz), 6.38 (s, 2H), 4.19 (t, 4H, *J* = 7.5 Hz), 1.86 (t, 4H, *J* = 6.5 Hz), 1.30 (s, 52H), 0.91 (t, 6H, *J* = 6.4 Hz).

RMN ¹³C (CD₃CN 100 MHz): δ (ppm) 137.53, 124.57, 123.25, 59.66, 54.30, 51.18, 49.83, 32.64, 32.58, 30.89, 30.34, 30.30, 30.26, 30.20, 30.04, 30.02, 29.57, 26.61, 23.33, 14.32.

HR-MS(ESI): m/z calc pour C₃₉H₇₄N₄²⁺ [M]²⁺: 299.2951; trouvé: 299.2962

Tf > 220 °C

2.8.13. Synthèse du bis-triflate de 3-hexadécyl-bis-imidazolium



Le protocole employé dans la synthèse 2.8.8 est le même qui a été utilisé lors de cette synthèse. (Rdt. = 23 %).

RMN ¹H ([D₆]-DMSO 400 MHz): δ (ppm) 9.39 (s, 2H), 7.97 (s, 2H), 7.89 (s, 2H), 6.60 (s, 2H), 4.20 (t, 4H, *J* = 7.2 Hz), 1.78 (t, 4H, *J* = 6.6 Hz), 1.23 (s, 52H), 0.85 (t, 6H, *J* = 6.3 Hz).

RMN ¹³C ([D₆]-DMSO 75 MHz): δ (ppm) 137.41, 123.21, 122.23, 58.40, 51.01, 49.31, 48.52, 31.30, 29.16, 29.07, 29.03, 28.98, 28.92, 28.86, 28.72, 28.43, 25.48, 22.85, 22.10, 13.95.

HR-MS(ESI): *m/z* calc pour C₃₉H₇₄N₄²⁺ [M]²⁺: 299,2962; trouvé: 299,2951.

T_f: 120 - 247°C (décomposition).