

Université de Montréal

**Étude des tachykinines et de leurs dérivés peptidiques associés à la douleur
neuropathique grâce à l'utilisation de modèles animaux et de la
chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse**

par

Floriane Pailleux

Département de Biomédecine Vétérinaire

Faculté de Médecine Vétérinaire

Co-tutelle

l'Université Claude Bernard de Lyon 1, France

Thèse présentée à la Faculté de Médecine Vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Philosophae Doctor* (Ph.D.)
en sciences vétérinaires
option pharmacologie

Octobre, 2013

© Floriane Pailleux, 2013

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Cette thèse intitulée :

Étude des tachykinines et de leurs dérivés peptidiques associés à la douleur neuropathique grâce à l'utilisation de modèles animaux et de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

Présentée par :

Floriane Pailleux

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Arnaud Salvador, président-rapporteur

Francis Beaudry, directeur de recherche

Jérôme Lemoine, directeur de recherche

Bertrand Rochat, examinateur externe

Michel Salzet, examinateur externe

Pascal Vachon, représentant du doyen de la FES

Résumé

La gestion de la douleur neuropathique reste un challenge en médecine, malgré le nombre de traitements actuellement disponible. L'expérimentation animale a généré beaucoup d'informations concernant la douleur, mais ces connaissances demeurent insuffisantes pour développer de nouveaux analgésiques plus efficaces tout en restant sécuritaires. La douleur est un symptôme clinique complexe avec de multiples origines, et les mécanismes de douleur centraux et périphériques dépendent de l'évolution de la pathologie. Il est donc essentiel d'investiguer plus profondément les mécanismes moléculaires responsables de l'initiation et du maintien de la douleur, afin de cibler de nouvelles voies de transmission de la nociception plus prometteuses pour soulager la neuropathie et développer de meilleures stratégies thérapeutiques. Ce projet s'est donc intéressé plus particulièrement à la famille des tachykinines issues du gène TAC1 (substance P, ses précurseurs et métabolites, et neurokinine A sont les peptides ciblés pour ce projet de recherche), une famille de neuropeptides qui joue un rôle critique dans la transmission nociceptive.

Pour réaliser cette étude, nous avons d'abord développé une stratégie de quantification afin de quantifier les expressions des différents neuropeptides bioactifs cibles, par HPLC-MS/MS. Puisqu'il existe différentes stratégies de quantification des peptides par HPLC-MS/MS, une méthode analytique fiable et robuste était nécessaire pour répondre aux objectifs de recherche. Nous avons développé une méthode utilisant la quantification relative avec un étalon interne stable marqué isotopiquement. En effet, pour quantifier les neuropeptides d'intérêt de l'étude, c'est la stratégie qui s'est avérée la plus reproductible et précise.

Suite à la mise au point de la stratégie de quantification, nous avons utilisé des modèles animaux, souvent nécessaires pour faire progresser la recherche scientifique sur la compréhension de la douleur.

Le modèle de constriction chronique du nerf sciatique (CCI) est un modèle validé, largement utilisé pour induire et étudier la douleur neuropathique. Afin de s'assurer du développement de la neuropathie, deux tests comportementaux, les filaments de von Frey et le test de Hargreaves, ont été employés avant et après la CCI. Les cerveaux, les élargissements lombaires et les plasmas des animaux ont été prélevés afin d'effectuer les analyses pour quantifier la modulation d'expression des différents neuropeptides bioactifs cibles entre le groupe animal contrôle et le groupe pathologique. Ceci a révélé une augmentation significative des concentrations spinales de β -tachykinine₅₈₋₇₁, SP et SP₃₋₁₁ chez les rats neuropathiques, signifiant donc que l'expression de ces trois peptides est étroitement liée. Au contraire, la concentration spinale de SP₅₋₁₁ est diminuée de façon significative chez les animaux neuropathiques. De plus, les concentrations cérébrales de β -tachykinine₅₈₋₇₁ et SP sont significativement plus élevées chez les rats neuropathiques. Tandis qu'aucune différence significative n'est notée au niveau des concentrations spinales ou cérébrales de NKA, β -tachykinine₅₈₋₇₀, SP₆₋₁₁ et SP₁₋₇. Ceci suggère que la β -tachykinine₅₈₋₇₁, SP, SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ pourraient potentiellement servir de biomarqueurs de la douleur neuropathique.

Nous avons aussi utilisé un modèle de souris *knock-out*, déficientes au niveau du gène du récepteur TRPV1 (TRPV1^{-/-}), afin d'étudier les modulations d'expression de différentes tachykinines en fonction de la présence ou non du récepteur TRPV1, connu pour être

étroitement lié aux tachykinines. Le récepteur vanilloïde TRPV1 est impliqué dans la transmission du signal douloureux en étant surexprimé, contribuant à la sensibilisation. Nos résultats ont montré que les concentrations spinales et cérébrales de SP et NKA sont significativement diminuées dans les tissus des souris TRPV1^{-/-}. Ceci démontre la contribution des tachykinines dans la modulation du seuil douloureux, ainsi qu'un lien entre l'expression de SP et NKA et celle du récepteur TRPV1 dans les systèmes nerveux central et périphérique. En effet, les récepteurs vanilloïdes, et plus particulièrement le récepteur TRPV1, jouent un rôle central dans le processus de stimuli nociceptifs. Il est aussi connu que plusieurs ligands du TRPV1, tels que l'eugénol, la vanilline, le [6]-gingérol, ou des agonistes endogènes comme certains endovanilloïdes atténuent la douleur neuropathique en agissant sur le récepteur TRPV1.

Suite à ces résultats, nous nous sommes intéressés aux métabolites de SP. En effet, différents mécanismes permettent la libération de SP suite à une lésion et à l'établissement de la douleur neuropathique. Il est bien documenté que le foie est l'organe principal du métabolisme. Par conséquent, au niveau sanguin, ce seront des métabolites de SP qui pourront être exprimés. Nous avons donc choisi d'étudier la stabilité métabolique de SP dans des microsomes de foie de rat, de souris et d'humain. Nos résultats ont montré que SP est rapidement dégradée et que le profil métabolique est différent selon l'espèce étudiée. Par conséquent, plusieurs métabolites de SP semblent intéressants et possèdent des activités pharmacologiques qui leur sont propres, dont SP₁₋₇, SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁.

SP, ses métabolites et ses précurseurs, ainsi que NKA s'avérant intéressants en tant que biomarqueurs potentiels de la douleur neuropathique, il semblait aussi important de développer une méthode pour les quantifier dans le plasma. En effet, il est plus aisé de collecter du plasma pour éviter de sacrifier l'animal dans le but de réaliser des études cinétiques à long terme ou de développer des méthodes de dosages applicables à l'humain. Nous avons donc développé une méthode HPLC-MS/MRM afin de pouvoir estimer le niveau endogène des neuropeptides cibles dans le plasma. En revanche, nous n'avons pas eu la chance de pouvoir quantifier ces peptides dans le plasma collecté lors de l'étude animale.

Il reste encore de nombreuses études à réaliser avant de pouvoir répondre à toutes les questions concernant la douleur neuropathique, sa transmission et les traitements possibles. Ce projet de doctorat a permis de commencer à éclairer la recherche sur la voie des tachykinines.

Mots clé : allodynie, chromatographie haute performance en phase liquide, douleur chronique, douleur neuropathique, hyperalgésie, neuropeptides, peptidomimétique, pharmacologie, spectrométrie de masse

Abstract

The management of neuropathic pain remains a challenge in medicine, despite the availability of numerous drugs. Animal experimentation has generated a tremendous amount of information about pain, but this knowledge is still insufficient for new more efficient and safe analgesics. Pain is a complex clinical symptom with multiple origins, and peripheral and central pain mechanisms depend on the pathology evolution. Thus, it is essential to further investigate the mechanisms responsible for the initiation and maintenance of pain in order to develop better effective therapies. This project is particularly focused on the tachykinin family encoded by TAC1 gene (substance P, its precursors and metabolites, neurokinin A), a family of neuropeptides that plays a critical role in nociceptive transmission.

We initially developed a quantification strategy in order to study the targeted bioactive neuropeptide expression modulation by HPLC-MS and HPLC-MS/MS. And it is critical to develop reliable and robust analytical methods to reach the objectives. So, we developed a method using relative quantification with stable isotopic labeled internal standards. In fact, in order to quantify target neuropeptides, this strategy was the most reproducible and accurate.

Following the development of the relative quantification strategy, we used validated animal models, fundamental to better knowledges of painful molecular mechanisms.

The model of chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI) is a validated model, widely used to induce and study neuropathic pain. To perform complete data, two behavioral tests, von Frey filaments and Hargreaves test, were used before and after the CCI to ensure the neuropathy establishment. The animal brains, lumbar enlargements and plasmas were collected to quantify the expression modulation of different targeted bioactive neuropeptides between the CCI group *versus* the control group. HPLC-MS/MS analyses revealed that the spinal β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP and SP₃₋₁₁ concentrations were significantly up-regulated in neuropathic animals, meaning these peptide expressions are closely related to pain behavior. In contrast, the spinal SP₅₋₁₁ concentration in neuropathic animals revealed a significant down-regulation compared with normal animals. Moreover, the brain β -tachykinin₅₈₋₇₁ and SP concentrations were significantly up-regulated in neuropathic animals. Interestingly, no significant concentration differences were observed in the spinal cord and brain for NKA, β -tachykinine₅₈₋₇₀, SP₆₋₁₁ and SP₁₋₇. This suggests that β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP, SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ could potentially serve as drug efficacy markers in early drug discovery.

We also used a knock-out mice model, deficient in the TRPV1 receptor gene (TRPV1^{-/-}) to study the expression modulation of different tachykinins according to the presence or absence the TRPV1 receptor. The TRPV1 receptor is known to be closely related to tachykinins. The over-expressed TRPV1 vanilloid receptor is involved in the transmission of painful signal, leading to the sensitization. Our results revealed that SP and NKA spinal and brain concentrations were significantly decreased in TRPV1^{-/-} mice. These results suggest an important tachykinin contribution in the pain threshold modulation, and a close link between SP, NKA and TRPV1 expressions in the central and peripheral nervous systems. Vanilloid receptors, particularly the TRPV1 receptor, play a central role in the nociceptive stimuli transmission. It is also known that several TRPV1 agonists, such as eugenol, vanillin, [6]-

gingerol, or endogenous agonists like endovanilloids alleviate pain in neuropathic and osteoarthritis models *via* their action on the TRPV1 receptor.

There are several mechanisms leading to the SP release following an injury and the neuropathy development. Nowadays, it is well documented the liver is the main organ of the metabolism. Thus, SP metabolites could be expressed in the blood level. So we are interested to SP metabolic stability in rat, mouse and human liver microsomes. Our results showed that SP is rapidly degraded and the metabolic profile is different depending on the species studied. Several SP metabolites seem interesting and have pharmacological activities, including SP₁₋₇, SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁.

As all these neuropeptides seemed interested targets like potential biomarkers of neuropathic pain, we developed a method to quantify them in the plasma. Additionally, it is easier to collect plasma to avoid sacrificing the animal in order to achieve long-term kinetic studies or develop assay methods applicable to humans. So we have developed a HPLC-MS/MRM analytical method to estimate the targeted neuropeptide endogenous levels in plasmas. However, we did not have the chance to quantify these peptides in collected plasmas during the animal study.

A lot of studies are still required to clarify different pathways involved in neuropathic pain in order to develop better and safer therapeutic strategies. This project allowed to better understanding of mechanisms related to tachykinin activities.

Keywords : allodynia, chronic pain, high performance liquid chromatography, hyperalgesia, mass spectrometry, neuropathic pain, neuropeptides, peptidomic, pharmacology

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations	xviii
Remerciements	xxii
Introduction	1
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
I. Les études en « -omique »	8
I.1 Généralités.....	8
I.2 Génomique	9
I.3 Transcriptomique	10
I.4 Protéomique et sous-protéome	11
I.4.1 Protéines et peptides	13
I.4.2 Peptides endogènes bioactifs	17
I.5 Métabolomique.....	18
I.6 Notions de biomarqueurs	19
II. Les techniques analytiques en peptidomique	21
II.1 Introduction à la bioanalyse	22
II.2 L'échantillonnage et la préservation	23
II.3 La préparation d'échantillon	25
II.3.1 Extraction par précipitation	26
II.3.2 Extraction sur support solide.....	27
II.3.3 Le recouvrement.....	31
II.4 La chromatographie haute performance en phase liquide	31
II.5 La spectrométrie de masse	35
II.5.1 Les sources d'ionisation	36
II.5.1.1 La source ESI.....	36
II.5.1.2 La source MALDI	39
II.5.2 L'effet matrice	41

II.5.2.1 Le rendement	42
II.5.3 Les analyseurs	43
II.5.3.1 Le quadrupôle et le triple quadrupôle.....	44
II.5.3.2 Les trappes ioniques	46
II.5.3.2.1 La trappe ionique tridimensionnelle	47
II.5.3.2.2 La trappe ionique linéaire	49
II.5.3.2.3 La trappe ionique linéaire couplée à un quadrupôle	49
II.5.3.2.4 QqOrbitrap (ou qExactive)	51
II.5.3.3 Le temps de vol.....	52
II.5.4 Les modes de balayage.....	55
II.5.4.1 Le mode « <i>full scan MS</i> »	55
II.5.4.2 Le mode « <i>single ion monitoring</i> ».....	55
II.5.4.3 Le mode « <i>product ion scan</i> » ou MS ²	56
II.5.4.4 Le mode MS ⁿ	57
II.5.4.5 Le mode « <i>precursor ion scan</i> ».....	57
II.5.4.6 Le mode « perte de neutre » ou « <i>neutral loss</i> ».....	58
II.5.4.7 Le mode « <i>selected reaction monitoring</i> »	58
II.5.4.8 Les modes MRM et MRM ³	59
II.5.5 Les cellules de collision	60
II.5.5.1 La dissociation induite par collision.....	61
II.5.5.2 La dissociation par collision à haute énergie.....	62
II.5.6 La fragmentation des peptides.....	63
II.5.7 Les détecteurs.....	65
II.6 Les autres méthodes de dosage en peptidomique	68
II.6.1 Le dosage des peptides par HPLC-Fluorescence	68
II.6.2 Le dosage des peptides par EIA	69
II.6.3 Le dosage des peptides par ELISA	69
II.6.4 Le dosage des peptides par RIA.....	71
II.6.5 Le dosage des peptides par IHC.....	71
II.7. Les méthodes de quantification absolue et relative en peptidomique par HPLC-MS ..	71
III. La douleur	78
III.1 Anatomie et physiologie de la douleur	78
III.1.1 La douleur aiguë et la douleur inflammatoire.....	78

III.1.2 La douleur neuropathique	79
III.2 La neurophysiologie de la douleur	80
III.2.1 Les neurones sensoriels primaires	84
III.2.2 La corne dorsale	84
III.2.3 Le tronc cérébral et les hémisphères cérébraux	86
III.2.4 L'hyperalgésie.....	87
III.2.5 L'allodynie	89
III.3 Les récepteurs et molécules agissant sur les nocicepteurs	89
III.3.1 Les récepteurs neurokinines.....	90
III.3.2 Les récepteurs opioïdes.....	91
III.3.3 Les récepteurs vanilloïdes.....	92
III.4 Les neurotransmetteurs traditionnels et leurs rôles	95
III.4.1 Les récepteurs ionotropiques	95
III.5 Les neurotransmetteurs peptidiques	97
III.5.1 Les tachykinines.....	97
III.5.2 Les précurseurs de SP	99
III.5.3 La substance P.....	100
III.5.4 Les métabolites de SP	102
III.5.5 Le neuropeptide K.....	103
III.5.6 La neurokinine A	103
III.5.7 La neurokinine B.....	104
III.5.8 Le neuropeptide gamma.....	104
III.6 Les peptides opioïdes endogènes.....	105
III.6.1 Les dynorphines	107
III.6.2 Les enképhalines.....	108
III.6.3 Les endomorphines	109
III.7 Les peptides anti-opioïdes	109
III.8 Autres peptides algogènes	110
IV. Modèles animaux et bioéthique.....	111
IV.1 Modèles animaux	112
IV.1.1 La constriction chronique du nerf sciatique.....	112
IV.1.2 Le modèle de souris <i>knock-out</i>	113
IV.2 Tests comportementaux.....	114

IV.3 Quelques traitements	116
V. Hypothèses de l'étude	118
VI. Objectifs de recherche	119
CHAPITRE 2 : ARTICLES	121
I. Article 1 : Internal standard strategies for relative and absolute quantification of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry	122
I.1 Abstract	122
I.2 Introduction	123
I.3 Internal standards for targeted quantitative peptidomics	127
I.4 Quantification using synthetic internal standards	130
I.5 Quantification base on reference internal standard	133
I.6 Quantification base on global internal standard	137
I.7 Concluding remarks	139
I.8 Acknowledgements	140
I.9 References	140
I.10 Figure legends	158
II. Article 2 : Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain	163
II.1 Abstract	163
II.2 Introduction	164
II.3 Experimental procedures	168
II.3.1 Chemicals and reagents	168
II.3.2 <i>In vivo</i> experiments	168
II.3.3 Von Frey filaments to evaluate secondary mechanical allodynia	169
II.3.4 Hargreaves' test to evaluate thermal hyperalgesia	170
II.3.5 Internal standards	170
II.3.6 Tissue sample preparation	171
II.3.7 Instrumentation	171
II.3.8 Bioanalytical method	172
II.3.9 Statistical analysis	173
II.4 Results	173
II.4.1 Evaluation of mechanical and thermal sensitivities	173

II.4.2 Mass spectrometry.....	174
II.4.3 Analytical performance	175
II.4.4 Analyses of spinal cord and brain peptides.....	175
II.5 Discussion	176
II.6 Conclusions.....	182
II.7 Acknowledgements.....	182
II.8 References.....	183
II.9 Table legends	197
II.10 Figure legends.....	198
III. Article 3 : Quantitative mass spectrometry analysis reveals that deletion of the TRPV1 receptor in mice alters substance P and neurokinin A expression in the central nervous system	203
III.1 Abstract.....	203
III.2 Introduction	204
III.3 Experimental.....	206
III.3.1 Chemicals and reagents.....	206
III.3.2 Synthesis of the internal standards.....	207
III.3.3 Sample preparation	207
III.3.4 Instrumentation	207
III.3.5 Bioanalytical methods.....	208
III.3.6 Statistical analysis	209
III.4 Results and discussion	209
III.4.1 Mass spectrometry	209
III.4.2 Analytical performance.....	210
III.4.3 Analysis of mouse tissues	211
III.5 Conclusions	213
III.6 Acknowledgements	214
III.7 References	214
III.8 Table legends	219
III.9 Figure legends.....	220
IV. Article 4 : Investigation of the metabolic biotransformation of substance P in liver microsomes by liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry.....	224
IV.1 Abstract	224

IV.2 Introduction	225
IV.3 Material and methods	227
IV.3.1 Chemicals and reagents	227
IV.3.2 Synthesis of the internal standard	228
IV.3.3 Instrumentation	228
IV.3.4 Bioanalytical methods	229
IV.3.5 Microsomal incubations.....	229
IV.3.6 Determination of metabolic stability	230
IV.3.7 SP metabolite identification by HPLC-MS/MS	231
IV.4 Results	231
IV.4.1 Analytical performances	231
IV.4.2 SP metabolic stability assessment in liver microsomes.....	231
IV.4.3 Characterization of SP metabolites by HPLC-MS/MS	232
IV.4.4 Interspecies SP comparative metabolic profiles	233
IV.5 Discussion	233
IV.6 Conclusion.....	236
IV.7 Acknowledgments	237
IV.8 References	237
IV.8 Table legends.....	245
IV.9 Figure legends	246
V. Article 5 : Development of an HPLC-MS/MRM method for the quantification of tachykinin related peptides in rat plasma	252
V.1 Abstract.....	252
V.2 Introduction.....	253
V.3 Experimental.....	254
V.3.1 Chemicals and reagents.....	254
V.3.2 Sample preparation	254
V.3.3 Bioanalytical method	255
V.4 Results and discussion	256
V.5 Acknowledgements.....	258
V.6 References.....	259
V.7 Table legend.....	262
V.8 Figure legends.....	263

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GENERALE.....	264
I. Récapitulatif des résultats obtenus.....	265
II. Résultats obtenus <i>versus</i> résultats attendus.....	269
III. Discussion sur l'implication des résultats obtenus.....	273
IV. Les perspectives envisagées.....	283
CONCLUSION.....	286
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	289

Liste des tableaux

Tableau 1 : Noms, codes à 3 et 1 lettres, structures et caractéristiques physicochimiques des 20 acides aminés naturels.	14
Tableau 2 : Critères de performance à prendre en compte lors du développement d'un protocole utilisant une extraction par SPE (d'après Salvador, 2009).	30
Tableau 3 : Récapitulatif des avantages et inconvénients associés à l'utilisation d'une source ESI ou MALDI.....	41
Tableau 4 : Récapitulatif des caractéristiques et performances de chaque instrument couramment utilisé en peptidomique (d'après Domon and Aebersold, 2006). Les symboles +, ++, +++ et ++++ sont des indicateurs de réponse faible à excellente. PIS = <i>precursor ion scan</i> , NL = <i>neutral loss</i> , MRM = <i>multiple reaction monitoring</i> , CID = <i>collision-induced dissociation</i> , HCD = <i>high-energy collisional dissociation</i>	63
Tableau 5 : Degrés d'affinité des peptides opioïdes endogènes pour les récepteurs opioïdes.	106

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes étapes de la formation du génome au protéome : la transcription, la traduction et les modifications post-traductionnelles.....	10
Figure 2 : Structure conventionnelle d'un acide aminé.....	15
Figure 3 : Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés.....	15
Figure 4 : Configurations possibles des protéines (structure quaternaire non illustrée) (copyright©2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.).....	16
Figure 5 : Explications d'un test utilisant des biomarqueurs et permettant de discriminer des populations saines et physiopathologiques. VN = vrais négatifs ; VP = vrais positifs ; FN = faux négatifs ; FP = faux positifs (d'après Soreide, 2009).....	21
Figure 6 : Molécule d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) utilisée dans le plasma comme agent chélateur et stabilisateur, bloquant l'activité enzymatique.....	23
Figure 7 : Protocole classique de SPE (d'après le guide Supelco, 1998) composé de quatre étapes : 1- conditionnement, 2- dépôt de l'échantillon, 3- rinçage, 4- élution.....	27
Figure 8 : Exemple de schéma d'un montage d'extraction sur support solide en ligne, via une vanne composée de 10 voies. Position A - Etapes de conditionnement de la colonne SPE et de dépôt de l'échantillon ; en parallèle, conditionnement de la colonne HPLC. Position B - Etape d'élution des composés sur la colonne SPE ; en même temps, l'échantillon est séparé et élué sur la colonne HPLC, puis détecté par spectrométrie de masse.....	30
Figure 9 : Détermination du recouvrement pendant les étapes de préparation d'échantillon par comparaison du signal d'une quantité connue d'analyte ajoutée et extraite en présence de la matrice biologique (A), <i>versus</i> la même concentration fortifiée en analyte après extraction de la matrice seule (B).	31
Figure 10 : Schéma décrivant le principe de la chromatographie haute performance en phase liquide : la phase mobile entraîne les analytes à travers une colonne (phase stationnaire), retenant les composés en fonction de leurs caractéristiques physicochimiques. Les analytes sont ensuite élués et analysés par le détecteur.....	32
Figure 11 : Aspect cinétique de la séparation chromatographique, entraînant un phénomène de dispersion et donc d'élargissement du pic chromatographique et de diminution de sensibilité.	33
Figure 12 : Schéma représentant une séparation chromatographique de deux composés selon différentes valeurs de résolution (Rs). Pour des valeurs ≤ 0.5 , un seul pic apparaît. Le retour à la ligne de base n'est obtenu que pour une valeur ≥ 1.25 (d'après Principles and practice of bioanalysis, 2008).....	34
Figure 13 : Exemple de chromatogramme reconstitué à partir de la mesure d'un courant ionique total (.....	34
Figure 14 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse composé de 4 éléments : la source d'ionisation, l'analyseur, le détecteur et l'enregistreur (d'après le site internet wikipedia, 2013).....	35

Figure 15 : Exemple du spectre MS de la β -tachykinine ₅₈₋₇₁ obtenu avec une source d'ionisation ESI, sur un analyseur de triple quadrupôle. Chaque ion détecté correspond à un état de charge précis du peptide.	36
Figure 16 : Schéma de l'ionisation par une source Electrospray. L'échantillon entre sous forme liquide, passe à travers un capillaire, est transformé sous forme gazeuse, puis analysé (d'après Yamashita and Fenn, 1984).....	37
Figure 17 : Schéma décrivant le principe du processus d'ionisation au sein d'une source ESI : l'échantillon arrive sous forme liquide, sous la production d'un champ électrique intense il y a formation du cône de Taylor, avec apparition de gouttelettes multi-chargées qui vont se désolvater et exploser en atteignant la limite de Rayleigh afin de former les composés ionisés qui vont pouvoir être analysés (d'après Soares <i>et al.</i> , 2012).....	37
Figure 18 : Schéma du principe d'ionisation au sein d'une source MALDI où l'échantillon (en vert) est co-cristallisé avec la matrice (en violet). L'échantillon est irradié par un laser entraînant désorption puis ionisation des peptides ciblés (d'après le site internet wikipedia, 2013).....	40
Figure 19 : Détermination du rendement d'une technique de bioanalyse : comparaison du signal du peptide d'intérêt ayant subi toutes les étapes de préparation d'échantillon dans la matrice biologique (A) <i>versus</i> le signal obtenu pour la même concentration en peptide en présence du solvant uniquement (C).	43
Figure 20 : Mouvement des ions dans un quadrupôle (de Hoffmann and Stroobant, 2007). Un ion positif au centre des barres acquiert une énergie cinétique en direction des barres de potentiels négatifs. Les valeurs de potentiel changent rapidement entre les quatre barres.	45
Figure 21 : Schéma de fonctionnement d'un analyseur quadrupolaire (d'après de Hoffmann and Stroobant, 2007)	46
Figure 22 : Schéma du principe de fonctionnement d'un triple quadrupôle	46
Figure 23 : Principe d'analyse des ions dans une trappe ionique tridimensionnelle : les ions rentrent dans l'IT après avoir été ionisés, passent à travers l'électrode hyperbolique d'entrée, restent confinés dans l'électrode annulaire où ils entrent en collision avec l'hélium et oscillent selon les équations de Mathieu, puis sont éjectés du piège par l'électrode hyperbolique de sortie selon la radiofréquence appliquée (d'après le site internet wikipedia, 2013).	48
Figure 24 : Schéma du principe d'un instrument hybride de type QqLIT	50
Figure 25 : Schéma de fonctionnement du QqOrbitrap (d'après Thermo Scientific).....	52
Figure 26 : Schéma d'un spectromètre de masse composé d'un analyseur de type TOF : (A) TOF linéaire où les ions sont séparés selon leur vitesse acquise au cours de la distance parcourue ; (B) TOF équipé d'un réflectron permettant de corriger la dispersion d'énergie cinétique des ions (d'après Annan, 1996).	54
Figure 27 : Schéma décrivant le principe du mode de balayage « <i>full scan MS</i> » dans un analyseur de type triple quadrupôle : un intervalle <i>m/z</i> défini en Q1 est balayé. Ce mode de scan permet l'identification des peptides (d'après Graves and Haystead, 2002).	55
Figure 28 : Schéma décrivant le principe du mode d'acquisition « <i>single ion monitoring</i> » dans un analyseur de type triple quadrupôle : l'ion ciblé est sélectionné en Q ₁ et q ₂ et Q ₃ sont inactifs et focalisent les ions (d'après Graves and Haystead, 2002).	56

Figure 29 : Schéma décrivant le principe du mode « <i>product ion scan</i> » dans un analyseur de type triple quadropôle : les ions précurseurs sont sélectionnés en Q ₁ , fragmentés en q ₂ puis focalisés vers Q ₃ et détectés (de Hoffmann and Stroobant, 2007).	56
Figure 30 : Schéma décrivant le principe du mode « <i>precursor ion scan</i> » dans un analyseur de type triple quadropôle : les ratios m/z des ions fils sont définis en Q ₃ afin de retrouver les ions parents correspondants en Q ₁ (de Hoffmann and Stroobant, 2007).	57
Figure 31 : Schéma décrivant le principe du mode « <i>neutral loss</i> » dans un analyseur de type triple quadropôle : les analyseurs Q ₁ et Q ₃ balayent une gamme de masses prédéfinies, avec un décalage constant correspondant au groupement neutre perdu lors de la réaction (de Hoffmann and Stroobant, 2007).	58
Figure 32 : Schéma décrivant le principe du mode « <i>selected reaction monitoring</i> » dans un analyseur de type triple quadropôle : l'ion parent est sélectionné en Q ₁ , fragmenté en q ₂ , et l'ion fils associé est sélectionné en Q ₃ (de Hoffmann and Stroobant, 2007).	58
Figure 33 : Schéma décrivant le principe MRM ³ développé sur un instrument hybride couplant un quadropôle et une trappe ionique linéaire (QqLIT) : des ions parents sont sélectionnés en Q ₁ , fragmentés en q ₂ , et leurs ions fils associés sont sélectionnés en Q ₃ pour être fragmentés à leur tour dans la LIT (d'après Fortin <i>et al.</i> , 2009).	60
Figure 34 : Schéma décrivant le principe d'une reconstruction MRM ³ développée sur un instrument hybride couplant un quadropôle et une trappe ionique linéaire (QqLIT) : les transitions MRM ³ majoritaires sont sommées afin de reconstituer le chromatogramme à partir de la mesure en courant ionique total en fonction du temps, puis le spectre de masse (d'après Fortin <i>et al.</i> , 2009).	60
Figure 35 : Schéma décrivant le principe de la fragmentation des ions parents dans une cellule CID (d'après l'Université de Bristol).	62
Figure 36 : Principe de la fragmentation peptidique en mode positif. Les fragments a, b et c contiennent l'extrémité N-terminale, tandis que les fragments x, y et z possèdent l'extrémité C-terminale du peptide. Le numéro indiqué correspond au nombre d'acides aminés contenu par le fragment.	64
Figure 37 : Spectre MS/MS de la substance P obtenu avec une cellule de collision CID, permettant de déterminer à quel fragment de la séquence peptidique correspondent les valeurs des rapports m/z obtenues sur le spectre, grâce une simulation des masses théoriques.	65
Figure 38 : Diagramme conceptuel du cylindre de Faraday (d'après Watson, 1972).	66
Figure 39 : Diagramme conceptuel du multiplicateur d'électrons avec dynode (d'après McFadden, 1973).	67
Figure 40 : Diagramme conceptuel du multiplicateur de photons (d'après le site internet http://wanda.fiu.edu/teaching/courses/Modern_lab_manual/scintillator.html).	68
Figure 41 : Schéma d'explication de la méthode de dosage par ELISA. A gauche, le type ELISA en sandwich est présenté, et à droite, la méthode ELISA en compétition (d'après Dolisi G, http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_prevention.htm).	70
Figure 42: Différentes approches pour la quantification en peptidomique. (A) Quantification utilisant les dilutions isotopiques. (B) Quantification utilisant les marquages isotopiques par MS/MS avec incorporation d'un groupement isobarique avec un ion fragment rapporteur de	

masse différente. (C) Quantification sans marquage donc sans modification de l'échantillon (d'après Domon and Aebersold, 2006).	72
Figure 43 : Principe du marquage chimique par dérivation à l'acétique anhydride (d'après Che and Fricker, 2002).	73
Figure 44 : Principe du marquage iTRAQ™ : chaque échantillon est marqué avec un des ions rapporteurs. Puis les échantillons sont mélangés ensemble. Les fragments obtenus ont la même masse, mais ce sont les ions rapporteurs qui sont suivis car ils sont différents (d'après le protocole iTRAQ™ Reagent, AB Sciex).	74
Figure 45 : Principe du marquage mTRAQ™ (d'après le protocole mTRAQ™ Reagent, AB Sciex).	75
Figure 46 : Simulation in silico de clusters isotopiques : (A) séparation résolue des deux isotopes ; (B) pollution isotopique (d'après Pailleux and Beaudry, 2012).	76
Figure 47 : Principe de quantification par label free. Les contrôles et les échantillons sont analysés séparément par HPLC-MS/MS. La quantification est basée sur la comparaison des intensités des pics (d'après Zhu <i>et al.</i> , 2009).	77
Figure 48 : Schéma représentant l'action des différentes fibres en fonction du stade de la douleur (d'après Julius and Basbaum, 2001).	82
Figure 49 : Schéma des voies de perception de la douleur (Marchand, 2005).	83
Figure 50 : Représentation schématique de la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres nerveuses sensorielles entrent dans la moelle épinière par la corne dorsale et se retrouvent dans les 6 couches (laminae) distinctes de la corne dorsale de la moelle épinière. Les axones des fibres peuvent se retrouver dans plusieurs laminae (d'après Rang <i>et al.</i> , 2007).	86
Figure 51 : Schéma de l'hyperalgésie primaire avec la mise en jeu de substances pronociceptives et des facteurs inflammatoires au niveau des tissus périphériques (d'après Julius and Basbaum, 2001).	88
Figure 52 : Schéma représentant les mécanismes responsables de l'hyperalgésie secondaire au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Maloine, 1997).	89
Figure 53 : La cascade d'évènements activant le récepteur TRPV1 et entraînant la sensibilisation locale par des agonistes endogènes, l'acidité ou la chaleur induisent l'ouverture des canaux calciques et sodiques entraînant une dépolarisation cellulaire et la sensibilisation centrale et périphérique. La capsaïcine désactive le récepteur TRPV1 suite à la dépolarisation initiale (d'après Anand and Bley, 2011).	94
Figure 54 : Différents mécanismes impliqués dans la transmission de la nociception, au niveau du système nerveux périphériques.	97
Figure 55 : Schéma décrivant le principe de la synthèse des tachykinines issues des quatre isoformes du gène TAC1 (d'après Pennefather <i>et al.</i> , 2004).	98
Figure 56 : Schéma représentant la synthèse des neuropeptides durant le transport axonal (d'après Hook <i>et al.</i> , 2008).	99
Figure 57 : Récapitulatif des interactions régulant le développement de la douleur neuropathique au niveau des afférents primaires. AC = adénylate cyclase, BK = bradykinine, DAG = diacyl glycérol, IP3 = inositol triphosphate, PGE = prostaglandine, OP/CB = opioïdes/cannabinoïdes, PKA = protéine kinase A, PKC = protéine kinase C, PLC=phospholipase C.	111

Figure 58 : Schéma du modèle chirurgical de constriction chronique du nerf sciatique (d'après Bennett et Xie, 1988).	113
Figure 59 : Photographies de l'évaluation de la douleur par les filaments de von Frey.	115
Figure 60 : Matériel utilisé pour réaliser le test de Hargreaves.	115
Figure 61 : Représentation des trois niveaux du SNC impliqués dans le contrôle endogène de la douleur : 1/ spinal, 2/ tronc cérébral et 3/ cortical (centres supérieurs). SGPA : substance grise périaqueducale et NRM : noyau du raphé magnus, deux régions impliquées.....	116
Figure 62 : Représentation schématique du métabolisme de la protéine précurseur protachykinine-1 et de l'action des différentes enzymes impliquées dans la synthèse des neuropeptides (Pailleux <i>et al.</i> , 2013). PC1/3 et PC2 reconnaissent des motifs d'une paire d'acides aminés basiques (KR-, RR-, RK- et KK-), et seule PC2 reconnaît le résidu basique seul R-. La carboxypeptidase E (CPE) catalyse la libération des résidus C-terminaux R- et K-. La peptidyl-glycine alpha-amidating mono-oxygénase (PAM) catalyse la réaction d'amidation au niveau de la glycine située C-terminal de la séquence peptidique. Les prolylendopeptidases (PREP) catalysent les hydrolyses des ponts P-X. Ce schéma présente les localisations possibles des actions enzymatiques au niveau des séquences peptidiques de la β -tachikynine ₅₈₋₇₁ , SP, SP ₃₋₁₁ , SP ₅₋₁₁ , NPK et NKA.....	279

Liste des abréviations

Abréviation	Nom
Aα	fibre A alpha
Aβ	fibre A beta
Aδ	fibre A delta
AC	adénylate cyclase
ACE	<i>angiotensin-converting enzyme</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
AINS	anti-inflammatoire non stéroïdien
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
amu	<i>atomic mass unit</i> ou unité de masse atomique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
Big Dyn	<i>big dynorphine</i>
BK	bradykinine
C	fibre C
CB	cannabinoïdes
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i> ou peptide relié au gène de la calcitonine
CID	<i>collision-induced dissociation</i> ou collision induite par dissociation
CV	coefficient de variation
Da	Dalton
DAG	diacyl glycérol
DC	courant continu
DOR	<i>delta opioid receptor</i>
Dyn	dynorphine
ECD	<i>electron capture dissociation</i> ou dissociation par capture d'électrons
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
ESI	<i>electrospray ionization</i> ou ionisation électrospray
ETD	<i>electron transfert dissociation</i> ou dissociation par transfert d'électrons
FWHM	<i>full width at half maximum</i> ou largeur à mi-hauteur du pic
g	constante gravitationnelle
GABA	acide gamma-amino-butyrique
GTPase	guanosine triphosphatase
HCD	<i>high-energy collisional dissociation</i> ou dissociation par collision à haute énergie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> ou

	chromatographie haute performance en phase liquide
IASP	<i>international association for study of pain</i> ou association internationale de l'étude de la douleur
IEF	isoélectrofocalisation
IP₃	inositol triphosphate
IS	<i>internal standard</i> ou standard (étalon) interne
IT	<i>ion trap</i> ou trappe ionique
iTRAQ	<i>isobaric tagging reagents for quantitative proteomic analysis</i>
KO	<i>knock-out</i>
KOR	<i>kappa opioid receptor</i>
LIT	<i>linear ion trap</i> ou trappe ionique linéaire
LOD	<i>limit of detection</i> ou limite de détection
m/z	ratio masse sur charge
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation</i> ou désorption/ionisation laser assistée par une matrice
min	minute
MOR	<i>morphine opioid receptor</i>
MPT	modification post-traductionnelle
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	<i>mass spectrometry</i> ou spectrométrie de masse
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem
mTRAQ	<i>mass-tagging for relative and absolute quantification</i>
NK1	récepteur neurokinine 1
NK2	récepteur neurokinine 2
NK3	récepteur neurokinine 3
NKA	neurokinine A
NKB	neurokinine B
NMDA	acide N-méthyl-D-aspartique
NPγ	neuropeptide gamma
NPK	neuropeptide K
NRM	noyau du raphé magnus
OP	opioïdes
ORL1	<i>opioïde receptor like 1</i>
p	niveau significatif (en statistiques)
PAM	peptidylglycine- α -amidatingmonooxygénase
PCs	proprotéines ou prohormones convertases
PGE	prostaglandine
pH	potentiel d'hydrogène (mesure de l'acidité d'une solution)
pI	point isoélectrique
PIS	<i>precursor ion scan</i>
PKA	protéine kinase A

PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
ppm	partie par millions
PREP	prolylendopeptidase
Q	quadrupôle
RF	radiofréquence
RVM	medulla rostroventrale
s	seconde
SGPA/PAG	substance grise périaqueducale
SIM	<i>single ion monitoring</i>
SNC	système nerveux central
SNP	système nerveux périphérique
SP	substance P
SPE	<i>solid phase extraction</i> ou extraction sur support solide
SRM	<i>selected reaction monitoring</i>
TAC1	gène précurseur de la protéine préprotachykinine-1
TAC2	gène précurseur de la protéine préprotachykinine-2
TFA	acide trifluoroacétique
TOF	<i>time of flight</i> ou temps de vol
TRPV	<i>transient receptor potential vanilloid</i>
WT	<i>wild-type</i> ou type sauvage

*C'est un petit pas pour l'homme,
mais un grand pas pour l'humanité*

Neil Armstrong

Cette citation décrit parfaitement le sentiment que j'ai ressenti plusieurs fois durant ce projet de recherche. Par moment, suite à des échecs, il est facile de se décourager, de se demander si les études en cours vont servir. Mais oui, la recherche est une affaire de longue haleine, de patience, et chaque étude au sein des différentes équipes internationales permet d'améliorer notre qualité de vie, nos connaissances et de parvenir à des résultats concrets. Mais pour cela, il faut passer par des étapes de recherche plus fondamentales et garder espoir.

Remerciements

En premier lieu, j'adresse mes sincères remerciements aux professeurs Michel Salzet et Bertrand Rochat qui ont accepté d'être mes examinateurs externes afin d'évaluer ce travail de recherche.

Je souhaite aussi remercier les professeurs Jérôme Lemoine et Arnaud Salvador de l'Université Claude Bernard de Lyon, qui m'ont encouragée à poursuivre mes études en réalisant un PhD. Avec leur aide, j'ai même pu le poursuivre en co-tutelle entre Lyon et Montréal, ce qui m'a permis de connaître une autre culture et une autre façon de travailler. Je tiens à vous dire merci d'avoir cru en moi. Merci à toi Jérôme de m'avoir encadrée dans ce projet. Et merci Arnaud de m'avoir aidée à développer mes compétences au niveau du laboratoire, lors de mes passages à Lyon.

Je tiens ensuite à vivement remercier le professeur Francis Beaudry qui m'a fait confiance en m'accueillant dans son laboratoire à l'Université de Montréal, pendant la majorité de ce projet de recherche. Au-delà du travail accompli ensemble et du partage de tes connaissances, Francis, nous avons pu aussi partager nos avis et idées au niveau du monde. C'est une véritable relation de confiance qui s'est installée entre nous, et je t'en remercie. Même si je me suis montrée parfois têtue (il paraît qu'un bon chercheur est têtue !), je pense que nous avons pu échanger sur de nombreux points, et j'apprécie énormément ton côté humain tout comme tes nombreuses compétences scientifiques qui m'ont été bénéfiques en tout point.

Puis, je tiens également à remercier le professeur Pascal Vachon pour ses cours accélérés en neurologie, ce qui était loin d'être gagné vu que je n'avais aucun bagage dans ce domaine, et ses connaissances qui m'ont beaucoup apporté au niveau scientifique. Merci aussi à vous pour les chirurgies des rats, qui n'auraient pas pu être réalisées sans vous. Malgré ces 3 ans, je ne me suis pas mise au vélo. Mais j'ai tout de même beaucoup apprécié nos échanges sur le tour de France, et encore plus au niveau culinaire ! Je vous remercie du temps que vous m'avez accordé et de votre gentillesse.

Enfin, je tiens à remercier vivement mes proches. Je pense surtout à mes parents, mes frères et leurs familles qui ont été très présents bien que n'étant pas dans le même domaine que moi. Bien souvent, vous avez dû vous demander ce que je partais faire si loin. Mais j'ai toujours pu compter sur vous durant le doctorat, que ce soit pour partager des moments heureux ou plus difficiles, car cette période amène souvent bien des questionnements. Merci de m'avoir soutenue pendant ces 3 années. Aujourd'hui, grâce au mémoire et à la soutenance, j'espère que vous comprendrez mieux tout ce que représente des travaux de recherche. Je tiens aussi à souligner la présence et la patience de mon conjoint car la distance a été une expérience difficile. Merci aussi à mes amis français qui m'ont toujours épaulée, qui ont pris de mes nouvelles régulièrement malgré la distance. Et merci aux amis québécois que j'ai appris à connaître et à comprendre car la langue, les expressions et la culture ont représenté toute une adaptation, et avec qui j'ai partagé de beaux moments. Ma route a croisé celle de

belles personnes qui m'ont accueillie chaleureusement, et qui ont fait du Québec mon pays adoptif. Il y a 3 ans, il était difficile pour moi de quitter mon confort, et aujourd'hui je suis peinée de partir.

Introduction

La prévalence concernant le nombre de personnes atteintes de douleurs chronique et/ou neuropathique augmente continuellement et touche environ 20% de la population mondiale (Breivik *et al.*, 2006). Par exemple, ces douleurs peuvent affecter des personnes ayant subi l'amputation d'un membre (douleur dite « du membre fantôme ») ou ayant été touchées par un cancer osseux. La douleur neuropathique provoque une généralisation de la douleur en déclenchant de l'allodynie (Julius and Basbaum, 2001), c'est-à-dire une perception de douleur suite à une stimulation normalement non douloureuse, ainsi que de l'hyperalgésie (Seybold, 2009), qui est une réponse exagérée à une stimulation normalement douloureuse. Actuellement, il existe de nombreux traitements disponibles mais souvent inefficaces ou associés à des effets indésirables, suite à une administration prolongée du traitement. Il est donc vital de se pencher plus profondément sur la compréhension des mécanismes moléculaires centraux et périphériques responsables de l'initiation et du maintien de la douleur neuropathique afin de mieux soulager les patients, animaux ou humains, d'améliorer leur qualité de vie et de développer des stratégies thérapeutiques plus efficaces et sécuritaires (Yokokawa *et al.*, 2009 ; Kuepper *et al.*, 2011). La découverte et la quantification de biomarqueurs de la douleur neuropathique pourra fournir une quantité importante d'informations au niveau des mécanismes, de l'efficacité et de la toxicité et pourra aider à prendre des décisions critiques lors du développement de nouveaux analgésiques. Un biomarqueur est une molécule (ou paramètre physiologique) qui peut être mesurée objectivement comme indicateur d'un processus biologique, d'un processus pathologique ou comme réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique.

L'information sensorielle nociceptive est perçue par le système nerveux suite à une cascade d'évènements biochimiques et physiologiques complexes (Basbaum, 1999). La

modulation de l'information sensorielle a lieu au niveau de la moelle épinière et est relayée par les neurones sensoriels périphériques (Moreira *et al.*, 2009 ; Honore *et al.*, 2000). Les neuropeptides, considérés comme des neurotransmetteurs et/ou neuromodulateurs, interviennent au niveau de système nerveux central et jouent un rôle fondamentale dans la transmission de la douleur (Levine *et al.*, 1993 ; Seybold, 2009). Ces neuropeptides sont libérés par les terminaisons nerveuses des fibres A δ et C au niveau des laminae I et II de la matière grise de la moelle épinière, en réponse à un stimulus nociceptif (Yu *et al.*, 1999). Lorsqu'ils sont libérés, ils participent à la production de facteurs inflammatoires et immunitaires, et agissent directement au niveau systémique. Plusieurs neuropeptides clé ont été identifiés, dont la famille des tachykinines. Il est maintenant bien connu que la famille des tachykinines possède un rôle critique dans les mécanismes périphériques et centraux de transmission de la douleur, étant un acteur clé dans les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'hyperalgésie primaire et secondaire, respectivement, et jouant donc un rôle pro-nociceptif (Lecci *et al.*, 2000). Le gène TAC1 encode la protéine précurseur protachykinine-1 composée de la séquence de quatre tachykinines, incluant SP, NKA (Basbaum, 1999), le neuropeptide K (NPK) et le neuropeptide gamma (NP γ) (Otsuka and Yoshioka, 1993). Au niveau central, la protéine précurseur protachykinine-1 est clivée durant le transport axonal par l'action de différentes protéases spécifiques, menant à la biosynthèse, la libération et l'interaction des neuropeptides bioactifs (Hook *et al.*, 2008). Les neuropeptides et hormones peptidiques sont synthétisés sous forme de précurseurs polypeptidiques et la formation de molécules bioactives nécessite de nombreuses étapes de maturation post-traductionnelle. Durant ces étapes protéolytiques, il y a formation de différents intermédiaires, dont deux précurseurs connus de SP, la β -tachykinine₅₈₋₇₁ et la β -tachykinine₅₈₋₇₀ (Hook and Affolter, 1988; MacDonald *et al.*, 1988).

Ce projet de doctorat s'est donc intéressé plus particulièrement aux tachykinines afin d'apporter de nouvelles connaissances au niveau des mécanismes moléculaires centraux et périphériques. Dans un premier temps, nous avons développé une méthode analytique fiable, robuste et précise afin de pouvoir identifier, caractériser et quantifier les neuropeptides ciblés par HPLC-MS/MS. Nous avons mis au point une stratégie de quantification utilisant un standard (ou étalon) interne stable marqué isotopiquement, puisque cette stratégie s'est avérée la mieux adaptée à notre étude.

Suite à ce développement de méthode, nous avons utilisé un modèle chirurgical de CCI (constriction chronique du nerf sciatique) sur un groupe de rats. Ce modèle, appelé aussi modèle de Bennett, est validé et largement utilisé pour induire et étudier la douleur neuropathique. La CCI est réalisée par quatre ligatures lâches du nerf sciatique du rat. Afin de s'assurer de l'établissement de la neuropathie, nous avons employé deux tests comportementaux, les filaments de von Frey et le test de Hargreaves, réalisés avant et après la CCI, permettant d'évaluer l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique, respectivement. L'utilisation de modèles animaux spécifiques et reconnus, reproduisant la pathologie va de pair avec la découverte de biomarqueurs et une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires associés aux conditions physiologiques de la pathologie. Les rongeurs sont des animaux possédant une structure du système nociceptif similaire à l'humain (Watkins and Maier, 1999), d'où l'intérêt de les utiliser afin de pouvoir appliquer plus facilement et rapidement les résultats de recherche obtenus à l'espèce humaine.

Les animaux ont ensuite été sacrifiés afin de collecter les élargissements lombaires, les cerveaux et le plasma, dans le but de quantifier la modulation d'expression des neuropeptides cibles par HPLC-MS/MS, incluant précurseurs et métabolites de SP, SP ainsi que NKA.

SP et NKA sont d'important neuropeptides pro-nociceptifs impliqués dans l'inflammation neurogénique (Pennefather *et al.*, 2004), tous les deux agonistes du récepteur neurokinine-1 (NK1) avec un degré d'affinité différent. Lors de leur libération au niveau des neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine, SP et NKA entraînent l'augmentation de la perméabilité vasculaire et des phénomènes de vasodilatation (Herbert and Holzer, 2002). La capsaïcine est le plus abondant composé âcre du piment. Il est bien illustré que les récepteurs vanilloïdes, et plus spécifiquement le récepteur TRPV1, sont activés par la capsaïcine (Yoshimura and Yonehara, 2001). Le récepteur TRPV1 agit comme un transducteur de l'information nociceptive et joue aussi un rôle central dans la modulation de la sensibilité thermique durant le processus inflammatoire (Steen *et al.*, 1992 ; Garcia-Hirschfeld *et al.*, 1995 ; Caterina *et al.*, 1997). Il a été précédemment démontré que plusieurs de ses ligands, incluant la vanilline (Beaudry *et al.*, 2010), le [6]-gingérol (Gauthier *et al.*, 2011) et l'eugénol (Lionnet *et al.*, 2010) possèdent des propriétés thérapeutiques dans le traitement de la douleur et de l'inflammation, faisant du TRPV1 une cible thérapeutique prometteuse. L'activation du TRPV1 déclenche la propagation de l'information sensorielle jusqu'au système nerveux central (SNC), menant à la sensation douloureuse. Suite à ce processus, les neuropeptides sensoriels pro-inflammatoires sont libérés, incluant les tachykinines (Colpaert *et al.*, 1983 ; Szallasi and Blumberg, 1999). L'activation du TRPV1 est donc étroitement liée à l'expression des tachykinines, comme cela a été démontré lors de l'administration de capsaïcine qui augmente significativement l'expression de SP (Zimmer *et al.*, 1998). SP, NKA et le TRPV1 possèdent donc des rôles critiques au niveau de la transmission nociceptive, et semblent agir en parallèle, d'où l'importance de mieux cerner les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène de nociception.

Afin d'étudier plus précisément l'impact du récepteur TRPV1 sur l'expression de SP et NKA, nous avons utilisé des modèles de souris *knock-out*, déficientes au niveau du gène TRPV1

(TRPV1^{-/-}). Ce modèle a permis de quantifier la modulation de l'expression de SP et NKA dans les moelles épinières et cerveaux en fonction de la présence ou non du gène TRPV1.

L'hyperalgésie primaire se développe au niveau du site de la lésion. Différentes cascades d'évènements entrent en jeu dont la diffusion au niveau des vaisseaux sanguins. Dans le sang, les métabolites des neuropeptides ciblés pourraient être exprimés puisque le foie est un des organes majoritaires contribuant au métabolisme. Pour cette raison, nous avons choisi d'étudier le profil et la stabilité métaboliques de SP au sein de trois espèces (rat, souris et humain), dans des microsomes de foie. Malgré le manque direct de démonstration, un certain nombre d'enzymes sont impliquées dans le métabolisme *in vivo* de la protéine précurseur et des peptides (Nadel and Borson, 1991). Le métabolisme des neuropeptides endogènes est peu documenté. En revanche, le métabolisme de SP dans le SNC et au niveau de la barrière hémato-encéphalique a déjà été investigué (Chappa *et al.*, 2007). Il a précédemment été rapporté que certains métabolites de SP possèdent des activités pharmacologiques (Sakurada *et al.*, 1999). Le récepteur NK1 étant le récepteur préférentiel de SP, certains métabolites de SP pourraient agir aussi sur ce récepteur dont SP₅₋₁₁ et SP₃₋₁₁ grâce à leur extrémité C-terminale. Les fragments N-terminaux de SP, tel que SP₁₋₇, sont aussi connus pour interagir avec les récepteurs opioïdes, menant donc à des actions antagonistes à SP (Igwe *et al.*, 1990). D'où l'importance de considérer la contribution des métabolites actifs lors de l'évaluation d'états patho-physiologiques, particulièrement si ces molécules sont utilisées comme biomarqueurs à des fins de diagnostic et/ou de pronostic.

Ces neuropeptides pourraient donc être de futurs biomarqueurs de la douleur neuropathique par leurs propriétés pharmacologiques. La collecte de moelle épinière ou de cerveau est nécessaire pour l'étude des mécanismes au niveau du SNC. Le prélèvement de sang permet des études cinétiques à long terme, et le sang est une matrice biologique

intéressante dans le contexte d'analyse de biomarqueurs pour le diagnostic et/ou le pronostic du développement et du maintien de la douleur neuropathique. De précédentes études ont amené quelques informations au niveau des concentrations endogènes de SP et NKA, indiquant des concentrations plasmatiques faibles, entraînant donc un challenge analytique (Bondy *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2006 ; Shang *et al.*, 2003; Gallai *et al.*, 1995). Par conséquent, une méthode HPLC-MS/MRM a été développée afin de déterminer de façon sélective, précise et juste la concentration de SP et NKA dans le plasma.

L'ensemble des travaux réalisés dans le cadre de ce projet a fait évoluer la compréhension des mécanismes moléculaires d'action des tachykinines dans le processus de transmission de la douleur neuropathique au niveau des SNC et SNP. Nous avons pu relier le développement et le maintien de la douleur neuropathique avec la modulation d'expression des tachykinines dans le cerveau et la moelle épinière des rats. Nos données démontrent aussi que l'expression des tachykinines et du récepteur TRPV1 est étroitement liée, permettent d'envisager de nouvelles stratégies et cibles thérapeutiques dont le récepteur TRPV1 et les enzymes intervenant dans la synthèse des neuropeptides. Les tachykinines, leurs précurseurs et métabolites pourraient devenir de potentiels biomarqueurs de la douleur neuropathique, afin d'établir un diagnostic et/ou un pronostic plus efficaces.

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les études en « -omique »

I.1 Généralités

Le suffixe « -omique » est un terme généralement utilisé pour décrire l'exploration des fonctions biologiques d'un organisme entier au niveau moléculaire, impliquant la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique. La génomique est l'étude complète du génome d'un individu ou d'une espèce (Smith *et al.*, 2005). Cependant, l'expression des gènes seule ne fournit pas d'information au niveau de l'épissage alternatif ou des modifications pouvant avoir lieu dans les étapes suivantes. La transcriptomique intervient donc afin d'étudier et de quantifier l'ensemble des ARN messagers issus de la transcription du génome, permettant d'obtenir une identification relative du taux de transcription de différents gènes pour un état physiopathologique donné (Kjellqvist *et al.*, 2013). La protéomique est nécessaire afin de pouvoir mieux cibler les fonctions des protéines et détecter des modifications post-traductionnelles, et donc des modifications touchant le peptidome et le métabolome. La protéomique représente l'étude entière et directe de l'expression des protéines d'un organisme, incluant les isoformes et les modifications post-traductionnelles (De Hoog and Mann, 2004). Et la métabolomique se réfère à l'étude complète des métabolites qui sont des molécules de faible poids moléculaire présentes dans une cellule ou un organisme à tout moment, indicateurs importants de l'état physiologique ou pathologique d'un organisme (Whitfield *et al.*, 2004). La protéomique et la métabolomique sont aujourd'hui largement utilisées dans les études toxicologiques et pharmacologiques (Ellis *et al.*, 2011 ; Lamoureux *et al.*, 2011). Ces sciences et techniques dites « -omiques » mènent à des études simultanées à différents niveaux moléculaires d'un individu ou d'une espèce, permettant de meilleures connaissances des mécanismes biochimiques afin d'appréhender la complexité du vivant dans son ensemble, au moyen de méthodologies les moins restrictives possibles sur un

plan descriptif dont la biologie intégrative (Ellinger-Ziegelbauer *et al.*, 2011). Plus particulièrement, ces approches, combinées ou non, peuvent être utiles pour mettre en évidence et identifier de nouveaux biomarqueurs (d'exposition, d'effet ou de susceptibilité), générer de nouvelles connaissances sur le plan mécanistique (modes et voies d'action), ou encore élaborer de nouveaux outils pour la pharmacologie ou la toxicologie prédictive.

I.2 Génomique

Le terme « génomique » a été proposé en 1986 par Thomas Roderick pour décrire la discipline scientifique qui consiste à cartographier, séquencer et analyser les génomes à partir de l'ADN (acide désoxyribonucléique), dans le but de connaître l'ensemble des gènes, leur disposition sur les chromosomes, leur séquence, leur fonction et leur rôle. Ceci afin de déterminer et de pouvoir pallier aux prédispositions individuelles à certaines pathologies. Le génome des organismes vivants est l'ensemble de leur matériel génétique. Il assure le fonctionnement des cellules et la transmission des caractères héréditaires au cours des générations. Le génome est constitué de molécules d'ADN qui sont des enchaînements de nucléotides, eux-mêmes constitués d'un sucre, d'un phosphate et d'un élément variable appelé la base. Cette base nucléotidique peut être une adénine, guanine, cytosine ou thymine. Aujourd'hui, plus de 1,000 génomes de diverses espèces, y compris l'homme, ont été séquencés (Altshuler *et al.*, 2010). Dorénavant, le problème le plus important s'est déplacé de la séquence des gènes à la connaissance de leurs fonctions. C'est le but de la génomique fonctionnelle.

Les informations génétiques issues de l'ADN sont ensuite transcrites en ARNm (acide ribonucléique messager), à leur tour traduits en protéines (Figure 1). Les données complètes du génome ne suffisent pas à élucider toutes les fonctions biologiques (Dongre *et al.*, 2001).

La transcriptomique, la protéomique et la métabolomique sont donc mises en place afin de mieux comprendre les multiples phénomènes intervenant dans les divers niveaux des organisations structurale et fonctionnelle du vivant. La complexité d'un organisme provient de cette construction « intégrée » d'une multitude de mécanismes. On parle de biologie intégrative.

Les différents mécanismes de contrôle d'expression du génome se situent au niveau de son accessibilité, laquelle est influencée par la structure de la chromatine, de l'assemblage des complexes d'initiation de la transcription, de la synthèse, maturation et dégradation des ARN, de l'assemblage des complexes d'initiation de la synthèse des protéines (traduction), de la traduction, de la modification, activation et dégradation des protéines. Chacun de ces mécanismes a ultimement une influence sur le phénotype.

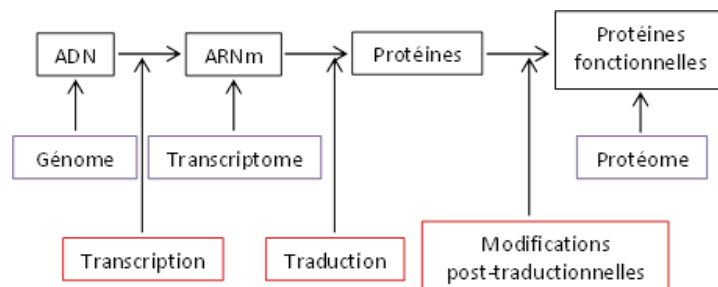


Figure 1: Les différentes étapes de la formation du génome au protéome : la transcription, la traduction et les modifications post-traductionnelles.

I.3 Transcriptomique

Comme illustrée sur la Figure 1, la transcriptomique fait suite à la génomique. Même si l'activité finale d'un gène est déterminée au niveau protéique, la connaissance de l'expression des ARNm (i.e. le transcriptome) constitue le premier niveau essentiel de l'information lors d'études portant sur les fonctions cellulaires intégrées et les profils d'expression des gènes spécifiques de cellules. Depuis le développement de technologies permettant de séquencer l'ADN, il a été possible d'étudier plusieurs milliers de gènes en

parallèle, afin d'obtenir des informations concernant des modifications au niveau du transcriptome (Silvestri *et al.*, 2010).

La sélection naturelle est entretenue par des mutations au niveau des séquences des gènes, en fournissant une importante diversité génétique (Levine and Tjian, 2003 ; Birchler *et al.*, 2003). Ces mutations modifient la quantité d'ARNm synthétisée pouvant entraîner des modifications phénotypiques morphologiques, physiologiques ou comportementales (Wray, 2007). Ces changements pourront être à l'origine de maladies (Maston *et al.*, 2006), d'où l'importance d'étudier le transcriptome.

La transcription est contrôlée et régulée par de nombreuses enzymes agissant à différents niveaux (Brown, 2006). Si la transcription est affectée, ceci entraînera une modification de la synthèse des protéines, menant à des changements au niveau des structures des protéines et de leurs fonctions. Si les protéines subissent des modifications, les peptides et les métabolites étant produits à partir de réactions enzymatiques des protéines seront eux aussi modifiés. L'étude du protéome, du peptidome et du métabolome amène donc des informations complémentaires.

I.4 Protéomique et sous-protéome

Le mot « protéome » regroupe l'ensemble des protéines exprimées par le génome. Le terme de « protéomique » décrit l'étude et la caractérisation de l'ensemble des protéines présentes à un moment donné et dans un environnement donné, au sein d'une cellule (Wilkins *et al.*, 1996). Contrairement au génome qui est plutôt considéré comme statique, le protéome possède une nature dynamique. Et pour de nombreuses raisons, la séquence d'un gène ainsi que son profil d'activité ne sont pas directement corrélés à l'image complète et précise de l'abondance d'une protéine, de l'état de son activité ou de structure moléculaire finale (Haynes *et al.*, 1998). En effet, le transcrit d'un gène peut être épissé de différentes façons

avant la traduction de la protéine. Grâce aux ribosomes, l'ARNm est traduit en protéines selon le code génétique. Les codons de l'ARNm ont une correspondance pour les acides aminés qui sont polymérisés pour pouvoir former une protéine. Les protéines sont ensuite clivées afin d'éliminer les séquences d'initiation, de transfert et de signal nécessaires à la traduction. A ce moment-là, les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles (MPTs) telles que des phosphorylations, glycosylations, sulfatations mais aussi la protéolyse. Ces MPTs sont nombreuses (plus de 300 connues), et peuvent être statiques ou dynamiques, menant à différentes fonctions biologiques incluant des rôles structurels, de reconnaissance, de transport, de catalyse, de protéolyse. Un seul gène peut donc encoder jusqu'à une cinquantaine de protéines différentes. L'analyse seule de la séquence d'ADN ou la quantification des ARNm ne suffit pas à prédire les formes actives des protéines ni à déterminer leurs niveaux d'expression.

De plus, le protéome varie selon le type de cellule, son environnement et son activité. Comme ce sont les protéines qui sont impliquées dans la plupart des processus biochimiques normaux ou pathologiques, l'étude directe des protéines permet une meilleure compréhension des maladies et des cascades d'évènements impliquées. Le génome humain contient environ 22,000 gènes codant potentiellement pour 40,000 protéines différentes. Et l'épissage alternatif de l'ARNm ainsi que les modifications post-traductionnelles possibles augmentent le nombre de protéines ou de fragments protéiques jusqu'à 2,000 000. En conséquence, le protéome est bien plus complexe que le génome (Kosak and Groudine, 2004).

Les peptides étant issus de la protéolyse des protéines, il est aussi important de s'intéresser à la peptidomique. La peptidomique, qui se situe au confluent de la protéomique et de la métabolomique, définit l'étude d'un sous-ensemble du protéome (Schrader and Schulz-Knappe, 2001 ; Schulz-Knappe *et al.*, 2001) permettant d'identifier les peptides endogènes bioactifs d'une cellule, d'un organe ou d'un organisme. L'expression de ces

peptides est étudiée dans différentes conditions physiologiques, afin de comprendre leurs fonctions et interactions.

I.4.1 Protéines et peptides

Les protéines sont des biopolymères formés d'un enchainement d'acides aminés, représentant la structure primaire. Il existe 20 acides aminés naturels, listés dans le Tableau 1, possédant chacun leurs propres caractéristiques physico-chimiques. Le terme peptides ou polypeptides ne réfère qu'à l'enchainement d'acides aminés (Karp, 1996). On considère qu'un peptide doit posséder moins de 50 résidus acides aminés ou être inférieur à 7 kDa (Creighton, 1993 ; Branden and Tooze, 1999).

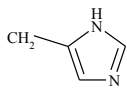
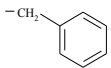
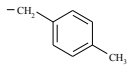
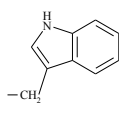
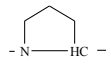
	Nom	Code 1 lettre	Code 3 lettres	Masse mono- isotopique (en Da)	pI	Acides aminés R-
Chaînes Aliphatiques	Glycine	G	Gly	75.03	6.06	-H
	Alanine	A	Ala	49.05	6.11	-CH ₃
	Leucine	L	Leu	131.10	6.01	-CH ₂
	Isoleucine	I	Ile	131.09	6.05	-CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₃
	Valine	V	Val	117.08	6.00	-CH(CH ₃) ₂
Chaînes Carboxyliques	Aspartate	D	Asp	133.04	2.85	-CH ₂ -COOH
	Glutamate	E	Glu	147.05	3.15	-CH ₂ -CH ₂ -COOH
Chaînes aminées	Lysine	K	Lys	146.11	9.60	-CH ₂ -(CH ₂) ₃ -NH ₂
	Arginine	R	Arg	174.11	10.76	-CH ₂ - (CH ₂) ₂ NHC(NH ₂)=NH
	Histidine	H	His	155.07	7.60	
Chaînes hydroxylées	Sérine	S	Ser	105.04	5.68	-CH ₂ -OH
	Thréonine	T	Thr	119.06	5.60	-CH(OH)-CH ₃
Chaînes amides	Asparagine	N	Asn	132.05	5.41	-CH ₂ -CONH ₂
	Glutamine	Q	Gln	146.07	5.65	-CH ₂ -CH ₂ -CONH ₂
Chaînes soufrées	Cystéine	C	Cys	121.02	5.05	-CH ₂ -SH
	Méthionine	M	Met	149.05	5.74	-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃
Chaînes aromatiques	Phénylalanine	F	Phe	165.08	5.49	
	Tyrosine	Y	Tyr	181.07	5.64	
	Tryptophane	W	Trp	204.09	5.89	
Hétérocycles	Proline	P	Pro	115.06	6.30	

Tableau 1 : Noms, codes à 3 et 1 lettres, structures et caractéristiques physicochimiques des 20 acides aminés naturels.

Les acides aminés ont tous la même base structurale, comme illustrée sur la Figure 2. L'extrémité N-terminale possède un groupement fonctionnel amine (NH₂), et l'extrémité C-

terminale est constituée d'un groupement fonctionnel carboxylique (COOH). L'atome de carbone lié à trois atomes et groupement différents est nommé « carbone alpha ». C'est un centre stéréogène important lors du repliement des protéines.

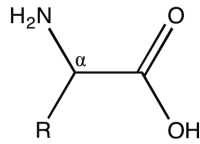


Figure 2 : Structure conventionnelle d'un acide aminé.

Pour former une protéine, les acides aminés se polymérisent en éliminant une molécule d'eau, et ils deviennent reliés entre eux par des liaisons peptidiques covalentes stables (Figure 3).

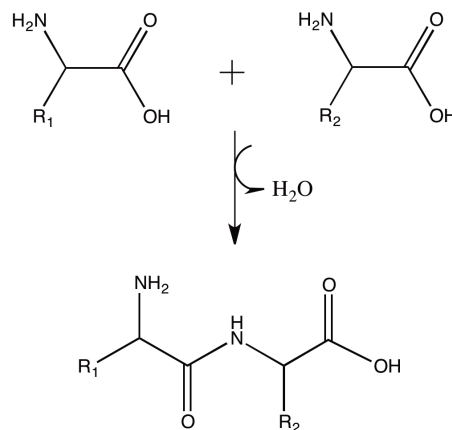


Figure 3 : Formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés.

Tous les acides aminés ont des propriétés chimiques différentes, en raison de la nature de leur chaîne latérale, représentée par le groupe (R). Les acides aminés sont aussi séparés et caractérisés selon leur point isoélectrique (pI). Par conséquent, il existe les acides aminés basiques (K, R, H) et acides (D et E). La charge de la protéine est dépendante du nombre d'acides aminés basiques ou acides qui la constitue.

Chaque protéine possède aussi une structure secondaire qui correspond à la conformation locale de son squelette (hélices α , feuillets plissés β , coudes), pour laquelle des liaisons hydrogènes ont lieu entre les groupements amide et carbonyle du squelette peptidique. Le repliement des acides aminés, *via* des interactions entre leurs chaînes latérales, amène une certaine conformation dans l'espace à la protéine, définissant sa structure tridimensionnelle (ou structure tertiaire) et son identité. La structure tertiaire comprend généralement plusieurs domaines de structures secondaires. Ces différentes structures sont responsables de la fonction assurée par la protéine (Pauling *et al.*, 1951). Certaines protéines possèdent aussi une structure quaternaire qui est constituée d'interactions non covalentes entre plusieurs chaînes polypeptidiques (i.g. l'hémoglobine). La Figure 4 représente les différentes structures composant une protéine.

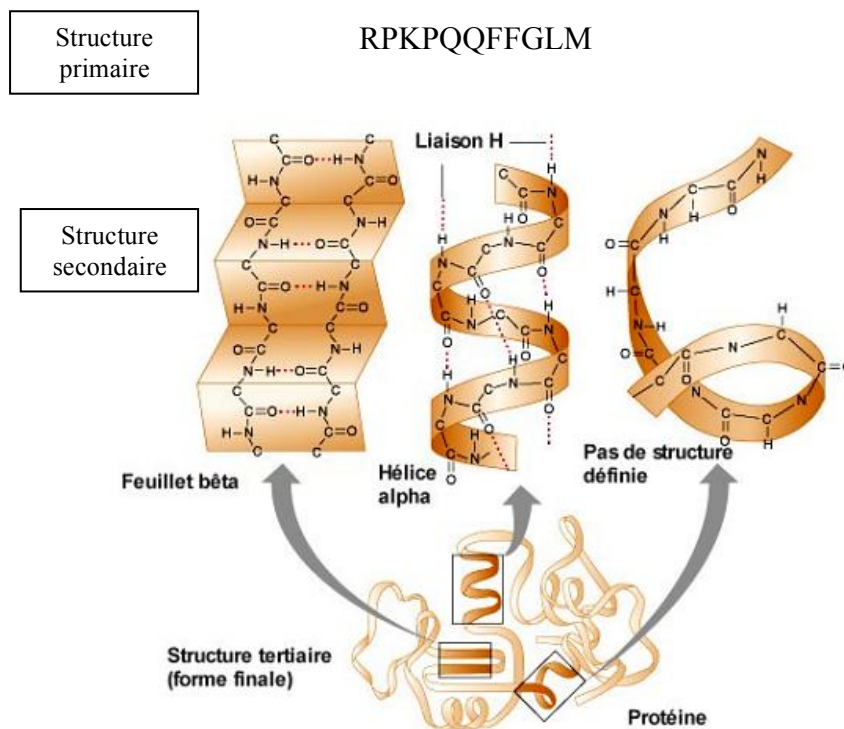


Figure 4 : Configurations possibles des protéines (structure quaternaire non illustrée) (copyright©2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.).

La rupture des interactions entre les acides aminés aboutit à la perte de la conformation tridimensionnelle de la protéine, entraînant alors une dénaturation de celle-ci de

façon réversible ou irréversible selon la cause. Lorsque la protéine est dénaturée, elle ne peut plus assurer sa fonction biologique. Différents facteurs de dénaturation peuvent intervenir tels que l'augmentation de température qui agite les atomes de la protéine et provoque une rupture des interactions faibles (e.g. liaisons hydrogènes), des pH extrêmes qui modifient les charges des chaînes latérales des acides aminés en altérant les liaisons ioniques et hydrogènes, une importante force ionique, la présence d'un solvant organique ou encore des agents réducteurs de thiols qui entraînent la rupture des ponts disulfures.

Les protéines subissent des étapes de maturation *via* des actions enzymatiques, générant des neuropeptides et hormones peptidiques endogènes bioactifs.

I.4.2 Peptides endogènes bioactifs

Il existe des peptides endogènes bioactifs, présents au sein des différents organismes vivants, et qui possèdent différentes fonctions et activités biologiques selon le milieu où ils sont localisés. Par exemple, ces peptides peuvent intervenir au niveau des mécanismes inflammatoires avec les interleukines (Sendur *et al.*, 2013), de vasodilatation et de pression avec la bradykinine et l'angiotensine (Souza *et al.*, 2013), ou encore de reproduction avec l'ocytocine (Gimpl and Fahrenholz, 2001). Ces peptides endogènes sont le résultat de la protéolyse de protéines précurseur clivées au niveau de motifs spécifiques, suite à un signal déclenchant l'activité enzymatique (Werle and Bernkop-Schnürch, 2006). Notre étude s'intéresse plus spécifiquement aux neuropeptides qui correspondent aux peptides synthétisés au niveau des neurones, suite à un stimulus nociceptif. Le gène précurseur est transcrit puis traduit au niveau du noyau du neurone, dans le SNC. Ce précurseur du neuropeptide est à son tour stocké dans des vésicules et transporté jusqu'aux terminaisons axonales. Durant ce transport axonal, les précurseurs des peptides subissent une maturation protéolytique générant

les neuropeptides bioactifs qui pourront se lier de façon spécifique à leur récepteur préférentiel et transmettre l'information nociceptive (Hook *et al.*, 2008).

A leur tour, les peptides semblent souvent rapidement dégradés, possédant donc une durée de vie très courte de l'ordre de quelques minutes (Lathan, 1999). Quelques métabolites intermédiaires de certains peptides endogènes semblent aussi posséder des activités pharmacologiques qui leur sont propres (Sakurada *et al.*, 1999 ; Haulica *et al.*, 2006).

I.5 Métabolomique

La métabolomique est une science relativement récente qui s'intéresse au métabolisme cellulaire (métabolisme intermédiaire) afin d'étudier l'ensemble des métabolites inférieurs à 1,500 Da tels que les sucres, les acides aminés, les acides gras, les acides organiques, les conjugués, les vitamines, certains peptides présents dans une cellule, un organe, un fluide biologique ou un organisme (Förster *et al.*, 2003). Les métabolites sont les produits de réactions enzymatiques. La métabolomique intervient après la protéomique (Zhao and Iyengar, 2012 ; Sun *et al.*, 2013). Le métabolome représente l'ultime réponse d'un organisme à une altération génétique, une pathologie, une exposition à un toxique ou à tout autre facteur susceptible de perturber son fonctionnement. Le métabolome est dépendant du contexte, et le taux de métabolites est modifié en fonction de l'état physiologique, développemental ou pathologique d'une cellule, du protéome, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme. La métabolomique repose sur l'obtention d'empreintes métaboliques obtenues à l'aide de différentes techniques analytiques dont, principalement, la spectrométrie de masse mais aussi la résonance magnétique nucléaire. L'étude du métabolome permet une meilleure compréhension de la biologie des systèmes en mettant en évidence des inter-relations métaboliques qui ne pourraient pas être détectées avec des méthodes biochimiques

traditionnelles (Ezan, 2008). La métabolomique permet d'associer des métabolites à des marqueurs moléculaires, amenant une meilleure compréhension de la manière dont le métabolisme et l'action des médicaments s'intègrent, donc de parvenir à une vision globale de la manière dont fonctionne le métabolisme d'un système. Un avantage inhérent de la métabolomique par rapport à la protéomique ou la génomique, est la capacité à pouvoir directement traduire les données inter-espèces, en particulier en ce qui concerne le développement de médicaments. Ceci est d'autant plus intéressant qu'il semble que les voies métaboliques soient conservées au cours de l'évolution et similaires entre les rongeurs et les humains (Trushina and Mielke, 2013).

La génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique sont donc des domaines complémentaires permettant d'identifier de nouveaux biomarqueurs de maladies et de nouvelles cibles thérapeutiques afin de mieux caractériser des phénotypes moléculaires, morphologiques, physiologiques correspondant à un état pathologique.

I.6 Notions de biomarqueurs

Le terme de « biomarqueurs » désigne une molécule ou paramètre physiologique (e.g. la pression artérielle, la température corporelle) qui peut être mesurée objectivement comme indicateur d'un processus biologique, d'un processus pathogénique ou comme réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique (Atkinson *et al.*, 2001 ; Dictionary of Cancer Terms). Cet indicateur peut être utilisé pour un diagnostic et/ou un pronostic de pathologies ciblées (Lagakos and Hoth, 1992 ; Nicholson *et al.*, 2002). Il peut aussi permettre un suivi de l'efficacité d'un médicament. Le but de la découverte de nouveaux biomarqueurs est de développer des tests cliniques de dépistage simples et non-invasifs pour détecter une maladie avant qu'elle ne soit symptomatique ou avant qu'elle ne soit développée à un stade

trop avancé pour pouvoir la traiter (Pepe *et al.*, 2001). Parallèlement, la découverte de nouveaux biomarqueurs permet aussi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés à une pathologie, afin de pouvoir développer de meilleures stratégies thérapeutiques (Rolan, 1997).

La recherche de biomarqueurs doit être réalisée selon une approche rigoureuse afin d'être pertinente (LaBaer, 2005). Deux paramètres importants rentrent en jeu dans le concept de découverte de biomarqueurs : la sensibilité et la spécificité (Figure 5). La sensibilité est la mesure de la capacité du test à identifier une condition quand elle est présente. C'est la proportion de vrais positifs qui représentent l'inclusion de personnes ayant développées la maladie étudiée. Une forte sensibilité est souhaitée pour valider le test (Soreide, 2009). Le taux de faux négatifs représente les personnes ayant un état physiopathologique mais n'ayant pas été détectées par le test.

$$\text{sensibilité} = \frac{\text{nombre de vrais positifs} \times 100}{\text{nombre de vrais positifs} + \text{nombre de faux négatifs}}$$

La spécificité, ou le taux réel de vrais négatifs, démontre à quel point le test est précis car c'est la capacité à définir les personnes étant atteintes de conditions pathologiques. Les faux positifs sont les patients n'ayant pas un état physiopathologique, mais étant détectés par comme tels par le test. Le but est donc d'obtenir un faible taux de faux positifs (Soreide, 2009).

$$\text{spécificité} = \frac{\text{nombre de vrais négatifs} \times 100}{\text{nombre de vrais négatifs} + \text{nombre de faux positifs}}$$

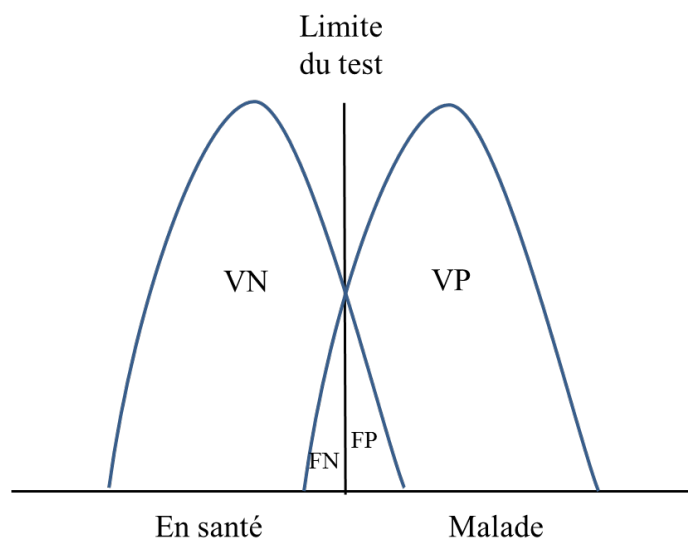


Figure 5 : Explications d'un test utilisant des biomarqueurs et permettant de discriminer des populations saines et physiopathologiques. VN = vrais négatifs ; VP = vrais positifs ; FN = faux négatifs ; FP = faux positifs (d'après Soreide, 2009).

Un projet de découverte de biomarqueurs doit utiliser une méthode d'analyse robuste, reproductible, précise et juste afin de pouvoir valider les résultats.

II. Les techniques analytiques en peptidomique

Bien que la protéomique et la peptidomique partagent des objectifs scientifiques et des outils technologiques, il existe des différences notables entre ces approches. En effet, la plupart des études protéomiques utilisent une stratégie ascendante ou *bottom-up* en impliquant des enzymes de digestion telles que la trypsine ou la chymotrypsine pour cliver les protéines et générer des fragments peptidiques permettant de reconstituer la séquence des protéines et donc de les identifier (Gygi and Aebersold, 2000). En revanche, la majorité des études peptidomiques ne nécessitent aucune étape de digestion *in vitro* (Schrader and Schulz-Knappe, 2001 ; Clynen *et al.*, 2003). De plus, le challenge analytique est différent, puisqu'en protéomique il n'est pas nécessaire d'identifier tous les fragments tryptiques pour identifier la protéine (Baggerman *et al.*, 2005).

Afin de comparer des profils peptidiques exprimés en conditions physiologiques ou pathologiques, la chromatographie haute performance en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse sont des outils puissants et performants couramment utilisés pour identifier, caractériser et quantifier les peptides endogènes. Les peptides endogènes étant souvent présents en faible quantité, une méthode analytique très sensible est nécessaire, entraînant donc un défi analytique. Afin d'obtenir des résultats fiables, reproductibles et justes, il y a différentes étapes à respecter avant l'analyse à proprement parler. Le développement d'outils bioinformatiques est aussi une aide précieuse pour répondre à ces études.

II.1 Introduction à la bioanalyse

La bioanalyse représente la science analytique de la vie. C'est une discipline connexe à la chimie analytique. Elle permet d'identifier, de caractériser et de quantifier des molécules et biomolécules telles que des xénobiotiques, métabolites, peptides ou protéines, présentes dans une ou des matrices biologiques (urine, plasma, liquide céphalo-rachidien, tissus). La bioanalyse joue donc un rôle fondamental dans l'étude du monde vivant à l'échelle moléculaire.

En peptidomique, une méthode analytique se compose de différentes étapes qui correspondent chacune à des critères établis avant le commencement de l'étude. Tout d'abord, il y a l'échantillonnage et la préservation des échantillons collectés jusqu'à leur utilisation. Puis, l'étape de préparation des échantillons doit être optimisée. Enfin, les échantillons peuvent être analysés par différentes techniques. Ici, nous verrons plus particulièrement l'HPLC et la spectrométrie de masse.

II.2 L'échantillonnage et la préservation

La méthode de prélèvement et de stockage d'un échantillon est critique, car elle impactera toutes les expériences et analyses qui suivront. Il est donc important de définir la démarche à respecter afin de pouvoir conserver l'intégrité des échantillons et de les stabiliser adéquatement.

Pour ce projet, suite à l'établissement de la neuropathie, le sang des rats a été prélevé par ponction intra-cardiaque. Suite au prélèvement, le sang a été placé dans des tubes contenant de l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) (Figure 6). Sa formule brute est $C_{10}H_{16}N_2O_8$ et sa masse moléculaire est de 292.2 g/mol.

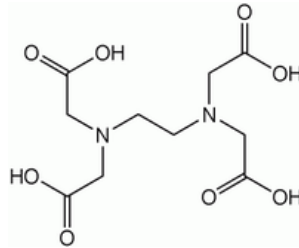


Figure 6 : Molécule d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) utilisée dans le plasma comme agent chélateur et stabilisateur, bloquant l'activité enzymatique.

L'EDTA est constitué de deux amines tertiaires et de quatre acides carboxyliques. Selon le pH de la solution, le nombre de sites liants évolue, structurant l'EDTA comme un ligand hexadentate. Cette propriété rend l'EDTA chélateur, lui permettant de former des complexes métalliques forts et stables (Holleman and Wiberg, 2001). C'est pour cette raison qu'il est utilisé comme inhibiteur des métallo-protéases qui utilisent des ions métalliques comme co-facteurs de leurs réactions enzymatiques. Ainsi, en se complexant entre autres aux ions Mg^{2+} , Zn^{2+} ou Ca^{2+} , l'EDTA bloque l'activité enzymatique de nombreuses protéases qui utilisent ces ions métalliques comme co-facteurs, évitant donc l'hydrolyse des protéines dans certains extraits biologiques. L'EDTA est un agent stabilisateur qui empêche aussi la coagulation du sang (Toledano *et al.*, 2013).

Les protéases présentes dans un échantillon biologique entraînent des dégradations protéolytiques, modifiant ainsi le protéome et le peptidome de l'échantillon. Même si la présence d'EDTA bloque l'activité des métallo-protéases, l'ajout d'acide phosphorique est recommandé afin de s'assurer de bien stopper l'activité enzymatique dans les échantillons de plasma, puisque de façon naturelle, un grand nombre de protéines est clivé par des processus enzymatiques endogènes, afin de synthétiser des hormones et peptides bioactifs (Docherty and Steiner, 1982 ; Loh *et al.*, 1984). L'acide phosphorique est un composé chimique de formule brute H_3PO_4 , avec une masse moléculaire de 98.0 g/mol et des valeurs de pKa de 2.12 ; 7.21 ; 12.67. L'ajout d'acide phosphorique au plasma entraîne la diminution du pH de la solution ($pH < 3$). En milieu acide, la conformation tertiaire des enzymes est modifiée, diminuant significativement leur activité car le changement de conformation ne leur permet plus de se lier à leurs substrats (Boury, 1960 ; Chu and Zheng, 2013). Ceci permet de conserver les peptides endogènes intacts et stables jusqu'à leur analyse.

Suite à la collecte de sang, les animaux ont été décapités. Les moelles épinières ont été prélevées à l'aide de liquide physiologique, sans dissection. Seule la zone d'élagissement lombaire correspondant aux segments de moelle épinière recevant les afférences des nerfs atteints, la plus représentative de l'expression des tachykinines et les récepteurs sont très présents à ce niveau, a été conservée. Ensuite, les cerveaux ont été rapidement enlevés de la boîte crânienne. Ce procédé est très rapide et dure moins d'une minute, permettant aussi de préserver les tissus de la dégradation enzymatique, puisque les protéases sont actives à température ambiante et au pH physiologique. Suite à l'extraction, les tissus ont été stockés à $-80^{\circ}C$ en attendant les analyses. En effet, pour une conservation des échantillons à long terme, il est plus sûr de congeler les peptides à $-20^{\circ}C$ voire à des températures plus froides (*A guide to handling and storing peptides*) afin d'éviter la dégradation des peptides par les enzymes

présentes au sein de l'échantillon biologique en arrêtant l'activité enzymatique. Ensuite, lors de leur utilisation, les tissus sont décongelés et homogénéisés dans une solution comportant de l'acide trifluoroacétique (TFA). Le TFA permet d'inhiber l'activité enzymatique en diminuant le pH de façon bien inférieure au pH physiologique ($6 < \text{pH} < 8$) puisque la préparation d'échantillon est réalisée à température ambiante (Beaudry, 2010). En abaissant le pH, le TFA agit comme un inhibiteur non spécifique contrairement à certains cocktails d'inhibiteurs plus sélectifs (Supuran *et al.*, 2002).

II.3 La préparation d'échantillon

Les projets de recherche touchant le domaine de la pharmacologie utilisent divers fluides biologiques tels que le plasma, le sérum, le liquide céphalo-rachidien, ou des tissus biologiques comme la moelle épinière, le cerveau. Toutes ces matrices sont considérées comme complexes car elles sont constituées de nombreuses molécules, dont des protéines et peptides (Anderson and Anderson, 2002) pouvant subir des dégradations protéolytiques *via* les protéases présentes dans le milieu et donc modifier le protéome et le peptidome de l'échantillon. Le protéome de ces fluides biologiques est très varié, avec des masses moléculaires allant de 1 à 1,000 kDa, et des concentrations variant de l'aM au mM. Il y a aussi présence de lipides, perturbant la solubilisation et modifiant les tensions de surface des échantillons. En raison de cette complexité, les peptides ciblés peuvent difficilement être analysés directement. Il devient donc nécessaire de simplifier l'échantillon afin d'en diminuer la complexité et de pouvoir obtenir des résultats toujours plus sensibles, spécifiques, répétables et reproductibles (Jmeian and El Rassi, 2009). Il convient d'utiliser la préparation d'échantillons la plus simple possible afin d'éviter des étapes intermédiaires entraînant des biais expérimentaux.

Contrairement à l'analyse des protéines qui nécessite des étapes de séparation sur gel d'électrophorèse (Jmeian and El Rassi, 2009) et/ou de digestion enzymatique (i.e. trypsine) (Canas *et al.*, 2007), les premières étapes d'analyse peptidomique correspondent à l'extraction et au préfractionnement (Fricker *et al.*, 2006 ; Yatskin *et al.*, 2009) suite à la stabilisation des échantillons. L'extraction de peptides endogènes des fluides ou tissus biologiques est souvent utilisée, surtout depuis que les chercheurs se tournent vers la recherche de biomarqueurs (Vandenbroek *et al.*, 2010 ; Moron and Devi, 2007). Mais c'est un processus qui doit être rigoureux (Paulson *et al.*, 2005), même si peu de littérature illustre le défi que représente la préparation d'échantillons en vue d'une étude peptidomique (Chen *et al.*, 2009). Les peptides endogènes sont extraits par précipitation, extraction sur support solide (SPE), extraction par immuno-affinité ou filtration (Ma *et al.*, 2009 ; Kawashima *et al.*, 2010).

II.3.1 Extraction par précipitation

La précipitation est une méthode de purification d'un échantillon biologique simple et rapide à mettre en place. En peptidomique, elle permet d'éliminer de façon non sélective les protéines présentes dans l'échantillon, permettant de créer un protocole générique. Il est important d'optimiser le ratio solvant/matrice afin de ne pas précipiter les peptides d'intérêt en même temps que les protéines. Après la précipitation, les échantillons sont centrifugés et les protéines de haut poids moléculaire localisées dans le culot peuvent être éliminées. La précipitation dilue aussi l'échantillon, ce qui peut devenir un problème si le composé d'intérêt est initialement faiblement concentré. Mais ceci peut être compensé en évaporant l'échantillon pour le concentrer. Ces avantages et inconvénients sont à prendre en compte afin de savoir si la précipitation est la meilleure approche pour purifier l'échantillon.

II.3.2 Extraction sur support solide

La SPE est une méthode de préparation d'échantillons qui permet de concentrer et purifier des analytes par leur rétention à partir d'une matrice biologique sur un support solide. Une méthode SPE se décompose en 4 principales étapes représentées sur la Figure 7. Une séquence SPE commence avec une étape de conditionnement de la cartouche, par activation du support avec du solvant organique et/ou de l'eau (Figure 7-1). Le conditionnement de l'adsorbant permet d'assurer des interactions reproductibles avec l'analyte. L'échantillon est ensuite déposé et l'analyte est piégé avec les composés interférents sur la cartouche (Figure 7-2). Puis, une étape de rinçage est effectuée afin d'éliminer le plus possible d'interférents de la matrice, piégeant l'analyte sur la cartouche (Figure 7-3). L'analyte est ensuite élué par un solvant organique (Figure 7-4).

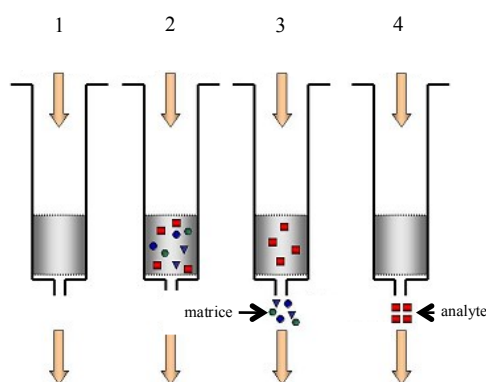


Figure 7 : Protocole classique de SPE (d'après le guide Supelco, 1998) composé de quatre étapes : 1- conditionnement, 2- dépôt de l'échantillon, 3- rinçage, 4- élution.

Il existe différents types de supports solides piégeant les analytes en fonction de leurs diverses propriétés physico-chimiques issues des acides aminés les composant (charge, pI, degré d'hydrophobicité, taille). Ces différences physico-chimiques entraînent des différences au niveau des affinités et des interactions des peptides pour le solvant et le support. La rétention des composés sur les supports répond à des interactions de type van der Waals, des

forces coulombiennes, des interactions dipôle-dipôle, des liaisons hydrogènes, des interactions diélectriques ou des liaisons donneur-accepteur avec transfert de charges.

Les cartouches SPE peuvent être composées de silice greffée (e.g. C₈, C₁₈, NH₂, phényl) ou vierge (SiOH), de polymères (e.g. copolymère de polystyrène-divinylbenzène). Les extractions SPE ont lieu par interactions apolaires sur silice C₁₈ par exemple (principe de phase inverse), interactions polaires sur silice vierge (principe de phase normale), interactions ioniques sur échangeurs de cations ou d'anions.

La rétention des analytes *via* des interactions apolaires (e.g. C₈ ou C₁₈) entre des ponts carbone-hydrogène de l'analyte et de l'adsorbant met en jeu les forces de van der Waals. Les analytes sont retenus sur la cartouche par un environnement polaire (eau, tampon) et sont élués par un solvant moins polaire (souvent un mélange entre acétonitrile ou méthanol et eau). Ces supports permettent de séparer des composés apolaires à moyennement polaires, comme les peptides composés d'acides aminés apolaires ou contenant des groupements apolaires. En phase inverse, la rétention est associée à l'hydrophobicité : les solutés apolaires seront très retenus sur la cartouche car ils interagissent avec les chaînes apolaires greffées sur la silice. Une diminution de la polarité permet d'éluier les composés.

La rétention par des interactions polaires (silice vierge) est réalisée en déposant l'échantillon en présence d'un solvant extrêmement apolaire tel que l'hexane, et en éluant les analytes avec un solvant polaire (e.g. dichlorométhane).

La cartouche échangeuse d'ions est chargée (positivement ou négativement) et l'analyte doit posséder une charge opposée. Le pH de la matrice doit donc être ajustée en fonction de l'adsorbant utilisé afin qu'il y ait interaction entre l'analyte et le support. Par exemple, pour retenir un peptide composé d'acides aminés basiques, l'adsorbant de la cartouche devrait avoir un pKa \approx 4 et le pH de la solution devrait avoir 2 unités de moins que le pKa de l'analyte cible, mais 2 unités de plus que le pKa du support. Et l'éluition d'un tel

composé est réalisée en ajustant le pH pour supprimer la charge de l'analyte ou de l'adsorbant. Il existe des adsorbants à faible ou fort échange d'ions. Le pH, la force ionique et la nature de l'ion développeur sont les paramètres intervenant dans ce type d'interactions.

Des cartouches avec des interactions en mode mixte sont aussi utilisées en mettant à contribution des interactions secondaires afin d'éluer complètement des composés possédant différentes propriétés physico-chimiques et mieux éliminer les contaminants, par combinaison de fonctionnalités comme, par exemple, l'échange d'anions forts et la propriété apolaire.

Le choix du support SPE est dépendant de l'analyte ciblé. Par exemple, une SPE sur résine SCX pourrait être envisagée pour retenir simultanément SP et NKA par interactions ioniques, puisque leurs points isoélectriques sont, respectivement, 11.51 et 7.59 et le plasma est stocké en milieu acide ($\text{pH} \leq 3$). En revanche, pour des peptides possédant des caractéristiques physicochimiques trop différentes, une méthode d'extraction générique peut être optimisée avec l'utilisation, par exemple, de polymères HLB.

Il existe aussi la SPE dite « *en ligne* » permettant de réaliser l'étape de préparation d'échantillons en parallèle de la séparation, et donc de gagner du temps et d'éviter aussi l'étape d'évaporation souvent nécessaire en SPE hors ligne. La SPE en ligne est aussi intéressante lors de la quantification de peptides présents en faible abondance. La SPE en ligne possède des étapes similaires à la SPE hors ligne mais, comme son nom l'indique, tout est réalisé comme un automate (Figure 8). L'extrait est retenu sur la colonne SPE selon les propriétés de l'adsorbant utilisé (les mêmes supports et adsorbants que vu précédemment sont disponibles pour ce type de colonne), puis il est directement élué dans le système chromatographique par l'intermédiaire de la phase mobile, permettant l'injection de la totalité de l'échantillon (Rogeberg *et al.*, 2013). Parfois, il y a des problèmes d'effets mémoire dus à

l'élution incomplète des analytes, à la détérioration de la colonne ou aux connectiques utilisés et à la complexité du système.

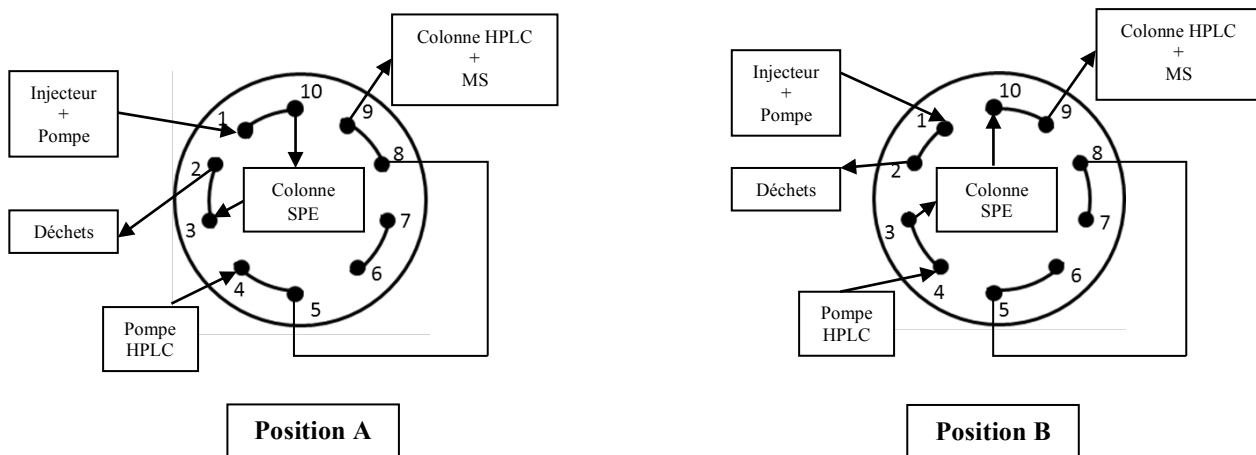


Figure 8 : Exemple de schéma d'un montage d'extraction sur support solide en ligne, via une vanne composée de 10 voies. Position A - Etapes de conditionnement de la colonne SPE et de dépôt de l'échantillon ; en parallèle, conditionnement de la colonne HPLC. Position B - Etape d'élution des composés sur la colonne SPE ; en même temps, l'échantillon est séparé et élué sur la colonne HPLC, puis détecté par spectrométrie de masse.

L'extraction et la purification par SPE présentent plusieurs avantages mais certains critères de performance doivent être évalués afin de s'assurer d'utiliser la stratégie d'extraction adaptée aux peptides ciblés (Tableau 2).

Critères	Influencés par
Reproductibilité	Précision et exactitude entre lots
Sélectivité	Dépend des interactions entre les analytes et le support utilisé, les conditions de lavage et d'élution
Capacité	Quantité d'adsorbant, propriétés des pores, coefficient de partition, concentration des analytes
Recouvrement	Interactions indésirables, absence d'interaction, contaminations croisées, propriétés des pores
Stabilité	Le type de support, le type de greffage, les conditions utilisées (e.g. pH extrêmes)
Propreté des extraits	La pureté des matériaux SPE, les conditions de lavage, la technique de détection, l'efficacité des frittes évitant la présence d'impuretés de l'adsorbant dans les extraits (ions métalliques, monomères), la distribution de la taille de particules
Coût	Les quantités de solvant utilisées, le débit d'extraction, la possibilité d'automatisation

Tableau 2 : Critères de performance à prendre en compte lors du développement d'un protocole utilisant une extraction par SPE (d'après Salvador, 2009).

II.3.3 Le recouvrement

Quel que soit le protocole choisi pour la préparation d'échantillon, il est important de vérifier le recouvrement de chaque étape (Figure 9). Le recouvrement d'extraction d'un analyte dans un dosage est obtenu en comparant le signal d'une quantité connue d'analyte ajoutée et extraite à partir de la matrice biologique (Figure 9-A), avec la même concentration fortifiée d'analyte après l'extraction de la matrice seule (Figure 9-B). Il est important que le recouvrement d'un analyte soit reproductible, précis et répétable. Le recouvrement est influencé par les interactions ou absence d'interaction avec le support ou autres constituants de l'échantillon, les contaminations croisées, les propriétés de supports utilisés non adaptées pour la préparation d'échantillon. Afin de calculer le recouvrement, des expériences devraient être réalisées pour comparer les résultats analytiques des échantillons extraits pour trois concentrations différentes (en haut, au milieu et en bas de la gamme dynamique étudiée) (*Guidance for Industry*, 2001).

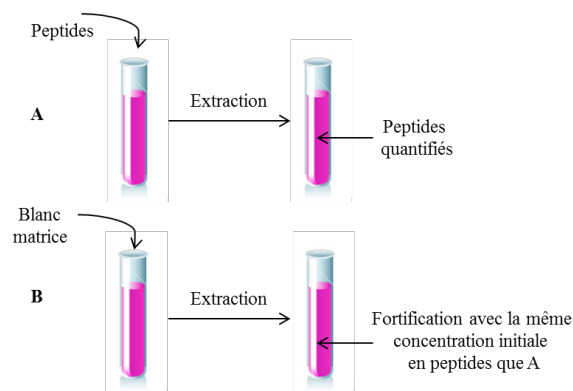


Figure 9 : Détermination du recouvrement pendant les étapes de préparation d'échantillon par comparaison du signal d'une quantité connue d'analyte ajoutée et extraite en présence de la matrice biologique (A), versus la même concentration fortifiée en analyte après extraction de la matrice seule (B).

II.4 La chromatographie haute performance en phase liquide

Après avoir été purifiés et extraits, les peptides peuvent être séparés de manière relativement résolue par HPLC. Un fluide, appelé phase mobile, exerce un effet d'entraînement des composés à analyser et parcourt une colonne, correspondant à la phase

stationnaire, qui va provoquer un effet retardateur par rétention des différents constituants du mélange. A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne. Les composés, solubles dans la phase mobile, sont ensuite entraînés dans la colonne. Lors d'une séparation chromatographique, les peptides restent en phase liquide. Le principe de l'HPLC est représenté sur la Figure 10.

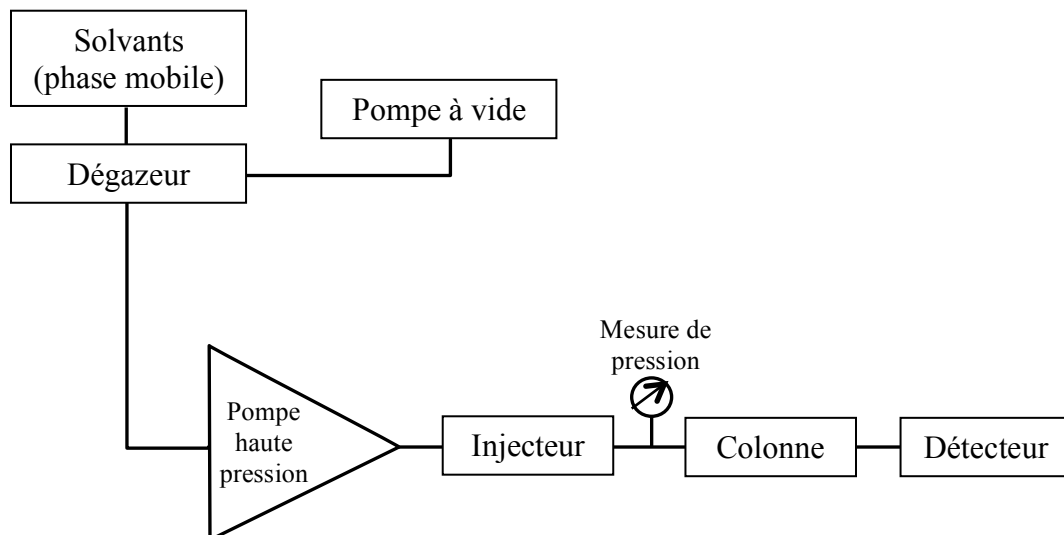


Figure 10 : Schéma décrivant le principe de la chromatographie haute performance en phase liquide : la phase mobile entraîne les analytes à travers une colonne (phase stationnaire), retenant les composés en fonction de leurs caractéristiques physicochimiques. Les analytes sont ensuite élués et analysés par le détecteur.

L'HPLC permet de séparer les composés d'un échantillon afin de pouvoir les identifier et les quantifier. Historiquement, la spectrométrie de masse était couplée à la chromatographie en phase gazeuse. Mais les peptides étant thermo-instables, le couplage HPLC-MS est incontournable pour les études peptidomiques, et l'HPLC permet de séparer les peptides en fonction de leurs diverses propriétés physico-chimiques issues des acides aminés les composant (charge, pI, degré d'hydrophobicité, taille) selon les mêmes principes décrits pour la SPE.

Au cours du transfert des composés dans la colonne chromatographique, il y a un phénomène de dispersion qui se produit, entraînant un élargissement du pic

chromatographique, illustré sur la Figure 11. Les sources de dispersion peuvent être dues à la diffusion longitudinale (dans une direction parallèle à l'axe de la colonne, en fonction de la température et de la pression), l'anisotropie d'écoulement (le mélange peut prendre plusieurs chemins d'écoulement à cause du remplissage, de la granulométrie ou des particules de la colonne) et la résistance aux transferts de masse (à cause des différences de vitesse de la phase mobile et du trajet à l'intérieur de la colonne). Si le phénomène de dispersion est trop important, la sensibilité du signal diminue significativement.

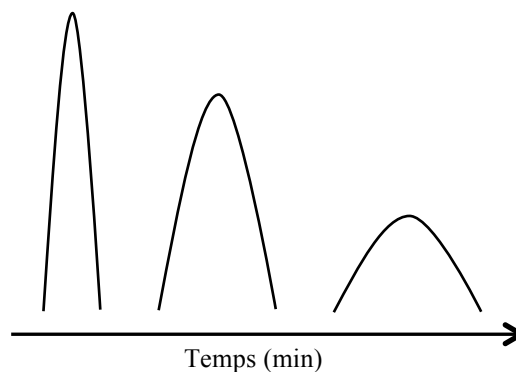


Figure 11 : Aspect cinétique de la séparation chromatographique, entraînant un phénomène de dispersion et donc d'élargissement du pic chromatographique et de diminution de sensibilité.

En général, une étude peptidomique s'intéresse à plusieurs peptides à séparer au sein d'un même échantillon. L'HPLC permet une séparation supplémentaire après la purification de l'échantillon, et d'éliminer les interférents issus de la préparation d'échantillon (e.g. sels, lipides) pouvant affecter la détection. La séparation chromatographique dépend de la résolution (Figure 12).

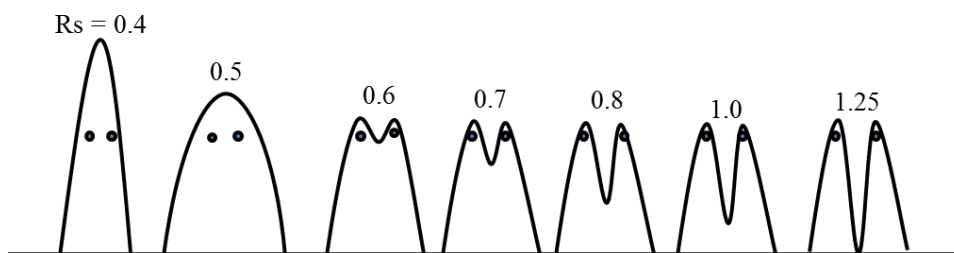


Figure 12 : Schéma représentant une séparation chromatographique de deux composés selon différentes valeurs de résolution (Rs). Pour des valeurs ≤ 0.5 , un seul pic apparaît. Le retour à la ligne de base n'est obtenu que pour une valeur ≥ 1.25 (d'après Principles and practice of bioanalysis, 2008).

Placé à la sortie de la colonne, un détecteur, couplé à un enregistreur, permet d'obtenir un tracé nommé chromatogramme (Figure 13), où le signal est fonction de la concentration de l'analyte. Ainsi, dans des conditions chromatographiques données, le temps de rétention qui correspond au temps d'éluion et de détection d'un composé, caractérise qualitativement une substance.

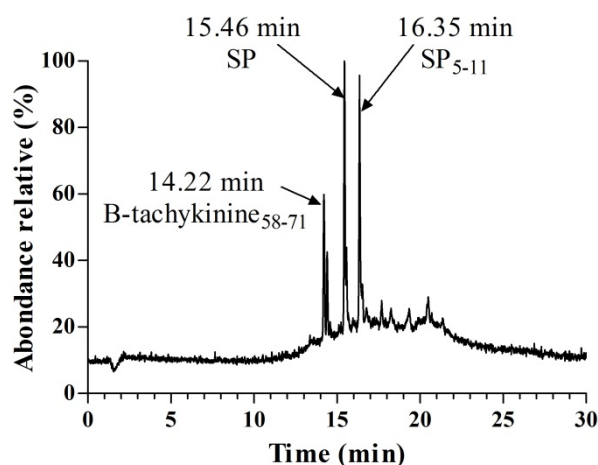


Figure 13 : Exemple de chromatogramme reconstitué à partir de la mesure d'un courant ionique total (TIC) en fonction du temps. La β -tachykinine₅₈₋₇₁, SP et SP₅₋₁₁ sont élués à 14.22, 15.46 et 16.35 minutes, respectivement.

Cependant, l'identification des peptides uniquement par une technique de séparation chromatographique n'est souvent pas suffisante. La présence de molécules issues de la matrice ou d'interférents provenant de l'extraction peut rendre l'identification des peptides

difficiles par HPLC. En peptidomique, le couplage HPLC-MS est un outil sensible qui permet d'identifier et caractériser les peptides dans les mélanges complexes.

II.5 La spectrométrie de masse

La MS, aujourd'hui utilisée en routine dans de nombreux laboratoires, est une technique d'analyse très puissante pour de nombreux composés. Le principe de fonctionnement d'un MS repose sur l'action d'un champ électrique (ou parfois magnétique) sur des molécules chargées afin d'identifier, caractériser et/ou quantifier les molécules d'intérêt. De façon classique, un spectromètre de masse est composé de différents éléments : la source d'ionisation, l'analyseur, le détecteur et l'enregistreur (Figure 14). La source permet l'ionisation des échantillons et le transport des ions vers l'analyseur de l'instrument. Selon le type d'instrument, un ou plusieurs analyseurs peuvent être présents afin de détecter et séparer les ions en fonction du ratio masse sur charge (m/z) qui s'exprime en Thomson, où la masse de l'ion sur l'échelle atomique est divisée par le nombre de charges absolues que l'ion possède. Seules les molécules ionisées sont détectées en MS. Ensuite, le détecteur collecte les ions en sortie de l'analyseur en fonction des différentes valeurs m/z , permettant d'associer une intensité au signal correspondant à chaque espèce. Puis, l'information est envoyée vers l'ordinateur afin d'être analysée et convertie en spectres de masses (Figure 15) (de Hoffmann *et al.*, 1999).

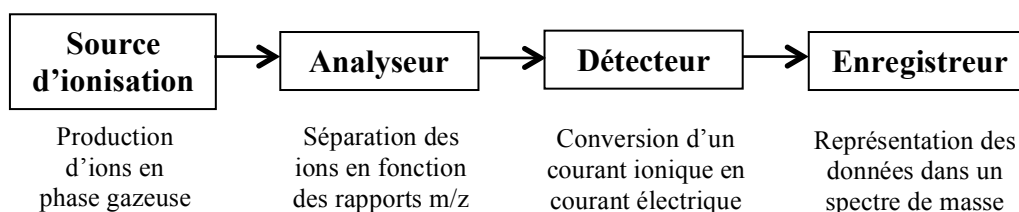


Figure 14 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse composé de 4 éléments : la source d'ionisation, l'analyseur, le détecteur et l'enregistreur (d'après le site internet wikipedia, 2013).

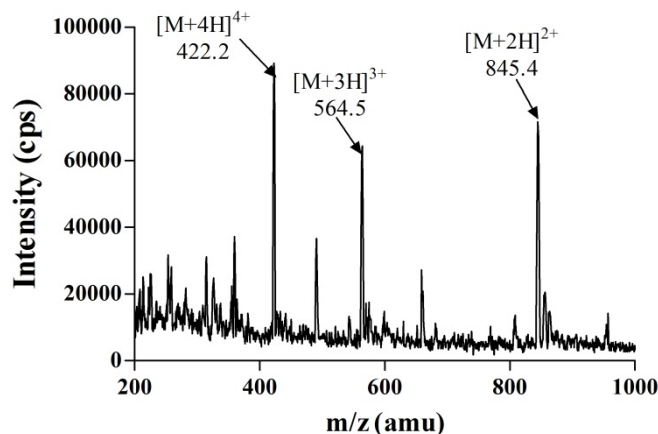


Figure 15 : Exemple du spectre MS de la β -tachykinine₅₈₋₇₁ obtenu avec une source d'ionisation ESI, sur un analyseur de triple quadrupôle. Chaque ion détecté correspond à un état de charge précis du peptide.

II.5.1 Les sources d'ionisation

Toutes les techniques de spectrométrie de masse font appel, non aux espèces moléculaires en tant que telles, mais aux molécules ionisées. Tous les procédés reposent sur les déplacements d'ions moléculaires chargés formés à partir d'une molécule. Afin que l'analyse soit réalisable, cela nécessite donc une étape préalable d'ionisation de l'échantillon. Il existe différentes sources d'ionisation qui sont utilisées selon les molécules étudiées, en fonction de l'approche souhaitée et des instruments à disposition. Les sources ESI (ionisation électrospray ou *electrospray ionization*) (Fenn *et al.*, 1989) et MALDI (désorption/ionisation laser assistée par une matrice ou *matrix-assisted laser desorption/ionisation*) (Karas and Hillenkemp, 1988) ont révolutionné la peptidomique car elles entraînent la formation d'ions stables avec peu ou pas de fragmentation des molécules d'intérêt au moment du processus d'ionisation et/ou de désorption (Griffiths and Wang, 2009).

II.5.1.1 La source ESI

John Fenn a couplé une source ESI à un spectromètre de masse (Lesur *et al.*, 2010) pour la première fois en 1988, lui permettant de produire le premier spectre ESI-MS de la myoglobine, et de recevoir le prix Nobel de chimie en 2002 (Yamashita and Fenn, 1983 ;

Yamashita and Fenn, 1984). La source ESI est un processus d'ionisation à faible énergie, à pression atmosphérique qui transforme les molécules issues d'une solution, en ions en phase gazeuse. Plusieurs étapes critiques entrent en jeu, dont la formation des gouttelettes, la désolvatation, le passage des ions en phase gazeuse et le transport des ions *via* un potentiel électrique (Fenn *et al.*, 1990 ; Fenn, 2003).

L'échantillon sous forme liquide entre dans le capillaire de la source ESI. Un champ électrique intense est produit à l'aide d'une différence de potentiel élevée, de 3 à 5 kV, appliquée entre le capillaire et l'électrode (Figure 16).

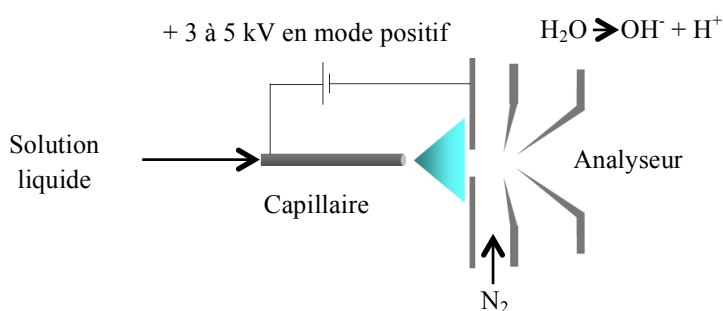


Figure 16 : Schéma de l'ionisation par une source Electrospray. L'échantillon entre sous forme liquide, passe à travers un capillaire, est transformé sous forme gazeuse, puis analysé (d'après Yamashita and Fenn, 1984).

Ce champ électrique charge le solvant contenant l'analyte à l'extrémité du capillaire produit cône de Taylor illustré sur la Figure 17 (Gaskell, 1997 ; Taylor, 1964).

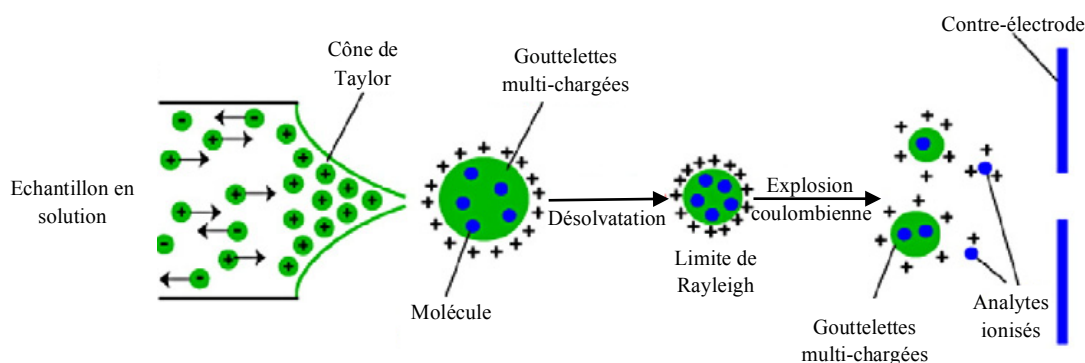


Figure 17 : Schéma décrivant le principe du processus d'ionisation au sein d'une source ESI : l'échantillon arrive sous forme liquide, sous la production d'un champ électrique intense il y a formation du cône de Taylor, avec apparition de gouttelettes multi-chargées qui vont se désolvater et exploser en atteignant la limite de Rayleigh afin de former les composés ionisés qui vont pouvoir être analysés (d'après Soares *et al.*, 2012).

Des gouttelettes sont créées lorsque les forces d'attraction sont insuffisantes pour retenir le liquide dans une formation stable du cône sous l'influence d'un champ électrique, et peuvent être chargées positivement ou négativement, selon la polarité du voltage appliquée. Suite à ce phénomène, la taille des gouttelettes diminue par un processus d'évaporation, jusqu'à devenir instables et atteindre la limite de Rayleigh. La limite de Rayleigh étant le point où les répulsions coulombiennes entre les charges sont égales aux forces cohésives de la tension de surface du liquide. A ce moment, les forces électrostatiques élevées entraînent l'explosion coulombienne. Ce processus est répété jusqu'à ce que les gouttelettes de plus en plus petites forment des ions en phase gazeuse (Cech and Enke, 2001 ; Cole, 1997 ; Watson and Sparkman, 2007).

Cependant, concernant le processus d'ionisation, il existe deux théories. Soit le modèle de charge résiduelle qui est dû à un rétrécissement des gouttelettes suite à l'évaporation du solvant et à une répulsion coulombienne dépassant la tension superficielle et créant une force de champ électrostatique, si intense à la surface de la gouttelette qu'un ion est arraché et transféré en phase gazeuse (Dole *et al.*, 1968). L'autre explication fait référence au modèle d'évaporation d'ions qui permettrait la formation de gouttelettes si petites qu'elles ne renfermeraient plus qu'une seule molécule, directement émise à ce stade en ion sous forme gazeuse (Iribarne and Thomson, 1976).

L'ionisation en mode positif conduit à la formation d'ions moléculaires mono-chargés de type $[M+X]^+$ et d'ions multichargés $[M+nX]^{z+}$, et plus particulièrement des ions de type $[M+nH]^{n+}$. Pour de larges biomolécules, les ions multichargés sont principalement observés et différents états de charges sont présents sur les spectres. Le nombre de charges dépend de la masse, du cluster formé, des propriétés physico-chimiques de la molécule ainsi que des solvants utilisés. Pour des échantillons complexes, cette multiplicité de pics accroît la

complexité des spectres et la difficulté d'identification des molécules d'intérêt. La formation d'adduits est aussi un phénomène régulièrement observé (e.g. ions ammonium, potassium, calcium). Les adduits sont des combinaisons entre l'ion moléculaire du composé ciblé et pouvant interférer s'ils ne sont pas voulus dans le système. L'ionisation dépend aussi de la composition des peptides en acides aminés. Sept acides aminés ont des chaînes ionisables : les acides aspartique et glutamique avec leur groupement carboxylique, la lysine avec le groupement amine, l'arginine et le groupement guanidyle, l'histidine et son noyau imidazole, la cystéine et le groupement thiol, la tyrosine avec le groupement phénol.

II.5.1.2 La source MALDI

Le principe de la source MALDI, représenté sur la Figure 18, a été introduit en 1988 par Karas et Hillenkamp (Karas and Hillenkamp, 1988), ainsi que par l'équipe de Tanaka (Tanaka *et al.*, 1988). Ce type de source est souvent utilisé pour ioniser des composés de hautes masses moléculaires, supérieurs à 300 kDa sans fragmentation lorsque ces composés sont mélangés à une matrice (Karas and Hillenkamp, 1988). La technique MALDI-MS est aussi régulièrement utilisée pour des mélanges peptidiques (Nordhoff *et al.*, 2007), et plus particulièrement des peptides tryptiques (Aebersold and Mann, 2003 ; Bonnel *et al.*, 2013). Un échantillon solide est dissous dans une solution puis dispersé dans une matrice organique solide aromatique composée d'acide sinapinique, ferrulique, caféique ou gentisique. Cette solution est déposée sur une cible métallique et laissée sécher. Après cristallisation, la cible est placée dans le spectromètre de masse. Cet échantillon est ensuite irradié par des photons émis par un laser dont la longueur d'onde est située dans la bande d'absorption de la matrice. Suite à l'absorption des photons du laser, des petites molécules de matrice sont vaporisées et désorbent avec elles les plus grosses molécules dont les peptides. Ce sont majoritairement des ions monochargés qui sont générés par une source MALDI.

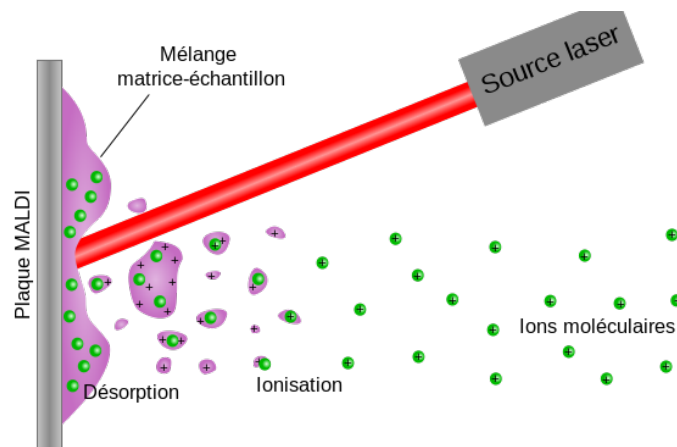


Figure 18 : Schéma du principe d'ionisation au sein d'une source MALDI où l'échantillon (en vert) est co-cristallisé avec la matrice (en violet). L'échantillon est irradié par un laser entraînant désorption puis ionisation des peptides ciblés (d'après le site internet wikipedia, 2013).

Actuellement, l'ionisation MALDI n'est pas clairement définie et trois modèles d'ionisation ont été proposés : photochimique (Vertes *et al.*, 1993), par cluster (Karas and Kruger, 2003) et par pseudo-transfert d'ions (Chang *et al.*, 2007). Concernant le modèle d'ionisation photochimique, l'ionisation multiphotonique suivie de collisions permet la production d'ions de matrice par photoionisation, protonation et déprotonation. Les ions biomoléculaires sont produits par protonation et déprotonation avec des ions de matrice et/ou d'autres biomolécules lors de processus de collisions en phase gazeuse. Pour le modèle d'ionisation par cluster, l'irradiation laser provoque la désorption de cluster d'ions qui produisent alors des ions biomoléculaires par expulsion des molécules de matrice. Le modèle de pseudo-transfert de protons produit des ions biomoléculaires pendant le processus de cristallisation, l'absorption de l'énergie laser permettant uniquement la désorption dans l'espace pour la détection par spectrométrie de masse.

En peptidomique, la source MALDI est fréquemment utilisée pour l'identification, la caractérisation et la quantification des peptides (Liu *et al.*, 2012 ; Predel *et al.*, 2012), et les peptides ionisés sont ensuite accélérés par un champ électrique et expulsés vers l'analyseur, souvent de type TOF.

Pour conclure sur les deux sources d'ionisation les plus fréquemment utilisées en peptidomique, le tableau 3 récapitule les différents avantages et inconvénients rencontrés lors de l'utilisation d'une source ESI ou MALDI.

	Avantages	Inconvénients
Source ESI	<ul style="list-style-type: none"> - Grande reproductibilité car pas de processus de cristallisation - Grande flexibilité pour l'analyseur car de faibles ratios m/z sont générés par la formation d'ions multichargés - Couplage HPLC possible pour séparer par une première étape les composés 	<ul style="list-style-type: none"> - Spectres de masse complexes dus aux multiples espèces ioniques d'un même analyte - Consommation importante d'échantillons (sauf pour le nanospray)
Source MALDI	<ul style="list-style-type: none"> - Rapidité d'analyse (quelques secondes) - Gamme de masses analysées large (> 100 kDa) allant de peptides courts à des grosses protéines - Spectres de masses simples : majoritairement des ions mono-chargés détectés, avec quelques ions doublement ou triplement chargés - Imagerie moléculaire possible pour les tissus - Grande sensibilité (quelques attomoles pour des peptides courts) 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible reproductibilité car contrôle difficile du processus de cristallisation et de production des ions - Résolution faible pour les grosses molécules car large distribution d'énergie cinétique des molécules pendant la désorption, formation éventuelle d'adduits de matrice, fragmentation métastable des molécules - Interférence des ions de matrice dans les basses masses, empêchant la détection de petites molécules - Couplage surtout à l'analyseur de type TOF - Cartographie peptidique en mode MALDI non applicable directement pour l'identification de peptides endogènes car pas de digestion enzymatique

Tableau 3 : Récapitulatif des avantages et inconvénients associés à l'utilisation d'une source ESI ou MALDI

II.5.2 L'effet matrice

L'effet matrice représente l'altération directe ou indirecte ou les interférences de la réponse analytique, dues à la présence d'autres composés co-extraits de la matrice biologique en même temps que les peptides ciblés. L'effet matrice doit donc être investigué afin de s'assurer que la précision, la sélectivité et la sensibilité ne soient pas compromises. Une courbe de calibration dans la matrice biologique doit être comparée avec une courbe de

calibration en présence de solvant, afin de détecter les effets matrice. En parallèle, la dilution des échantillons issus de la matrice biologique doit aussi être étudiée et comparée à la dilution de standards en présence de solvants. De même que les liaisons non spécifiques doivent être déterminées (*Guidance for Industry*, 2001). La méthode de préparation d'échantillon est aussi critique. En effet, il a déjà été démontré que l'élution en SPE décroche des interférents chargés provenant du support entraînant des problèmes de suppression d'ionisation.

La présence d'autres composés (agents d'appariement d'ions) non volatils (King *et al.*, 2000) autres que les peptides cibles, peut aussi entraîner une perte de charge des peptides d'intérêt et donc une suppression d'ionisation au niveau du spectromètre de masse (Wang and Cole, 1997). La suppression d'ionisation peut être accentuée par la source ESI s'il y a présence de matériel non volatil au niveau du spray, entraînant une co-précipitation de l'analyte avec les molécules non volatiles (Dams *et al.*, 2003 ; Stahnke *et al.*, 2012). Ceci aura pour conséquence de diminuer la quantité de gouttelettes formée et donc de diminuer la quantité d'analytes détectée. Afin d'éviter le phénomène de suppression d'ionisation, une solution possible est l'élimination du matériel non volatil en l'éluant au niveau du front de solvant par gradient HPLC, évitant que ce matériel problématique ne soit élué au même temps de rétention que les analytes d'intérêt. De plus, l'utilisation d'un standard interne (e.g. isotope stable) limite aussi les effets négatifs de la suppression d'ionisation en subissant les mêmes phénomènes que les composés cibles.

II.5.2.1 Le rendement

Le rendement d'une technique bioanalytique prend en compte le recouvrement et l'effet matrice, ainsi que les autres phénomènes pouvant intervenir pendant la préparation d'échantillon et la méthode analytique. Il est illustré par la Figure 19. Il correspond à la comparaison entre une expérience où les peptides avec la matrice biologique subissent toutes

les étapes de l'analyse (Figure 19-A), et une expérience où les peptides sont purs et présents uniquement dans le solvant à la même concentration qu'initialement dans la matrice (Figure 19-C).

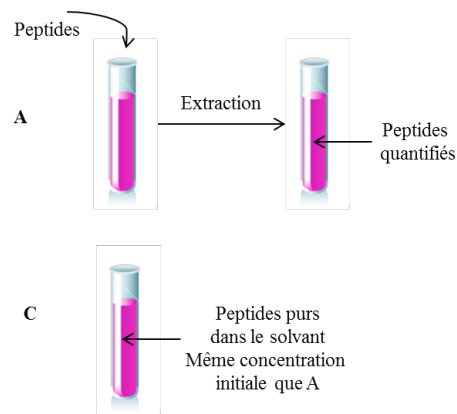


Figure 19 : Détermination du rendement d'une technique de bioanalyse : comparaison du signal du peptide d'intérêt ayant subi toutes les étapes de préparation d'échantillon dans la matrice biologique (A) versus le signal obtenu pour la même concentration en peptide en présence du solvant uniquement (C).

Le rendement est important à définir avant de commencer l'analyse quantitative d'une étude car c'est un paramètre pouvant être limitant. Un rendement doit surtout être stable afin d'éviter les erreurs analytiques et pouvoir réaliser une comparaison différentielle entre un groupe pathologique et un groupe sain. Il n'est pas nécessaire d'obtenir une méthode avec un rendement de 100%, mais il faut un rendement permettant de détecter et de quantifier les peptides d'intérêt, surtout s'ils sont présents à l'état de traces.

II.5.3 Les analyseurs

Suite à leur formation au sein de la source d'ionisation, les ions en phase gazeuse sont transmis vers l'analyseur. L'interface va accélérer et focaliser les ions de la pression atmosphérique de la source vers un vide poussé au niveau de l'analyseur. L'analyseur est la partie de l'instrument qui sépare les ions obtenus en fonction de leur rapport m/z , selon un mécanisme propre à chaque analyseur. En peptidomique, l'analyseur doit permettre à la fois

de réaliser la détection MS pour l'identification, ainsi que la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) pour la quantification et la caractérisation. L'analyseur permet d'obtenir la sensibilité, la résolution, la précision de masse et la capacité à générer des spectres riches en informations (Aebersold and Mann, 2003). La justesse ou exactitude d'un analyseur est le degré de conformité de la quantité mesurée avec la vraie valeur. La précision de masse détermine le degré avec lequel les quantités mesurées présentent les mêmes résultats ou des résultats similaires. Un haut pouvoir résolutif est nécessaire afin d'obtenir une précision suffisante et attribuer une masse exacte.

Il existe différents types d'analyseurs. En peptidomique, les plus utilisés sont les analyseurs de type quadrupolaire (Q), les trappes ioniques ou pièges à ions (IT) et les trappes ioniques linéaires (LIT) (Aebersold and Mann, 2003 ; Vatansever *et al.*, 2010). Ainsi que des analyseurs hybrides couplant deux ou plusieurs analyseurs tels que les triple quadrupôles (QqQ), le quadrupôle couplé au temps de vol (Q-q-TOF) (Paul and Steinwedel, 1953) et plus récemment, l'hybride QqOrbitrap (Scigelova and Makarov, 2006). Les analyseurs hybrides permettent d'obtenir des informations complémentaires, une sensibilité et une capacité de séparation encore plus importantes que l'analyseur seul. Chacun de ces instruments possèdent ses propres caractéristiques dont il faut tenir compte afin de choisir le meilleur analyseur pour l'étude souhaitée.

II.5.3.1 Le quadrupôle et le triple quadrupôle

Un quadrupôle est un filtre de masse qui utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon leur rapport m/z . Il est composé de quatre barres métalliques parallèles, disposées aux quatre angles d'un carré. Une tension ayant une composante continue (DC) (Woodcock *et al.*, 2007) et un potentiel alternatif de radiofréquence (RF) (Gintzler *et al.*,

2008) sont appliqués entre les quatre barres. Les électrodes adjacentes sont portées à des potentiels opposés, tandis que les électrodes situées de façon opposée sont de même potentiel (Figure 20). Ceci crée un champ dynamique à l'intérieur du quadrupôle.

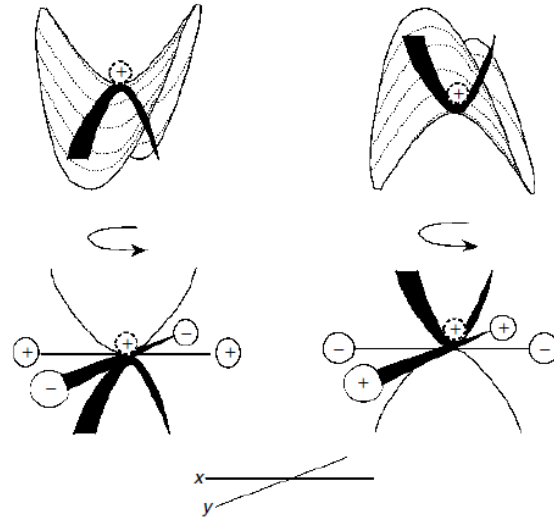


Figure 20 : Mouvement des ions dans un quadrupôle (de Hoffmann and Stroobant, 2007). Un ion positif au centre des barres acquiert une énergie cinétique en direction des barres de potentiels négatifs. Les valeurs de potentiel changent rapidement entre les quatre barres.

Les tensions continues et alternatives varient de façon linéaire, entraînant la séparation des ions en fonction de leur rapport m/z . En effet, selon le potentiel appliqué certains ions seront éliminés, les « ions en non résonance », tandis que les « ions en résonance » auront une trajectoire stable entre les quatre barres (Figure 21), atteignant alors le détecteur. Les ions arrivent en continu dans le quadrupôle.

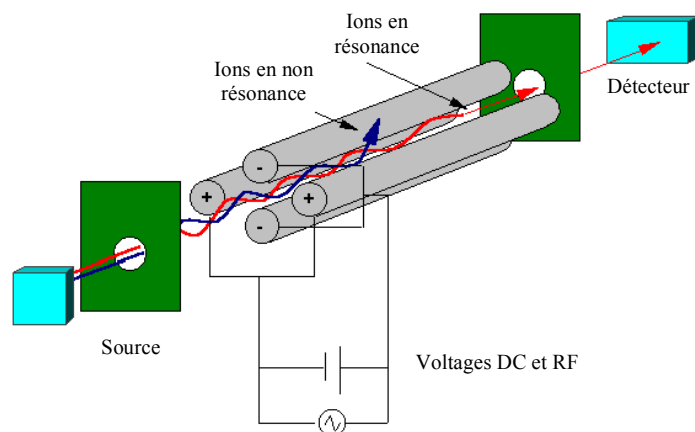


Figure 21 : Schéma de fonctionnement d'un analyseur quadrupolaire (d'après de Hoffmann and Stroobant, 2007)

Un triple quadrupôle est un analyseur hybride constitué de trois quadrupôles positionnés en série, avec des fonctions propres (Figure 22). Le premier (Q_1) et le troisième (Q_3) quadrupôles fonctionnent comme des filtres de masse qui laissent passer tous les ions ou seulement les ions sélectionnés, selon le mode de balayage utilisé. Le second quadrupôle (q_2) est une chambre de collision qui permet de fragmenter les ions sélectionnés. L'avantage de cet instrument est l'augmentation de la sélectivité *via* l'utilisation de deux filtres de masses, l'un à la suite de l'autre.

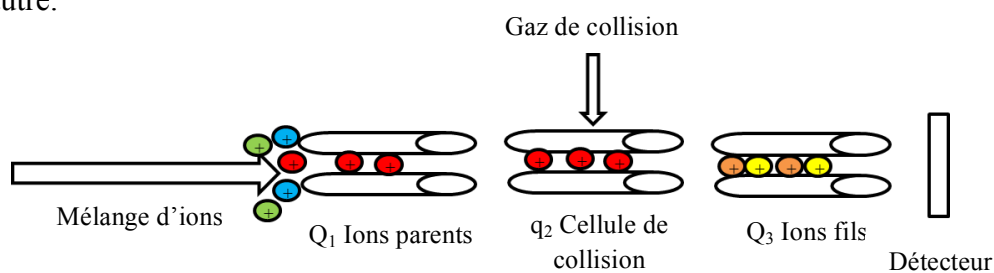


Figure 22 : Schéma du principe de fonctionnement d'un triple quadrupôle

II.5.3.2 Les trappes ioniques

Les analyseurs de type trappe ionique permettent de capturer les ions en direction axiale avec application d'une RF (et en présence d'hélium pour l'IT de ThermoScientific), et

de les accumuler pendant un temps donné pour les analyser. Les IT sont robustes, sensibles, abordables et permettent de produire beaucoup d'informations structurales en effectuant la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Cependant, les IT possèdent une faible précision de masse et donc un faible pouvoir résolutif, et la linéarité de l'instrument est affectée par le nombre limité d'ions pouvant être accumulés en même temps dans la trappe, avant que le critère espace/charge ne déforme leur distribution et ne diminue la mesure de leur précision de masse. Il existe deux types de IT : la trappe tridimensionnelle (3D) et la trappe linéaire (LIT).

II.5.3.2.1 La trappe ionique tridimensionnelle

La trappe ionique 3D, ou piège à ions de Paul et Penning (Makarov, 1996), est constituée d'une électrode annulaire recouverte de part et d'autre de l'espace central par une électrode hyperbolique (électrodes chapeaux) (Stafford *et al.*, 1984). L'entrée des ions s'effectue à travers un orifice percé dans l'une de ces électrodes (calotte supérieure). Contrairement aux quadrupôles, les ions ne traversent pas l'analyseur mais restent confinés à l'intérieur de la trappe, qui possède un volume de 1 à 2 cm³. Lorsque les ions entrent dans la trappe, leur énergie cinétique est réduite par les collisions provoquées avec le gaz de collision, l'hélium, présent dans le piège (Figure 23).

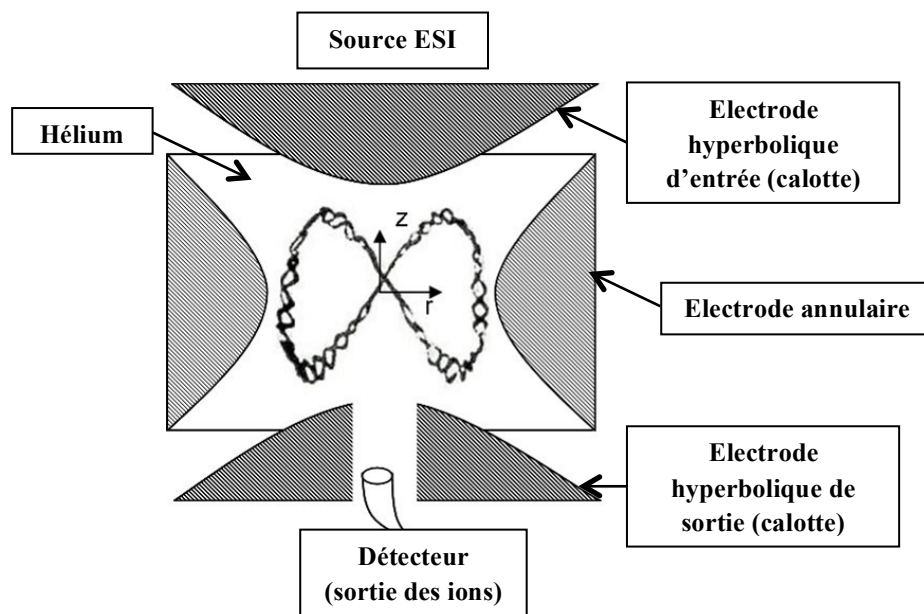


Figure 23 : Principe d'analyse des ions dans une trappe ionique tridimensionnelle : les ions rentrent dans l'IT après avoir été ionisés, passent à travers l'électrode hyperbolique d'entrée, restent confinés dans l'électrode annulaire où ils entrent en collision avec l'hélium et oscillent selon les équations de Mathieu, puis sont éjectés du piège par l'électrode hyperbolique de sortie selon la radiofréquence appliquée (d'après le site internet wikipedia, 2013).

Les ions venant de l'interface sont piégés dans la trappe grâce à un champ quadrupolaire généré par l'électrode annulaire soumise à une radiofréquence, et permettant le stockage des ions jusqu'à leur éjection de la trappe. A l'intérieur de ce piège, les ions suivent une trajectoire oscillante close qui obéit aux équations de Mathieu (March, 2000). La stabilité de la trajectoire va dépendre de la radiofréquence appliquée sur l'électrode annulaire. Plus la radiofréquence sera élevée, plus le puits de potentiel sera important, améliorant ainsi le piégeage des ions. Par contre, la profondeur du puits de potentiel est inversement proportionnel au rapport m/z des différents ions piégés, ce qui signifie que plus l'amplitude sera importante, plus les ions de faible ratio m/z auront une trajectoire instable et risqueront de ne pas être piégés par la trappe. Ensuite, la radiofréquence appliquée sur l'électrode annulaire est augmentée progressivement, entraînant une déstabilisation de la trajectoire des ions et donc leur éjection successive vers le détecteur par l'orifice de l'électrode chapeau de

sortie, dans l'ordre des rapports m/z croissants. L'éjection des ions est radiale, le long des axes x et y . La détection des ions est réalisée par la présence de deux détecteurs présents de part et d'autre du quadropôle (ThermoScientific). Les ions peuvent donc rester piégés dans la trappe pendant le temps nécessaire au déroulement de l'analyse, mais le nombre d'ions piégés dans une IT conventionnelle reste limité afin de ne pas saturer le piège et donc éviter de diminuer la sensibilité. La résolution d'une trappe 3D est inversement de la vitesse de scan.

II.5.3.2.2 La trappe ionique linéaire

La LIT est une trappe ionique linéaire, stockant les ions dans un cylindre bien plus large que l'IT traditionnelle (3D), permettant donc d'augmenter la sensibilité, la résolution et la précision de masse (Hager, 2002 ; Schwartz *et al.*, 2002). Son fonctionnement est basé sur l'action d'un champ électrique de radiofréquences appliqué sur les ions. Le mouvement des ions dépend de leur rapport m/z puisqu'il existe des zones de stabilité pour lesquelles les ions d'une masse « m » ont un mouvement oscillatoire stable et restent donc piégés dans la trappe. Par la suite, ces ions piégés sont éjectés sélectivement en fonction de leur ratio m/z . La LIT permet d'augmenter de façon considérable la rapidité d'acquisition et donc les performances de l'instrument. De plus, la sensibilité du balayage est améliorée, facilitant la spectrométrie de masse en tandem.

II.5.3.2.3 La trappe ionique linéaire couplée à un quadropôle

La QqLIT est un instrument hybride couplant un analyseur quadropolaire avec une LIT illustrée par la Figure 24. Le quadropôle seul détecte les ions présents dans un échantillon de façon continue, tandis que la QqLIT emmagasine, ionise puis détecte les ions selon des cycles de temps définis qui tendent vers quelques millisecondes.

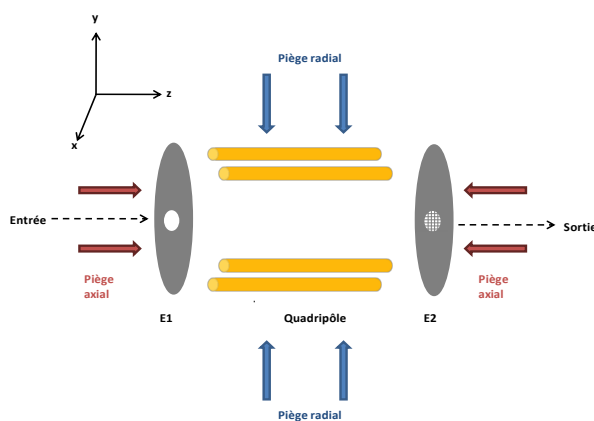


Figure 24 : Schéma du principe d'un instrument hybride de type QqLIT

Le quadripôle se comporte de la même façon que vu précédemment, excepté qu'il possède deux électrodes à chaque extrémité, E1 et E2, et que l'électrode E2 a un potentiel électrique plus élevé entraînant un confinement des ions selon l'axe axial z. La LIT est utilisée soit comme un filtre, soit en tant que piège à ions. Des capteurs détectent la quantité d'ions formés et arrêtent le processus d'ionisation lorsque le nombre maximum d'ions est atteint. Ceci permet de diminuer l'occupation de l'espace de la trappe, contrairement à une trappe conventionnelle. Une fois le processus d'ionisation terminé, les molécules sont piégées selon une trajectoire sinusoïdale définie par des champs oscillants et non-oscillants. Les ions sont piégés un certain temps, puis éjectés par application d'une RF sur les électrodes de sortie. Une RF fixe piège uniquement des ions correspondant à un ratio m/z , tandis qu'un balayage de différentes RF piège une plus large gamme de ratios m/z . La QqLIT peut donc piéger des ions spécifiques possédant une certaine valeur m/z , augmentant la sensibilité. La QqLIT peut aussi exécuter plusieurs étapes MS ou MS^n permettant d'isoler lors d'une première étape un ion spécifique correspondant à un ratio m/z , de le fragmenter et d'accumuler ses fragments. Lors d'une deuxième étape, les fragments isolés pourront être à leur tour fragmentés. Ceci permettra de diminuer de façon significative le bruit de fond et d'améliorer la sensibilité et la spécificité (Hager, 2002).

II.5.3.2.4 QqOrbitrap (ou qExactive)

Le QqOrbitrap est un instrument hybride (Figure 25) permettant d'obtenir des mesures de masse exacte afin d'identifier les protéines ou peptides dans des mélanges complexes (i.e. plasma, urine) mais aussi de déterminer les modifications post-traductionnelles, des interactions entre protéines et/ou ligands. En effet, les protéines exprimées au sein d'échantillons complexes représentent une gamme de concentrations d'au moins 10 ordres de grandeur entraînant un important défi analytique (Anderson and Anderson, 2002). Une précision de masse ≤ 2 ppm permet de rendre très fiable l'identification de peptides (Washburn *et al.*, 2001) ainsi que le pouvoir résolutif (140,000 FWHM). L'Orbitrap a été récemment développé par Alexander Makarov (Makarov *et al.*, 2006 ; Scigelova and Makarov, 2006).

Le premier analyseur est un quadropôle utilisé comme un premier filtre. La C-Trap est employée pour conserver, accumuler et focaliser les ions préalablement à leur injection pulsée dans l'Orbitrap. L'analyseur de masse de type Orbitrap est une trappe électrostatique constituée d'une électrode en forme de tonneau à l'intérieur de laquelle se trouve une autre électrode en forme de fuseau (Scigelova and Makarov, 2006). Les ions sont éjectés tangentiellement à l'électrode centrale et piégés autour d'elle par application d'un voltage défini entre les deux électrodes (Makarov *et al.*, 2006). Le champ électrostatique induit l'oscillation des ions selon l'axe z, en formant des spirales autour de l'électrode interne selon une certaine fréquence qui dépend de la valeur du ratio m/z. L'oscillation suit une fréquence qui est inversement proportionnel à la racine carrée du rapport m/z de l'ion analysé.

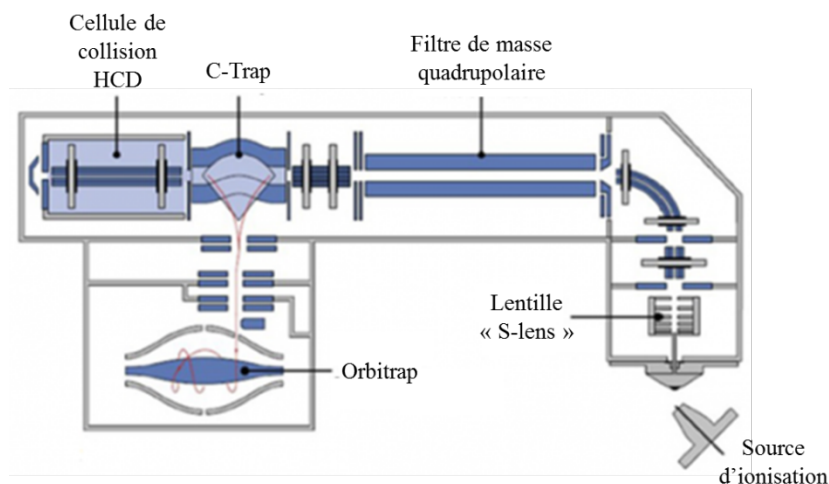


Figure 25 : Schéma de fonctionnement du QqOrbitrap (d'après Thermo Scientific)

Cet instrument hybride permet une grande sensibilité et rapidité d'acquisition des spectres au niveau du premier analyseur, ainsi qu'une haute résolution et une précision de masse importante grâce au deuxième analyseur, révolutionnant la peptidomique.

II.5.3.3 Le temps de vol

L'analyseur par temps de vol linéaire permet de mesurer le temps mis par les ions pour parcourir une distance donnée dans une zone libre de champ, appelée tube de vol, après avoir été accélérés par un champ électrique (Figure 26-A). La séparation des ions ne dépend donc que de leur vitesse acquise lors de la phase d'accélération. Les ions possédant un faible rapport m/z sont détectés les premiers. La vitesse des particules chargées après accélération ne sera pas modifiée puisque les ions se déplacent dans une zone de vol de champ libre. Dans un TOF, la vitesse d'un ion est déterminée par la longueur du tube et le temps mis par l'ion pour le parcourir. Cette mesure peut être effectuée par un convertisseur analogique-numérique ou par un convertisseur de temps-numérique.

Dans un TOF avec un réflectron (Figure 26-B), le réflectron a pour but de corriger la dispersion en énergie cinétique des ions. Pour cela une série de lentilles sur lesquelles sont

appliqués des potentiels croissants sont placés à l'extrémité du tube de vol. Ces différentes lentilles vont agir comme un miroir électrostatique, et permettre une inversion de la direction des ions, qui vont converger sur un plan sur lequel est placé le détecteur. La dispersion en énergie est donc corrigée ponctuellement ce qui permet d'augmenter la résolution. Les ions les plus énergétiques arrivent en premier au niveau du réflectron et vont pénétrer plus profondément. Ils seront donc réfléchis dans un temps plus long. Ainsi, tous les ions ayant un rapport m/z identique se trouvent focalisés sur un même plan, le détecteur du réflectron étant placé sur le plan de focalisation de ces ions (Weickhardt *et al.*, 2003). Mais certaines espèces ioniques perdent leurs charges et ne sont donc pas soumises à l'effet du champ électrostatique ou peuvent se fragmenter avant. Ces phénomènes peuvent diminuer la sensibilité car ces espèces risquent de ne pas être détectées correctement.

L'analyseur TOF est souvent couplé à une source d'ionisation MALDI afin de mesurer les masses des peptides intacts (Olthoff *et al.*, 1988).

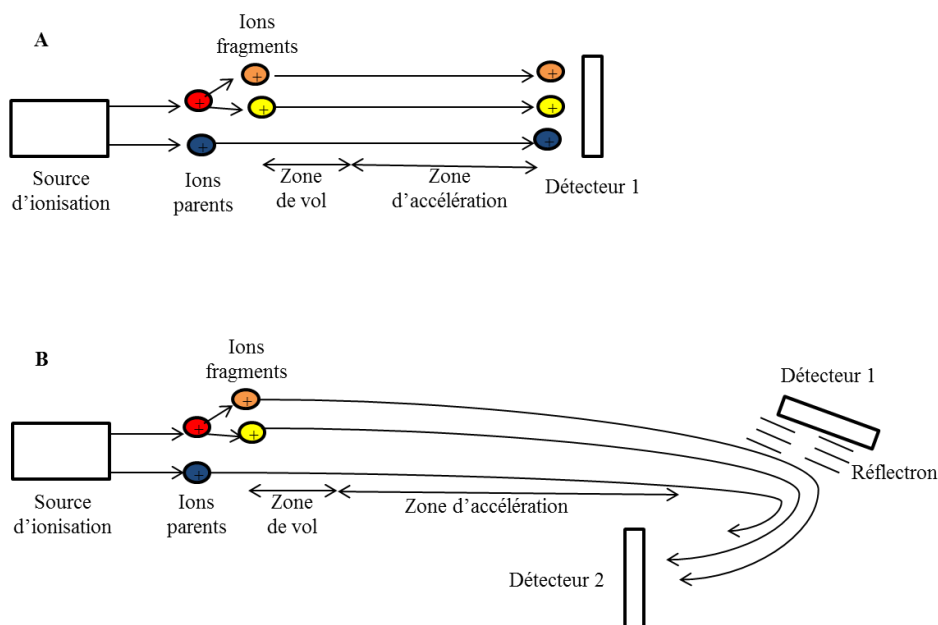


Figure 26 : Schéma d'un spectromètre de masse composé d'un analyseur de type TOF : (A) TOF linéaire où les ions sont séparés selon leur vitesse acquise au cours de la distance parcourue ; (B) TOF équipé d'un réflectron permettant de corriger la dispersion d'énergie cinétique des ions (d'après Annan, 1996).

Grâce à l'extraction pulsée retardée, le TOF linéaire a une résolution pouvant atteindre 2000. L'ajout d'un réflectron permet d'augmenter la résolution jusqu'à 20,000 (Mamyryn *et al.*, 1973), mais il est difficile de détecter des molécules > 20,000 Th avec ce type d'analyseur.

Il existe aussi des hybrides comme le Q-TOF comportant un quadripôle couplé à un TOF ou le TOF-TOF, les deux analyseurs étant séparés par une cellule de collision (Loboda *et al.*, 2000). Les ions possédant une valeur de m/z définie sont sélectionnés dans le premier analyseur (quadripôle ou TOF), fragmentés dans la cellule de collision et les ions fragments sont envoyés au TOF. Le Q-TOF peut être couplée à une source ESI. Ces instruments permettent d'obtenir de plus grandes sensibilité, résolution et précision de masse. Les spectres de fragmentation sont plus riches avec l'utilisation de ces instruments hybrides et contiennent donc plus d'informations (Aebersold and Mann, 2003). Ils sont donc aussi très utilisés en peptidomique.

II.5.4 Les modes de balayage

Différents modes de balayage peuvent être utilisés, selon l'information recherchée.

II.5.4.1 Le mode « *full scan MS* »

Le mode « *full scan MS* » est un mode de balayage pour lequel un intervalle de rapports m/z est balayé, sans autre sélection supplémentaire (Figure 27). Les ions séparés dans l'espace en fonction du temps. Il en résulte la détection d'un grand nombre d'ions issus de la source et ayant des rapports m/z différents compris dans l'intervalle ciblé. Dans le cas d'un instrument hybride, ce mode d'acquisition peut être effectué par Q_1 , Q_3 ou la LIT. Les autres analyseurs sont alors inactifs et permettent uniquement de focaliser les ions en direction du détecteur. Il est utilisé pour l'identification des peptides.

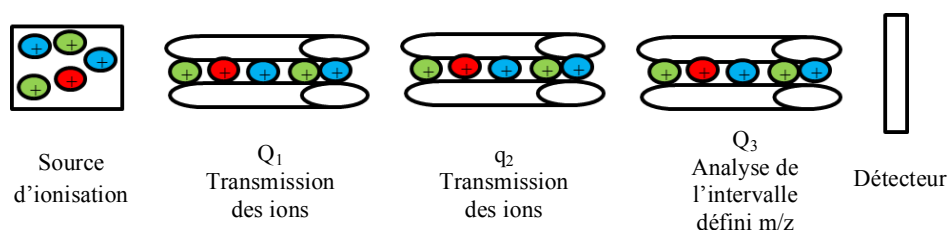


Figure 27 : Schéma décrivant le principe du mode de balayage « *full scan MS* » dans un analyseur de type triple quadrupôle : un intervalle m/z défini en Q_1 est balayé. Ce mode de scan permet l'identification des peptides (d'après Graves and Haystead, 2002).

II.5.4.2 Le mode « *single ion monitoring* »

Le mode d'acquisition SIM est plus sélectif que le mode « *full scan MS* », car il permet le suivi d'un seul rapport m/z sélectionné pendant un temps fixe (Figure 28). Ce mode de balayage augmente la sélectivité du système et donc la sensibilité du signal. L'ion ciblé est sélectionné en Q_1 (ou Q_3), et q_2 et Q_3 (ou Q_1) sont inactifs et jouent le rôle de focalisation des ions. Avec un quadrupôle, la durée du balayage des ions sélectionnés est proportionnelle à la gamme de rapports m/z balayée. Par conséquent, si peu de valeurs m/z sont sélectionnées (par

rapport au mode « *full scan MS* »), le temps imparti pour la détection des ions correspondants sera plus grand. En même temps, l'élimination des ions indésirables supprime le bruit de fond et, dans le cas d'une trappe ionique, cela permet de stocker plus d'ions d'intérêt dans l'analyseur.

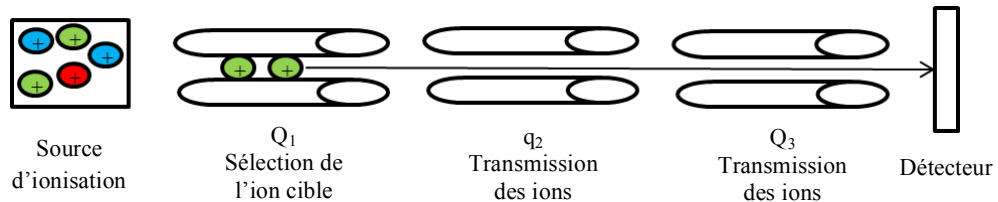


Figure 28 : Schéma décrivant le principe du mode d'acquisition « *single ion monitoring* » dans un analyseur de type triple quadrupôle : l'ion ciblé est sélectionné en Q_1 et q_2 et Q_3 sont inactifs et focalisent les ions (d'après Graves and Haystead, 2002).

II.5.4.3 Le mode « *product ion scan* » ou MS^2

Lors d'une première étape, ce mode d'acquisition produit les ions précurseurs (ou ions parents) sélectionnés par Q_1 . Ces ions sont ensuite fragmentés dans la cellule de collision. Puis tous les ions fragments sont focalisés vers Q_3 , sans sélection, et détectés (Figure 29). Ce mode de balayage est relativement sélectif car, par exemple, deux ions précurseurs de même rapport m/z ne se fragmentent pas selon le même patron, entraînant donc la formation d'ions fragments différents et possédant des rapports m/z propres à leurs structures. Ce mode permet de caractériser et de quantifier les peptides.

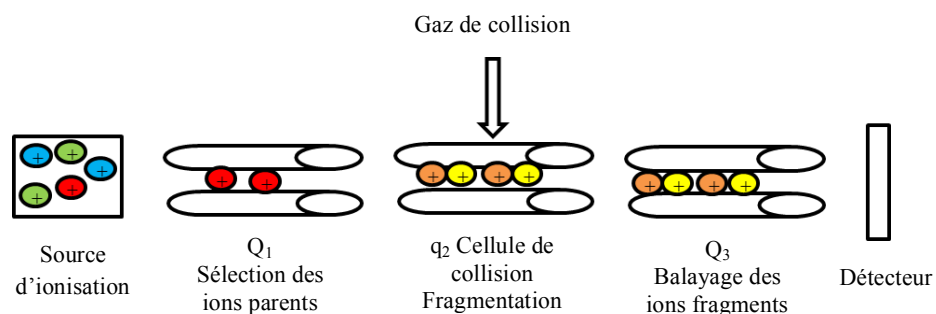


Figure 29 : Schéma décrivant le principe du mode « *product ion scan* » dans un analyseur de type triple quadrupôle : les ions précurseurs sont sélectionnés en Q_1 , fragmentés en q_2 puis focalisés vers Q_3 et détectés (de Hoffmann and Stroobant, 2007).

II.5.4.4 Le mode MSⁿ

Le processus en deux étapes concernant l'isolement et la fragmentation (MS²) peut se répéter plusieurs fois (MS/MS/MS.../MS), et on parle alors de MSⁿ. Il y a plusieurs étapes successives de fragmentation. Les étapes de remplissage, d'isolement et de fragmentation sont programmées de façon à obtenir les ions fragments issus de (n-1) fragmentations successives. Le mode MSⁿ permet d'obtenir des informations structurales très complètes et caractéristiques, menant à l'élucidation structurale d'un composé. Il peut permettre d'élucider les modifications post-traductionnelles. Le processus MSⁿ est réalisé à l'aide d'un analyseur de type trappe ionique. Ces répétitions de fragmentations doivent tenir compte de la limite de sensibilité de l'instrument utilisé. Le nombre *n* de cycles de fragmentation est limité par la quantité maximale d'ions qui peuvent être emmagasinés dans la trappe avant la fragmentation.

II.5.4.5 Le mode « precursor ion scan »

Ce mode permet de rechercher des ions parents capables de se fragmenter en produisant un ion fils cible (Figure 30).

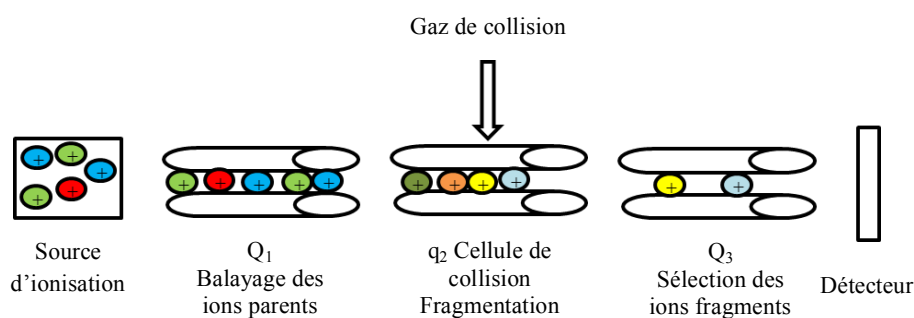


Figure 30 : Schéma décrivant le principe du mode « precursor ion scan » dans un analyseur de type triple quadrupôle : les ratios *m/z* des ions fils sont définis en Q₃ afin de retrouver les ions parents correspondants en Q₁ (de Hoffmann and Stroobant, 2007).

II.5.4.6 Le mode « perte de neutre » ou « *neutral loss* »

Lors de ce mode d'acquisition, les deux analyseurs Q_1 et Q_3 balaient une gamme de masses ciblée simultanément, avec un décalage de masse constant correspondant au groupement neutre perdu (Figure 31). Ceci permet d'obtenir tous les ions parents capables de se fragmenter en générant un neutre de masse égale au décalage de masse imposé.

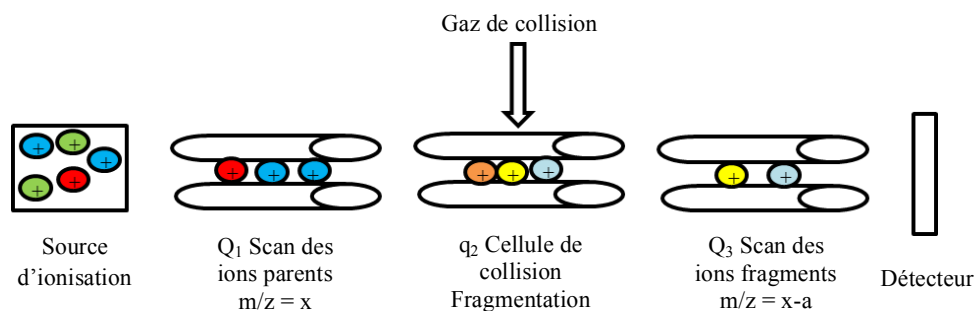


Figure 31 : Schéma décrivant le principe du mode « *neutral loss* » dans un analyseur de type triple quadropôle : les analyseurs Q_1 et Q_3 balaient une gamme de masses prédéfinies, avec un décalage constant correspondant au groupement neutre perdu lors de la réaction (de Hoffmann and Stroobant, 2007).

II.5.4.7 Le mode « *selected reaction monitoring* »

Le mode SRM permet le suivi d'une transition particulière entre un ion parent sélectionné en Q_1 , fragmenté en q_2 , et l'ion fils associé sélectionné en Q_3 (Figure 32). Ce mode d'acquisition permet une quantification peptidique très sélective et spécifique.

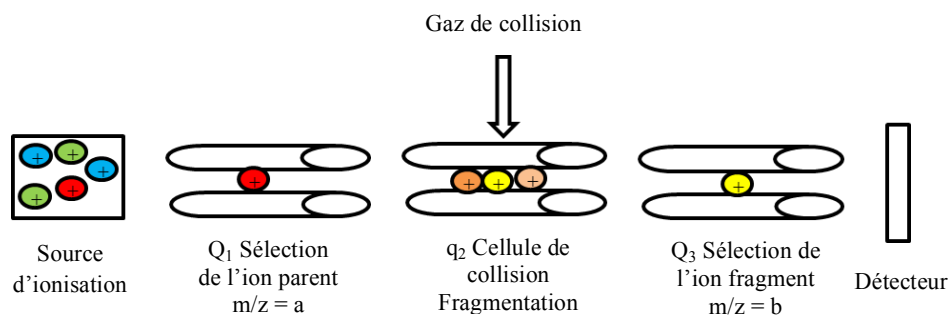


Figure 32 : Schéma décrivant le principe du mode « *selected reaction monitoring* » dans un analyseur de type triple quadropôle : l'ion parent est sélectionné en Q_1 , fragmenté en q_2 , et l'ion fils associé est sélectionné en Q_3 (de Hoffmann and Stroobant, 2007).

II.5.4.8 Les modes MRM et MRM³

Les modes d'acquisition SRM et MRM (« *multiple reaction monitoring* ») sont souvent confondus dans la communauté scientifique car ils sont assez semblables et les concepteurs de logiciels ont parfois fait des amalgames entre les deux notions. La différence réside dans le fait qu'en mode MRM plusieurs transitions sélectionnées entre les ions parents et les ions fragments peuvent être monitorées simultanément. Le mode MRM consiste en une série de courtes expériences pour lesquelles un ion parent et un ion fragment caractéristique spécifique d'un ion parent sont sélectionnés en Q₁ et Q₃, respectivement. En général, l'instrument opère selon plusieurs cycles correspondant à des séries de transitions et enregistre le signal en fonction du temps (élution chromatographique). Le logiciel effectue donc une reconstruction MRM à partir du chromatogramme obtenu. Ce mode est très sélectif et spécifique (comme le mode SRM), mais le nombre de transitions suivies dépend des capacités de l'instrument utilisé.

Le mode MRM³ est possible sur des instruments hybrides couplant un quadropôle et une trappe ionique linéaire (QqLIT). C'est une technologie récemment développée permettant d'augmenter significativement les capacités de fragmentation (Collings *et al.*, 2003), la sensibilité (Loboda *et al.*, 2000 ; Collings and Romaschin, 2009) et la spécificité. Ceci augmente encore la fiabilité d'identification de peptides dans un mélange complexe. Le mode MRM³ permet la sélection d'ions parents spécifiques dans le quadropôle (Q₁), leur fragmentation en q₂, puis la sélection d'ions fragments primaires spécifiques, à leur tour piégés et fragmentés dans la LIT pour générer des ions fragments secondaires par résonance (Figure 33). Ce sont les transitions MRM³ les plus intenses qui sont sommées pour reconstituer le chromatogramme puis le spectre de masse (Figure 34).

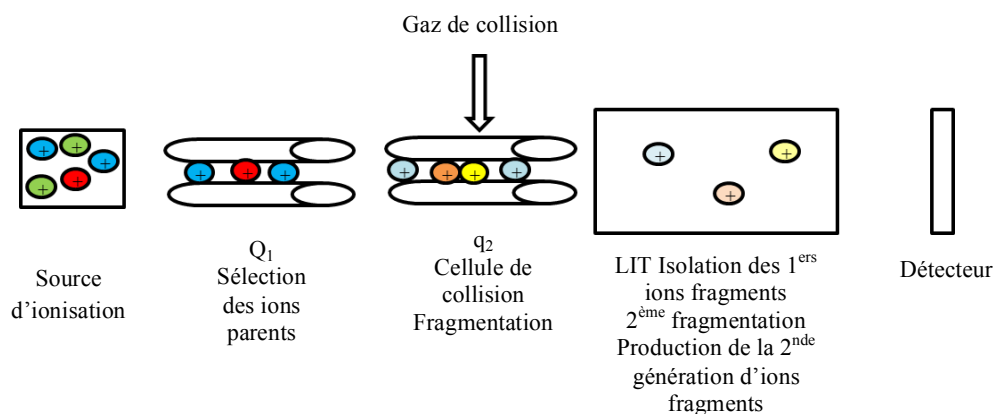


Figure 33 : Schéma décrivant le principe MRM³ développé sur un instrument hybride couplant un quadropôle et une trappe ionique linéaire (QqLIT) : des ions parents sont sélectionnés en Q₁, fragmentés en q₂, et leurs ions fils associés sont sélectionnés en Q₃ pour être fragmentés à leur tour dans la LIT (d'après Fortin *et al.*, 2009).

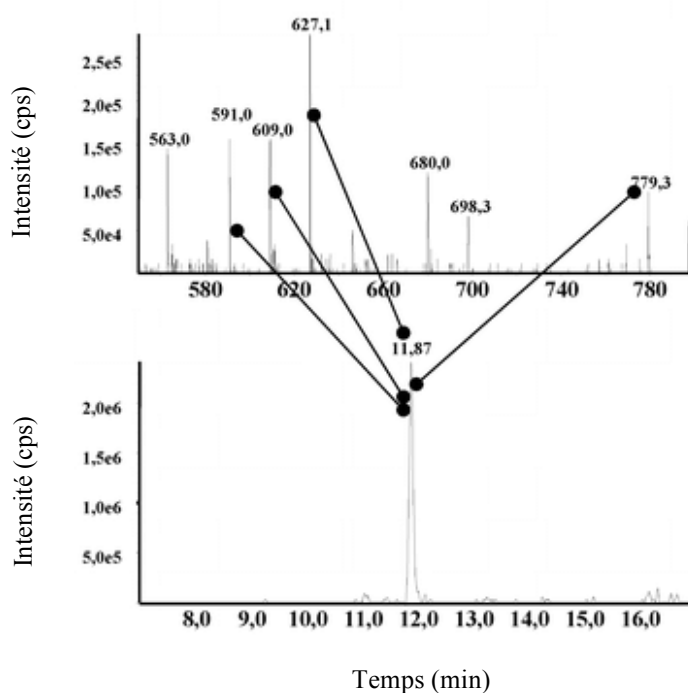


Figure 34 : Schéma décrivant le principe d'une reconstruction MRM³ développée sur un instrument hybride couplant un quadropôle et une trappe ionique linéaire (QqLIT) : les transitions MRM³ majoritaires sont sommées afin de reconstituer le chromatogramme à partir de la mesure en courant ionique total en fonction du temps, puis le spectre de masse (d'après Fortin *et al.*, 2009).

II.5.5 Les cellules de collision

La spectrométrie de masse en tandem requiert la fragmentation de l'ion précurseur sélectionné par le premier analyseur, afin de générer des ions produits dans le dernier

analyseur. Ce sont les cellules de collision qui induisent la fragmentation. Il en existe différents types incluant les cellules de collision CID, HCD, ETD (dissociation par transfert d'électrons), ECD (dissociation par capture d'électrons). En peptidomique, ce sont les CID et HCD les plus fréquemment utilisées. Le processus de fragmentation est différent pour chacune de ces cellules, et les spectres obtenus apportent donc des informations complémentaires.

II.5.5.1 La dissociation induite par collision

La cellule CID reste la méthode la plus courante utilisée pour la fragmentation (McLucky, 1992 ; Shukla and Futrell, 2000 ; Jennings, 2000). Les ions parents sélectionnés rentrent dans la cellule de collision contenant un gaz de collision inerte tels que l'argon, l'hélium, l'azote. Ces ions parents rentrent en collision avec les molécules de gaz neutres (Wells and McLucky, 2005). Les ions sélectionnés peuvent subir une ou plusieurs collisions avec le gaz, selon le potentiel d'énergie de la molécule, jusqu'à ce que le seuil de fragmentation soit atteint et que les ions fragments soient générés (Figure 35). Ces collisions peuvent avoir lieu à faible (1 à 100 eV) ou haute énergie (keV) selon l'instrument (QqLIT et TOF, respectivement). Le type de fragmentation obtenue est donc dépendant des propriétés des ions parents sélectionnés et de l'énergie appliquée. A trop faible énergie, les réactions de fragmentation sont souvent limitées à des pertes de neutres (e.g. H₂O, MeOH, CO, CO₂) selon la nature de l'ion parent. Ces pertes de neutres ne sont pas vraiment considérées comme des informations structurales significatives, mais elles permettent tout de même d'obtenir des informations sur les groupes fonctionnels de la molécule cible (e.g. détermination du type de modification post-traductionnelle d'une protéine). A plus haute énergie, il y a beaucoup plus d'informations structurales avec souvent des fragmentations au niveau de positions

caractéristiques au sein de la molécule. Mais si une énergie trop élevée est appliquée, le clivage des liaisons carbone-carbone peut mener à une fragmentation non contrôlée.

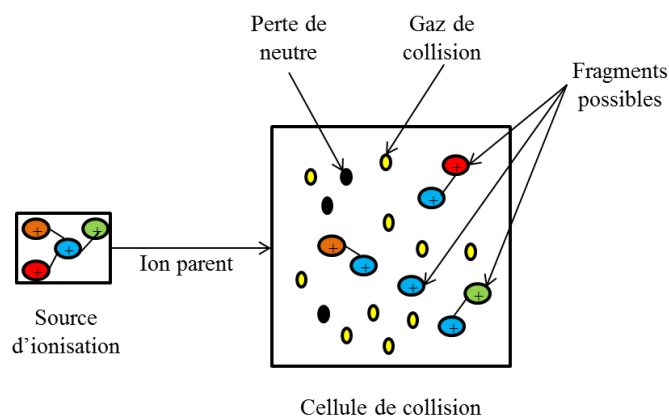


Figure 35 : Schéma décrivant le principe de la fragmentation des ions parents dans une cellule CID (d'après l'Université de Bristol).

II.5.5.2 La dissociation par collision à haute énergie

L'HCD est la cellule de collision présente dans l'instrument hybride QqOrbitrap (Olsen *et al.*, 2007). Cette cellule de collision est capable de générer des ions fragments de faibles m/z . En revanche, la cellule HCD ne peut produire que des ions fragments dans une gamme d'ordre 10. La collision par HCD nécessite des fragmentations à haute énergie, améliorant la qualité de fragmentation et augmentant le nombre d'informations obtenues sur le spectre de masse. Par exemple, les états de charge sont facilement distingués et le nombre de fragments obtenus permet d'identifier de façon fiable les peptides d'intérêt et de déterminer des modifications post-traductionnelles (Falick *et al.*, 1993). En revanche, la fragmentation étant plus importante qu'avec une cellule CID, la sensibilité diminue avec la cellule HCD (Zougman *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2009). Dans l'hybride QqOrbitrap, l'HCD est couplée à la C-Trap afin de mieux focaliser les ions pour les transmettre à l'Orbitrap.

Le Tableau 4 récapitule les avantages et inconvénients associés à chaque analyseur décrit précédemment. Le choix d'un analyseur MS au détriment d'un autre prend en compte les performances et inconvénients propres à chaque technologie, mais doit aussi répondre à l'étude souhaitée et donc aux informations recherchées. Bien évidemment, ce choix est aussi fonction des instruments disponibles au sein des laboratoires d'accueil. Pour réaliser ce projet de doctorat, les analyseurs de type IT 3D pour l'Université de Montréal, QqQ, QqLIT et QqOrbitrap (qExactive) pour l'Université de Lyon ont été utilisés.

	IT / LIT	QqTOF	QqOrbitrap	QqQ / QqLIT
Précision de masse	+	+++	++++	++
Résolution	+	+++	++++	+
Sensibilité (S/N)	+++	++	+++	+++
Gamme dynamique	+	++	+++	+++
Source ESI	oui	oui	oui	oui
Source MALDI		oui		
Cellule de collision	CID	CID	HCD, CID	CID
MS/MS	oui	oui	oui	oui
Modes de balayage privilégiés	MS, MS ⁿ	MS	MS, MS ⁿ	PIS, NL, MRM, MRM ³
Identification	++	++	++++	+ / ++
Quantification	+ / ++	+	+++	+++
Vitesse d'analyse	+	++	+++	++

Tableau 4 : Récapitulatif des caractéristiques et performances de chaque instrument couramment utilisé en peptidomique (d'après Domon and Aebersold, 2006). Les symboles +, ++, +++ et ++++ sont des indicateurs de réponse faible à excellente. PIS = precursor ion scan, NL = neutral loss, MRM = multiple reaction monitoring, CID = collision-induced dissociation, HCD = high-energy collisional dissociation

II.5.6 La fragmentation des peptides

La fragmentation des peptides et protéines se déroule dans la cellule de collision, de façon prédictible et répond à une nomenclature démontrée par Roepstorff, Fohlman et Bieman (Roepstorff and Fohlman, 1984; Biemann, 1990). Cette fragmentation se produit au niveau de la liaison de la chaîne peptidique et génère des séries d'ions à partir de l'extrémité N- ou C-terminale du peptide, ou au niveau de la chaîne latérale des acides aminés. Seuls les fragments chargés sont détectés. Si la charge est située sur l'extrémité N- terminale, l'ion appartient à la

série a, b ou c. Si la charge est localisée au niveau de l'extrémité C-terminale, l'ion appartient à la série x, y ou z (Figure 36).

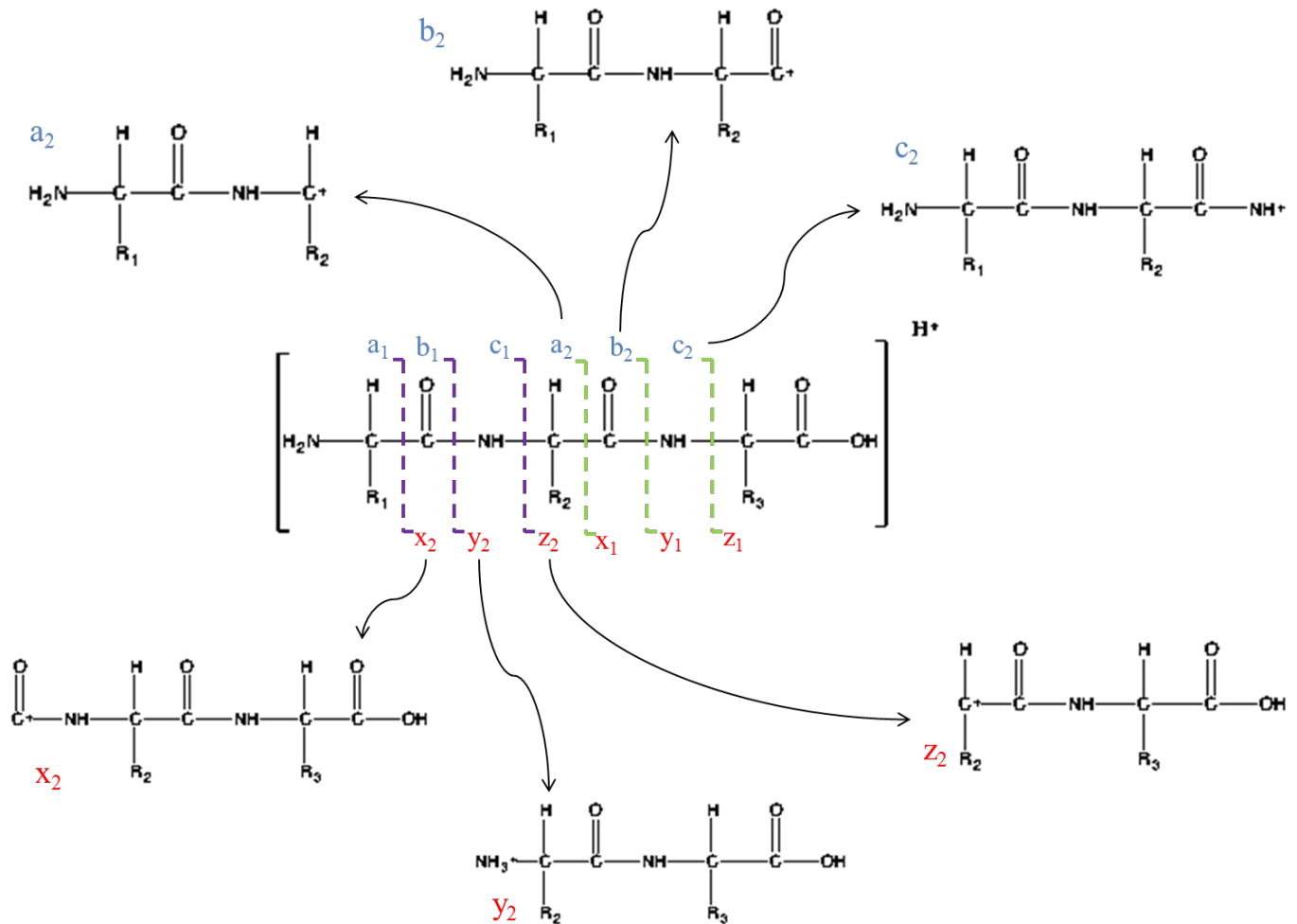


Figure 36 : Principe de la fragmentation peptidique en mode positif. Les fragments a, b et c contiennent l'extrémité N-terminale, tandis que les fragments x, y et z possèdent l'extrémité C-terminale du peptide. Le numéro indiqué correspond au nombre d'acides aminés contenu par le fragment.

Dans une cellule de collision CID à faible énergie, les fragments b_n et y_n sont majoritairement observés car il y a une coupure préférentielle au niveau de cette liaison peptidique. En revanche, dans une cellule de collision HCD l'énergie utilisée est plus élevée, générant aussi des ions de séries a_n, x_n, c_n et z_n. L'analyse du spectre MS/MS permet donc de déduire la séquence peptidique à partir des différences de masse observées entre les fragments consécutifs d'une même série (Figure 37). L'analyse des spectres MS/MS est aussi facilitée

par l'utilisation de banques de données en établissant une corrélation de similarité entre les spectres MS/MS expérimentaux et les spectres théoriques (Steen and Mann, 2004), ce qui permet d'identifier un grand nombre de peptides de façon fiable.

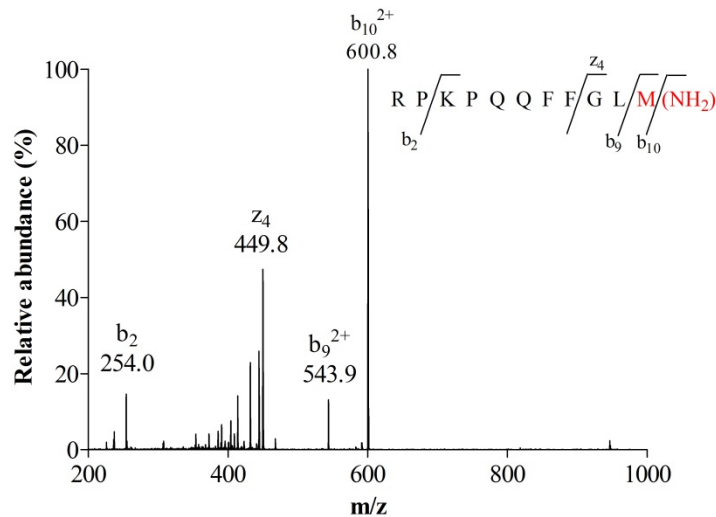


Figure 37 : Spectre MS/MS de la substance P obtenu avec une cellule de collision CID, permettant de déterminer à quel fragment de la séquence peptidique correspondent les valeurs des rapports m/z obtenues sur le spectre, grâce à une simulation des masses théoriques.

II.5.7 Les détecteurs

Il existe différents types de détecteurs permettant de compter les ions et d'amplifier le signal. Les trois plus courants sont le cylindre de Faraday, le multiplicateur d'électrons et le multiplicateur de photons.

Dans le cylindre de Faraday, les ions positifs sont neutralisés par les électrons au niveau du collecteur. Le voltage à travers la résistance permet une mesure du courant ionique. Le signal est ensuite amplifié. La petite électrode en métal placée dans la cage de Faraday intercepte les ions positifs. Sa position inclinée permet d'éjecter les ions non détectés (Figure 38). Le courant d'ions mesuré et amplifié est directement proportionnel au nombre d'ions et de charges par ion. La réponse du cylindre de Faraday est indépendante de l'énergie, de la

masse ou de la nature chimique des ions. Cette technique est précise mais peu sensible, avec une certaine lenteur de mesure et un important bruit de fond.

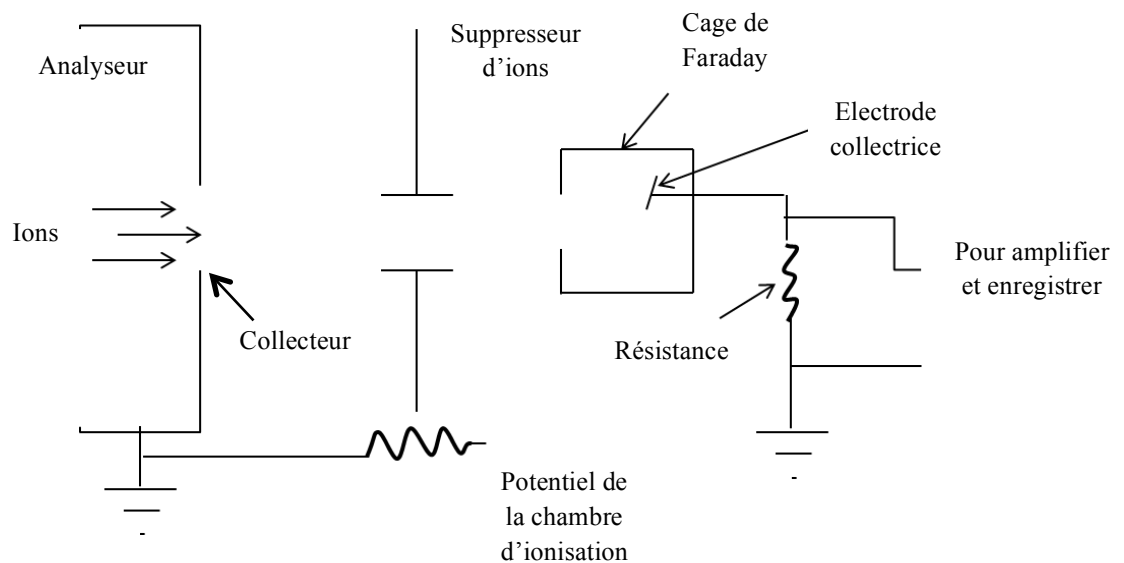


Figure 38 : Diagramme conceptuel du cylindre de Faraday (d'après Watson, 1972).

Le multiplicateur d'électrons est le détecteur le plus utilisé. Il utilise le principe de l'émission d'électrons secondaires pour amplifier le signal (Harris *et al.*, 1984). Le faisceau d'ions sortant de l'analyseur est focalisé sur la dynode de conversion qui émet des électrons directement proportionnels au nombre d'ions présents (conversion ions à électrons). Les électrons secondaires obtenus avec la dynode sont accélérés et focalisés sur une seconde dynode qui émet à son tour des électrons secondaires (conversion électrons à électrons). L'amplification est donc réalisée par une cascade de conversion (Fies, 1988). Chaque étape est connectée à un potentiel de plus en plus élevé, et le collecteur final (ou anode) est connecté à un amplificateur conventionnel (Figure 39). Il possède une bonne sensibilité avec une amplification forte, mais il est moins précis que le cylindre de Faraday et a une durée de vie limitée.

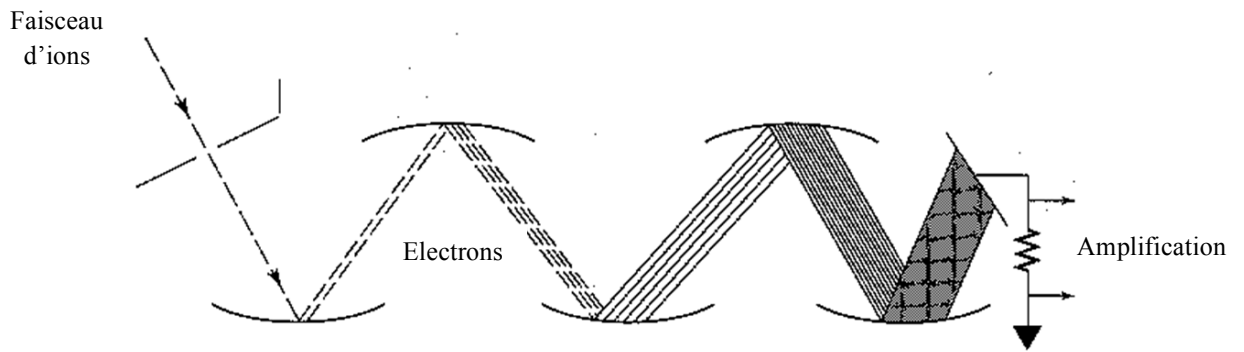


Figure 39 : Diagramme conceptuel du multiplicateur d'électrons avec dynode (d'après McFadden, 1973).

Le multiplicateur de photons est dérivé du multiplicateur d'électrons en détectant les photons. Un photon entrant (ici nommé « *scintillation photon* ») frappe la photo-cathode et libère un électron. Celui-ci est ensuite accéléré vers une plaque métallique appelée dynode, où l'impact libère plus d'électrons (typiquement deux électrons sont générés). Ceux-là sont à leur tour accélérés vers une seconde dynode et chaque électron génère deux électrons supplémentaires. De cette façon, le nombre d'électrons obtenus augmente exponentiellement. A la fin, tous les électrons libérés sont collectés par l'anode où ils produisent un courant électrique pulsé qui est mesuré (Figure 40). Ce détecteur présente une bonne sensibilité avec une amplification forte, mais le balayage est moins rapide qu'avec un multiplicateur d'électrons.

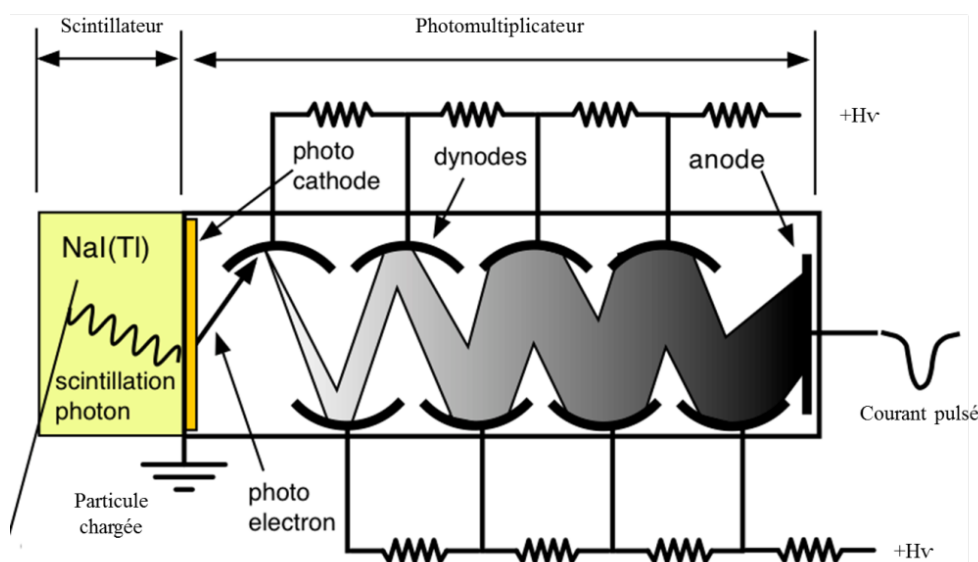


Figure 40 : Diagramme conceptuel du multiplicateur de photons (d'après le site internet http://wanda.fiu.edu/teaching/courses/Modern_lab_manual/scintillator.html).

II.6 Les autres méthodes de dosage en peptidomique

II.6.1 Le dosage des peptides par HPLC-Fluorescence

Il existe plusieurs autres méthodes de détection utilisées en parallèle en peptidomique pour compléter les analyses HPLC-MS, dont l'HPLC-fluorescence. Différentes approches avec l'HPLC-fluorescence sont possibles. Soit le peptide contient des résidus acides aminés possédant des chaînes latérales aromatiques tels que la tyrosine, le tryptophane ou la phénylalanine. Ces acides aminés émettent à des longueurs d'onde spécifiques : la phénylalanine émet avec un maximum à 282 nm, la tyrosine émet avec un maximum à 303 nm et le tryptophane émet avec un maximum à 350 nm. L'absorption des peptides (et protéines) a lieu à 280 nm, due à la présence de tyrosine et de tryptophane. Si le peptide absorbe à des longueurs d'onde plus hautes que 295 nm, ceci est dû principalement au tryptophane qui s'excite en fluorescence entre 295-305 nm (Ladokhin, 2000).

Le peptide peut aussi être marqué avec une molécule absorbant en fluorescence, comme l'utilisation du monobromobimane qui est un réactif lipophile réagissant sur les cystéines libres des peptides (Petrotchenko *et al.*, 2006). Ces marquages sont souvent dérivés

sur les cystéines, imposant donc un peptide possédant des résidus cystéines (Wheeler *et al.*, 2003).

II.6.2 Le dosage des peptides par EIA

Le dosage des peptides par EIA (*enzyme immunoassay*) est aussi utilisé. Cette technique met en jeu une compétition d'antigènes. Par exemple, Fehder *et al.*, ont conjugué SP avec l'acétylcholinestérase (l'enzyme jouant le rôle de marqueur), qui produit par une succession de réactions, l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque, possédant un maximum d'absorbance à 412 nm (Fehder *et al.*, 1998). L'acétylcholinestérase est stable à un pH physiologique et son activité n'est pas inhibée en présence de tampons. Cette méthode permet de quantifier le complexe SP-acétylcholinestérase et de le détecter grâce aux propriétés d'absorption de l'acétylcholinestérase.

II.6.3 Le dosage des peptides par ELISA

Les peptides peuvent aussi être dosés par la méthode ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), développée au début des années 1970 (Engvall and Perlmann, 1971 ; van Weemen and Schuurs, 1972). Cette méthode utilise un anticorps et plusieurs approches sont possibles, dont l'approche *en sandwich* (Figure 41) pour laquelle une quantité connue d'anticorps dirigés contre le peptide d'intérêt est fixée sur une surface. Un second anticorps est lié à une enzyme et dirigé contre le peptide d'intérêt qui est ajouté à ce moment. Un substrat est ajouté et sera converti par l'enzyme liée au second anticorps. Cette conversion est accompagnée de l'émission de photons qui seront détectés. Le nombre de photons émis est proportionnel à la concentration de la protéine d'intérêt. Il existe aussi le dosage en ELISA *par compétition* (Figure 41) où un antigène marqué est ajouté à l'échantillon contenant l'antigène à doser. Il y aura compétition entre l'antigène à doser et l'antigène marqué pour se

fixer sur les anticorps. Après élimination des réactifs non fixés (antigènes marqués et non marqués en excès), le signal est mesuré. Puisque le signal provient exclusivement de l'antigène marqué, plus le signal est important, plus d'antigène marqué est lié aux anticorps.

La méthode ELISA est très sensible mais plusieurs problèmes sont rencontrés dont l'indisponibilité de l'anticorps dirigé contre le peptide d'intérêt ou la validation d'un choix d'anticorps (Whiteaker *et al.*, 2011), la présence d'auto-anticorps qui reconnaissent l'épitope du peptide à doser empêchant le peptide d'intérêt de se lier à l'anticorps ajouté lors du dosage et donc faussant les résultats (Taylor *et al.*, 2008), des problèmes de réactivités croisées (Mayer and Hudrisier, 2012) si la séquence d'épitope choisie pour l'anticorps peut se fixer sur d'autres surfaces ou sur d'autres molécules possédant une séquence similaire au peptide d'intérêt (e.g. SP et ses métabolites). SP a déjà été dosée par la méthode ELISA (Otsuka *et al.*, 2011).

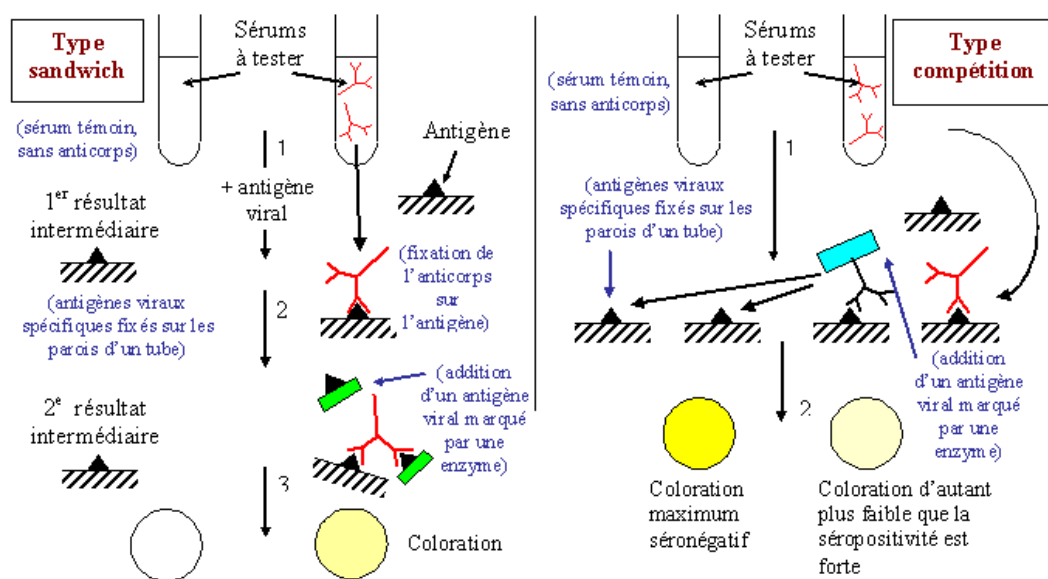


Figure 41 : Schéma d'explication de la méthode de dosage par ELISA. A gauche, le type ELISA en sandwich est présenté, et à droite, la méthode ELISA en compétition (d'après Dolisi G, http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_prevention.htm).

II.6.4 Le dosage des peptides par RIA

En peptidomique, la technique de RIA (*radioimmunoassay*) est une méthode d'immunodosage par compétition, utilisant un anticorps spécifique couplé à un antigène purifié associé soit au peptide marqué radioactivement, soit au peptide d'intérêt non marqué. En sachant la concentration d'antigène ajoutée à l'échantillon, il est possible de doser le peptide ciblé. Par exemple, la SP ¹²⁵I a déjà été utilisée pour doser SP dans le plasma (Fernandez-Rodriguez *et al.*, 1995).

II.6.5 Le dosage des peptides par IHC

Le dosage peptidique par immunohistochimie (IHC ou *immunohistochemistry*) a été mis en place par le Dr Albert Coons en 1941 (Coons *et al.*, 1941). Il consiste en la liaison du peptide d'intérêt avec un antigène, reconnaissant un anticorps spécifique. Cet anticorps est soit conjugué à une enzyme catalysant une réaction colorée et permettant donc le dosage du complexe, soit marqué avec un fluorophore, rendant possible la détection en fluorescence. Cette méthode de dosage permet de marquer directement les cellules d'une coupe de tissu, et de suivre la différence d'expressions de peptides selon les zones observées, comme par exemple dans une coupe de cerveau où le marquage permet de connaître les zones qui surexpriment les analytes cibles. SP a aussi déjà été dosée par cette méthode (Johansson *et al.*, 1981).

II.7. Les méthodes de quantification absolue et relative en peptidomique par HPLC-MS

Il existe tout un panel de stratégies de quantification utilisées en spectrométrie de masse, pour l'étude des peptides. L'application d'une méthode au profit d'une autre dépend fortement de l'utilisation souhaitée des résultats obtenus ainsi que de la nature de ce qui est

quantifié. Suivant la stratégie utilisée, la quantification sera dite absolue ou relative (Griffiths and Wang, 2009).

La quantification absolue est réalisée à l'aide d'un standard externe et permet d'exprimer la concentration de la molécule cible en valeur absolue déterminée à partir de la concentration connue du standard. La quantification relative consiste à comparer les aires sous les pics des analytes d'intérêt, d'au moins deux groupes d'échantillons comme, par exemple, un groupe contrôle sain et un ou plusieurs groupes pathologiques. Ces deux méthodes de quantification peuvent être effectuées sans marquage (« *label free* ») ou avec un marquage, isotopique ou non (Figure 42).

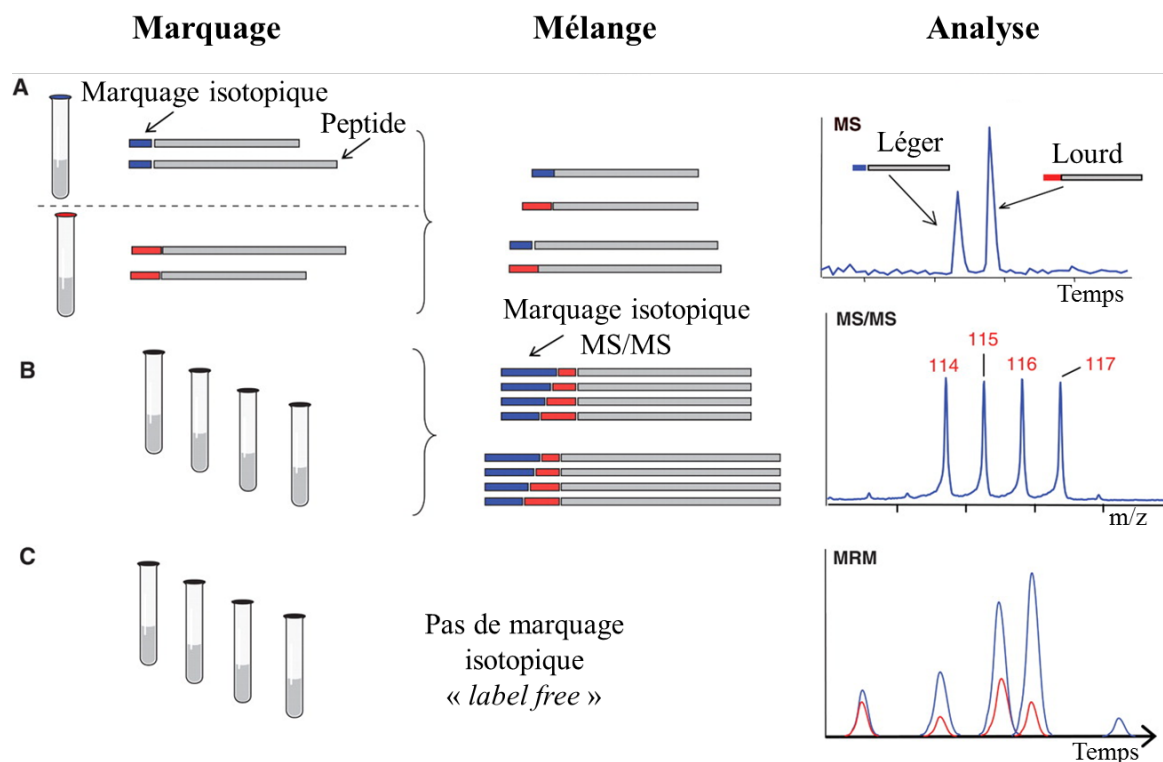


Figure 42: Différentes approches pour la quantification en peptidomique. (A) Quantification utilisant les dilutions isotopiques. (B) Quantification utilisant les marquages isotopiques par MS/MS avec incorporation d'un groupement isobarique avec un ion fragment rapporteur de masse différente. (C) Quantification sans marquage donc sans modification de l'échantillon (d'après Domon and Aebersold, 2006).

La Figure 42-A illustre la quantification par dilution isotopique menant à la comparaison de signal d'un peptide « léger » non marqué, et d'un peptide « lourd » marqué

isotopiquement, dans une même analyse HPLC-MS. En peptidomique, ce marquage est incorporé de façon chimique (Ong *et al.*, 2003). La différence de masse entre le peptide « léger » et le peptide « lourd » dépend du nombre d'atomes lourds incorporé (^{13}C , ^{15}N , ^2D) sur les résidus acides aminés du peptide. Le plus souvent, ce sont les résidus glycine et leucine qui sont marqués car la réaction est simple et facilement contrôlable. Dans le cas de ce marquage, les propriétés physico-chimiques restent relativement similaires. La méthode par dilution isotopique avec incorporation d'atomes de deutérium stables a été utilisée pour ce projet, pour une quantification relative du ratio entre le signal du peptide non marqué et celui du peptide marqué, permettant de savoir si un peptide est sur- ou sous-exprimé pour la pathologie étudiée.

Il existe aussi des marquages par dérivatisation chimique réalisée directement au laboratoire, rapides et peu onéreux. Par exemple, le marquage par acétylation du peptide sur l'acide aminé N-terminal et/ou sur la lysine de la chaîne latérale avec l'acétique anhydride, illustré sur la Figure 43, peut être envisagé (Che and Fricker, 2002). Les peptides sont soit marqués H_6 (léger), soit D_6 (lourd), ce qui permet de les différencier par leurs masses respectives.

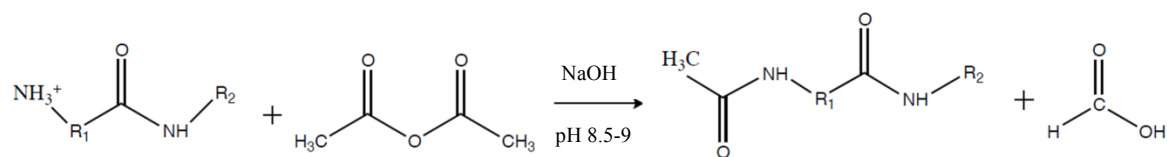


Figure 43 : Principe du marquage chimique par dérivatisation à l'acétique anhydride (d'après Che and Fricker, 2002).

La Figure 42-B propose une quantification basée sur l'incorporation d'un marquage isotopique isobarique de type réactifs iTRAQTM (*isobaric tag for relative and absolute quantification*) permettent le marquage des peptides sur le groupement amine de l'extrémité

N-terminale (Ross *et al.*, 2004). Ce type de marquage est constitué de trois parties : l'ion rapporteur qui est chargé et possède des masses allant de 113 à 121 amu, la balance neutre qui possède des masses allant de 24 à 32 amu et un groupement réactif peptidique constant (Figure 44). Ce marquage est dit isobarique car la masse totale du marqueur est constante et vaut 145 amu. Ce type de marquage permet d'observer des effets de modulation dans le temps comme un suivi cinétique. Ces fragments rapporteurs sont détectés lors de l'analyse MS/MS et la quantification est réalisée par comparaison des intensités des ions fragments cibles. Avec cette approche, il est possible de comparer jusqu'à quatre conditions expérimentales différentes en une seule analyse, augmentant la sensibilité MS.

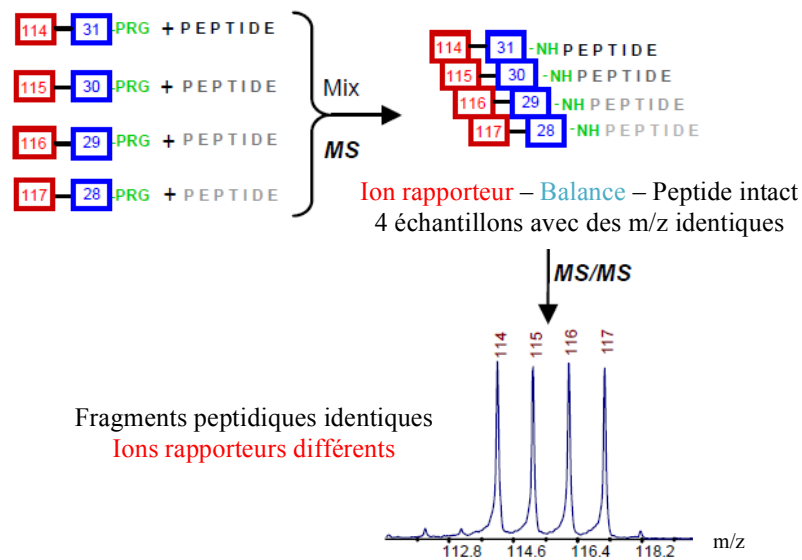


Figure 44 : Principe du marquage iTRAQTM : chaque échantillon est marqué avec un des ions rapporteurs. Puis les échantillons sont mélangés ensemble. Les fragments obtenus ont la même masse, mais ce sont les ions rapporteurs qui sont suivis car ils sont différents (d'après le protocole iTRAQTM Reagent, AB Sciex).

Les peptides peuvent aussi être marqués selon le marquage non-isobarique mTRAQTM (*mass-tagging for relative and absolute quantification*) sur le groupement amine de l'extrémité N-terminale (Figure 45). Ce réactif est aussi constitué de trois parties : l'ion rapporteur chargé marqué $\Delta 0$, $\Delta 4$ ou $\Delta 8$, la balance neutre et le groupement PRG (Applied

Biosystems mTRAQ™ Reagents Protocol, 2009). Pour ce type de marquage, le marqueur complet (ion rapporteur + balance) ne possède pas la même masse totale selon le nombre d'isotopes stables incorporés. Ce marquage est dit « non-isobarique ». Ce type de marquage permet de conserver l'information structurale, d'obtenir des données sur des modifications post-traductionnelles et de détecter des peptides marqués avec une différence de masse de 4 amu.

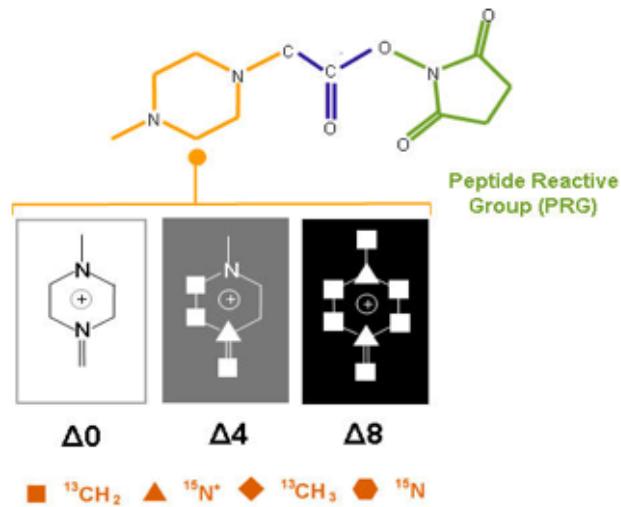


Figure 45 : Principe du marquage mTRAQ™ (d'après le protocole mTRAQ™ Reagent, AB Sciex).

Tous ces marquages sont très utilisés en protéomique de type ascendante (*bottom-up*), mais il faut prendre en compte certains problèmes qui peuvent être rencontrés lors de la quantification utilisant des marquages. La Figure 46-A montre qu'un spectromètre de masse de résolution unitaire permettrait une séparation fiable de ces deux échantillons. En revanche, la Figure 46-B indique que les ions précurseurs monitorés pour chaque marquage possèdent des masses trop proches, ne permettant pas d'être isolés adéquatement avec un instrument de résolution unitaire. Avant d'opter pour un type de marquage ou d'étalon interne, il faut donc prendre en considération les problèmes de pollution isotopique (Pailleux and Beaudry, 2012).

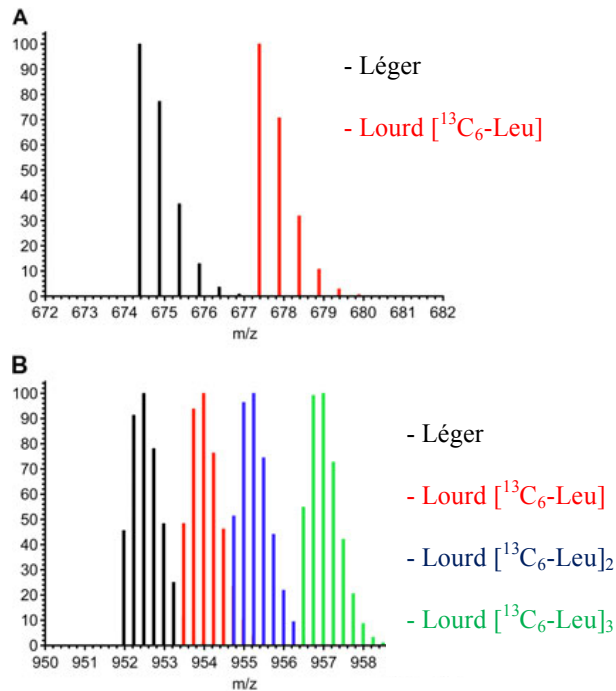


Figure 46 : Simulation in silico de clusters isotopiques : (A) séparation résolue des deux isotopes ; (B) pollution isotopique (d'après Pailleux and Beaudry, 2012).

La méthode de quantification par « *label free* » (Figure 42-C) est une technique de plus en plus utilisée en peptidomique, car elle ne nécessite aucune préparation chimique et donc aucune modification de l'échantillon, conservant l'intégrité des échantillons peptidiques à analyser. Elle permet aussi d'analyser un grand nombre de peptides simultanément. C'est une méthode sans marquage, avec (e.g. incorporation de peptides naturels) ou sans standard interne. Dans un premier temps, il faut aligner les transitions de masses sélectionnées afin de s'assurer qu'elles correspondent à la structure du peptide ciblé. Ensuite, il faut optimiser ces transitions utilisées pour créer une méthode analytique sensible. Puis, il faut traiter statistiquement ces transitions. Comme illustré sur la Figure 47, cette quantification est basée sur la comparaison de profils MS et la comparaison de l'intensité du signal observée entre deux échantillons (Le Bihan *et al.*, 2006). Ceci permet de corréliser les changements de concentrations peptidiques entre différents phénotypes et/ou génotypes (e.g. *wild-type versus knock-out*) et de comparer un nombre illimité d'échantillons même si chaque échantillon doit

être analysé individuellement. Mais, chaque variation dans la préparation d'échantillon amène plusieurs erreurs expérimentales qui ne peuvent pas être corrigées par un étalon interne pour cette méthode de quantification. Le biais expérimental peut donc avoir un impact important sur le résultat final. Par conséquent, cette méthode de quantification nécessite des méthodes HPLC-MS reproductibles et fiables (Ong *et al.*, 2003).

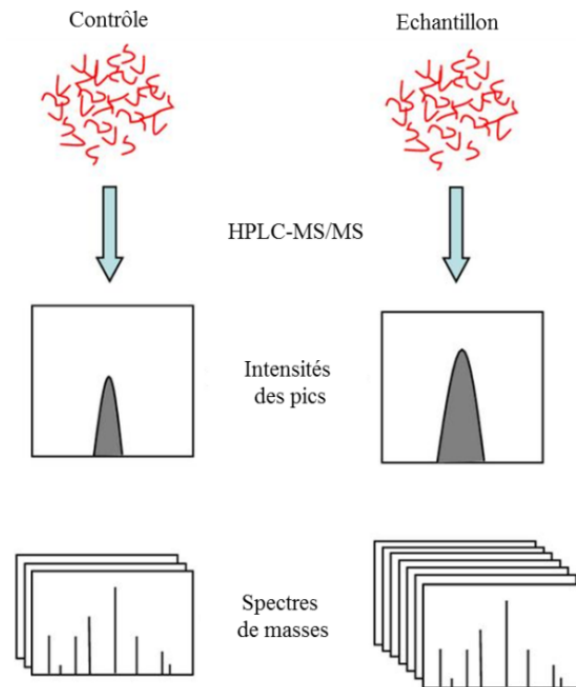


Figure 47 : Principe de quantification par label free. Les contrôles et les échantillons sont analysés séparément par HPLC-MS/MS. La quantification est basée sur la comparaison des intensités des pics (d'après Zhu *et al.*, 2009).

Pendant notre étude, nous avons essayé différentes méthodes de quantification sur les neuropeptides cibles. Finalement, c'est la quantification par dilution isotopique qui a été choisie pour réaliser ce projet, car c'est la méthode qui s'est avérée la plus reproductible, la plus fiable, et qui a permis de diminuer les variations instrumentales et techniques afin d'obtenir des résultats analytiques intègres.

III. La douleur

Selon l'association internationale de la douleur, IASP (*international association for study of pain*), la douleur est décrite comme une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable résultant d'une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en de tels termes (d'après le site de l'IASP, 2013). Avec l'augmentation de l'espérance de vie, de plus en plus de personnes ont vécu ou vivent avec des problèmes de douleur chronique. C'est un problème de santé publique mondiale qui concerne la qualité de vie des patients. Même s'il existe une classification des différents types de douleur, il reste difficile d'établir un plan de traitement de cette douleur actuellement, puisqu'il reste encore de nombreuses inconnues au niveau des symptômes et des mécanismes moléculaires centraux impliqués dans l'activation des voies de signalisation et d'inhibition de la douleur. Il est donc important d'améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires centraux.

III.1 Anatomie et physiologie de la douleur

Il existe trois types de douleur qui sont classés douleur nociceptive (ou aigüe), douleur inflammatoire et douleur neuropathique.

III.1.1 La douleur aigüe et la douleur inflammatoire

La douleur aigüe est une sensation vive et immédiate, déclenchée par le système nerveux pour alerter l'ensemble de l'organisme. C'est une douleur d'installation récente, considérée comme un symptôme entraînant une démarche diagnostique afin d'en préciser l'origine pour en diminuer la cause et limiter les conséquences. Il s'agit, en général, d'un mécanisme générateur simple qui n'implique pas de lésions tissulaires importantes. Lors

d'une lésion tissulaire accompagnée d'inflammation, d'autres mécanismes locaux sont mis en jeu, impliquant les cellules du système inflammatoire.

III.1.2 La douleur neuropathique

Cette douleur est due à une atteinte fonctionnelle ou pathologique des systèmes nerveux périphérique et central, et qui perdure dans le temps même lorsque la réparation tissulaire a eu lieu. Une douleur est définie comme chronique si elle perdure au-delà de 6 mois (Turk and Okifuji, 2001). Dans cette situation, la douleur n'a plus une valeur protectrice, mais est plutôt destructrice que ce soit sur le plan physique que psychologique et même social. La douleur neuropathique induit principalement deux signes cliniques caractéristiques, l'hyperalgésie et l'allodynie. Les principales pathologies pouvant entraîner une douleur neuropathique sont d'origine métabolique, nutritionnelle, infectieuse, médicamenteuse, toxique, néoplasique, vasculaire ou traumatique (Wattier, 2013). Cependant, les douleurs neuropathiques peuvent aussi être causées par des lésions ou des désordres affectant la moelle épinière ou le cerveau comme des tumeurs, des accidents vasculaires cérébraux, l'épilepsie ou des troubles neurodégénératifs (d'après le site du NIH, 2013). Des facteurs génétiques semblent aussi contribuer à l'établissement de certaines douleurs neuropathiques (Dominguez *et al.*, 2012). Sur le plan fondamental, les douleurs neuropathiques sont liées à un dysfonctionnement des mécanismes de contrôle et de transmission des messages nociceptifs.

Les symptômes d'une douleur neuropathique reflètent soit un état d'hyperexcitabilité du système nerveux, soit une diminution du seuil de douleur. La classification selon le site anatomique divise les douleurs neuropathiques en origine centrale, périphérique ou mixte.

Une douleur neuropathique peut se développer lorsque les fibres nerveuses ne peuvent pas se régénérer, induisant alors la formation d'un névrome. Des facteurs neurotrophiques et

des cytokines sont produits sur ce site, entraînant le développement d'activités ectopiques au sein des fibres C de la corne dorsale, contribuant à l'apparition d'allodynie tactile, une caractéristique typique de la douleur neuropathique.

III.2 La neurophysiologie de la douleur

Suite à une lésion, le message nociceptif est véhiculé par différents types de fibres nerveuses qui sont des nocicepteurs sensibles à des stimuli thermiques, mécaniques et chimiques. Ces fibres interviennent tour à tour, selon la phase de douleur (Figure 48).

Les fibres A β sont de grosses fibres myélinisées, de diamètre 6 à 12 μm , à conduction rapide (vitesse de conduction comprise entre 35 et 75 m/s), qui participent à la transmission d'informations non nociceptives, comme le toucher léger, ainsi qu'à la modulation de la douleur (Marchand, 2005). Lors de douleur neuropathique, il y a une désinhibition au niveau de la corne dorsale de la moelle, rendant ces fibres responsables du phénomène d'allodynie (Spicher *et al.*, 2008) et permettant la libération de SP (Malcangio *et al.*, 2000). Les fibres A β régulent l'information nociceptive en entraînant un effet d'inhibition sur la douleur perçue via le phénomène de la « théorie du portillon » énoncé par Melzack et Wall. Ce phénomène identifie le recrutement d'interneurones inhibiteurs dans la substance gélatineuse de la corne dorsale par ces fibres dans la moelle (Basbaum and Jessell, 2000; Marchand, 2005). De plus, le recrutement des fibres A β permet une augmentation de l'excitabilité neuronale par une altération de l'influx intramembranaire d'ions chlorure des neurones de la corne dorsale (De Koninck, 2007). Cela survient en conséquence d'une diminution de la fonction de la pompe KCC2 à co-transporteur K⁺/Cl⁻ retrouvée sur les terminaisons postsynaptiques des neurones de projection qui élimine l'action hyperpolarisante de certains neurotransmetteurs inhibiteurs

(l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine), entraînant la perte des neurones GABA. Le GABA est le principal neurotransmetteur qui inhibe l'émission des potentiels d'action par les neurones, chez les mammifères.

Les fibres A δ sont des fibres myélinisées de plus petit calibre que les fibres A β (diamètre de 1 à 5 μm), qui conduisent des informations nociceptives relativement rapidement (5 à 30 m/s) avec un seuil de recrutement élevé. Les fibres A δ représentent la plus grande majorité des fibres myélinisées et répondent à des stimulations mécaniques ou thermiques intenses, traduisant donc l'allodynie et l'hyperalgésie en diminuant le seuil de réponse mécanique et thermique de ces récepteurs. Ces fibres sont responsables de la première douleur suite à une stimulation nociceptive (Bouhassira, 2009).

Les fibres C sont de petites fibres polymodales amyéliniques (diamètre de 0.2 à 1.5 μm) qui envoient des informations lentes et diffuses (vitesse de conduction de 0.5 à 2 m/s) et répondent à des stimulations nociceptives. Les fibres C répondent à des stimulations thermiques, chimiques ou mécaniques. Puisque les fibres C sont de lents conducteurs, elles sont responsables de la seconde douleur, plus tardive et diffuse entraînée par une stimulation nociceptive de type brûlure (Bouhassira, 2009). Ces fibres C sont importantes au niveau de l'intensité de la douleur ressentie. Il a aussi été prouvé que le recrutement à haute fréquence des fibres C produit une augmentation du nombre de potentiels d'action des fibres de la moelle épinière : c'est le phénomène appelé *windup* (Mendell, 1966). Lors de ce phénomène, une réponse croissante des neurones est observée face à une stimulation croissante et répétée. Ceci induira la libération de nombreuses substances dont les neuropeptides (Marchand, 2005). Les cellules deviendront hyperexcitables et activeront l'expression de gènes. Ces

modifications diminueront la sensibilité du neurone secondaire qui répondra, par la suite, à plus haute fréquence à des stimulations nociceptives (hyperalgésie) ainsi qu'à des stimulations non-nociceptives (allodynie).

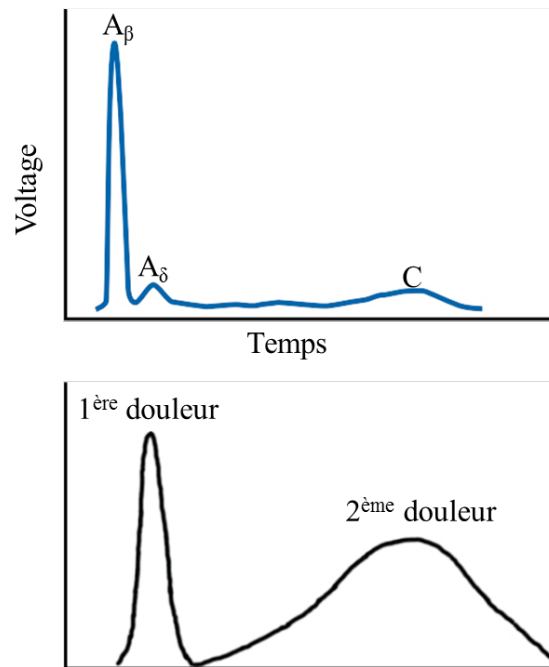


Figure 48 : Schéma représentant l'action des différentes fibres en fonction du stade de la douleur (d'après Julius and Basbaum, 2001).

La transmission de la douleur implique plusieurs parties du système nerveux (Willis and Chung, 1987; Willis, 2007). La Figure 49 représente la neuro-anatomie des voies nerveuses chez les mammifères qui sont divisées en deux grandes catégories : le SNP (de la périphérie jusqu'à l'entrée au niveau de la moelle épinière avec l'implication des neurones primaires) et le SNC (de la moelle épinière jusqu'aux centres supérieurs d'interprétation en passant par tous les noyaux du tronc cérébral et des noyaux sous-corticaux, et donc l'implication des neurones secondaires) (Bear *et al.*, 1997). La voie neuronale responsable de la sensation de douleur débute avec l'activation des neurones sensoriels primaires qui, suite à un premier contact synaptique au niveau de la moelle épinière, active les neurones secondaires. Une partie de ces neurones secondaires va stimuler les neurones moteurs réflexes

responsables de la réponse de retrait rapide, et l'autre partie génère la sensation de douleur par projection jusqu'au cortex somatosensoriel *via* le thalamus (Simone *et al.*, 1991). Suivant le type de douleur et les sensations perçues, ce ne sont pas les mêmes zones du système nerveux qui sont mises à contribution. Les voies ascendantes de la douleur se divisent en fonction de leur lame d'origine dans la moelle épinière (Bernard and Gauriau, 2004). Il existe deux voies principales qui transmettent les informations nociceptives : la voie spinothalamique latérale et la voie spinoréticulaire médiane (Marchand, 2005).

L'aspect désagréable de la douleur serait généré par des voies issues de la moelle épinière et activant le cortex préfrontal, les amygdales et le noyau accumbens, l'insula et serait accompagné de changements dans la fonction d'autonomie, des cycles du sommeil et de l'humeur.

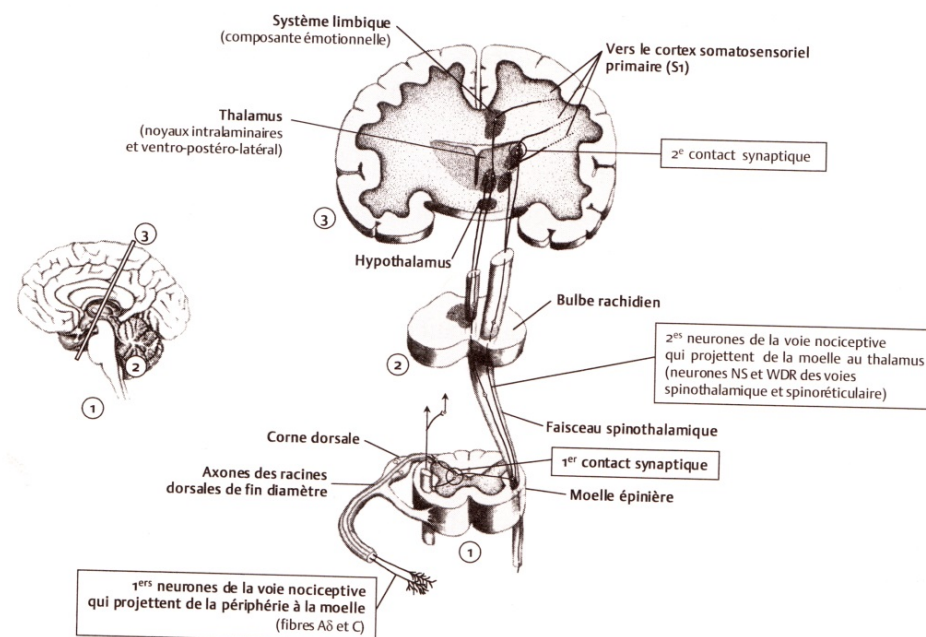


Figure 49 : Schéma des voies de perception de la douleur (Marchand, 2005).

III.2.1 Les neurones sensoriels primaires

Les terminaisons périphériques du neurone sensoriel primaire convergent, ce qui provoque un changement de l'activité neuronale lors de la transduction des stimuli mécaniques, thermiques ou chimiques, et produit un potentiel dû à un flux ionique (Julius and Basbaum, 2001). De nombreux facteurs sont impliqués au niveau de la transmission de la douleur. Les informations nociceptives sont transmises de la périphérie au SNC, notamment grâce à certains canaux sodiques spécifiques, dont les $Na_{V1.7}$ et $Na_{V1.8}$, qui jouent un rôle clé au sein des douleurs chroniques (Lai *et al.*, 2003). En réponse à une dépolarisation locale de la membrane, un influx de Na^+ est observé, générant une variation de potentiel au niveau des terminaisons périphériques des nocicepteurs. Ceci provoque une excitabilité de la membrane et module la propagation des potentiels d'action des terminaisons périphériques au SNC (Wood and Baker, 2001). La nociception implique la détection de variations de températures, de stimuli mécaniques, ainsi que la présence de substances chimiques libérées par les cellules endommagées. Ces nocicepteurs sont impliqués dans le signal de douleur aiguë et contribuent aussi à la persistance des conditions pathologiques de la douleur.

III.2.2 La corne dorsale

La corne dorsale est depuis longtemps considérée comme une « plaque tournante » qui régule le débit et l'activité périphérique (Melzack and Wall, 1965). Comme illustré sur la Figure 50, la corne dorsale est composée de différentes couches appelées des laminae d'où arrivent et partent les informations nociceptives. Suite à une lésion, des molécules sensorielles situées aux terminaisons nerveuses libres des nocicepteurs convertissent les stimuli en potentiel synaptique. Lorsque leur amplitude est suffisamment élevée, des potentiels d'action sont amorcés et conduits par les axones jusqu'à la corne dorsale de la moelle en empruntant les racines dorsales des nerfs spinaux (Schaible and Richter, 2004). À l'intérieur de la corne

dorsale de la moelle épinière se produit un premier contact synaptique entre les fibres afférentes nociceptives et des neurones de projection. Dans la lamina I, les neurones de projection reçoivent l'influx des fibres A δ . Puisque les fibres A δ ont une vitesse de conduction relativement rapide, ces fibres sont responsables de la douleur dite primaire. Ces nocicepteurs sont responsables de la douleur localisée et précise tel un pincement de la peau. Elles sont sollicitées lors de stimuli thermiques et mécaniques de haute intensité. Les fibres A δ projettent vers la moelle et se retrouvent dans la lamina I de la corne dorsale de la moelle (Dickenson, 2004). Les neurones de projection recevant l'influx des fibres A δ , reçoivent aussi des influx venant des fibres C par l'intermédiaire d'interneurones dont le corps cellulaire se retrouve dans la lamina II. Les dendrites des neurones de la lamina V se retrouvent dans plusieurs laminae et font contact avec les axones terminaux des fibres afférentes (A δ et A β) ainsi qu'avec des interneurones qui ont un contact synaptique avec des fibres C (Basbaum and Jessell, 2000).

Les deux voies ascendantes principales qui transmettent l'influx nociceptifs entrent en jeu au niveau de la corne dorsale. La voie spinothalamique latérale projette vers les noyaux thalamiques latéraux et prend origine au niveau des laminae I, IV et VII de la corne dorsale de la moelle épinière. Ses axones se terminent dans la partie latérale du complexe ventro-basal et dans le groupe nucléaire postérieur du thalamus. Cette voie est d'afférence rapide avec des champs récepteurs précis et permet de localiser précisément d'où vient la douleur car les fibres sont ensuite projetées vers le cortex somatosensoriel (Marchand, 2005).

La stimulation sélective des fibres A β recrute des interneurones inhibiteurs dans la substance gélatineuse des cornes postérieures de la moelle. A leur tour, les cellules de cette substance gélatineuse régulent la dépolarisation de cellules plus profondes de la corne dorsale. Ceci donne naissance à la voie spinothalamique réticulaire (ou médiane) qui est

composée de fibres provenant des lames profondes VII et VIII. Ses axones cheminent d'abord dans la formation réticulée au niveau du tronc cérébral avant de projeter vers les noyaux thalamiques médians. Les signaux sont ensuite transmis à de nombreuses sphères du cortex ipsilatéral, notamment le lobe frontal et le système limbique. Cette voie, qui a des champs récepteurs plus larges et des fibres plus lentes, joue un rôle dans la mémoire et la perception désagréable liée à la douleur. Les modulations interindividuelles sont importantes face à cette composante (Marchand, 2005).

Au niveau de la corne dorsale, les récepteurs opioïdes μ , δ ou κ sont retrouvés en grande concentration, permettant de moduler la libération de vésicules remplies de glutamate, de CGRP et de SP (Fichna *et al.*, 2007).

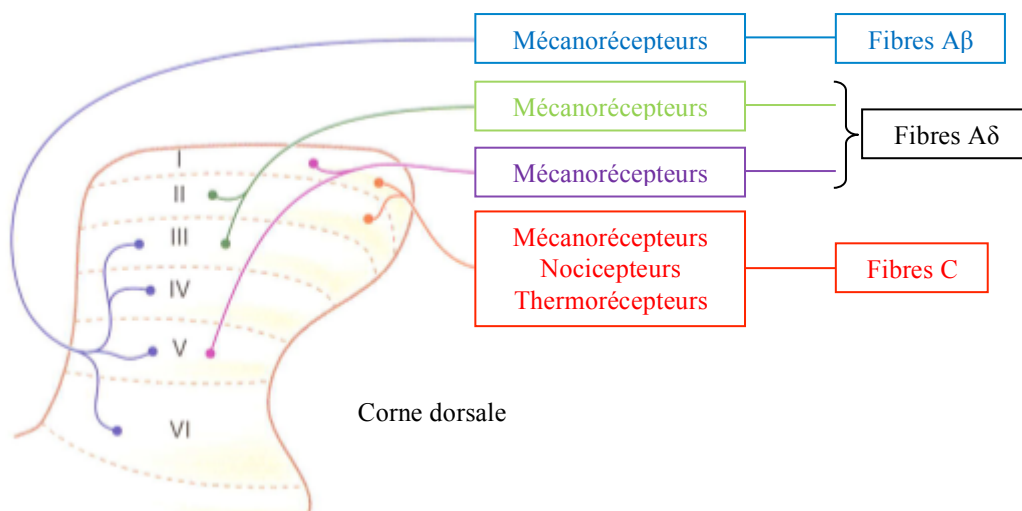


Figure 50 : Représentation schématique de la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres nerveuses sensorielles entrent dans la moelle épinière par la corne dorsale et se retrouvent dans les 6 couches (laminae) distinctes de la corne dorsale de la moelle épinière. Les axones des fibres peuvent se retrouver dans plusieurs laminae (d'après Rang *et al.*, 2007).

III.2.3 Le tronc cérébral et les hémisphères cérébraux

Les signaux nociceptifs passent par le tronc cérébral, l'hypothalamus, le thalamus et plusieurs régions corticales telles que les zones préfrontale, pariétale et insulaire. Le neurone

sensoriel primaire du SNP entre en contact avec le neurone secondaire spécifique ou non. Les fibres dites secondaires parviennent à la moelle épinière, et se dirigent vers les différents noyaux du thalamus. Deux voies majoritaires ascendantes transmettent les signaux nociceptifs de la corne dorsale au thalamus : la voie spinothalamique latérale qui projette ses fibres nerveuses vers les noyaux latéraux du thalamus, et la voie spinoréticulaire (ou spinothalamique médiane) qui projette ses fibres vers certaines structures du tronc cérébral ou vers les noyaux médians du thalamus. Les neurones des noyaux latéraux continuent leur chemin vers les centres corticaux sensori-discriminatifs du cortex somatosensoriel. Les neurones en provenance des noyaux médians projettent vers les centres corticaux motivo-affectifs du système limbique. Des études d'imagerie médicale montrent que le thalamus, les cortex somatosensoriels primaire (S1) et secondaire (S2), l'insula et le cortex frontal sont les principaux sites qui sont activés lors de stimulations thermiques douloureuses (Rainville *et al.*, 2001).

III.2.4 L'hyperalgésie

L'hyperalgésie est une augmentation de la perception du niveau de la douleur suite à une stimulation douloureuse. Il a été proposé que l'hyperalgésie pouvait s'exprimer sous deux formes : l'hyperalgésie primaire et l'hyperalgésie secondaire. Lors du déclenchement d'hyperalgésie primaire (Figure 51), il y a libération de différentes substances en périphérie, dont la bradykinine, les prostaglandines, l'histamine, la substance P ou la sérotonine, qui vont agir au niveau de nocicepteurs proches du site de lésion, et provoquer une sensibilisation (Julius and Basbaum, 2001). Cette réaction élèverait donc la disponibilité ou la quantité de neurorécepteurs, augmentant l'influx nerveux et la nociception.

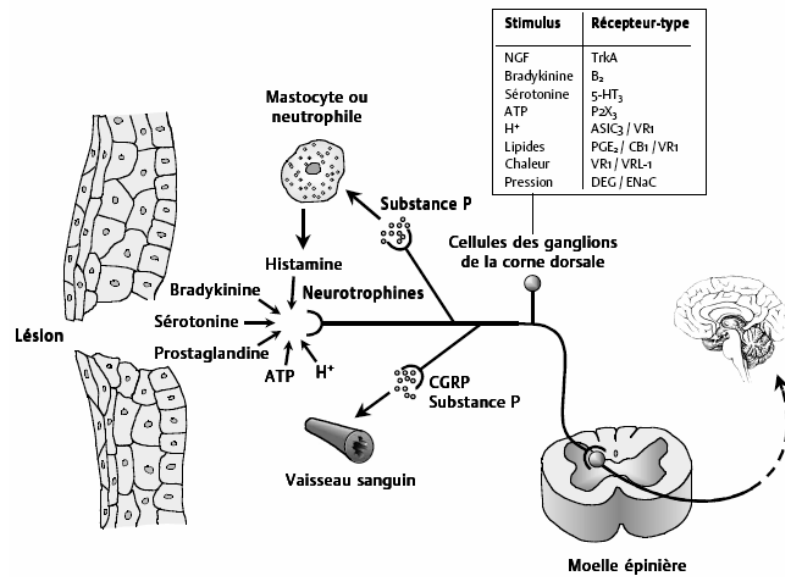


Figure 51 : Schéma de l'hyperalgésie primaire avec la mise en jeu de substances pronociceptives et des facteurs inflammatoires au niveau des tissus périphériques (d'après Julius and Basbaum, 2001).

Comme discuté précédemment, l'hyperalgésie primaire se développe en périphérie et met en jeu la diffusion du message nociceptif au niveau du système sanguin. Les facteurs inflammatoires, dont les neuropeptides comme SP, sont libérés dans les vaisseaux sanguins. Il est donc intéressant d'investiguer au niveau des concentrations plasmatiques des neuropeptides et de leurs métabolites.

L'hyperalgésie secondaire (Figure 52) entraîne une sensibilisation centrale (Rowbotham and Macintyre, 2003) et met en jeu l'interaction directe entre les neuropeptides et leurs récepteurs spécifiques au niveau des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière. Il est donc intéressant de quantifier la modulation d'expression des tachykinines à ce niveau.

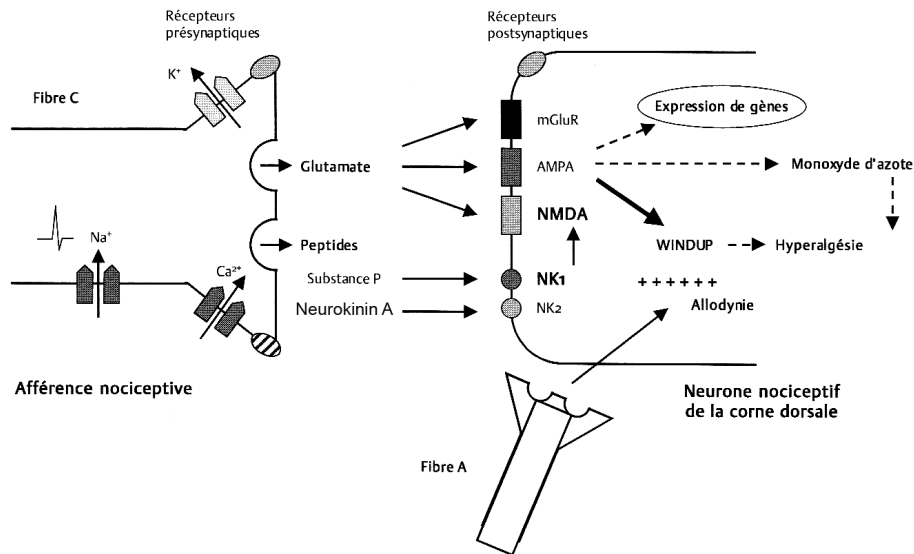


Figure 52 : Schéma représentant les mécanismes responsables de l'hyperalgésie secondaire au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière (Maloine, 1997).

III.2.5 L'allodynie

L'allodynie résulte d'une perception douloureuse suite à une stimulation non douloureuse. L'allodynie peut être causée par trois conditions différentes : 1) une sensibilité accrue des neurones de transmission de la douleur à la moelle épinière (c'est la sensibilisation centrale), 2) un abaissement des seuils d'activation des nocicepteurs (c'est la sensibilisation périphérique) (Julius and Basbaum, 2001) ou 3) une désinhibition des collatérales sensorielles sur les neurones des voies nociceptives (Keller *et al.*, 2007). L'allodynie peut être de nature thermique (au chaud ou au froid) ou mécanique (statique ou dynamique). Chez l'humain, la douleur neuropathique allodymique mécanique est provoquée par un stimulus tactile et est ressentie, par exemple, à la pression des vêtements sur la peau, un frôlement de la peau.

III.3 Les récepteurs et molécules agissant sur les nocicepteurs

Suite à une lésion de nature mécanique, thermique ou chimique, plusieurs substances seront libérées, activant les nocicepteurs qui sont des fibres sensibles aux stimuli

potentiellement nuisibles. Il existe plusieurs types de récepteurs aux petites molécules et aux peptides qui sont présents sur les nocicepteurs.

III.3.1 Les récepteurs neurokinines

Il existe trois principaux récepteurs des neurokinines, NK1, NK2 et NK3 qui sont les récepteurs préférentiels de trois tachykinines : la substance P (SP), la neurokinine A (NKA) et la neurokinine B (NKB), respectivement (Maggi, 2000). Cependant SP agit sur ces trois récepteurs neurokinines selon différents degrés d'affinité : majoritairement en se liant au récepteur NK1, puis NK2 et enfin NK3 (Harrison and Geppetti, 2001). Les tachykinines et leurs récepteurs sont largement distribués au niveau des SNC et SNP (Amadoro *et al.*, 2007). Les tachykinines se lient à leurs récepteurs de façon préférentielle mais pas exclusive. Les récepteurs neurokinines appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G.

NK1 est largement exprimé au niveau central et périphérique, et est présent dans les neurones, les cellules endothéliales vasculaires, les muscles et différents types de cellules immunitaires. Un stimulus nociceptif périphérique intense induit l'internalisation (déplacement du récepteur dans le cytoplasme du neurone) du récepteur NK1 dans les neurones de la lamina I (Mantyh, 2002). Durant l'inflammation, les neurones possédant des récepteurs NK1, internalisent le récepteur NK1 lors de la réponse à la stimulation nociceptive. L'internalisation du récepteur NK1 semble être un indicateur fiable et quantifiable de l'activité de ce récepteur (Trafton *et al.*, 1999), et pourrait potentiellement être un bon indicateur de l'activité de SP.

Le récepteur NK2 est détecté en périphérie au niveau des cellules musculaires lisses, certains types cellulaires neuronaux et des immunocytes, ainsi qu'au niveau des couches

intermédiaires de la corne dorsale (lamina II à IV) (Coggeshall and Carlton, 1997) et dans les noyaux spécifiques du cerveau (Pennefather *et al.*, 2004).

Le récepteur NK3 est abondamment exprimé au niveau du SNC et, bien que la NKB ne semble pas exprimée en périphérie, le récepteur NK3 est détecté dans quelques tissus périphériques (Pennefather *et al.*, 2004). Plus précisément, le récepteur NK3 a été retrouvé au niveau du cortex cérébral, du noyau du tractus solitaire et de la corne dorsale de la moelle épinière (Khawaja and Rogers, 1996).

III.3.2 Les récepteurs opioïdes

Trois principaux types de récepteurs opioïdes ont été identifiés : μ ou « MOR » (*morphine opioid receptor*), δ ou « DOR » (*delta opioid receptor*) (Evans *et al.*, 1992; Kieffer *et al.*, 1992) et κ ou « KOR » (*kappa opioid receptor*) (Chen *et al.*, 1993; Yasuda *et al.*, 1993). Un quatrième récepteur opioïde, ORL1 (*opioïde receptor like 1*), a aussi été recensé mais il n'est pas toujours considéré comme possédant une action opioïdergique (Mollereau *et al.*, 1994). Tous ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G de type $G_{i/o}$ et sont caractérisés par 7 domaines transmembranaires. Les ganglions de la racine dorsale, la moelle épinière, la substance grise périaqueducule (PAG) et la médulla rostroventrale (RVM) sont riches en récepteurs opioïdes qui sont également localisés au niveau des terminaisons périphériques des neurones afférents primaires (Stein *et al.*, 2001). Les fibres afférentes primaires possèdent approximativement 20% de récepteurs μ , 15% de récepteurs δ et 10% de récepteurs κ (Ji *et al.*, 1995). Les récepteurs opioïdes agissent donc à trois niveaux différents de la douleur : au niveau central, de la moelle épinière et en périphérie. Au niveau cellulaire, ils inhibent l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants réduisant ainsi la libération de neurotransmetteurs au niveau présynaptique. Les

opioïdes permettent aussi l'ouverture des canaux potassiques entraînant une hyperpolarisation cellulaire au niveau postsynaptique (Beaulieu, 2005). Au niveau central les récepteurs opioïdes se retrouvent principalement au niveau de régions impliquées dans la transmission et la modulation du message nociceptif, en particulier les voies descendantes inhibitrices mais aussi sur les voies ascendantes de la douleur. Au niveau spinal, les récepteurs opioïdes μ , δ ou κ sont retrouvés en grande concentration au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière et une de leurs actions est de moduler la libération de SP (Beaulieu, 2005).

Les récepteurs μ sont connus pour atténuer l'allodynie mécanique et l'hyperalgésie thermique (Porreca *et al.*, 2001 ; Burgess *et al.*, 2002). Pendant le processus inflammatoire, l'expression des récepteurs opioïdes est accrue et le transport axonal des récepteurs opioïdes à partir du corps cellulaire vers les terminaisons nerveuses périphériques des neurones afférents est augmenté.

III.3.3 Les récepteurs vanilloïdes

Les récepteurs vanilloïdes sont des canaux cationiques dépendants favorisant la transmission de la nociception. Il existe plusieurs types de ces récepteurs dont les récepteurs TRPV (*transient receptor potential vanilloid*) qui transmettent plusieurs types de stimuli sensoriels et nociceptifs. Cette famille de récepteurs est divisée principalement en quatre classes : TRPV1, TRPV2, TRPV3 et TRPV4. Les récepteurs vanilloïdes ont été découverts en 1846 lors de recherches sur la sensation de brûlure en bouche du piment (Thresh, 1846). Le composé âcre du piment a été nommé capsaïcine. Cette molécule vanilloïdes augmente la fréquence de dépolarisation en se liant aux récepteurs vanilloïdes (Nelson, 1919), et plus particulièrement au récepteur TRPV1. Les récepteurs vanilloïdes reliés à la douleur sont localisés principalement dans le SNP. Ils sont exprimés dans Ils sont exprimés dans les

neurones des ganglions de la corne dorsale (Guo *et al.*, 1999), les ganglions du nerf trijumeau (Acs and Blumberg, 1994), les ganglions du nerf vague (Acs and Blumberg, 1994 ; Szallasi, 1995), l'hypothalamus (Jancso-Gabor *et al.*, 1970 ; Szolcsanyi *et al.*, 1971), la formation réticulée (Acs *et al.*, 1996), les noyaux gris de la base, le striatum, le mésencéphale, les bulbes olfactifs, le pont, le cervelet, le cortex, le thalamus, et l'hippocampe (Sasamura *et al.*, 1998). Au niveau spinal, les récepteurs vanilloïdes sont présents à la fois au niveau présynaptique et post-synaptique de la corne dorsale de la moelle épinière (Guo *et al.*, 1999 ; Valtschanoff *et al.*, 2001). Certaines autres cellules peuvent aussi exprimer ces récepteurs comme par exemple les lymphocytes (Lai *et al.*, 1998), les mastocytes et les cellules gliales (Biro *et al.* (a,b), 1998).

Le récepteur TRPV1 est activé à une température de 43°C (seuil de douleur thermique pour l'espèce humaine), par les protons (diminution du pH intracellulaire) et par les composés vanilloïdes comme la capsaïcine. L'activation du récepteur induit l'ouverture des canaux calciques, permettant au Ca^{2+} d'entrer dans la cellule nerveuse sensorielle et entraînant une dépolarisation cellulaire (Caterina *et al.*, 1997) (Figure 53). La capsaïcine ainsi que d'autres agonistes du récepteur TRPV1 peuvent induire la libération des tachykinines en favorisant l'afflux de Ca^{2+} *via* le récepteur TRPV1 (Colpaert *et al.*, 1983 ; Szallasi and Blumberg, 1999). Les neurones sensibles aux vanilloïdes utilisent du glutamate, de l'ATP et d'autres neuropeptides comme neurotransmetteurs (Holzer, 1991 ; Malmberg and Yaksh, 1994 ; Lundberg, 1996). Une combinaison de neurotransmetteurs pourrait jouer un rôle dans la transmission de la douleur car les antagonistes testés atteignent rarement une analgésie complète (Dray and Urban, 1996 ; Belvisi *et al.*, 1992). Les vanilloïdes provoquent la relâche de neuropeptides pro-inflammatoires des terminaisons nerveuses sensibles comme SP, NKA et le CGRP (Hua *et al.*, 1986) ou d'acides aminés excitateurs (Sorkin and McAdoo, 1993), qui

initient la cascade de l'inflammation neurogène et sensibilisent les neurones algogènes (Gepetti and Holzer, 1996). En cas de contact prolongé, la capsaïcine peut aussi inhiber le récepteur TRPV1, entraînant un effet analgésique qui peut être modulé par les tachykinines et le CGRP (Bartho *et al.*, 2004). Par la suite, lors de la désactivation du récepteur, il y a arrêt de la libération de neuropeptides (Gamse *et al.*, 1982 ; Miller *et al.*, 1982 ; Taylor *et al.*, 1984). Sachant que SP joue un rôle primordial dans la transmission de la douleur au niveau central, la modulation des récepteurs vanilloïdes centraux affectera la transmission de la douleur à ce niveau.

Le récepteur TRPV1 joue donc un rôle prépondérant lors de la libération des tachykinines (Maggi, 2000) ainsi qu'au niveau de la sensation douloureuse et de l'hyperalgésie thermique et ionique induites par des lésions tissulaires (Yiangou *et al.*, 2001).

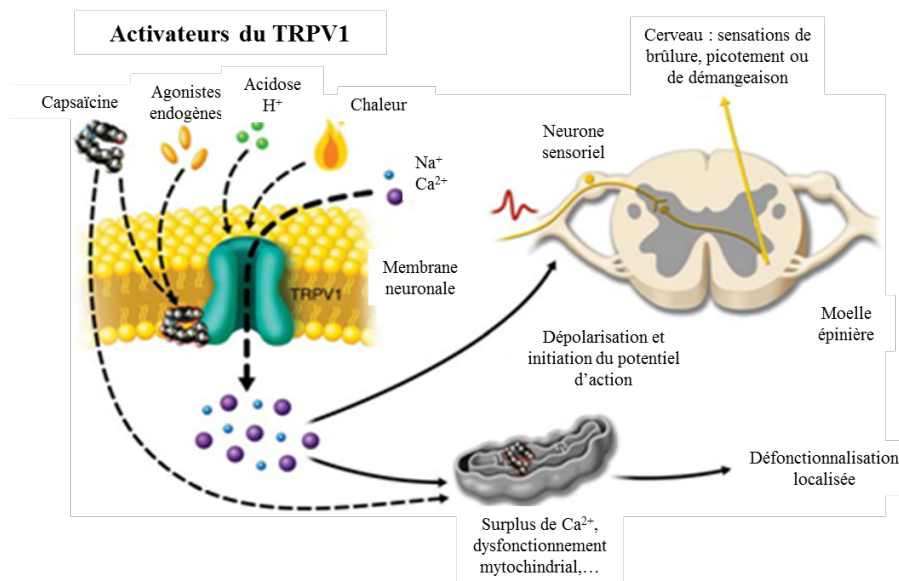


Figure 53 : La cascade d'évènements activant le récepteur TRPV1 et entraînant la sensibilisation locale par des agonistes endogènes, l'acidité ou la chaleur induisent l'ouverture des canaux calciques et sodiques entrainant une dépolarisation cellulaire et la sensibilisation centrale et périphérique. La capsaïcine désactive le récepteur TRPV1 suite à la dépolarisation initiale (d'après Anand and Bley, 2011).

III.4 Les neurotransmetteurs traditionnels et leurs rôles

III.4.1 Les récepteurs ionotropiques

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires perméables à différents ions tels que Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- ou Mg^{2+} . Ils peuvent être sélectifs ou laisser passer plusieurs ions. Les récepteurs glutamaergiques représentent une des principales familles de canaux ioniques ayant un rôle important dans la douleur. Cette cascade d'évènements induit d'importantes modifications de l'excitation neuronale en réduisant le seuil nociceptif, augmentant la réponse à un stimulus nociceptif et la durée de cette réponse, et diffusant la sensation douloureuse au-delà de la zone de lésion.

Il existe plusieurs types de canaux sodiques voltage-dépendants qui laissent entrer les ions Na^+ à l'intérieur de la terminaison nerveuse lors de la dépolarisation cellulaire, conduisant l'information nerveuse et contribuant à la production du potentiel d'action et à la sensibilisation des fibres sensorielles (Porreca, 2010). La famille de canaux calciques voltage-dépendants module l'excitation neuronale en libérant des neurotransmetteurs au niveau des terminaisons nerveuses libres des nocicepteurs, lors de la dépolarisation cellulaire (Kandel and Siegelbaum, 2000b). Ces canaux calciques induisent la synthèse de prostaglandines et modifient les protéines kinases qui régulent l'ARN (Navez *et al.*, 1997). La famille des canaux potassiques est variée et modulée par des kinases, phosphatases, GTPases (Coetzee *et al.*, 1999). Certains canaux potassiques voltage-dépendants s'ouvrent en même temps que les canaux sodiques lors de la dépolarisation, entraînant les phénomènes d'hyperalgésie et d'allodynie (Liu *et al.*, 2001), mais sont aussi impliqués dans les mécanismes d'anti-nociception des agonistes de plusieurs récepteurs possédant une action nociceptive tels que les cannabinoïdes et les canaux GABAergiques (Ocana *et al.*, 2004). Le message nociceptif est aussi modulé par des substances inhibitrices telles que le neurotransmetteur GABA (acide gamma-amino-butyrique) ou des opioïdes endogènes (enképhalines, dynorphines). Le

récepteur GABA_A est un canal ionique perméable aux ions Cl⁻. Suite à une lésion périphérique, une augmentation de l'excitabilité neuronale est observée par une altération de l'influx intramembranaire d'ions chlorure (Cl⁻) des neurones de la corne dorsale (De Koninck, 2009). Cela survient en conséquence d'une diminution de la fonction de la pompe KCC à co-transporteur K⁺/Cl⁻ retrouvée sur les terminaisons postsynaptiques des neurones de projection qui élimine l'action hyperpolarisante de certains neurotransmetteurs inhibiteurs (e.g. l'acide GABA et la glycine). Le récepteur GABA_B est un récepteur métabotrope qui inhibe la libération des neurotransmetteurs au niveau post-synaptique.

Lors du développement d'une douleur neuropathique, l'acide GABA peut aussi devenir excitateur si la concentration en ions Cl⁻ devient trop importante.

La sérotonine est aussi impliquée au niveau des voies descendantes excitatrices en activant les récepteurs à sérotonine de la moelle épinière (Zeitz *et al.*, 2002). De plus, la sérotonine est synthétisée par les neurones mono-aminergiques, un autre mécanisme périphérique, modulant les terminaisons libres des fibres sensorielles en inhibant la douleur (Vanegas and Schaible, 2004). Les catécholamines telles que la noradrénaline et la dopamine jouent aussi un rôle inhibiteur au niveau des voies de transmission de la douleur (Harrison and Geppetti, 2001).

En résumé, il existe plusieurs molécules et récepteurs impliqués dans la nociception. La Figure 54 récapitule les différents mécanismes pouvant être impliqués dans la transmission nociceptive.

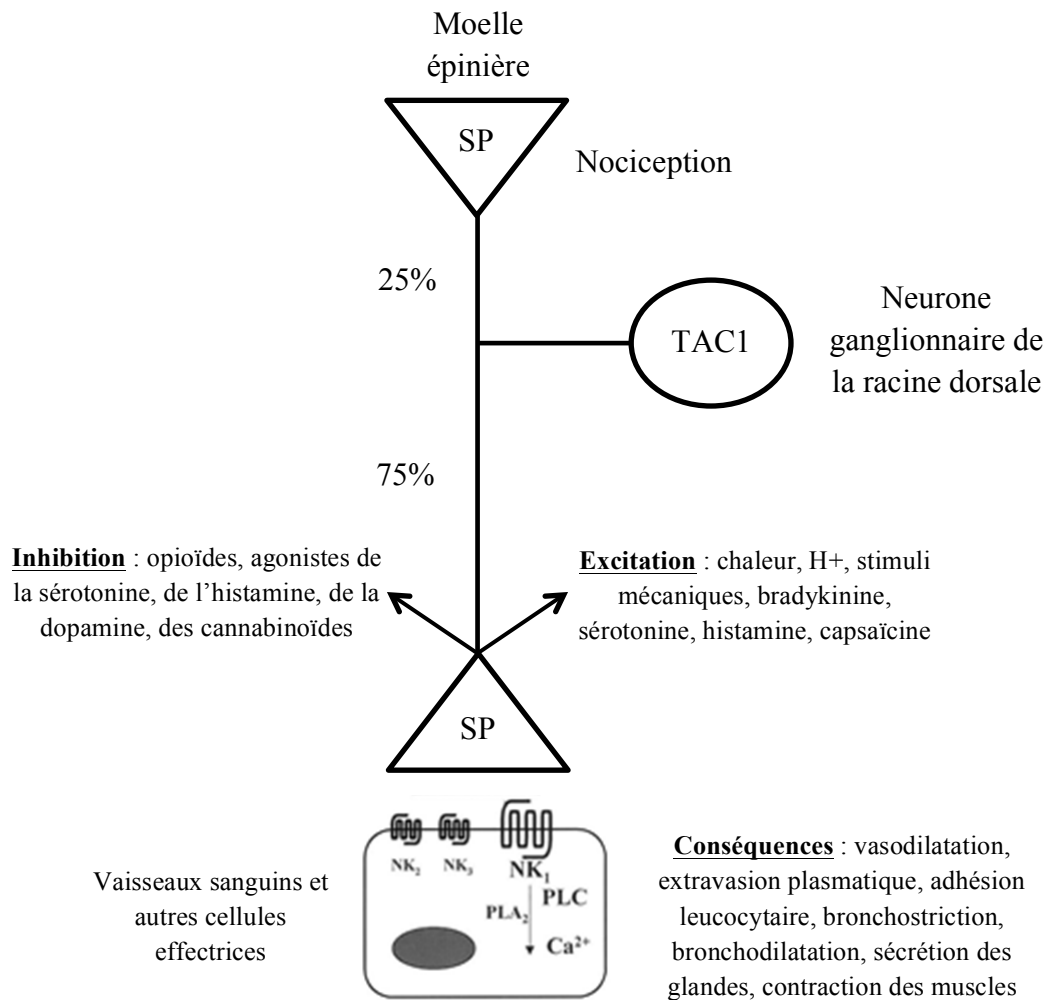


Figure 54 : Différents mécanismes impliqués dans la transmission de la nociception, au niveau du système nerveux périphériques.

III.5 Les neurotransmetteurs peptidiques

III.5.1 Les tachykinines

Les tachykinines sont une famille de neuropeptides qui partagent une extrémité C-terminale commune et essentielle pour leurs activités biologiques, du type Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ (Pennefather *et al.*, 2004). Cette famille contient SP, NKA et NKB, qui sont les plus abondantes au niveau du cerveau des mammifères. Elles agissent avec différentes affinités sur les trois récepteurs NK1, NK2 et NK3.

Les tachykinines sont issues de plusieurs gènes. Le gène TAC1, anciennement appelé PPT-A, est à l'origine de la protéine précurseur qui est subit une maturation protéolytique afin de libérer plusieurs neuropeptides bioactifs : SP, NKA, NPK (neuropeptide K) et le neuropeptide γ (NP γ). Le gène TAC1 possède quatre isoformes : α , β , γ , δ (Otsuka and Yoshioka, 1993) représentés sur la Figure 55. SP peut être synthétisée seule à partir des ARNm α et δ . En revanche, NKA est toujours synthétisée en même temps que SP à partir des ARNm β et γ . L'isoforme ARNm β permet aussi la synthèse du NPK, et l'isoforme ARNm γ permet la formation du NP γ (Harrison and Geppetti, 2001). L'épissage alternatif des ARNm du gène TAC1 affecte la distribution de SP et NKA. Ce sont les isoformes β et γ qui sont les plus abondants, ce qui signifie que SP et NKA sont synthétisées comme co-transmetteurs au niveau périphérique et central (Takeda *et al.*, 1990; Maggi, 2000). Le gène TAC1 est distribué au niveau du SNC, SNP et du système nerveux entérique. Les terminaisons périphériques des neurones afférents primaires sensibles à la capsaïcine sont une des sources neuronales des tachykinines issues de TAC1.

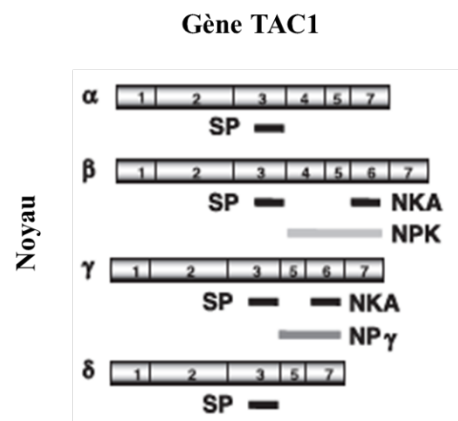


Figure 55 : Schéma décrivant le principe de la synthèse des tachykinines issues des quatre isoformes du gène TAC1 (d'après Pennefather *et al.*, 2004).

III.5.2 Les précurseurs de SP

Les neuropeptides proviennent de larges précurseurs protéiques reconnus comme des proneuropeptides. Les structures primaires de ces proneuropeptides inclut la séquence de la forme active d'au moins un des neuropeptides sur toute sa longueur (Funkelstein *et al.*, 2010). La Figure 56 représente la protéine précurseur de SP, la protachykinine-1, clivée par l'action de protéases spécifiques afin de synthétiser les neuropeptides bioactifs *via* un processus protéolytique post-traductionnel durant le transport axonal (Hook *et al.*, 2008).

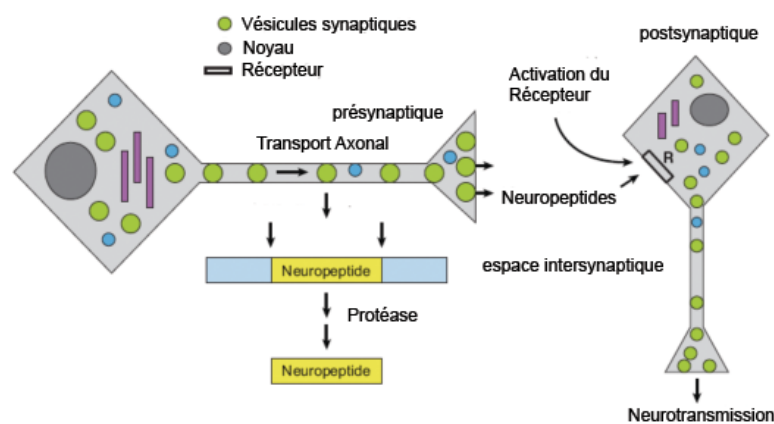


Figure 56 : Schéma représentant la synthèse des neuropeptides durant le transport axonal (d'après Hook *et al.*, 2008).

Plusieurs enzymes sont impliquées dont les prohormones convertases (PCs) et les endopeptidases (Harrison and Geppetti, 2001). Plus particulièrement, de récentes études ont souligné la contribution significative de PC1/3 et PC2 (Zheng *et al.*, 1994; Cui *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2005). Ces deux enzymes reconnaissent des motifs spécifiques composés soit d'une paire d'acides aminés basiques (i.e. KR-, RR-, RK- and KK-), ou d'un seul résidu arginine (R-) (ceci concerne seulement PC2) (Seidah *et al.*, 2008). Les deux précurseurs connus de SP, la β -tachykinine₅₈₋₇₁ (RPKPQQFFGLMGKR) et la β -tachykinine₅₈₋₇₀ (RPKPQQFFGLMGK) (Hook and Affolter, 1988; MacDonald *et al.*, 1988) sont connues pour être clivés par des carboxypeptidases spécifiques (Hook *et al.*, 2008), suivie de l'action de la PAM (peptidylglycine- α -amidatingmonooxygénase), induisant la biosynthèse de SP.

Parmi un grand nombre d'enzymes impliquées dans le métabolisme *in vivo* de la protéine protachykinine-1 et des neuropeptides, il existe aussi l'endopeptidase neutre et l'enzyme « *angiotensin-converting* » (ACE) qui sont probablement les deux enzymes les plus impliquées dans les processus métaboliques du SNP et de la circulation sanguine (Nadel and Borson, 1991).

III.5.3 La substance P

SP a été découverte par von Euler et Gaddum en 1931. SP est la tachykinine la plus étudiée. Elle est constituée de 11 acides aminés (HRPKPQQFFGLM-NH₂) avec un poids moléculaire de 1347.65 Da. Au niveau du SNC, SP est synthétisée entre autre dans les neurones primaires afférents situés dans les lamina I et II de la moelle épinière de la corne dorsale et participe à l'augmentation du stress et de l'anxiété lors d'un syndrome de douleur neuropathique. Les neurones de la corne dorsale peuvent être activés lors d'une stimulation nociceptive même si la concentration de SP dans la moelle épinière est faible, et puisque des seconds messagers peuvent moduler l'activité d'autres récepteurs, SP est considérée à la fois comme un neurotransmetteur et un neuromodulateur (Wall *et al.*, 1981). Selon la définition de Potter *et al.*, suggérant qu'un neurotransmetteur peut exercer des effets inhibiteurs ou excitateurs sur des cellules post-synaptiques, SP peut donc être considérée comme un neurotransmetteur (Otsuka and Yoshioka, 1993).

SP est libérée à partir des grosses vésicules à la suite du clivage de la PAR-2 par la tryptase, de la liaison de la bradykinine aux récepteurs B₂, d'une sensibilisation induite par les cytokines par les lipopolysaccharides, ou du monoxyde d'azote. Elle agit sur les trois récepteurs des neurokinines mais a une plus forte affinité pour le récepteur NK1.

Suite à sa libération, SP dépoliarise les neurones de la corne dorsale en induisant l'augmentation de concentration intracellulaire de Ca²⁺ dans ces neurones, et modifie le

courant des canaux K^+ voltage-dépendants (Rusin *et al.*, 1992). Par conséquent, SP altère l'excitabilité des neurones responsables de la transmission de la douleur, dans la corne dorsale. Liu et ses collègues ont démontré que l'activation des récepteurs NMDA induirait la libération de SP et l'internalisation du récepteur NK1 dans les neurones de la corne dorsale. Les récepteurs NMDA étant localisés au niveau des terminaisons des fibres de petit diamètre, ils faciliteraient et prolongeraient la transmission des messages nociceptifs par le biais de la libération de SP et de glutamate, qui sont situés au niveau des afférences primaires (Cao *et al.*, 1998). Ce dernier prolongerait la douleur en maintenant la dépolarisation des terminaisons présynaptiques et en induisant une augmentation de concentration de Ca^{2+} intracellulaire. Ces récepteurs NMDA pourraient aussi réguler la libération de SP par l'intermédiaire de messagers, comme l'oxyde nitrique par exemple (Liu *et al.*, 1997). A l'inverse, SP semble moduler les effets des récepteurs NMDA en potentialisant l'effet du glutamate au niveau des neurones secondaires. Lors de la libération de SP, certains chercheurs ont également noté qu'il y avait aussi activation du récepteur TRPV1 par phosphorylation modulée par la protéine kinase C (PKC), et la sensibilisation des nerfs sensoriels *via* les prostaglandines (Levine *et al.*, 1993).

Les récepteurs des neuropeptides ne sont pas uniquement confinés aux régions synaptiques. En effet, la neurotransmission peptidergique a souvent lieu à une échelle de temps plus lente que celle des neurotransmetteurs classiques. Il n'est donc pas surprenant que les récepteurs peptidiques soient localisés à distance des synapses. Seulement une petite fraction de SP agit sur le récepteur NK1 au niveau de la synapse. Mais il est su que SP peut diffuser loin de son site de production, et pourrait donc trouver un autre récepteur sur lequel elle serait capable d'agir (Mantyh, 2002).

Dans les tissus périphériques, SP entraînent une vasodilatation et la formation d'un œdème caractéristiques de l'inflammation neurogénique. Il est aussi connu que SP induit des contractions rapides des muscles lisses gastro-intestinaux (Hökfelt *et al.*, 2001), et module les cellules de l'immunité en induisant la prolifération des lymphocytes-T (Szallasi and Blumberg, 1999; Mantyh and Yaksh, 2001). SP est donc un neuromodulateur important entre le système nerveux et le système immunitaire, participant à l'augmentation de la production de cytokines qui sensibilisent les neurones et augmentent la douleur (Dimitriadou *et al.*, 1994; Vergnolle *et al.*, 2001).

III.5.4 Les métabolites de SP

Le métabolisme de SP dans le SNC et au niveau de la barrière hémato-encéphalique a aussi été étudié (Chappa *et al.*, 2007). L'injection intrathécale des métabolites a permis de démontrer que les fragments C-terminaux SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ ainsi que le fragment N-terminal SP₁₋₇ possédaient des propriétés pharmacologiques dans le SNC (Sakurada *et al.*, 1999). SP₁₋₇ produit un effet anti-nociceptif naloxone réversible, modulé par les récepteurs (Freed *et al.*, 2001). Même si ce n'est pas très bien démontré, il semblerait que SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ interagissent avec le récepteur NK1 en déclenchant des actions anti-nociceptives (Igwe *et al.*, 1990; Vigna, 2001). SP₃₋₁₁ transmet aussi des informations nociceptives (Richter and Oehme, 1983). Une endopeptidase, la prolylendopeptidase ou PREP, catalyse l'hydrolyse des ponts de motif Pro-X des peptides possédant moins de 30 acides aminés (Nolte *et al.*, 2009), participant donc à la synthèse de SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁.

Par conséquent, les précurseurs et les métabolites de SP jouent un rôle important dans le développement de l'hyperalgésie secondaire.

III.5.5 Le neuropeptide K

NPK est composé des 36 acides aminés (DADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHKTDSFVGLM-NH₂), entre les résidus 72 et 107 de la séquence de la protéine précurseur protachykinine-1, d'un poids de 3978.07 Da. NPK est en quelque sorte le précurseur de NKA, et est étendu du côté de l'extrémité N-terminale par rapport à NKA. NPK a été d'abord isolé dans des cerveaux porcins, puis il a été étudié dans des cerveaux de rats où il semble être distribué différemment dans le SNC. NPK est aussi un peptide biologiquement actif et possède un effet bronchostricteur et intervient au niveau de la pression artérielle systémique (Tatemoto *et al.*, 1985 ; Arai and Emson, 1986 ; Valentino *et al.*, 1986).

NPK est exprimé par les fibres C nociceptives dans les neurones sensoriels afférents primaires. Il a été démontré que NPK avait un effet plus lent mais une plus longue action que SP ou NKA (Martling *et al.*, 1987), ce qui suggère des activités biologiques différentes. NPK agit aussi sur NK1 mais avec une affinité moins efficace que SP (Takeda and Krause, 1989).

III.5.6 La neurokinine A

NKA est un neuropeptide de 10 acides aminés (HKTDSFVGLM-NH₂) de 1133.30 Da, possédant une partie de séquence commune (extrémité C-terminale) avec celle de NPK. NKA est aussi exprimée dans le SNC et les neurones sensoriels afférents primaires, fournissant ainsi un grand nombre de tissus périphériques (Pennefather *et al.*, 2004). Dans plusieurs zones, NKA est co-localisée avec SP mais présente en plus faible abondance, tout comme son récepteur NK2 par rapport à NK1 (Tsuchida *et al.*, 1990). NKA peut aussi se lier à NK1, selon un degré d'affinité moindre par rapport à la liaison SP-NK1. Trafton et ses collègues ont démontré que SP et NKA avaient des sites d'interaction différents au niveau du récepteur NK1 (Trafton *et al.*, 2001). NKA est relâchée en même temps que SP au niveau des terminaisons nerveuses de la moelle épinière et des tissus périphériques. Elle joue un rôle de

neurotransmetteur excitateur (Otsuka and Yoshioka, 1993). Selon plusieurs études, il semblerait que SP soit dégradée plus rapidement que NKA (Duggan *et al.*, 1990; Hope *et al.*, 1990; Hope *et al.*, 1990). Lorsque NKA se lie à NK2, ceci provoque une dépolarisation qui contribue au développement de l'hyperalgésie secondaire (Levine *et al.*, 1993 ; Baumbauer *et al.*, 2009 ; Dickenson, 1995). Et il existe un lien étroit entre l'augmentation de SP et NKA et la libération des acides aminés excitateurs (e.g. glutamate) qui sont libérés en même temps, suite à un influx de Ca^{2+} , et ont des actions synergiques (Skilling *et al.*, 1990 ; Levine *et al.*, 1993). SP et NKA contribuent donc à la sensibilisation centrale et l'hypersensibilité douloureuse.

III.5.7 La neurokinine B

NKB est issue du gène TAC3, anciennement dénommé PPT-B, qui code seulement pour cette tachykinine (Kotani *et al.*, 1986 ; Page *et al.*, 2000). NKB est un neuropeptide contenant 10 acides aminés (DMHDFVGLM-NH₂) de 1209.53 Da. NKB est présente au niveau du SNC et de la moelle épinière (Kangawa *et al.*, 1983 ; Moussaoui *et al.*, 1992 ; Goubillon *et al.*, 2000 ; Patacchini *et al.*, 2000). Le gène TAC3 a une taille similaire à celle du gène TAC1 mais seuls deux isoformes ARNm encodent pour la NKB. NKB est synthétisée à partir d'un processus protéolytique et une amidation sur l'extrémité C-terminale grâce à l'action de l'enzyme PAM, comme lors de la synthèse de SP (Nakanishi, 1987). Par son action au niveau des récepteurs NK1, NK2 et NK3, NKB possède un rôle dans la transmission de l'information au niveau des SNC et SNP en induisant l'expression du gène *c-fos* (Spitznagel *et al.*, 2001).

III.5.8 Le neuropeptide gamma

NP γ est un peptide de 36 acides aminés (YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYI

NLITRQRY-NH₂) de 4366.13 Da, qui doit son nom aux tyrosines situées aux extrémités N- et C-terminales. Il est localisé dans le SNC et le SNP (dans les systèmes sympathique, cholinergique, sensoriel, entérique) et les neurones centraux. Il module plusieurs fonctions physiologiques dont la satiété, l'anxiété ou le tonus vasculaire (Pedrazzini *et al.*, 2003; Heilig, 2004; Feletou *et al.*, 2006). NP γ est co-stocké avec la noradrénaline. Il existe 6 récepteurs du NP γ (Y₁ à Y₆) qui sont couplés aux protéines G_{i/o}. Les récepteurs Y₁ et Y₂ sont co-exprimés avec les récepteurs de la bradykinine ainsi qu'avec le CGRP (Brain *et al.*, 1985; Zhang *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2004). Le récepteur Y₁ possède une fonction inhibitrice du comportement nociceptif en modulant les neurosécrétions (Duggan *et al.*, 1991; Naveilhan *et al.*, 2001b; Taiwo and Taylor, 2002; Gibbs *et al.*, 2004). A l'inverse, il semblerait que le récepteur Y₂ possède un effet excitateur en activant les neurones sensoriels (Abdulla and Smith, 1999; Xu *et al.*, 1999).

III.6 Les peptides opioïdes endogènes

Les opioïdes définissent toute substance, endogène ou synthétique, qui produit des effets similaires à la morphine et qui sont bloqués par un antagoniste. Ils sont synthétisés dans les ganglions de la racine dorsale et sont transportés dans les SNC et SNP, ainsi que dans les terminaisons des neurones sensoriels. Les neurones qui synthétisent les peptides opioïdes endogènes sont présents dans les ganglions de la racine dorsale. Les mécanismes d'activation des peptides opioïdes ne sont encore pas totalement élucidés. Il existe 3 familles de peptides opioïdes endogènes : les dynorphines, les enképhalines et les endomorphines. Ces peptides endogènes ont une sélectivité particulière pour chaque récepteur opioïde (Tableau 5).

	μ	δ	κ
Endomorphines	+++	+++	+++
Leu-enképhaline	+	+++	-
Met-enképhaline	++	+++	-
Dynorphines	++	+	+++

Tableau 5 : Degrés d'affinité des peptides opioïdes endogènes pour les récepteurs opioïdes.

Les opioïdes ont une action directe sur les afférents primaires car ils raccourcissent le plateau de potentiel d'action. De plus, les ligands κ bloquent les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, réduisant ainsi la libération de neurotransmetteurs et donc inhibant la dépolarisation. Les ligands μ et δ augmentent la conductance des ions K^+ ce qui induit la diminution de conductance des ions Ca^{2+} (Werz and MacDonald, 1983), entraînant une hyperpolarisation cellulaire. Au niveau central, les opioïdes agissent sur les voies descendantes inhibitrices et sur les voies ascendantes de la douleur (Fields, 2004). Au niveau de la moelle, les opioïdes possèdent également une action indirecte *via* la stimulation des fibres inhibitrices GABAergiques qui bloquent la libération de SP et de glutamate (Tillement and Albengres, 2001). En conditions de stress ou de libération de cytokines suite à des lésions tissulaires, les peptides opioïdes endogènes peuvent être libérés localement et avoir un effet analgésique. Les agonistes κ semblent posséder des propriétés analgésiques périphériques d'autant plus importantes si une inflammation est déclenchée (Riviere, 2004). Les peptides opioïdes endogènes peuvent être libérés localement par des cellules immunitaires et entraîner une analgésie (Chauvin et Beaulieu, 2005). Lorsque les récepteurs opioïdes situés sur les cellules immunitaires sont activés par les ligands opioïdes, ils peuvent supprimer l'activité des lymphocytes et inhiber la synthèse ou la libération de cytokines.

Les précurseurs protéiques de ces peptides opioïdes endogènes codant pour les enképhalines, les dynorphines, la β -endorphine et la nociceptine (ou orphanine FQ (N/FQ))

sont la préproenképhaline, la préprodynorphine, la proopiomélanocortine et la préproN/FQ respectivement (Chauvin et Beaulieu, 2005).

III.6.1 Les dynorphines

Les dynorphines sont synthétisées à partir de l'hydrolyse de leurs précurseurs protéiques, les préprodynorphines grâce à l'activité enzymatique des PC1/3 et PC2 (Perone and Castro, 1997). Lors de la phase d'allodynie déclenchée par une lésion, l'expression des ARNm des préprodynorphines est sensiblement augmentée (Labombarda *et al.*, 2008). Les interneurons des prodynorphines sont localisées dans les terminaisons centrales des afférents primaires de la lamina superficielle (Lai *et al.*, 2006). Il a été suggéré qu'à des concentrations physiologiques, le système dynorphinique aurait une action anti-nociceptive, tandis qu'à des concentrations physiopathologiques élevées, ce système serait pro-nociceptif, en agissant sur les récepteurs NMDA (Hauser *et al.*, 1999). Les effets anti-nociceptifs ou pro-nociceptifs des dynorphines pourraient donc dépendre de l'interaction avec les récepteurs opioïdes, NMDA et les récepteurs à la bradykinine, tout comme des concentrations retrouvées au site d'action du peptide.

La « *big* » dynorphine₁₋₃₂ est un peptide composé de 32 acides aminés, dérivée de la prodynorphine et composée de la dynorphine A (dynorphine A₁₋₁₇) et de la dynorphine B (dynorphine B₂₀₋₃₂) (Merg *et al.*, 2006). La big dynorphine₁₋₃₂ est un ligand endogène qui semble avoir une forte affinité pour le récepteur opioïde κ . De précédentes études ont montré que cette dynorphine est localisée dans le liquide céphalo-rachidien et le cerveau (Xie and Goldstein, 1987). Sa présence dans le cerveau implique qu'elle est synthétisée à partir de la prodynorphine et sécrétée par les neurones. Mais le taux de « *big* » dynorphine semble bien moins important que celui de la dynorphine A au niveau des neurones (Merg *et al.*, 2006). Il

semblerait que la « big » dynorphine agisse également sur les récepteurs NMDA, selon le site où elle est libérée (Tan-No *et al.*, 2005; Kuzmin *et al.*, 2006).

La dynorphine A est un peptide endogène qui possède une sélectivité importante pour le récepteur opioïde κ , et agit aussi de façon non-sélective sur les récepteurs MOR, DOR et ORL1. La dynorphine A possède des effets non opioïdiques à type d'effets neurotoxiques à concentrations élevées. C'est un peptide opioïde endogène issu de la prodynorphine et contenant la séquence de 1 à 17 acides aminés. La dynorphine A produit une excitation neuronale en modulant des récepteurs non-opioïdes. Elle induit aussi un influx de Ca^{2+} *via* les canaux calciques voltage-dépendants, dans les neurones sensoriels en activant les récepteurs de la bradykinine (Lai *et al.*, 2006). Dans la moelle épinière, la dynorphine A possède des effets paradoxaux (Lai *et al.*, 2001), en étant à la fois inhibitrice de la nociception en modulant les récepteurs opioïdes, et en participant au maintien de la douleur neuropathique en induisant la libération des acides aminés excitateurs en agissant au niveau des récepteurs NMDA. La dynorphine A active également les fibres C, entraînant la libération du CGRP, menant au développement de l'hyperalgésie (Lai *et al.*, 2006).

La big dynorphine₁₋₃₂ et la dynorphine A sont co-localisées avec le glutamate, SP et CGRP amplifiant l'excitation neuronale et augmentant la libération de SP et CGRP menant donc à une action pro-nociceptive (Marvizon *et al.*, 2009).

III.6.2 Les enképhalines

Les enképhalines sont issues du clivage de la protéine précurseur, la préproenképhaline, par les PC1/3 et PC2 au niveau des SNC et SNP (Breslin *et al.*, 1993 ; Johanning *et al.*, 1996). La Leu-enképhaline composée de 5 acides aminés (YGGFL) de 555.63 Da et la Met-enképhaline constituée de 5 acides aminés (YGGFM) de 573.24 Da, sont les deux enképhalines qui ont été isolées (Johanning *et al.*, 1996 ; Mathis and Lindberg,

1992). Les enképhalines sont des neurotransmetteurs inhibant les voies de la douleur durant une courte période d'action en agissant sur les récepteurs opioïdes (Kiguchi *et al.*, 2008).

III.6.3 Les endomorphines

Les endomorphines 1 et 2, ou endorphines, agissent comme la morphine mais sont sécrétées par l'hypophyse et l'hypothalamus. L'endomorphine-1 est largement distribuée dans le cerveau (Schreff *et al.*, 1998; Martin-Schild *et al.*, 1999) tandis que l'endomorphine-2 est localisée majoritairement dans la moelle épinière (Martin-Schild *et al.*, 1999; Pierce and Wessendorf, 2000). Ces différences de distribution pourraient suggérer l'existence de deux précurseurs protéiques différents ou de deux voies de synthèse protéolytiques différentes. Ce sont des neurotransmetteurs qui agissent sur leurs récepteurs en produisant un effet analgésique. Les endomorphines sont localisées dans le cerveau, la moelle épinière et le système digestif, des zones importantes de transmission nociceptive (Fichna *et al.*, 2007).

III.7 Les peptides anti-opioïdes

Afin d'être qualifiés de peptides anti-opioïdes, il faut que ces peptides s'opposent aux effets des opioïdes ou qu'ils induisent même des effets opposés, qu'ils soient des neurotransmetteurs et qu'ils soient libérés suite à la stimulation des récepteurs opioïdes. Plusieurs peptides anti-opioïdes sont référencés, dont le neuropeptide FF, le neuropeptide AF (Yang *et al.*, 1985), le neuropeptide SF (Yang and Martin, 1995). Ces peptides possèdent tous une signature RFamide (Arg-Phe-NH₂) à leur extrémité C-terminale et sont regroupés dans la famille des peptides RFamides (Zajac and Mollereau, 2006).

III.8 Autres peptides algogènes

Les hormones peptidiques sont une classe de peptides sécrétés dans le sang qui jouent un rôle important dans la transmission de la nociception. Il en existe différents types.

Le CGRP (peptide lié au gène de la calcitonine) est un neuromodulateur qui participe à l'induction de la douleur neuropathique. Il possède 37 acides aminés (SCNTATCVTHRLAGLLSRSGGVVKDNFVPTNVGSEAF) et une masse de 3950.5 Da. Le CGRP est issu de l'épissage alternatif de l'ARNm du gène de la calcitonine. Il est localisé dans tout le système nerveux, mais est présent majoritairement au sein des fibres sensibles afférentes primaires et est souvent co-localisé avec SP (Lundy and Linden, 2004). Le CGRP se lie à deux récepteurs spécifiques couplés à une protéine G, CGRP₁ et CGRP₂, activant les enzymes adénylate cyclase (Juaneda *et al.*, 2000) et les protéines kinases A et C, induisant une faible dépolarisation *via* une action directe au niveau des cellules nociceptives de la corne dorsale (Ryu *et al.*, 1988). Le CGRP délivré seul dans le système nerveux a peu ou pas d'effet, mais il améliore les effets dus à la libération de SP et semble retarder la dégradation enzymatique de SP (Sun *et al.*, 2004). SP et CGRP agissent donc en synergie afin de prolonger la dépolarisation des membranes et d'exciter les neurones secondaires de la corne dorsale (Levine *et al.*, 1993). Il a été prouvé que le CGRP contribue au développement et au maintien de la sensibilisation centrale par son augmentation dans des modèles de douleur inflammatoire (Ferland *et al.*, 2011; Bird *et al.*, 2006).

Il existe d'autres peptides participant à la transmission de l'information nociceptive tels que la bradykinine (Barella *et al.*, 2011 ; Dray and Perkins, 1993), la somatostatine (Dickenson, 1995), la famille des angiotensines (Pinho *et al.*, 2011), la vasopressine (Koshimizu and Tsujimoto, 2009), l'ocytocine, la cholécystokinine (Tuchscherer *et al.*, 1987), le VIP (vasoactive intestinal peptide), la galanine, ou le NPY.

Afin de simplifier la compréhension des différents mécanismes abordés précédemment, la Figure 57 récapitule une partie des interactions modulant le développement et le maintien de l'hyperalgésie et de l'allodynie.

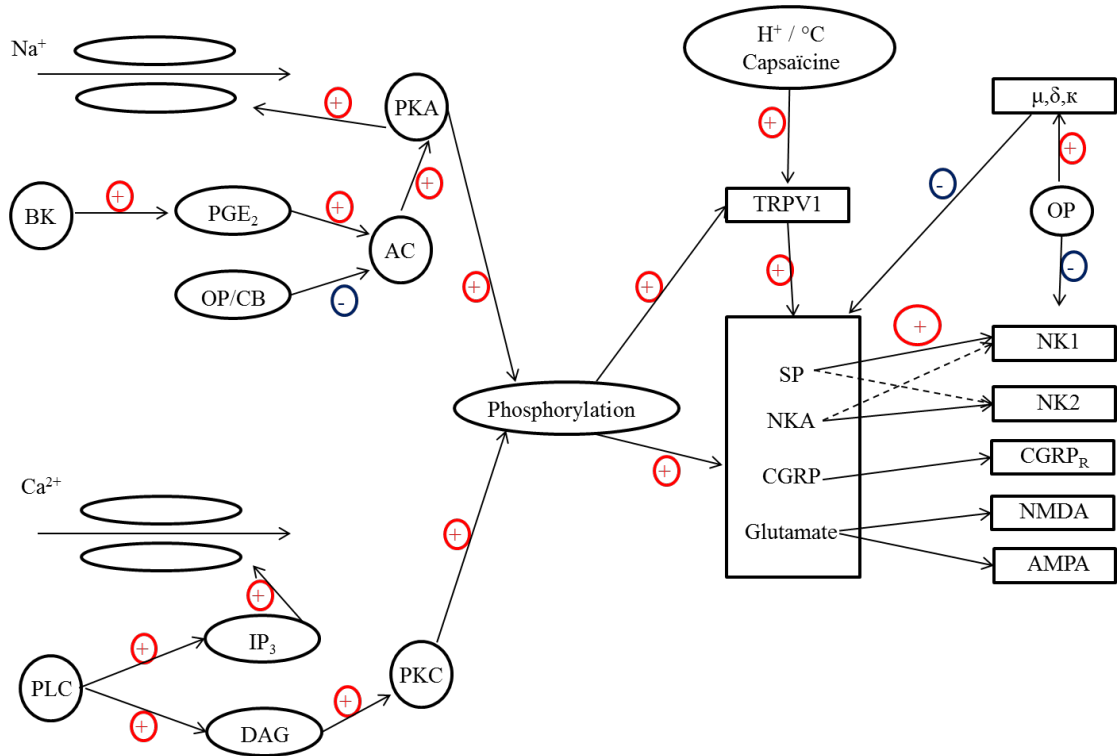


Figure 57 : Récapitulatif des interactions régulant le développement de la douleur neuropathique au niveau des afférents primaires. AC = adénylate cyclase, BK = bradykinine, DAG = diacyl glycérol, IP₃ = inositol triphosphate, PGE = prostaglandine, OP/CB = opioïdes/cannabinoïdes, PKA = protéine kinase A, PKC = protéine kinase C, PLC=phospholipase C.

IV. Modèles animaux et bioéthique

Afin de faire avancer la recherche scientifique, l'utilisation d'animaux de laboratoire de différentes espèces est courante et s'avère nécessaire pour élucider des mécanismes *in vivo*. L'utilisation des animaux en recherche biomédicale est un sujet controversé et de nombreuses personnes se questionnent sur la pertinence, voire le droit d'infliger aux animaux un stress ou toute autre forme de douleur. Il existe une réglementation en bioéthique propre à chaque pays, et qui évolue en fonction des découvertes. Au Canada, tout chercheur désirent utiliser des animaux de laboratoire à des fins expérimentales doit se soumettre aux exigences du Conseil

canadien de protection des animaux (CCPA), l'organisme responsable de la surveillance, du soin et de l'utilisation des animaux utilisés en expérimentation.

IV.1 Modèles animaux

Concernant la douleur neuropathique, il existe différents modèles animaux permettant d'induire des lésions des nerfs périphériques et centraux, afin de comprendre les mécanismes responsables de cette douleur et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus ciblées (Wang and Wang, 2003). Le choix d'un modèle entraîne une différence dans les expressions des biomarqueurs potentiels suivis. En effet, les modèles sont classés en cinq catégories et induisent une douleur inflammatoire, neuropathique, viscérale, postopératoire ou cancéreuse (Hogan, 2002). Les modèles de constriction chronique du nerf sciatique et de gènes *knock-out* seront décrits, car ils ont été utilisés pour étudier la douleur neuropathique lors de ce projet.

IV.1.1 La constriction chronique du nerf sciatique

La CCI a été mise au point par Bennett (Bennett and Xie, 1988). Quatre ligatures lâches sont placées autour du nerf sciatique du rat, tel qu'illustré sur la Figure 58, sans affecter le flot sanguin. L'animal développe des comportements nociceptifs assez marqués, tels que la protection du membre atteint, une paralysie partielle et la réduction de l'appui. L'hypersensibilité et l'allodynie sont évaluées au moyen de tests thermiques et mécaniques. Elles se développent en 10 à 14 jours et persistent environ 8 à 12 semaines. Des réactions anormales au niveau du membre controlatéral peuvent également être observées. La CCI provoque aussi la perte des grosses fibres myélinisées alors que les fibres myélinisées de plus petit diamètre ou les fibres amyélinisées sont moins atteintes. Mais ce modèle ne permet pas de savoir la contribution des fibres endommagées par rapport aux fibres intactes dans le

développement de la douleur neuropathique (Kim *et al.*, 1997). Par ce modèle, la douleur neuropathique est développée et maintenue, permettant la mise en route de toutes les cascades d'évènements menant à la transmission du message nociceptif, dont la biosynthèse et la libération des neuropeptides de la famille des tachykinines et leurs interactions avec les différents récepteurs mentionnés précédemment.

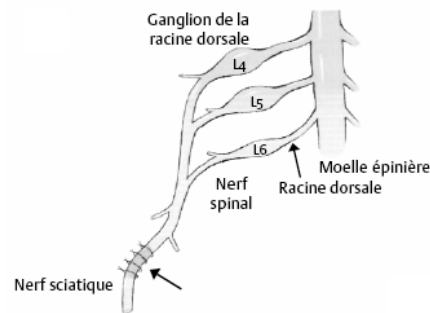


Figure 58 : Schéma du modèle chirurgical de constriction chronique du nerf sciatique (d'après Bennett et Xie, 1988).

IV.1.2 Le modèle de souris *knock-out*

Le modèle KO est un génotype de souris génétiquement modifié. Durant nos études, nous avons utilisé des tissus de souris déficientes du gène TRPV1 ($TRPV1^{-/-}$) afin d'étudier la modulation d'expression des tachykinines, et plus particulièrement SP et NKA, en fonction de la présence ou non du gène exprimant le récepteur TRPV1. En effet, d'après plusieurs études, il semblerait que l'expression des tachykinines et l'activation du récepteur TRPV1 soient liées. L'utilisation d'un génotype sans expression du gène TRPV1 devrait permettre de pouvoir conclure de façon fiable l'existence d'un lien étroit, sans perturbation des résultats par le développement d'inflammation souvent présente lors de douleur neuropathique. De plus, il est parfois difficile et subjectif d'utiliser des tests comportementaux sur des animaux. Les modèles KO permettent d'observer et de comparer les phénotypes de souris possédant un gène volontairement altéré, par rapport aux souris normales (type sauvage ou *wild-type*).

Pour réaliser ce modèle, un gène modifié est introduit dans des cellules souches embryonnaires de souris. Cette manipulation résulte en une mutation qui empêche, prévient ou modifie l'expression d'un gène qui est alors incapable de produire une protéine fonctionnelle, entraînant une altération du phénotype. Il existe plusieurs types de souris KO concernant la recherche sur la douleur comme, par exemple, l'étude du système opioïde (Kieffer and Gavériaux-Ruff, 2002), l'identification de nouveaux facteurs biochimiques agissant au niveau de la douleur neuropathique, de la SP et du récepteur NK1 (Malmberg and Basbaum, 1998), ou encore la compréhension du gène TAC1 (Hökfelt et al., 2001; O'Shaughnessy et al., 2006).

IV.2 Tests comportementaux

Actuellement, l'évaluation de la douleur reste complexe. En effet, la douleur est un phénomène multidimensionnel qui, étant une perception, peut être liée à des facteurs physiques et psychologiques chez les animaux. L'évaluation de la douleur peut être réalisée à l'aide de différents tests comportementaux. Durant cette étude, deux tests ont été utilisés pour établir la ligne de base avant et après la CCI pour s'assurer du développement de la neuropathie.

Le test avec les filaments de von Frey (Figure 59) est un test de sensibilité mécanique utilisé chez l'humain et les animaux pour détecter l'allodynie lors de neuropathie. L'association internationale qui étudie la douleur (IASP) définit l'allodynie comme une perception douloureuse en réponse à un stimulus non nociceptif. Lors de ce test, des filaments de nylon de différents diamètres sont appliqués sur la surface plantaire de la patte de l'animal. Le seuil de retrait de l'animal par rapport à la force exercée par le filament est mesuré. Ce test permet de mesurer la sensibilité au toucher, et donc d'évaluer l'allodynie mécanique (Chaplan *et al.*, 1994).

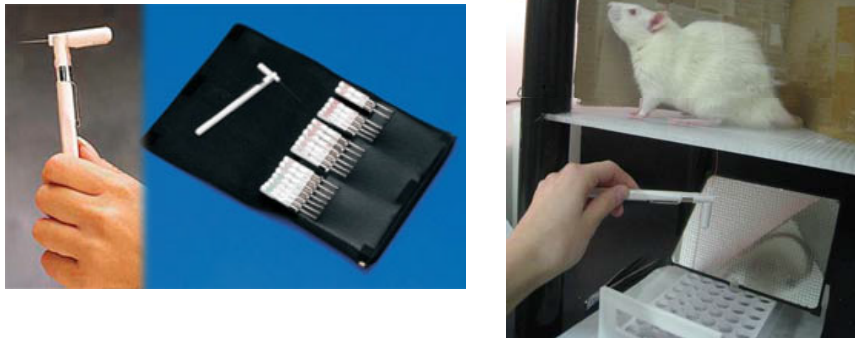


Figure 59 : Photographies de l'évaluation de la douleur par les filaments de von Frey.

Le test de Hargreaves (Figure 60) permet la mesure de la sensibilité thermique douloureuse de l'hyperalgésie cutanée suite. Selon l'IASP, l'hyperalgésie est une réponse exagérée à une stimulation normalement douloureuse. Lors de ce test, la surface plantaire de la patte de l'animal est chauffée par un rayon lumineux. Le temps de réaction que met l'animal pour retirer sa patte est mesuré et permet l'évaluation de la douleur. Le résultat de ce test est moins affecté que d'autres car des tests répétés ne contribuent pas au développement de l'hyperalgésie (Mogil *et al.*, 1999). Le membre atteint par la douleur conduit à un temps de latence beaucoup plus court. Les changements du temps de latence correspondent à la diminution du seuil de nociception thermique. Cette méthode permet donc d'évaluer l'hyperalgésie thermique (Hargreaves *et al.*, 1988).

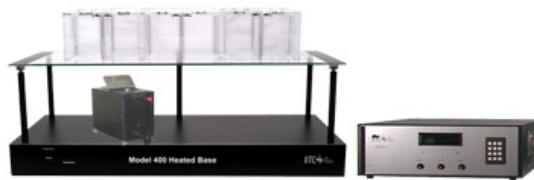


Figure 60 : Matériel utilisé pour réaliser le test de Hargreaves.

Ces tests comportementaux sont de bons indicateurs de l'établissement de la neuropathie mais restent subjectifs, car ils sont sujets à l'interprétation et à l'expérience des

manipulateurs et au fait que l'animal subit un certain stress quand il est amené dans la pièce d'expérimentation.

IV.3 Quelques traitements

Actuellement, des traitements du contrôle de la douleur sont disponibles et ciblent les différents niveaux des voies de la douleur (Figure 61).

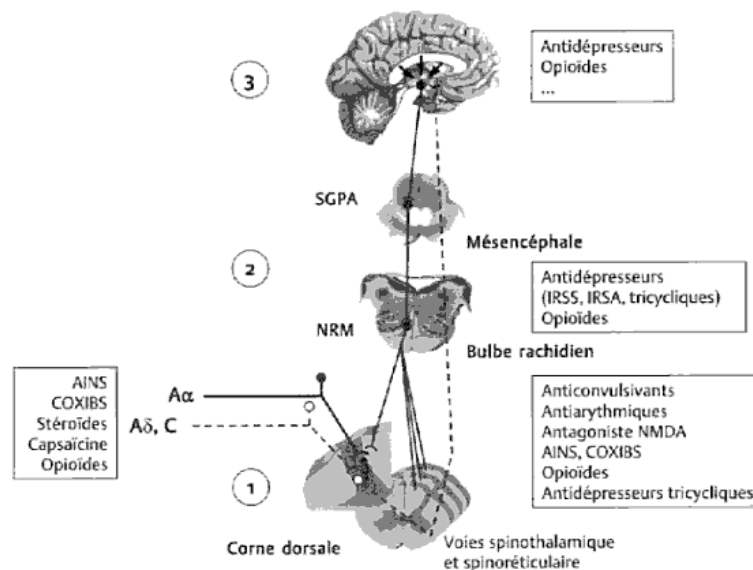


Figure 61 : Représentation des trois niveaux du SNC impliqués dans le contrôle endogène de la douleur : 1/ spinal, 2/ tronc cérébral et 3/ cortical (centres supérieurs). SGPA : substance grise périaqueducale et NRM : noyau du raphé magnus, deux régions impliquées.

La famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) a été découverte dans les années 1860, avec l'utilisation de l'aspirine. Les AINS agissent de façon spécifique sur une enzyme appelée cyclooxygénase (Vane and Botting, 1998). Les AINS inhibent la production de prostaglandines en inhibant la cyclooxygénase et ont, globalement, un délai d'action assez long. Les AINS sont de petites molécules hydrophobes avec une configuration spatiale spécifique, les rendant sélectifs (Kurumbail *et al.*, 1996). Les AINS ont des effets indésirables possibles, tels que des risques d'hémorragie, d'insuffisance rénale ou hépatique, des problèmes cardiaques.

Les opioïdes sont les médicaments jugés les plus efficaces actuellement pour soulager des douleurs modérées à sévères. Ils agissent sur les trois niveaux endogènes du contrôle de la douleur, et leur efficacité dépend du récepteur ciblé. Les opioïdes les plus souvent prescrits sont la morphine, le tramadol, le proxypène, la codéine et l'oxycodone (Harvey, 2008). La grande distribution des récepteurs opioïdes dans l'organisme induit des effets secondaires non négligeables dont entre autres la dépression respiratoire, la bradycardie, la bronchostriction (Chauvin and Beaulieu, 2005). De plus, la prise répétée d'opioïdes peut aussi engendrer une dépendance physiologique et/ou psychologique au médicament.

Au niveau du contrôle de l'expression du TRPV1, différents agonistes et antagonistes ont montré leur efficacité. Le TRPV1 est un récepteur vanilloïde activé par la capsaïcine et l'eugénol. La capsaïcine est un agoniste connu et spécifique qui désensibilise le récepteur TRPV1 (Szallasi and Blumberg, 1999). Mais l'utilisation de la capsaïcine peut provoquer des irritations ou des sensations de brûlure. L'eugénol, un des composants du clou de girofle, est un antagoniste naturel du TRPV1, agissant en bloquant de façon réversible les canaux Na^+ menant à l'activation du TRPV1, soulageant donc la douleur neuropathique (Szallasi and Blumberg, 1993 ; Yang *et al.*, 2003 ; Lionnet *et al.*, 2010) et possédant un effet analgésique (Guénette *et al.*, 2007). Il a été précédemment démontré que les antagonistes du TRPV1 induisaient une analgésie que ce soit contre la douleur inflammatoire ou neuropathique (Caterina *et al.*, 1997 ; Ohkubo and Shibata, 1997 ; Tominaga *et al.*, 1998).

Les antidépresseurs et les anticonvulsants appartiennent à un groupe de médicaments communément appelés analgésiques adjuvants. Les antidépresseurs interagissent avec les neurones monoaminergiques centraux qui utilisent la noradrénaline et la sérotonine en tant que neurotransmetteurs. Ils peuvent bloquer la recapture de noradrénaline et/ou de sérotonine (Sindrup and Jensen, 1999; Reisner, 2003). Les anticonvulsants sont des régulateurs négatifs

de l'excitabilité neuronale, en augmentant l'inhibition ou en diminuant l'excitation du SNC (Wiffen *et al.*, 2010).

V. Hypothèses de l'étude

Il existe toute une gamme de traitements disponibles pour la gestion de la douleur, mais ils demeurent souvent insuffisants et leur utilisation à long terme induit des effets secondaires indésirables et nocifs pour la santé. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la découverte de nouveaux analgésiques efficaces et sécuritaires devient donc critique. Pour cela, il faut approfondir les connaissances scientifiques au niveau des mécanismes moléculaires associés aux processus inflammatoires et de transmission de l'information nociceptive du SNP, du SNC et au niveau systémique.

Les tachykinines sont connues pour jouer un rôle critique dans la transmission du message nociceptif. Lors d'une lésion, il est su que les neuropeptides bioactifs, leurs précurseurs et d'autres produits de la réaction protéolytique sont libérés en formant une « soupe inflammatoire », déclenchant de l'hyperalgésie primaire au niveau du SNP. Ces neuropeptides bioactifs, dont SP et NKA, leurs précurseurs et métabolites possèdent leurs propres activités pharmacologiques et interviennent aussi au niveau du SNC, en contribuant au développement de l'hyperalgésie secondaire. L'étude de la modulation d'expression de ces neuropeptides aux niveaux spinal et cérébral, ainsi que l'étude de la stabilité et du profil métabolique de SP dans des microsomes hépatiques s'avèrent donc importantes afin de définir quels analytes pourraient devenir des biomarqueurs de la douleur chronique et quelles nouvelles cibles thérapeutiques pourraient être envisagées. Aucune preuve n'ayant été apportée afin de démontrer que SP passe bien dans le sang à des concentrations plasmatiques suffisantes pour justifier la présence d'un métabolisme hépatique, il nous a semblé important

de réaliser une quantification relative des tachykinines dans le plasma des rats neuropathiques et sains.

Les étapes de maturation des précurseurs impliquent plusieurs familles enzymatiques, dont les proprotéines convertases PC1/3 et PC2. Il semble aussi important d'éluder les sites de clivage spécifiques à chaque neuropeptide afin de pouvoir définir si ces enzymes pourraient être régulées dans le but de contrôler le développement et le maintien de la douleur.

Aujourd'hui, il est connu que SP favorise la sensibilisation du récepteur TRPV1 (Zimmer *et al.*, 1998). Nous croyons que l'expression et l'activation du récepteur TRPV1 modulent celles des tachykinines, et plus particulièrement SP et NKA, et donc que le TRPV1, SP et NKA sont étroitement liés. Nous pensons que si l'activation du récepteur TRPV1 est régulée par administration d'antagonistes (e.g. eugénol, [6]-gingérol), l'expression des tachykinines serait à son tour régulée, abaissant ainsi le seuil douloureux du patient, allégeant donc sa perception de la douleur.

VI. Objectifs de recherche

Afin de répondre aux hypothèses émises, différents objectifs ont été établis.

1) Développer et valider des stratégies analytiques fiables, capables d'identifier, caractériser et quantifier spécifiquement les tachykinines ciblées dans les cerveaux, les moelles épinières et la circulation systémique (plasma) par HPLC-MS, HPLC-MS/MS et HPLC-MRM.

2) Relier la modulation d'expression des tachykinines cibles (précurseurs et métabolites de SP, SP et NKA) et le développement de la neuropathie, entre des cerveaux et moelles épinières de rats contrôles *versus* des rats neuropathiques. Ceci en employant le modèle animal de CCI pour développer la neuropathie, et en utilisant le test de Hargreaves et

les filaments de von Frey et pour établir la ligne de base avant la chirurgie et démontrer l'installation d'une douleur neuropathique suite à la chirurgie.

3) Mettre en évidence la modulation d'expression de SP et NKA par l'activation du récepteur TRPV1 dans le SNC, en quantifiant les neuropeptides ciblés dans des moelles épinières et cerveaux de souris WT et TRPV1^{-/-}.

4) Déterminer la stabilité et le profil métaboliques de SP dans des microsomes hépatiques de rats, souris et humains, *in vitro*, afin d'identifier, caractériser et quantifier les métabolites de SP pour chacune des espèces.

CHAPITRE 2 : ARTICLES

I. Article 1 : Internal standard strategies for relative and absolute quantification of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry

F. Pailleux^{a,b} and F. Beaudry^a

***Biomedical Chromatography*. 2012;26(8):881-891.**

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2012), with permission from Wiley.

^aGroupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada

^bUMR 5280 CNRS Université de Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne cedex, France

I.1 Abstract

The development of LC-MS/MS instruments and related applications improved the large-scale analyses of proteins and peptides in complex biological mixtures. The historical factor limiting these types of studies was the lack of sensitivity and reproducibility. However, the capacity of these analyses to detect proteins and peptides was significantly enhanced to a point where they are routinely performed in specialized laboratories in support to drug development programs as well as prognostic and diagnostic investigations. The analytical strategy used in peptidomic analyses needs to minimize the fluctuation in data measurements that might mask or reduce the precision of the determinations and consequently reduce the sensitivity of the assay. Inherently, it outlines the importance of careful standardization to reduce technical and instrumental variation. Therefore, this review will focus on the strengths and the limitations of the different experimental approaches used for the integration of internal standards in peptidomic studies. This review will examine a wide variety of methods, reagents, instrumentations and data analysis tools available to design peptidomic experiments.

Moreover, this review will focus on the importance of precision and accuracy in order to adequately establish analysis threshold to detect peptide expression differences.

I.2 Introduction

Recent LC-MS technological developments together with the integration of new analytical strategies significantly contributed to the acceleration of drug discovery and development (Lee and Kerns, 1999; Korfmacher, 2005). Furthermore, the development of specialized bioinformatic tools opened new opportunities for the identification and quantification of biomarkers (Palagi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007b; Kumar and Mann, 2009). Undoubtedly, the meaning of bioanalysis evolved and motivated the continual development of LC-MS-based technologies and strategies (Chalkley, 2010; Honour, 2011). Novel LC-MS applications significantly contributed to major advances for pharmaceutical and clinical research (Korfmacher, 2005; Shushan, 2010). However, typical pharmaceutical applications seemed to mostly emphasize high throughput and sensitivity, but recently struggled to identify effective lead compounds, uncovering the necessity for an important overhaul of the discovery process (Trist, 2011). The development of mechanism driven drug discovery strategies is key to improving success and relies on the development of a better knowledge of the molecular pathology in order to identify biomarkers (Jørgensen, 2011; Lee *et al.*, 2011). A biomarker is a biochemical entity (e.g. proteins, peptides, metabolites), which can be measured and used to diagnose or classify diseases (Lee *et al.*, 1995). The analysis of biomarkers provides a new approach to monitor therapeutic response (Lee and Hall, 2009). The latest information generated by the human genome project promised great hope for making early detection of diseases a reality, but initial findings illustrated that information on protein localization, structure, function, expression and post-translational modifications is key in achieving this goal (Chautard *et al.*, 2009; Westwick and Lamerdin, 2011). Consequently,

major efforts were made to develop new LC-MS and other related MS technologies to support the identification and quantification of proteins in complex biological samples (Chalkley, 2010). Proteomics aim at elucidating the structure, function and interaction of all the proteins found in cells or organisms (Bousquet-Dubouch *et al.*, 2011). Proteomic studies are not straightforward, especially if the objective is to understand the biomolecular mechanism underlying a specific pathological condition since protein functions are gained following very specific post-translational modifications (Kamath *et al.*, 2011). This assertion is particularly true for bioactive peptides that are mainly proteolytic fragments of precursor proteins (Hook *et al.*, 2008).

The subproteome contains numerous biological active compounds, including small proteins, peptide hormones, neuropeptides and transient fragments of protein degradation (Schiess *et al.*, 2009). The expressions peptidome and peptidomics both refer to the simultaneous visualization and identification of all peptides expressed in a cell or tissue. The concentration of endogenous peptides is likely to vary as a function of the particular physiological status. Peptidomic analysis may lead to the discovery of biologically relevant peptides as disease biomarkers, efficacy indicators or basically early indicators of biological activity and/or toxicity (Baggerman *et al.*, 2004; Schrader and Selle, 2006). Biomarkers are extensively used in medicine and more recently in drug discovery and development (Lee and Hall, 2009). Thus, peptide expression patterns may contribute to the discovery of novel biomarkers that could help to accelerate preclinical and clinical drug development as well as assist post-approval safety surveillance.

The detection and quantification performed using well-established proteomic approaches are not well adapted for peptidomic analysis and alternative strategies need to be considered. In addition, comprehensive peptide analyses are limited by minute concentrations of some peptides, particularly owing to the relatively short half-life of some peptides along

with proprotein turnover, making their detection and interpretation an important challenge (Tinoco *et al.*, 2011). Proprotein maturation into active peptides often follows a common multistep process (Hook *et al.*, 2008), making peptidomic analysis very complex. Consequently, the analysis methods and strategies need to be customized and adapted. Peptides have different physico-chemical properties from proteins and other endogenous biomolecules and hormones. The detection system for these analyses needs to satisfy several conditions; primarily, it must be sensitive and specific to allow the analyses of minute amounts (Tamvakopoulos, 2007). The analytical methods need to permit the quantitative comparisons of expression patterns among samples by simultaneous or sequential detection of the peptides with acceptable figure of merits (Ye *et al.*, 2009). The analytical strategy used in peptidomic analyses needs to minimize the fluctuation in data measurements that might mask or reduce the precision of the determinations and consequently reduce the sensitivity of the assay (Cairns, 2011). This is a critical factor since understanding the impact of the method precision can influence the experimental design to achieve the required power either by leading to a greater number of replicates or by modifying the analytical and instrumental strategy to reduce analysis noise. It is well known that technical and instrumental errors can be a significant source of variation (Friedman, 2012). Data analysis and interpretation are restricted to looking for concentration changes above a threshold determined by the system's experimental error or noise. It limits the sensitivity of the system, as biologically relevant changes smaller than the threshold cannot be quantified. Thus, the analytical strategy used may hamper the ability to reveal peptide modulation or biological effects that are statistically significant between samples. Inherently, it outlines the importance of careful standardization to reduce technical and instrumental variation.

Mass spectrometry has become the method of choice for the identification and accurate quantification of the subproteome in complex biological samples, mainly owing to its

high sensitivity and selectivity. More specifically, the use of specific peptide biomarkers represents a new perspective for LC-MS applications to foster better understanding of the molecular biology of diseases and complement proteomic and metabolic current efforts (Soloviev and Finch, 2006). The combination of electrospray (ESI) and matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) methods with one or several mass analyzers (i.e. QqQ, QqLIT, QqTOF, LITOrbitrap) offers a large variety of analytic tools with performance figures adequate to establish a precise and accurate peptide expression profile (Araki *et al.*, 2011; Ferranti *et al.*, 2011; Mangerini *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012a). As mentioned before, analytical strategies developed to support proteomic studies are not readily applicable for peptidomic studies. However, some general principles can be applied and lessons can be learned for the extensive literature in order to help develop better peptidomic strategies. In quantitative proteomics, proteins are usually labeled during sample preparation and commonly quantified using a mass spectrometry related technique (Peters *et al.*, 2001; Lill, 2003; Ong and Mann, 2005; Becker, 2008). The quantification of proteins can be divided into two distinct categories, absolute and relative quantification. Most quantitative proteomics studies use relative quantification strategies (Ong and Mann, 2005), but with the increased number of protein and peptide drugs, absolute quantification has become an important topic in quantitative proteomics (Ohtsuki *et al.*, 2011). Relative quantification of protein abundances is measured between two or more sets of biological samples and statistically compared. The study outcomes are dependent on the assumption that data were normalized appropriately to remove systematic bias, permitting accurate comparison. Normalization in proteomics has been performed using different methods including *in silico* or label-free approaches (Podwojski *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010), isotope-coded affinity tags methodologies (Gygi *et al.*, 1999), isobaric (Thompson *et al.*, 2003, Ross *et al.*, 2004) and nonisobaric (DeSouza *et al.*, 2008) peptide labeling (i.e. iTRAQ, TMT, mTRAQ) and de novo synthesis of internal

standards (i.e. surrogate peptide analogs, stable isotope labeled peptides; Lebert *et al.*, 2011). Are these approaches adaptable for normalization in peptidomic studies? This review will discuss several strategies used in peptidomic studies to alleviate the endemic problem of analytical error in all phases of peptide biomarker studies.

I.3 Internal standards for targeted quantitative peptidomics

As discussed previously, quantitative proteomic has been the center of recent MS and related technique developments. More recently, the effectiveness of multiple reaction monitoring (MRM) for targeted protein quantification has been widely demonstrated using triple quadrupole (Picotti *et al.*, 2010), linear ion trap (Fortin *et al.*, 2009), Orbitrap (Nogueira *et al.*, 2012) and hybrid quadrupole time of flight based MS systems (Andrews *et al.*, 2011). The interest in MRM assays is mainly driven by the well-known sensitivity and selectivity of these techniques (Picotti *et al.*, 2009). The early development of LC-MS-based assays focused mainly on small pharmaceutical analytes (e.g. drugs and metabolites) and it was rapidly recognized that internal standards (IS) are essential in developing robust and reproducible MRM assays with high analytical precision and accuracy (Hamdan and Righetti, 2002, Mirzaei *et al.*, 2009). Consequently, it is now a common approach to use internal standards within quantitative workflow, including the emerging field of targeted quantitative proteomics (Hoofnagle *et al.*, 2012), and they play an important role in pathway profiling, biomarker verification and biomarker validation (Kuhn *et al.*, 2011). Peptidomic analyses have their own challenges, but the technical and instrumental development of robust and reliable quantitative methods is somewhat analogous to proteomic methods. Standardization methods to reduce technical and instrumental variation are at the center of the method development process. There are several approaches to standardization, but internal standard methods appear to be

the most reliable and used amongst bioanalytical scientists (Mulvana, 2010). There are three main approaches to creating internal standards for peptidomic analysis. The first approach is to use a synthetic reference internal standard (SIS). Chemical peptide analogs (Winter *et al.*, 2010) or stable labeled isotopic peptide analogs (Selevsek *et al.*, 2011) are used to create the internal standards for quantitative MRM assays. A second approach is to use a reference sample to which everything will be compared. This method is referred to as the reference internal standard (RIS) method. In the RIS method, chemical or metabolic isotopic labeling is required to enable relative quantification-based MRM pairs (Chen *et al.*, 2009; Walther and Mann, 2011). The last approach is similar to RIS to some extent but using a global internal standard (GIS) strategy, the internal standard is created with a pool of all biological samples and differentially labeled with isotopic tags (Pan and Aebersold, 2007). There are distinctive applications of these strategies. RIS and GIS are used mostly for relative quantification and SIS is used for both relative and absolute quantification, thus making SIS more appropriate in the field of biomarker validation and analysis. Relative quantification cannot be neglected and it is a very important tool for pathway profiling (Regnier and Julka, 2006) as well as in biomarker identification and verification (Bennett *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012b). Mainly, these approaches were developed in support to bottom-up proteomic efforts, but in subsequent sections, we will discuss those strategies in the context of peptidomic analysis.

Some recent developments in quantitative proteomics showed interesting results using label-free quantification workflows (Neilson *et al.*, 2011; Gonnelli *et al.*, 2012). This strategy used either spectral counting and/or peptide elution ion trace profiles (XIC or MRM) for direct quantification using *in silico* normalization methods. Although label-free quantification of peptides reduces the amount of sample preparation steps, and can provide useful information for pattern detection, it is however very dependent on the technical and instrumental errors, statistical power and statistical model used (Levin, 2011). Moreover, it is

extremely dependent on the instrument stability over time since the analysis time for each sample is commonly between 45 and 120 min (Sandra *et al.*, 2008; Issaq *et al.*, 2009). Biomarker study outcome relies profoundly on the precision and the sensitivity of the LC-MS instrument used and consequently the label-free approach may represent an added challenge. However, this approach has a time and cost advantage, which is non-negligible but thorough methodological investigations are needed to ascertain fluctuation in data measurements and define level of significance according to the threshold determined by the method's precision (Levin, 2011). To overcome the lack of an efficient standardization in label-free analysis, some recent studies used a control protein as a pseudo internal standard strategy, resulting in a significant improvement in the robustness and error noise of the assays (Tabata *et al.*, 2007; Hoofnagle *et al.*, 2012). In peptidomic analysis, this is somewhat equivalent to using an analog peptide as the internal standard, a common cost-effective strategy for the development of methods for relative and absolute quantification of targeted peptides (Lanckmans *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2011), and it is an integral part of the SIS strategy that will be further discussed. Not satisfied with theoretical assertion of these different strategies, we made a retrospective analysis of our data generated during recent neuropeptidomic studies performed in our laboratory and compared the observed coefficient of variation (CV) when using traditional label-free approach *vs* standardization with analog peptide internal standards and isotopic-labeled internal standards. The data presented in Fig. 1 suggest that isotopic labeled internal standard provides a significant improvement, but a label-free approach was not as bad as expected. Monitoring the raw peak area across several injections revealed that the CVs observed from specific MRM transitions were less than 20%, which is quite acceptable. Despite the fact that the reproducibility is not as good compared with an internal standard method, if the peptide concentration differences are significant between groups, this may

represent an easy alternative to perform rapid pathway profiling to identify potential biomarkers. However even if the CV is less than 20%, when adding the biological variability amongst a specific group, this method of analysis limits the sensitivity of the assay, as biologically relevant changes smaller than the error threshold cannot be detected. Hence, peptide biomarker analysis will significantly gain in precision and accuracy using peptide analogs as internal standards or even better, using synthetic peptide labeled internal standards.

I.4 Quantification using synthetic internal standards

Isotopic dilution techniques have been around for decades in mass spectrometry. They have been used extensively in forensic science (Nakahara *et al.*, 1991), in diagnostic (Wolthers and Kraan, 1999), in metabolism (Kuhara, 2007) and more recently for the quantification of small therapeutic drugs to support pharmacokinetic and toxicokinetic studies (Yokokawa *et al.*, 2009; Kuepper *et al.*, 2011). The successful application of this strategy in many spheres of analytical chemistry led to significant interest in the proteomic and peptidomic fields. Stable isotope-labeled peptides, created chemically *de novo*, have certainly many advantages since resulting internal standards would preserve very high similarities with the physico-chemical properties (except for the mass) of the targeted peptides. However, this approach is not cost-effective when larger numbers of peptides need to be analyzed. This method is generally suited to studying a very precise molecular mechanism or when a few very specific peptide biomarkers were verified and needed further validation (Hoofnagle, 2010). It is widely recognized that using a stable isotope-labeled internal standard will offer the best guarantee for high specificity, reproducibility and precision of the method, since it diminishes problems with calibration and sample preparation matrix effects associated with the analysis of complex biological samples (Julka and Regnier, 2004; Bronsema *et al.*, 2012).

Different amino acids residues are available incorporating labeled atoms such as ^{13}C , ^{15}N or ^2H (or d for deuterium). Conceptually, since stable isotope-labeled internal standards are nearly identical in structure and assuming they co-elute with the analyte, the degree of ionization suppression or enhancement caused by the co-eluting matrix components should be compensated for by the internal standard (Stokvis *et al.*, 2005; Remane *et al.*, 2010). Therefore, while the absolute response might be affected, the analyte to IS peak area ratio should be unaltered, and consequently, the figure of merits should improve using stable isotope-labeled internal standards. This is an accepted assumption and in many cases it is an assumption validated by the actual data (Halquist and Karnes, 2011; Xia *et al.*, 2011). In an ideal world, using stable isotope-labeled internal standards for bioanalytical assays would be the prevailing method, but it is not always practical and/or economical. Deuterated internal standards cost much less compared with other labeling alternatives, but what are the consequences? Many deuterium labeled amino acids are commercially available and can be successfully used in de novo peptide synthesis. However, resulting deuterium labeled peptides may display more physicochemical property differences compared with the light peptide impacting chromatographic retention (Kato *et al.*, 2000; Wieling, 2002) and electrospray ionization (Wang *et al.*, 2007a). As illustrated in Fig. 2, we tested the impact of deuterium label peptides on chromatographic retention for two tachykinin-related peptides. The results suggest that, in one case, the light and heavy forms of substance P were nearly identical in chromatographic retention but a metabolite, substance P₅₋₁₁, had a 1 min difference in retention time using a 19 min linear gradient on a C₈ 100 mm column. The difference is not insignificant, but is it sufficient to deter the use of deuterated labeled peptides, particularly for small peptides? The chromatographic behavior and retention differences are strongly linked to the number of deuterium atoms and the molecular weight of the analyte. Consequently, larger peptide with three to five deuterium atoms would show less chromatographic dissimilarities.

The primary sequence of many bioactive peptides has at least eight amino acids but these peptides are metabolized (Berman *et al.*, 1999; Hook *et al.*, 2008) and some have a very short half-life (Weber *et al.*, 1992, Pailleux *et al.*, 2012), thus many quantitative peptidomic analysis would be required to analyze active peptides and resulting metabolites that may have much shorter primary sequences. When comparing deuterated and non-deuterated internal standard analogs, it is clear from all the historical data that, despite differences in chromatographic behavior, deuterated internal standards provide a better solution compared with analog ones. The cost advantage of the deuterated internal standard analog can be an incentive to introduce internal standard early in the process of biomarker discovery and/or verification, which may significantly improve the validation success.

There are other considerations when using stable isotope labeled internal standards. Isotopic clusters of light and heavy peptides, especially for multiply charged species, need to be assessed adequately. Bioinformatic tools are available to quickly make simulations that would help to properly determine the adequate number of labeled atoms needed to be incorporated to avoid isotopic pollution (Ong and Mann, 2005; Cappadona *et al.*, 2011). Ideally, singly charged precursor ion isotope clusters should be separated by at least 3 Da, but doubly and triply charged species are commonly more abundant in ESI-MS for peptides with more than 10 amino acids (Julka and Regnier, 2004). The analysis of doubly or multiply charged species would benefit larger precursor ion isotope cluster mass differences, especially when using unit mass resolution mass spectrometers (Cox and Mann, 2011). Quantitative LC-MRM assays are generally developed and validated using triple quadrupole instrument or hybrid linear ion trap, which are by definition unit mass resolution instruments. Other instruments offering high-resolution MRM-like quantification are available, such as hybrid Orbitrap and QqTOF instruments (de Graaf *et al.*, 2011; Plumb *et al.*, 2012). These instruments feature much higher resolution, up to 100,000 full width at half maximum

(FWHM), which is an advantage for high resolution, accurate mass MS/MS data, but precursor ions are still isolated at low mass resolution in the first mass analyzer (e.g. quadrupole, LIT). Poor selection of precursor ion clusters can result in isotopic pollution of MS/MS data, even using hybrid high-resolution mass spectrometers. Are precursor ion clusters really a concern? In Fig. 3, we are showing two examples of typical bioactive peptides regularly analyzed by LC-MS/MS. The first example (Fig. 3A) simulated the precursor ion clusters for substance P and ($^{13}\text{C}_6$ -Leu) substance P for the doubly charged species. The results showed that the separation of the precursor ion clusters would allow a selective isolation with a unit mass resolution first analyzer of a tandem mass spectrometer. However, the analysis of CGRP, a 37-amino acid peptide, would require more caution. As illustrated in Fig. 3(B), the precursor ion clusters are close since quadruply charged species dominate the ESI-MS spectrum for this peptide. The simulated spectra suggest that 10-12 Da should separate the light and heavy form of CGRP to adequately isolate precursor ion using a unit mass resolution first analyzer of a tandem mass spectrometer. Careful evaluations should be made prior to making a synthesis decision on a stable isotope-labeled internal standard. It should start with instrumental analysis of the light version of the targeted peptide and, using the results, perform adequate simulations using bioinformatic tools (Ong and Mann, 2005). Stable isotope-labeled internal standard will provide the best internal standard alternative but cannot be used blindly.

I.5 Quantification base on reference internal standard

Reference internal standard strategy uses a single sample (or a pool of reference samples) as the reference to which all other samples will be compared. This strategy is widely used in proteomics, particularly in bottom-up proteomic studies (Lebert *et al.*, 2011). It is

mainly used during biomarker discovery studies since it is a much more cost-effective strategy compared with using synthetic peptide internal standards for a wide-scope peptidomic study (Wang and You, 2012). There are several strategies used to create internal standards with a single sample. The first approach would be to use a stable isotope chemical-labeling strategy. As discussed in the previous section, the simplest approach for targeted peptide analysis is to chemically synthesize stable isotope-labeled internal standards and spike a known quantity in the samples to enable quantitation. RIS represents an alternative approach, but requires different chemical strategies. Instead of substituting specific amino acids with their heavy counterpart, we used the reactivity of specific amino acid functional groups to introduce chemical labels, specifically, N-terminal amino groups, C-terminal carboxyl groups and the primary amine of lysine (Ong and Mann, 2005). Nonisobaric amine labeling reagents for creating internal standards for quantitative LC-MRM assays is probably the most applied strategy in bottom-up proteomic and recent peptidomic studies (Che *et al.*, 2005; Chiappetta *et al.*, 2010; DeSouza *et al.*, 2010). One major advantage of this method is that it requires only one simple labeling step to create an internal standard for every peptide in a given sample. Bottom-up proteomic studies showed above 90% labeling efficiency for tryptic peptides in real samples (Ernault *et al.*, 2008). This is a strong argument in favor of this strategy and makes it very attractive for further adaptation in peptidomic studies. One constraint associated with bioactive peptides is the diversity of the C-terminal amino acid compared with tryptic peptides as well as the distribution length of peptides. Nonisobaric amine labeling reagents react with N-terminal amino groups but also with lysine. Tryptic peptides would have lysine residues at the C-terminal and therefore the reaction yield would not be compromised by steric hindrance caused by the secondary structure of the peptide. Moreover, the large diversity of peptides with physiological interests would be a limiting factor since several lysine residues can be observed in their primary structure and

consequently the reaction may generate a pool of products with variable yields (Ong and Mann, 2005). An evaluation of mTRAQ nonisobaric amine labeling reagent on substance P and CGRP was performed. As illustrated in Fig. 4(A and B), the doubly charged precursor ion clusters for mTRAQ labeled substance P is acceptable since both the N-terminal amine and the lysine residue were derivatized. Moreover, the yield of the reaction appears to be similar for mTRAQ reagents $\Delta 0$, $\Delta 4$ and $\Delta 8$. Subsequently, LC-MRM assay can be developed using specific reporter ions (i.e. $\Delta 0$, m/z 113; $\Delta 4$, m/z 117; $\Delta 8$, m/z 121). On the other hand, CGRP mTRAQ nonisobaric amine labeling does not provide enough ion cluster separation for a selective isolation with a unit mass resolution first analyzer of a tandem mass spectrometer. CGRP is a 37-amino acid peptide including only one lysine residue in its primary structure. The N-terminal amine and the lysine residue were derivatized and the full scan revealed that the quintiply charged precursor ion was the most abundant. Charged species with lower multiplicities were observable but the sacrifice in ion abundance would be detrimental for the development of a quantitative assay. Also, the yield of the reaction appeared to be variable between mTRAQ reagents $\Delta 0$, $\Delta 4$ and $\Delta 8$ and our internal data suggest that it is widely variable between runs. This later observation might be the consequence of steric hindrance of the lysine residue, which may influence the yield of the reaction. Similarly to typical tryptic peptides, nonisobaric amine labeling reagents can be an effective strategy for the quantification of relatively short bioactive peptides (< 15 amino acids), but may represent a challenge when lysine residues are present in the primary structure of the peptide. Another observation from this data is the overlap in precursor ion mass between the two targeted peptides analyzed. Comparison of Fig. 4(B and D) revealed that mTRAQ reagents $\Delta 4$ and $\Delta 8$ generated products with similar precursor ion masses for substance P and CGRP, outlining the necessity for good chromatographic separation, particularly if reporter ions are used to build the LC-MRM assay. Thus, rapid-gradient (Guillarme *et al.*, 2010) and ballistic-gradient

(Romanyshyn and Tiller, 2001) reversed phase high-performance liquid chromatography may not be an adequate choice when using nonisobaric amine labeling reagent to create an internal standard for peptidomic analysis.

Nonisobaric amine labeling can be achieved without using a commercial kit (i.e. mTRAQ). There are many other options, including acetylation with acetic anhydride (d_6 or $^{13}C_4$; Che *et al.*, 2005), propionic anhydride (d_{10} or $^{13}C_6$; Nam *et al.*, 2005), succinic anhydride (d_4 , $^{13}C_4$; Koehler *et al.*, 2009) and additional related approaches (Ong and Mann, 2005). Generic labeling methods offer more flexibility for optimization, which is an important element during the development phase of a peptidomic LC-MS/MS assay owing principally to the large diversity of physiological relevant peptides. Other less common methods include the esterification of the C-terminal carboxyl group (Goodlett *et al.*, 2001). The esterification is not commonly considered since the resulting products are less stable and the reaction can be easily reversed. Other chemical-labeling strategies have been developed to support proteomic studies, including the alkylation of cysteine (Sechi and Chait, 1998), but they are not applicable to peptidomic studies.

Another class of amine-modifying labeling reagents that create isobaric peptide analogs may represent an interesting alternative to nonisobaric amine labeling strategies, since it allows multiplexing. There are commercial kits available (iTRAQ and TMT) that have been extensively used in bottom-up proteomic studies (Quaglia *et al.*, 2008). iTRAQ reagents share similarities to mTRAQ reagents (DeSouza *et al.*, 2008) and both strategies can be used within a project without much protocol modification and thus may represent an asset for discovery biomarker workflow. However, the same limitations as observed for the mTRAQ reagent exist for the iTRAQ reagent. Additionally, isobaric labeling reduces the distinct structural MS/MS information that still exists while performing nonisobaric amine labeling. The strongest argument in favor of iTRAQ is that it allows a highest order multiplexing (8-plex).

iTRAQ, and similarly TMT, performed best when used in LC-MRM assays (Armenta *et al.*, 2010), including post processing LC-MRM on high-resolution hybrid instruments (Pawar *et al.*, 2011). Amine-modifying labeling reagents also performed better in low-complexity mixtures compared with high-complexity mixtures and required systematic method optimization to achieve good selectivity and repeatability (Quaglia *et al.*, 2008). Another issue, specifically related to LC-MRM methods based on reporter ions, is associated with compression of the quantitation ratios typically observed in high-complexity mixtures (Ow *et al.*, 2011). The compression is essentially due to the effect from overlapping precursors, which generate a background level of reporter ion signals. Again, rapid-gradient and ballistic-gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography are not a suitable choice when using isobaric amine labeling reagent for relative quantification of peptides in high-complexity mixtures. In a multiplexing LC-MRM method, a reference sample (or a pool of reference samples) would be labeled with one of the iTRAQ reagents to create an internal standard, combined with test samples labeled with other specific iTRAQ reagents, and analyzed together with specific reporter ions (Burkhart *et al.*, 2011). The ratio is then used for relative peptide quantification. Alternatively, we could create the internal standard with synthetic peptide instead of an actual sample and performed absolute quantification.

I.6 Quantification base on global internal standard

Global internal standard involves the creation an internal standard from a pool of all of the biological samples to be analyzed. It is a different approach compared with RIS, where only a reference sample, sometimes a pool of reference samples, is used as an internal standard. In the GIS approach, all samples are used to create the reference samples (Chakraborty and Regnier, 2002; Pan and Aebersold, 2007). Even if this is disputable,

generally, the GIS method is used during verification where hundreds of samples are analyzed (DeSouza *et al.*, 2010). The challenge resides in making the pool of hundreds of samples; robotics can greatly help for biological fluids, but may represent an additional challenge for biological tissues or even in vitro preparations. This approach is interesting when using multiplexing reagents (e.g. mTRAQ), particularly using the triplex reagent enabling the analysis of two samples (normal and pathologic) along with the GIS within a single injection, increasing the method throughput. Similarly to RIS methods, the ratio of light and heavy labeled samples MRM traces is computed and used for the relative quantification of peptides (Ong and Mann, 2005). Also, with both methods, peptide ratios can be used to compare the modification in expression between all the biological samples. GIS methods could offer a better approach at normalizing samples compared with RIS or SIS, especially if the nature of the samples to be compared vary widely (Chakraborty and Regnier, 2002). This can be true for in vitro models, but also with samples from normal, pathological and treated patients (Pan and Aebersold, 2007; Xiang *et al.*, 2010). Consequently, the relative ratio of the sample to the internal standard will be affected more equally by technical effects and so the use of GIS may improve comparisons across multiple samples, whereas in label-free LC-MRM studies, most of the variability are attributed to injection variability, matrix effect and ionization suppression and interferences (Zhu *et al.*, 2010). Using GIS, the matrix effect and ionization suppression problem could be better normalized compared with SIS and RIS methods. The importance of careful standardization to reduce technical variation is an important preoccupation (Cairns, 2011). This is particularly true in peptidomic studies, since expression studies comparing one set of samples with another using relative (GIS or RIS) or absolute (SIS) quantification methods are restricted at looking for changes above a threshold determined by the system's experimental error (Cairns, 2011). Thus, biologically relevant changes smaller than the threshold cannot be detected. The internal standard strategy is a

determining factor in the power of revealing actual expression changes. This is a very generic statement. We decided to investigate SIS, RIS and GIS approaches and measured the impact of each method on our ability to detect expression differences in actual biological samples. As illustrated in Fig. 5, we measured dynorphin A and substance P in rat spinal cord of normal and pathological animals. The conclusions derived from the analytical results were unaffected by the internal standard strategy used. In all cases evaluated, the trends were similar and they were all statistically significant ($p < 0.05$). However, when examining the actual intragroup variability, it is apparent that SIS method reduces the error as shown by a significant reduction of the standard error observed. This could be a determining factor to detect minute differences between two sets of samples. There are always questions raised when the expression differences are statistically significant but the changes are very small. Some experts may argue that what is being observed has little biological relevance. Nevertheless, the GIS or the RIS methods are not invalidated by the substantial enhancement observed using the SIS approach. The effect of group sizes should be taken into consideration, especially when differences are small and near the analytical error. Improving the system's experimental error may contribute significantly to the ability to detect statistically significant differences (Ahmed, 2009). As mentioned before, SIS is not an effective or realistic strategy for 'shot-gun' peptidomic analysis. GIS and RIS provide a significantly more universal approach in the early phase of biomarker discovery (Chakraborty and Regnier, 2002; Ong and Mann, 2005; Pan and Aebersold, 2007).

I.7 Concluding remarks

Quantitative LC-MRM assays used in peptidomic studies should use a standardization method to reduce technical and instrument variation. The technical variation, sometimes

referred as analytical noise, is defined as variations in data measurements that mask or decrease the precision of a signal and consequently reduce the sensitivity of an experiment to detect biologically significant differences between samples and/or groups of samples. Thoughtful evaluation of the method precision will influence the analytical experimental design, especially with regard to the internal standard strategies and the number of replicates being needed at the technical and biological level to reduce the noise and improve the ability to detect peptide expression differences. RIS, GIS or SIS strategies can be used in peptidomic studies, but users should be aware of the limitations for each approach before making a suitable choice.

I.8 Acknowledgements

This work was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry NSERC Discovery grant no. 386637-2010). F. Pailleux received a scholarship from the Coopération et mobilité Internationales Rhône-Alpes.

I.9 References

Ahmed FE. Utility of mass spectrometry for proteome analysis: part II. Ion-activation methods, statistics, bioinformatics and annotation. *Expert Review of Proteomics*. 2009;6(2):171-197.

Andrews GL, Simons BL, Young JB, Hawkrigde AM, Muddiman DC. Performance characteristics of a new hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (TripleTOF 5600). *Analytical Chemistry*. 2011;83(13):5442-5446.

Araki Y, Nonaka D, Tajima A, Maruyama M, Nitto T, Ishikawa H, Yoshitake H, Yoshida E, Kuronaka N, Asada K, Yanagida M, Nojima M, Yoshida K, Takamori K, Hashiguchi T, Maruyama I, Lee LJ and Tanaka K. Quantitative peptidomic analysis by a newly developed one-step direct transfer technology without depletion of major blood proteins: its potential utility for monitoring of pathophysiological status in pregnancy-induced hypertension. *Proteomics*. 2011;11(13):2727-2737.

Armenta JM, Perez M, Yang X, Shapiro D, Reed D, Tuli L, Finkielstein CV and Lazar IM. Fast proteomic protocol for biomarker fingerprinting in cancerous cells. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(17):2862-2870.

Baggerman G, Verleyen P, Clynen E, Huybrechts J, De Loof A and Schoofs L. *Peptidomics. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2004;803(1):3-16.

Becker GW. Stable isotopic labeling of proteins for quantitative proteomic applications. *Briefing in Function Genomic and Proteomic*. 2008;7(5):371-382.

Bennett S, Grant M, Creese AJ, Mangialasche F, Cecchetti R, Cooper HJ, Mecocci P and Aldred S. Plasma levels of complement 4a protein are increased in Alzheimer's disease. *Alzheimer Disease and Associate Disorders*. 2011;in press. doi:10.1097/WAD.0b013e318239dcbd.

Berman Y, Ageyeva L, Veksler B, Wood D and Devi LA. Dynorphin A processing enzyme: tissue distribution, isolation, and characterization. *Journal of Biochemistry*. 1999;125(3):641-647.

Bousquet-Dubouch MP, Fabre B, Monsarrat B and Burlet-Schiltz O. Proteomics to study the diversity and dynamics of proteasome complexes: from fundamentals to the clinic. *Expert Review of Proteomics*. 2011;8(4):459-481.

Bronsema KJ, Bischoff R and van de Merbel NC. Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2012;893-894:1-14.

Burkhart JM, Vaudel M, Zahedi RP, Martens L and Sickmann A. iTRAQ protein quantification: a quality-controlled workflow. *Proteomics*. 2011;11(6):1125-1134.

Cairns DA. Statistical issues in quality control of proteomic analyses: good experimental design and planning. *Proteomics*. 2011;11(6):1037-1048.

Cappadona S, Muñoz J, Spee WP, Low TY, Mohammed S, van Breukelen B and Heck AJ. Deconvolution of overlapping isotopic clusters improves quantification of stable isotope-labeled peptides. *Journal of Proteomics*. 2011;74(10):2204-2209.

Chakraborty A and Regnier FE. Global internal standard technology for comparative proteomics. *Journal of Chromatography A*. 2002;949(1-2):173-184.

Chalkley R. Instrumentation for LC-MS/MS in proteomics. *Methods in Molecular Biology*. 2010;658:47-60.

Chautard E, Thierry-Mieg N and Ricard-Blum S. Interaction networks: from protein functions to drug discovery. A review. *Pathologie-Biologie*. 2009;57(4):324-333.

Che FY, Biswas R and Fricker LD. Relative quantitation of peptides in wild-type and Cpe(fat/fat) mouse pituitary using stable isotopic tags and mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2005;40(2):227-237.

Chen X, Sun L, Yu Y, Xue Y and Yang P. Amino acid-coded tagging approaches in quantitative proteomics. *Expert Review of Proteomics*. 2007;4(1):25-37.

Chiappetta G, Ndiaye S, Demey E, Haddad I, Marino G, Amoresano A and Vinh J. Dansyl-peptides matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric (MALDI-MS) and tandem mass spectrometric (MS/MS) features improve the liquid chromatography/MALDI-MS/MS analysis of the proteome. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2010;24(20):3021-3032.

Cox J and Mann M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. *Annual Review of Biochemistry*. 2011;80:273-299.

DeSouza LV, Taylor AM, Li W, Minkoff MS, Romaschin AD, Colgan TJ and Siu KW. Multiple reaction monitoring of mTRAQ-labeled peptides enables absolute quantification of

endogenous levels of a potential cancer marker in cancerous and normal endometrial tissues. *Journal of Proteome Research*. 2008;7(8):3525-3534.

DeSouza LV, Krakovska O, Darfler MM, Krizman DB, Romaschin AD, Colgan TJ and Siu KW. mTRAQ-based quantification of potential endometrial carcinoma biomarkers from archived formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Proteomics*. 2010;10(17):3108-3116.

Ernoul E, Gamelin E and Guette C. Improved proteome coverage by using iTRAQ labelling and peptide OFFGEL fractionation. *Proteome Science*. 2008;6:27.

Ferranti P, Nasi A, Bruno M, Basile A, Serpe L and Gallo P. A peptidomic approach for monitoring and characterising peptide cyanotoxins produced in Italian lakes by matrix-assisted laser desorption/ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2011;25(9):1173-1183.

Fortin T, Salvador A, Charrier JP, Lenz C, Bettsworth F, Lacoux X, Choquet-Kastylevsky G and Lemoine J. Multiple reaction monitoring cubed for protein quantification at the low nanogram/milliliter level in non-depleted human serum. *Analytical Chemistry*. 2009;81(22):9343-9352.

Friedman DB. Assessing signal-to-noise in quantitative proteomics: multivariate statistical analysis in DIGE experiments. *Methods in Molecular Biology*. 2012;854:31-45.

Gonnelli G, Hulstaert N, Degroeve S and Martens L. Towards a human proteomics atlas. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, in press.

Goodlett DR, Keller A, Watts JD, Newitt R, Yi EC, Purvine S, Eng JK, von Haller P, Aebersold R and Kolker E. Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2001;15(14):1214-1221.

de Graaf EL, Altelaar AF, van Breukelen B, Mohammed S and Heck AJ. Improving SRM assay development: a global comparison between triple quadrupole, ion trap, and higher energy CID peptide fragmentation spectra. *Journal of Proteome Research*. 2011;10(9):4334-4341.

Guillarme D, Ruta J, Rudaz S and Veuthey JL. New trends in fast and high resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010;397(3):1069-1082.

Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH and Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*. 1999;17(10):994-999.

Halquist MS and Karnes HT. Quantitative liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of macromolecules using signature peptides in biological fluids. *Biomedical Chromatography*. 2011;25(1-2):47-58.

Hamdan M and Righetti PG. Modern strategies for protein quantification in proteome analysis: advantages and limitations. *Mass Spectrometry Review*. 2002;21(4):287-302.

Honour JW. Development and validation of a quantitative assay based on tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2011;48(2):97-111.

Hoofnagle AN. Quantitative clinical proteomics by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: assessing the platform. *Clinical Chemistry*. 2010;56(2):161-164.

Hoofnagle AN, Becker JO, Oda MN, Cavigliolo G, Mayer P and Vaisar T. Multiple-reaction monitoring-mass spectrometric assays can accurately measure the relative protein abundance in complex mixtures. *Clinical Chemistry*. 2012;58(4):777-781.

Hook V, Funkelstein L, Lu D, Bark S, Wegrzyn J and Hwang SR. Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2008;48:393-423.

Issaq HJ, Chan KC, Blonder J, Ye X and Veenstra TD. Separation, detection and quantitation of peptides by liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(10):1825-1837.

Jørgensen JT. A challenging drug development process in the era of personalized medicine. *Drug Discovery Today*. 2011;16(19-20):891-897.

Julka S and Regnier F. Quantification in proteomics through stable isotope coding: a review. *Journal of Proteome Research*. 2004;3(3):350-363.

Kamath KS, Vasavada MS and Srivastava S. Proteomic databases and tools to decipher post-translational modifications. *Journal of Proteomics*. 2011;75(1):127-144.

Kato K, Jingu S, Ogawa N and Higuchi S. Determination of pibutidine metabolites in human plasma by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2000;24(2):237-249.

Koehler CJ, Strozynski M, Kozielski F, Treumann A and Thiede B. Isobaric peptide termini labeling for MS/MS-based quantitative proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2009;8(9):4333-4341.

Korfmacher WA. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2005;10(20):1357-1367.

Kuepper U, Musshoff F, Hilger RA, Herbstreit F and Madea B. Pharmacokinetic properties of succinylmonocholine in surgical patients. *Journal of Analytical Toxicology*. 2011;35(5):302-311.

Kuhara T. Noninvasive human metabolome analysis for differential diagnosis of inborn errors of metabolism. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2007;855(1):42-50.

Kuhn E, Whiteaker JR, Mani DR, Jackson AM, Zhao L, Pope ME, Smith D, Rivera KD, Anderson NL, Skates SJ, Pearson TW, Paulovich AG and Carr SA. Inter-laboratory evaluation of automated, multiplexed peptide immunoaffinity enrichment coupled to multiple reaction monitoring mass spectrometry for quantifying proteins in plasma. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011, in press.

Kumar C, Mann M. Bioinformatics analysis of mass spectrometry-based proteomics data sets. *FEBS Letters*. 2009;583:1703-1712.

Lanckmans K, Sarre S, Smolders I and Michotte Y. Use of a structural analogue versus a stable isotope labeled internal standard for the quantification of angiotensin IV in rat brain dialysates using nanoliquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2007;21(7):1187-1195.

Lebert D, Dupuis A, Garin J, Bruley C and Brun V. Production and use of stable isotope-labeled proteins for absolute quantitative proteomics. *Methods in Molecular Biology*. 2011;753:93-115.

Lee JW and Hall M. Method validation of protein biomarkers in support of drug development or clinical diagnosis/prognosis. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2009;877(13):1259-1271.

Lee MS and Kerns EH. LC/MS applications in drug development. *Mass Spectrometry Reviews*. 1999;18(3-4):187-279.

Lee JW, Hulse JD and Colburn WA. Surrogate biochemical markers: precise measurement for strategic drug and biologics development. *Journal of Clinical Pharmacology*. 1995;35(5):464-470.

Lee JM, Han JJ, Altwerger G and Kohn EC. Proteomics and biomarkers in clinical trials for drug development. *Journal of Proteomics*. 2011;74(12):2632-2641.

Levin Y. The role of statistical power analysis in quantitative proteomics. *Proteomics*. 2011;11(12):2565-2567.

Lill J. Proteomic tools for quantitation by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2003;22(3):182-194.

Mangerini R, Romano P, Facchiano A, Damonte G, Muselli M, Rocco M, Boccardo F and Profumo A. The application of atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization to the analysis of long term cryopreserved serum peptidome. *Analytical Biochemistry*. 2011;417(2):174-181.

Mirzaei H, Brusniak MY, Mueller LN, Letarte S, Watts JD and Aebersold R. Halogenated peptides as internal standards (H-PINS): introduction of an MS-based internal standard set for liquid chromatography-mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2009;8(8):1934-1946.

Mulvana DE. Critical topics in ensuring data quality in bioanalytical LC-MS method development. *Bioanalysis*. 2010;2(6):1051-1072.

Nakahara Y, Takahashi K, Shimamine M and Takeda Y. Hair analysis for drug abuse: I. Determination of methamphetamine and amphetamine in hair by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry method. *Journal of Forensic Science*. 1991;36(1):70-78.

Nam HW, Simpson R and Kim YS. N-terminal isotope tagging with propionic anhydride: proteomic analysis of myogenic differentiation of C2C12 cells. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2005;826(1-2):91-107.

Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, Lee A, van Sluyter SC and Haynes PA. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics*. 2011;11(4):535-553.

Nogueira FC, Palmisano G, Schwämmle V, Campos FA, Larsen MR, Domont G and Roepstorff P. Performance of isobaric and isotopic labeling in quantitative plant proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2012;11(5):3046-3052.

Ohtsuki S, Uchida Y, Kubo Y and Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics-based ADME research as a new path to drug discovery and development: methodology, advantages, strategy, and prospects. *Journal of Pharmaceutical Science*. 2011;100(9):3547-3559.

Ong SE and Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chemical Biology*. 2005;1(5):252-262.

Ow SY, Salim M, Noirel J, Evans C and Wright PC. Minimising iTRAQ ratio compression through understanding LC-MS elution dependence and high-resolution HILIC fractionation. *Proteomics*. 2011;11(11):2341-2346.

Pailleux F, Lemoine J and Beaudry F. Investigation of the metabolic biotransformation of substance P in liver microsomes by liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2012. DOI: 10.1002/bmc.2746.

Palagi PM, Hernandez P, Walther D and Appel RD. Proteome informatics I: bioinformatics tools for processing experimental data. *Proteomics*. 2006;6(20):5435-5444.

Pan S and Aebersold R. Quantitative proteomics by stable isotope labeling and mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology*. 2007;367:209-218.

Pawar H, Kashyap MK, Sahasrabudhe NA, Renuse S, Harsha HC, Kumar P, Sharma J, Kandasamy K, Marimuthu A, Nair B, Rajagopalan S, Maharudraiah J, Premalatha CS, Kumar KV, Vijayakumar M, Chaerkady R, Prasad TS, Kumar RV, Kumar RV and Pandey A. Quantitative tissue proteomics of esophageal squamous cell carcinoma for novel biomarker discovery. *Cancer Biology & Therapy*. 2011;12(6):510-522.

Peters EC, Horn DM, Tully DC and Brock A. A novel multifunctional labeling reagent for enhanced protein characterization with mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2001;15(24):2387-2392.

Picotti P, Bodenmiller B, Mueller LN, Domon B and Aebersold R. Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. *Cell*. 2009;138(4):795-806.

Picotti P, Rinner O, Stallmach R, Dautel F, Farrah T, Domon B, Wenschuh H and Aebersold R. High-throughput generation of selected reaction monitoring assays for proteins and proteomes. *Nature Methods*. 2010;7(1):43-46.

Plumb RS, Fujimoto G, Mather J, Potts WB, Rainville PD, Ellor NJ, Evans C, Kehler JR and Szapacs ME. Comparison of the quantification of a therapeutic protein using nominal and accurate mass MS/MS. *Bioanalysis*. 2012;4(5):605-615.

Podwojski K, Eisenacher M, Kohl M, Turewicz M, Meyer HE, Rahnenführer J and Stephan C. Peek a peak: a glance at statistics for quantitative label-free proteomics. *Expert Review of Proteomics*. 2010;7(2):249-261.

Quaglia M, Pritchard C, Hall Z and O'Connor G. Amine-reactive isobaric tagging reagents: requirements for absolute quantification of proteins and peptides. *Analytical Biochemistry*. 2008;379(2):164-169.

Regnier FE and Julka S. Primary amine coding as a path to comparative proteomics. *Proteomics*. 2006;6(14):3968-3979.

Remane D, Wissenbach DK, Meyer MR and Maurer HH. Systematic investigation of ion suppression and enhancement effects of fourteen stable-isotope-labeled internal standards by their native analogues using atmospheric-pressure chemical ionization and electrospray ionization and the relevance for multi-analyte liquid chromatographic/mass spectrometric procedures. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2010;24(7):859-867.

Romanyshyn LA and Tiller PR. Ultra-short columns and ballistic gradients: considerations for ultra-fast chromatographic liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A*. 2001;928(1):41-51.

Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlett-Jones M, He F, Jacobson A and Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2004;3(12):1154-1169.

Sandra K, Moshir M, D'hondt F, Verleysen K, Kas K and Sandra P. Highly efficient peptide separations in proteomics Part 1. Unidimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2008;866(1-2):48-63.

Schiess R, Wollscheid B and Aebersold R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Molecular Oncology*. 2009;3(1):33-44.

Schrader M and Selle H. The process chain for peptidomic biomarker discovery. *Disease Markers*. 2006;22(1-2):27-37.

Sechi S and Chait BT. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Analytical Chemistry*. 1998;70(24):5150-5158.

Selevsek N, Matondo M, Sanchez Carbayo M, Aebersold R and Domon B. Systematic quantification of peptides/proteins in urine using selected reaction monitoring. *Proteomics*. 2011;11(6):1135-1147.

Shushan B. A review of clinical diagnostic applications of liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2010;29(6):930-944.

Soloviev M and Finch P. Peptidomics: bridging the gap between proteome and metabolome. *Proteomics*. 2006;6(3):744-747.

Stokvis E, Rosing H and Beijnen JH. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Communication in Mass Spectrometry*. 2005;19(3):401-407.

Tabata T, Sato T, Kuromitsu J and Oda Y. Pseudo internal standard approach for label-free quantitative proteomics. *Analytical Chemistry*. 2007;79(22):8440-8445.

Tamvakopoulos C. Mass spectrometry for the quantification of bioactive peptides in biological fluids. *Mass Spectrometry Reviews*. 2007;26(3):389-402.

Thomas A, Solymos E, Schänzer W, Baume N, Saugy M, Dellanna F and Thevis M. Determination of Vasopressin and Desmopressin in urine by means of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry for doping control purposes. *Analytica Chimica Acta*. 2011;707(1-2):107-113.

Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neumann T, Johnstone R, Mohammed AK and Hamon C. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*. 2003;75(8):1895-1904.

Tinoco AD, Kim YG, Tagore DM, Wiwczar J, Lane WS, Danial NN and Saghatelian A. A peptidomics strategy to elucidate the proteolytic pathways that inactivate peptide hormones. *Biochemistry*. 2011;50(12):2213-2222.

Trist DG. Scientific process, pharmacology and drug discovery. *Current Opinion in Pharmacology*. 2011;11(5):528-533.

Walther DM and Mann M. Accurate quantification of more than 4000 mouse tissue proteins reveals minimal proteome changes during aging. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011;10(2):M110.004523.

Wang M and You J. Mass spectrometry for protein quantification in biomarker discovery. *Methods in Molecular Biology*. 2012;815:199-225.

Wang S, Cyronak M and Yang E. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007a;43(2):701-707.

Wang Y, Chiu JF and He QY. Bioinformatic application in proteomic research on biomarker discovery and drug target validation. *Current Bioinformatics*. 2007b;2(1):11-20.

Weber SJ, Louis RB, Trombley L, Bisette G, Davies P and Davis TP. Metabolic half-life of somatostatin and peptidase activities are altered in Alzheimer's disease. *Journal of Gerontology*. 1992;47(1):B18-25.

Westwick JK and Lamerdin JE. Improving drug discovery with contextual assays and cellular systems analysis. *Methods in Molecular Biology*. 2011;756:61-73.

Wieling J. LC-MS-MS experiences with internal standards. *Chromatographia*. 2002;55(S):S107-S113.

Winter D, Seidler J, Kugelstadt D, Derrer B, Kappes B and Lehmann WD. Minimally permuted peptide analogs as internal standards for relative and absolute quantification of peptides and proteins. *Proteomics*. 2010;10(7):1510-1514.

Wolthers BG and Kraan GP. Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry of steroids. *Journal of Chromatography A*. 1999;843(1-2):247-274.

Xia JQ, Sedransk N and Feng X. Variance component analysis of a multisite study for the reproducibility of multiple reaction monitoring measurements of peptides in human plasma. *PLoS One*. 2011;6(1):e14590.

Xiang F, Ye H, Chen R, Fu Q and Li L. N,N-dimethyl leucines as novel isobaric tandem mass tags for quantitative proteomics and peptidomics. *Analytical Chemistry*. 2010;82(7):2817-2825.

Ye X, Blonder J and Veenstra TD. Targeted proteomics for validation of biomarkers in clinical samples. *Briefing in Functional Genomic and Proteomic*. 2009;8(2):126-135.

Yokokawa A, Yamamoto K, Omori Y, Shibasaki H, Shinohara Y, Kasuya Y and Furuta T. Simultaneous determination of androstenedione, 11beta-hydroxyandrostenedione, and testosterone in human plasma by stable isotope dilution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2009;877(7):621-626.

Zhang X, Petruzzello F, Zani F, Fouillen L, Andren PE, Solinas G and Rainer G. High identification rates of endogenous neuropeptides from mouse brain. *Journal of Proteome Research*. 2012a;11(5):2819-2827.

Zhang X, Yin X, Yu H, Liu X, Yang F, Yao J, Jin H and Yang P. Quantitative proteomic analysis of serum proteins in patients with Parkinson's disease using an isobaric tag for relative and absolute quantification labeling, two-dimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry. *Analyst*. 2012b;137(2):490-495.

Zhu W, Smith JW and Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;2010:6.DOI: 10.1155/2010/840518.

I.10 Figure legends

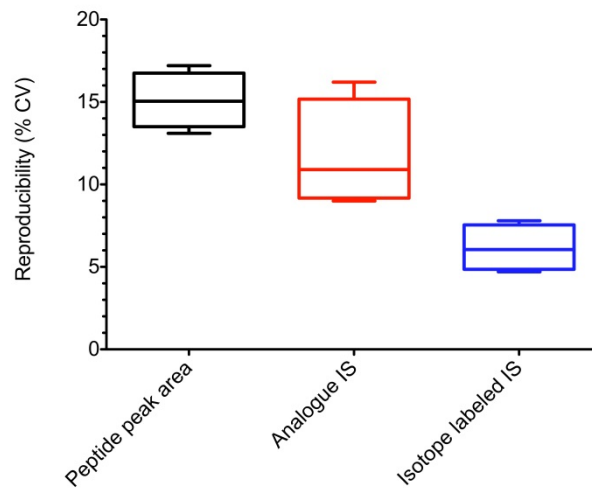


Figure 1 : Comparison of the reproducibility observed in neuropeptide

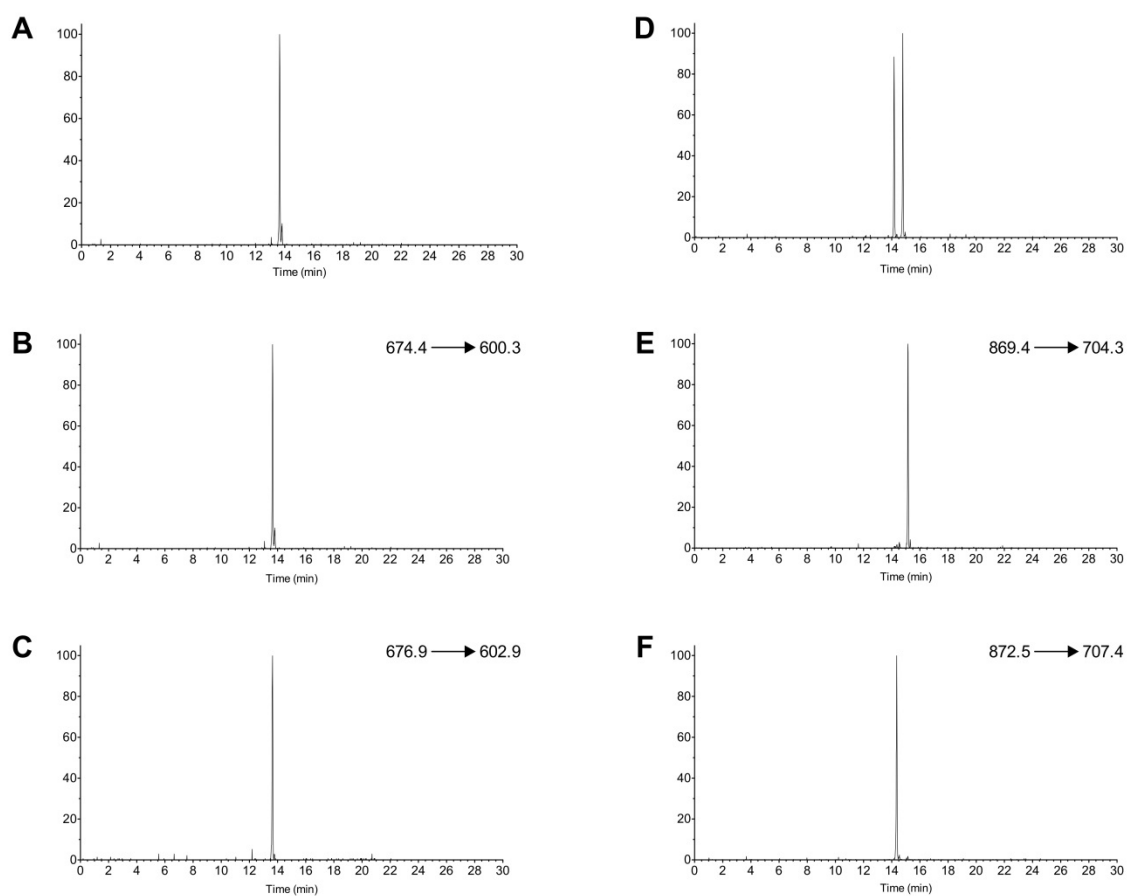


Figure 2 : LC-MS/MS analysis of targeted tachykinin related peptides using deuterated peptide analogs as internal standard. (A) Total ion current (TIC) chromatogram of a 1:1 molar mixture of substance P and deuterated substance P (d₂-Gly, d₃-Leu). (B) Extracted ion chromatogram (XIC) of substance P. (C) XIC of deuterated substance P (d₂-Gly, d₃-Leu). (D) TIC chromatogram of a 1:1 molar mixture of substance P₅₋₁₁ and deuterated substance P₅₋₁₁ (d₃-Leu). (E) XIC of substance P₅₋₁₁. (F) XIC of deuterated substance P₅₋₁₁ (d₃-Leu). Samples were chromatographed using a Thermo Biobasic C₈ 100x1mm column and a 19 min linear gradient (5:95:0.4 to 60:40:0.4; CAN-H₂O-formic acid) at a flow rate of 75 μ L/min for a total run time of 30 min. The analyses were performed on a AB sciex QTRAP system.

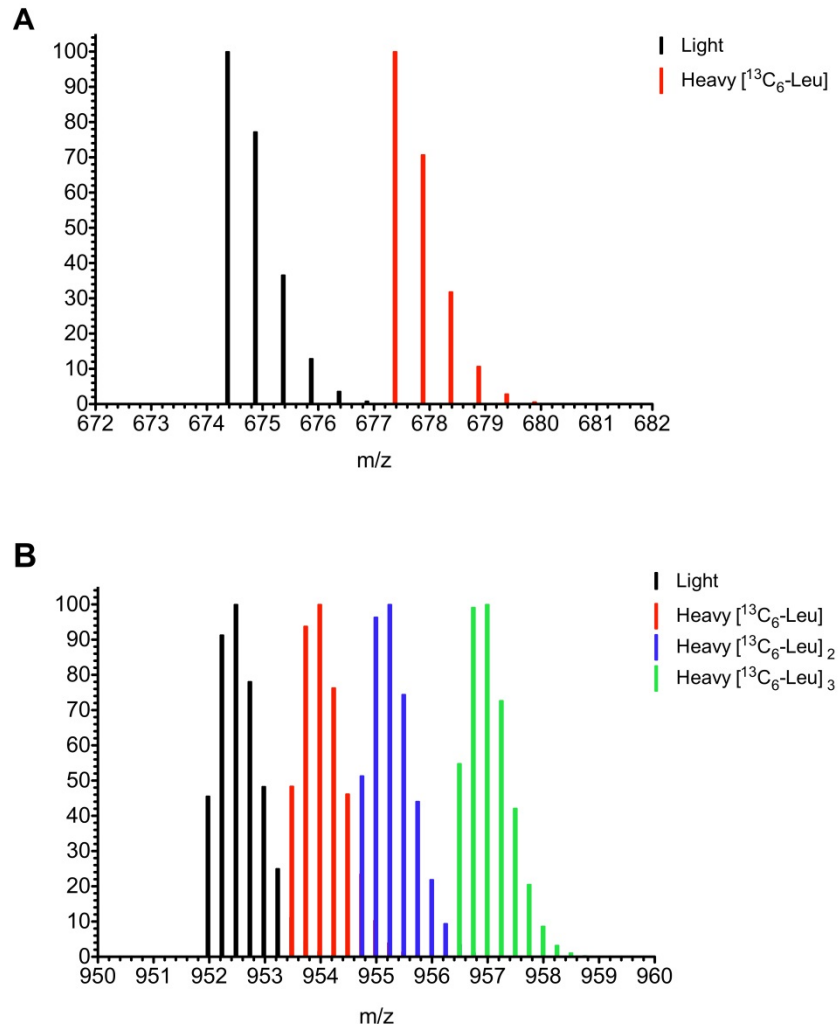


Figure 3 : *In silico* isotopic clusters simulation for two typical peptides. (A) Assessment of light and heavy forms of substance P for the doubly charged species. (B) Assessment of light and three heavy forms of CGRP for the quadruply charged species. The heavy form of both peptides are labeled with [$^{13}\text{C}_6$]Leu.

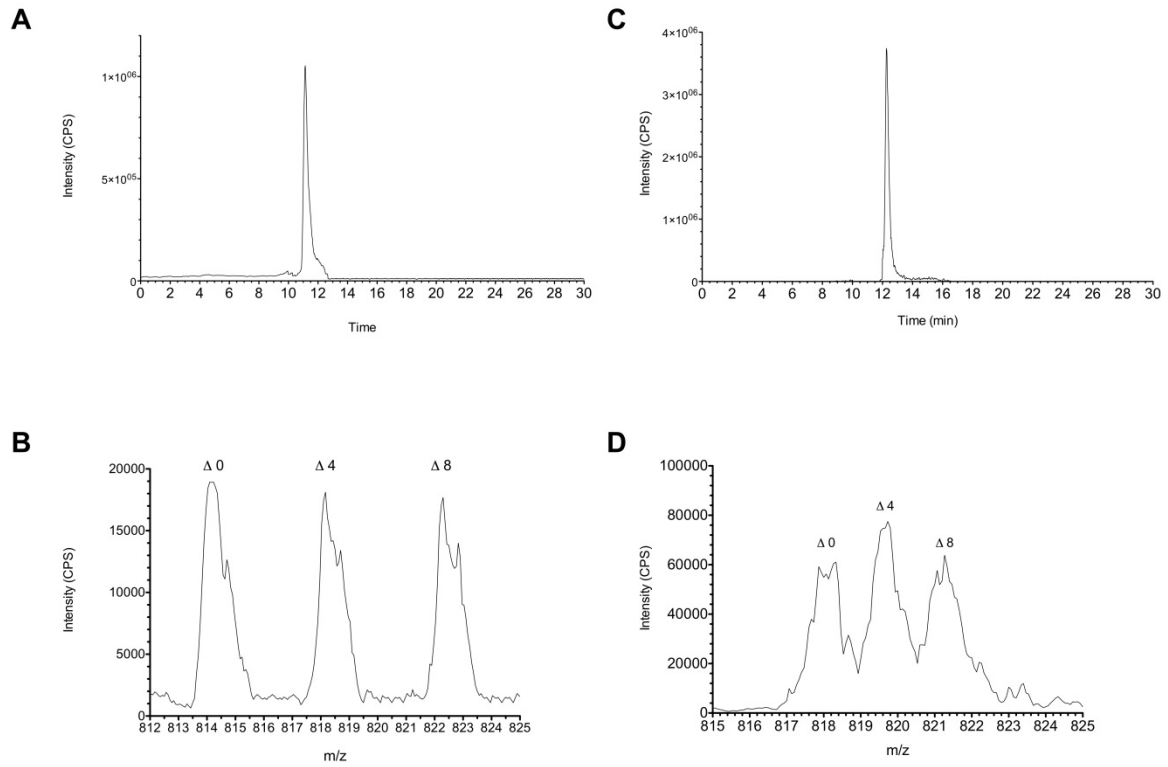


Figure 4 : LC-MS analysis of targeted mTRAQ labeled peptides. (A) TIC chromatogram of a 1:1:1 molar mixture of $\Delta 0$, $\Delta 4$ and $\Delta 8$ labeled substance P. (B) Evaluation of isotopic cluster for doubly charged ions of $\Delta 0$, $\Delta 4$ and $\Delta 8$ labeled substance P. (C) TIC chromatogram of a 1:1:1 molar mixture of $\Delta 0$, $\Delta 4$ and $\Delta 8$ labeled CGRP. (D) Evaluation of isotopic cluster for quintuply charged ions of $\Delta 0$, $\Delta 4$ and $\Delta 8$ labeled CGRP.

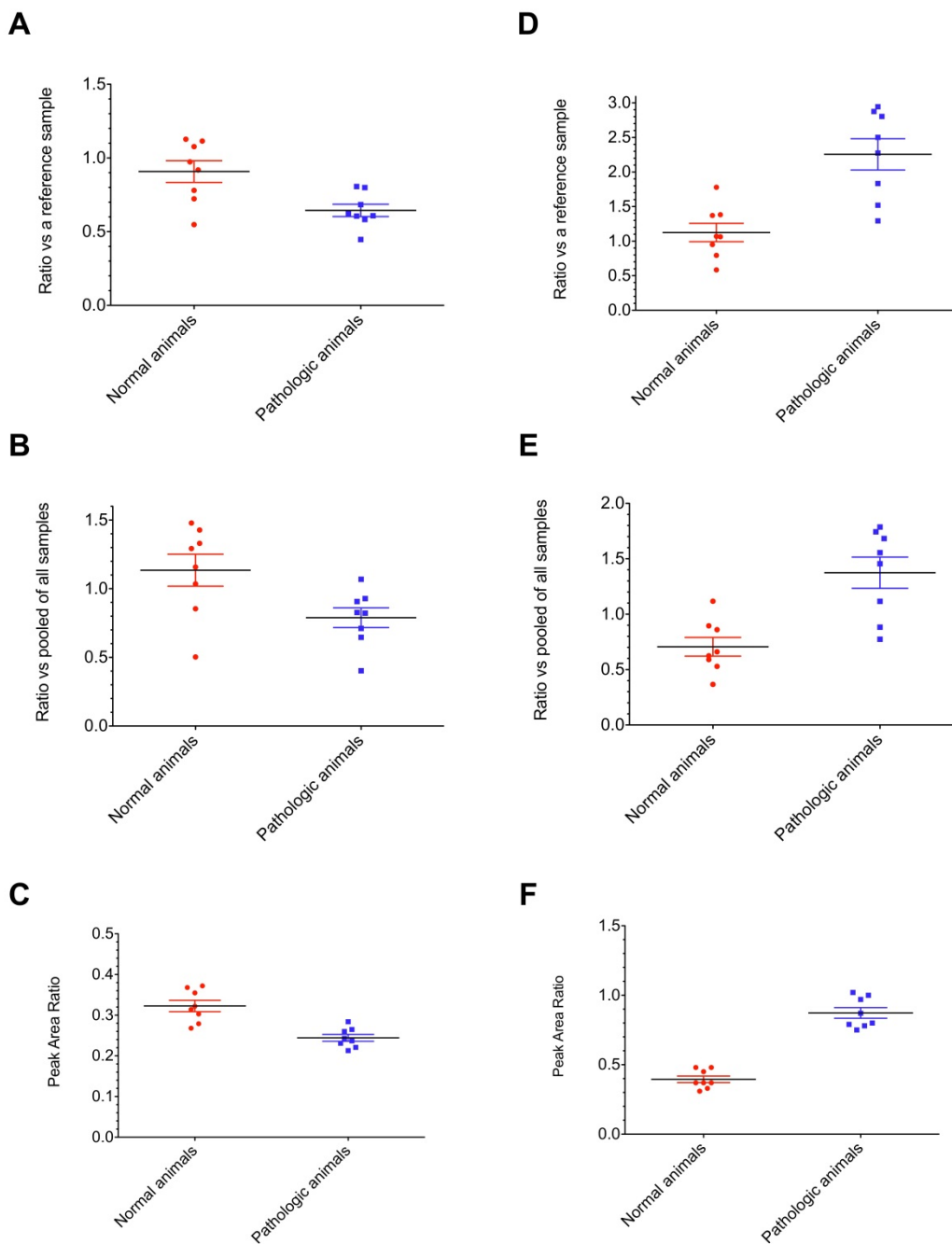


Figure 5 : Vertical scatter chart representing Dynorphin A and Substance P modulation in normal (n = 8) and pathologic rats (n = 8) (mean SEM). (A) LC-MRM quantitative measurements of dynorphin A in rat spinal cord using an RIS approach. (B) LC-MRM quantitative measurements of dynorphin A in rat spinal cord using a GIS approach. (C) LC-MRM quantitative measurements of dynorphin A in rat spinal cord using an SIS approach. (D) LC-MRM quantitative measurements of substance P in rat spinal cord using an RIS approach. (E) LC-MRM quantitative measurements of substance P in rat spinal cord using a GIS approach. (F) LC-MRM quantitative measurements of substance P in rat spinal cord using an SIS approach. Samples were chromatographed using a Thermo Biobasic C8 100x1 mm column and a 12 min linear gradient (5:95:0.4 to 60:40:0.4; CAN-H₂O-formic acid) at a flow rate of 75 μ L/min for a total run time of 30 min. The analyses were performed on a Thermo LCQ system. For GIS and RIS approaches, the internal standards were created with d₆-acetic anhydride and the test samples were derivatized with acetic anhydride and analyzed in duplex mode. For SIS, deuterated analogs of dynorphin A and substance P were used.

II. Article 2 : Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain

F. Pailleux^{a,c}, P. Vachon^b, J. Lemoine^c, F. Beaudry^a

Neuropeptides. 2013;47(4):261-271.

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2013), with permission from Elsevier.

^aGroupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

^bDépartement de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St. Hyacinthe, Québec, Canada

^cUMR 5280 CNRS, Université Claude Bernard de Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne Cedex, France

II.1 Abstract

Animal models are widely used to perform basic scientific research in pain. The rodent chronic constriction injury (CCI) model is widely used to study neuropathic pain. Animals were tested prior and after CCI surgery using behavioral tests (von Frey filaments and Hargreaves test) to evaluate pain. The brain and the lumbar enlargement of the spinal cord were collected from neuropathic and normal animals. Tachykinin related peptides were analyzed by high performance liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry. Our results reveal that the β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP and SP₃₋₁₁ up-regulation are closely related to pain behavior. The spinal β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP and SP₃₋₁₁ concentrations were significantly up-regulated in neuropathic animals compared with normal animals ($p < 0.001$; $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). In contrast, the spinal SP₅₋₁₁ concentration in neuropathic animals

revealed a significant down-regulation compared with normal animals ($p < 0.05$). The brain spinal β -tachykinin₅₈₋₇₁ and SP concentrations were significantly up-regulated ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). Interestingly, no significant concentration differences were observed in the spinal cord and brain for NKA, β -tachykinin₅₈₋₇₀, SP₁₋₇ and SP₆₋₁₁ ($p > 0.05$). The β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP and C-terminal SP metabolites could potentially serve as biomarkers in early drug discovery.

II.2 Introduction

Neuropathic pain occurs in numerous medical conditions and the number of patients suffering from associated symptoms is increasing worldwide (Dworkin *et al.*, 2007). Neuropathic pain is a consequence of damage or disorder to the peripheral nervous system (PNS) or to the central nervous system (CNS) (Okamoto *et al.*, 2001). The symptoms are characterized by an exaggerated nociceptive state and are typically divided in two main categories, allodynia and hyperalgesia. Allodynia is linked to pain responses to non-noxious stimuli (Julius and Basbaum, 2001) and hyperalgesia is associated to increased pain responses to noxious stimuli (Seybold, 2009). Both allodynia and hyperalgesia can occur with mechanical, cold or heat stimulations. The diagnosis and prognosis of neuropathic pain could greatly benefit from a mechanism-based approach. However, this is currently limited by the lack of appropriate analytical methods and validated biomarkers (Jorgensen, 2011; Lee *et al.*, 2011). Additionally, it is essential to improve our understanding of the molecular mechanisms responsible for the initiation and maintenance of chronic pain states to facilitate the development of more effective and safe therapeutic drugs (Yokokawa *et al.*, 2009; Kuepper *et al.*, 2011). Biomarker measurements can provide important mechanistic, efficacy, or toxicity information that will certainly help to make better decisions during the development of new

treatments. The use of specific animal models of pain go hand in hand with biomarker discovery research since it can provide detailed insights into the molecular mechanisms of the pathological condition. This is particularly important in the context of the translation of research findings to other species (i.e. human). Noxious sensory information is perceived by the nervous system following a cascade of complex physiological and biochemical processes (Basbaum, 1999). Considerable deciphering and modulation of sensory information occurs in the spinal cord as it is relayed by peripheral sensory neurons (Moreira *et al.*, 2009; Honore *et al.*, 2000). Neuropeptides are either neurotransmitters or neuromodulators at various levels into the central nervous system and play a fundamental role in pain transmission (Levine *et al.*, 1993; Seybold, 2009). Several key neuropeptides were identified, predominantly, tachykinin and opioid related peptides (Felippotti *et al.*, 2012; Ferland *et al.*, 2011; Mika *et al.*, 2011). Members of the tachykinin family are generally pro-nociceptive neuropeptides and have been known to play an important role in central sensitization leading to hyperalgesia and allodynia (Lecci *et al.*, 2000). Opioid peptides (i.e. endomorphins and enkephalins) have potent analgesic effects in the CNS and play an important role in endogenous pain inhibition (Machelska, 2007). They mainly interact with μ and δ opioid receptors expressed on primary afferent sensory neurons (Carr and Lovering, 2000; Stanojevic *et al.*, 2008). Tachykinins and opioids have been extensively studied in the spinal cord, but research has been limited by several shortcomings inherent to in vivo neuropeptide studies.

Tachykinins are reported to play a critical role in nociceptive transmission in the PNS and the CNS (Pailleux *et al.*, 2012; Gao and Peet, 1999). There are three main mammalian tachykinins, namely substance P (SP), neurokinin A (NKA) and neurokinin B (NKB), which exert their actions via the interaction with specific receptors (Patacchini and Maggi, 1995). The distribution of tachykinin receptors in the rat spinal cord was examined by autoradiographic studies, and results suggested that tachykinin receptor binding sites are

located on the postsynaptic membrane of spinal neurons (Mantyh *et al.*, 1989). SP and NKA are pronociceptive peptides and both are agonists of the neurokinin 1 receptor (NK1) present in the lamina I of the spinal cord (Yu *et al.*, 1999). NKA also binds to the NK2 receptor expressed at lower levels (laminae II-IV) of the spinal cord and its expression correlates with intensity, frequency, and duration of pain (Sluka *et al.*, 1997). Agonists of NK1 and NK2 receptors provoke a sustained slow depolarization that significantly contributes to the development of secondary hyperalgesia (Levine *et al.*, 1993; Baumbauer *et al.*, 2009; Dickenson, 1995). Moreover, there is a close link between the up-regulation of SP and NKA and the increased release of excitatory amino acids such as glutamate (Skilling *et al.*, 1990; Levine *et al.*, 1993). Altogether, these biomolecular events are basic elements of the central sensitization and pain hypersensitivity.

Neuropeptides are derived from larger protein precursors recognized as proneuropeptides referring to protein precursors of peptide neurotransmitters. Proneuropeptide primary structures include the sequence of the active form of at least one neuropeptide within its full-length (Funkelstein *et al.*, 2010). The tachykinin precursor 1 (TAC1) gene encodes the protachykinin-1 protein containing the sequence of four tachykinin peptides, including SP and NKA (Basbaum, 1999), as well as related peptides neuropeptide K (NPK) and neuropeptide gamma (NP γ) (Otsuka and Yoshioka, 1993). The protachykinin-1 protein is believed to be cleaved by the action of specific proteases into active neuropeptides by post-translational proteolytic processing during axonal transport (Hook *et al.*, 2008). It has been shown that many neuropeptides are synthesized by the actions of prohormone convertases (PCs) and endopeptidases during the axonal transport (Harrison and Geppetti, 2001). More specifically, recent studies outlined the significant contribution of PC1/3 and PC2 into the proteolytic processing of proneuropeptides (Zheng *et al.*, 1994; Cui *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2005). It was demonstrated that PC1/3 and PC2 recognize motives composed of

either a pair of basic amino acids (KR-, RR-, RK- and KK-), or a single arginine (R) residue (only PC2) (Seidah *et al.*, 2008). The role of PCs in the maturation of the protachykinin-1 protein remains to be demonstrated, but as shown in Fig. 1, the primary sequence of the protein suggests that PC1/3 and PC2 could play an important role in the release of SP and NKA. Specifically, PC1/3 and PC2 could be important in the synthesis of β -tachykinin₅₈₋₇₁, a known precursor of SP (Hook and Affolter, 1988; MacDonald *et al.*, 1988), and the synthesis of NKA. Moreover, SP metabolism in the CNS and at the blood–brain barrier was previously examined (Chappa *et al.*, 2007). The results indicate that SP metabolites should be considered since it was demonstrated that C-terminal SP fragments SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁ and N-terminal fragment SP₁₋₇ have pharmacological activities in the CNS (Sakurada *et al.*, 1999). Consequently, not only SP and NKA should be analyzed, but the SP precursor β -tachykinin₅₈₋₇₁ and SP metabolites can have important functions during the development of secondary hyperalgesia.

Animal pain models are very useful to gather knowledge on pain pathophysiology and evaluate antinociception effects of drugs (Pitcher *et al.*, 1999; Hofmann *et al.*, 2003; Walczak *et al.*, 2005). We used a validated rat model of neuropathic pain (Bennett and Xie, 1988) characterized by tactile allodynia (Chaplan *et al.*, 1994) and thermal hyperalgesia (Hargreaves *et al.*, 1988) to study the expression of tachykinin related peptides in the CNS. We hypothesized that neuropathic animals would have increased levels of β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP and NKA in the CNS that would correlate with behavioral tests. An increase of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ levels could also contribute to the development of hyperalgesia since they both interact with the NK1 receptor (Igwe *et al.*, 1990; Vigna, 2001). Moreover, SP₁₋₇ produces naloxone-reversible antinociception effect (Krumins *et al.*, 1989), a phenomenon mediated by opioid-receptors (Freed *et al.*, 2001). The objectives of this study were initially to develop and validate a HPLC-MS/MS assay to quantify targeted tachykinin-related peptides in brain and

spinal cord tissues. Secondly, following the establishment of the neuropathy using the chronic constriction injury (CCI) model (Bennett and Xie, 1988) and appropriate behavior testing, targeted tachykinin related peptide analyses were performed by HPLC-MS/MS to associate CNS tissues expression with pain behavior results.

II.3 Experimental procedures

II.3.1 Chemicals and reagents

Substance P, neurokinin A, β -tachykinin₅₈₋₇₁, β -tachykinin₅₈₋₇₀, SP₁₋₇, SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁ and SP₆₋₁₁ were purchased from Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA). Deuterium labeled analog peptides were synthesized and used as internal standards (CanPeptide, Inc., Pointe-Claire, QC, Canada). Acetonitrile was purchased from Fisher Scientific (NJ, USA) and trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from BDH Laboratory supplies (Poole, England, UK). Hexane and formic acid (FA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Standard solutions were prepared in 0.25% TFA solution as described previously (Beaudry, 2010).

II.3.2 *In vivo* experiments

A total of 14 male Sprague-Dawley rats weighing 250–300 g (young adults of 7-8 weeks old) were used for the experiments (Charles River, St-Constant, QC, Canada). The rats were divided into two groups: a control group (n = 8) and a neuropathic group (n = 6). The animals were allowed seven days of acclimation before the start of the experiments. The animals were group-housed (2 rats per cage) in polycarbonate cages (Ancare, Bellmore, NY, USA) on hardwood sawdust bedding (Beta chip, Northeastern Products Co, Warrenburg, NY, USA) in a temperature controlled room (21 ± 2 °C) and maintained on a 12:12 h light:dark cycle. The rats received tap water and a standard laboratory rodent diet (Charles River Rodent

chow 5075, St-Constant, QC, Canada) ad libitum. The animals were trained for two consecutive days on both behavioral tests. Baseline values for thermal and mechanical sensitivities were established over 3 days of experimentation following the animal training phase.

The CCI model was used to induce neuropathic pain (Bennett and Xie, 1988). The animals in the neuropathic group were anesthetized with 3% and 1% isoflurane in oxygen for induction and maintenance, respectively. The right thigh hair was clipped and the skin disinfected with betadine and alcohol. Skin and biceps femoris incisions were made and the sciatic nerve was visualized under a dissecting microscope to carefully isolate it from surrounding connective tissue using glass probes. Four loose ligatures with equal spacing (1 mm) were placed around the nerve using chromic 4.0 catgut. The muscle layers and skin were both sutured independently using 4.0 Vicryl. All animals recovered well and none showed any distress, excessive pain or auto mutilation during the study.

Following a 5-day recovery period from surgery, thermal and mechanical sensitivities of the left (unoperated) and right (operated) hind paws were determined using the Hargreaves test (Hargreaves *et al.*, 1988) test and von Frey filaments (Von Frey *et al.*, 1986) during two consecutive days to assess the development of the neuropathy. The behavioral tests were performed in the morning to avoid circadian variations. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal prior to animal use and it was performed in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

II.3.3 Von Frey filaments to evaluate secondary mechanical allodynia

Briefly, paw-withdrawal thresholds were evaluated on the plantar surface with the use of von Frey filaments (0.4 to 26 g; Stoelting, Wood Dale, IL, USA). The rats were placed on a

customized platform, as described by Pitcher (Pitcher *et al.*, 1999). The monofilaments were applied to the central region of the plantar surface until buckling occurred, through the grid floor and avoiding the foot pads, to establish the mechanical sensitivity. The filament was applied only when the rat was stationary on its four paws and testing sessions began after 5-10 min acclimatization to the experimental setup (i.e. animal stopped exploring the environment). A trial consisted of three applications of these different filaments. The test was stopped as soon as the animal removed its hind paw. The filament number was recorded to represent the paw withdrawal threshold when withdrawal occurred at least twice out of three trials.

II.3.4 Hargreaves' test to evaluate thermal hyperalgesia

Thermal hyperalgesia was evaluated with the Hargreaves apparatus (IITC Life Science, CA, USA). Each animal was placed in a chamber with Plexiglas walls. The ground floor plate was made of glass and the temperature was maintained between 27 and 31°C to improve testing precision. The animals were acclimatized to the apparatus for 15 min prior testing. Subsequently, a radiant heat generated by a high intensity light bulb (40 W) was directed to the plantar surface of the hind paw. The time (s) the animal took to lift its paw from the floor was recorded. The baseline for each animal was calculated as the mean of three trials. Each trial was separated by a 10-15 min interval to avoid receptor sensitization. The cut-off time of the radiant stimulation was set at 20 s to minimize tissue injury.

II.3.5 Internal standards

Deuterium labeled peptides were mixed together and diluted in a 0.25% TFA solution at a final concentration of 500 pg/μL. This solution was used as an internal standard solution.

This internal standard mixture was tested by HPLC-MS/MS at a relevant concentration to verify possible isotopic clusters.

II.3.6 Tissue sample preparation

The animals from both groups (i.e. normal and neuropathic) were euthanized with an overdose of isoflurane followed by a transection of the cervical spine. A flush of saline was performed within the spinal canal to collect the spinal cord lumbar enlargement. Tissue sample was snap-frozen in cold hexane ($\approx -60^{\circ}\text{C}$) and stored immediately at -80°C pending analyses. Simultaneously, the brain was removed completely, the cerebellum and cerebral peduncle were removed, and the remaining cerebral tissue was stored at -80°C pending analyses. Nervous tissues were collected seven days after CCI surgery. Tissues from normal animals were harvested at the same time and animals were kept under identical conditions. As we described previously, tissue processing is an important step to preserve the sample integrity and adequately stabilize endogenous peptides (Beaudry, 2010). The rat tissues were weighed accurately and homogenized using a tissue tearor following the addition of 0.25% TFA solution at a ratio of 1:5 (w:v). The samples were sonicated for 20 min and 150 μL of the homogenate were mixed with 150 μL of acetonitrile to precipitate high molecular weight proteins. The samples were vortexed and centrifuged at 12,000g for 10 min and 150 μL of the supernatant were transferred into an injection vial and spiked with 150 μL of the internal standard solution (deuterium labeled peptides). The vials were capped and vortexed vigorously prior to HPLC-MS/MS analysis.

II.3.7 Instrumentation

The HPLC-MS/MS system included a Thermo Surveyor autosampler, a Thermo Surveyor MS pump and a Thermo LCQ Advantage Ion Trap Mass Spectrometer (San Jose,

CA, USA). Quadrupole ion trap instruments typically have unit mass resolution throughout the mass range. The instrument was calibrated and the resolution was set at 0.5-0.7 Da at full width at half maximum (FWHM). Data were acquired and analyzed with Xcalibur 1.4 (San Jose, CA, USA), and regression analyses were performed with PRISM (version 5.0d) GraphPad software (La Jolla, CA, USA) using nonlinear curve-fitting module with an estimation of the goodness of fit. The calibration lines were constructed from the peak-area ratios of targeted neuropeptides and corresponding deuterated labeled peptides used as internal standards.

II.3.8 Bioanalytical method

The chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C₈ 100x1 mm, with a particle size of 5 μm. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.4% of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 1 min, the ratio was maintained at 5:95. From 1 to 12 min, a linear gradient was applied up to a ratio of 60:40 and maintained for 3 min. The mobile phase composition ratio was reverted at the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 15 min for a total run time of 30 min. The flow rate was fixed at 75 μL/min and 2 μL of sample were injected using full loop mode. All targeted neuropeptides and deuterium labeled peptides eluted between 7.8 and 9.8 min. The mass spectrometer was coupled with the HPLC system using a pneumatically assisted electrospray ion source (ESI). The sheath gas was set to 10 units and the ESI electrode was set to 4000 V in positive mode. The capillary temperature was set at 300°C and the capillary voltage to 34 V. All scan events were acquired with a 300 ms maximum injection time. Peptides and corresponding deuterium-labeled peptides were analyzed sequentially. The mass spectrometer operated for quantitative

analyses in full scan MS/MS and the quantification was based on specific post-processing MRM extracted ion chromatograms. Specific analysis details are presented in Table 1.

II.3.9 Statistical analysis

Behavior results are presented as means (\pm SEM). The statistical difference was assessed with repeated measures ANOVA and a Dunnett's post hoc test using GraphPad PRISM (version 5.0d); $p < 0.05$ was considered significant. Neuropeptide concentrations were compared between both groups using an unpaired t -test and significance was set a priori to $p < 0.05$.

II.4 Results

II.4.1 Evaluation of mechanical and thermal sensitivities

The von Frey test allowed to evaluate the tactile allodynia and the results are presented in Fig. 2A, for both paws ($n = 6$). The values reported are the force threshold (g) necessary to elicit withdrawal of the paw. Prior (i.e. baseline) and post-surgery values are presented. Tactile allodynia is clearly present 6 days after the CCI procedure and rats were neuropathic as shown with the force threshold (g) values for the right paw compared with baseline values ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ to 6 and 7 day after surgery, respectively). Likewise, the data show that the values for the left (unaffected) paw were not significantly different from the baseline.

The Hargreaves test results are reported in Fig. 2B, for both paws ($n = 6$). Values prior to surgery as well as 6 and 7 days post CCI procedure are shown. The results clearly demonstrate thermal hypersensitivity after 6 and 7 days post-surgery ($p < 0.001$ to 6 and 7 day after surgery). As expected, the values for the left (unaffected) paw were not significantly different from the baseline.

Together, the von Frey filament and Hargreaves tests supported that animals were neuropathic at the time of tissue collection (i.e. 7 days post-surgery). All behavioral results obtained for this experiment were compatible with previous results generated in our laboratory (Guénette *et al.*, 2007; Beaudry *et al.*, 2010; Lionnet *et al.*, 2010; Gauthier *et al.*, 2012).

II.4.2 Mass spectrometry

Full-scan and product ion mass spectra for all peptides and internal standards were obtained in positive ion mode. The full-scan electrospray mass spectrum of each peptide showed the formation of characteristic pseudo molecular ions $[M+nH]^{n+}$ and the fragment ions observed in MS/MS spectra were annotated based on the Roepstorff and Fohlman nomenclature (Roepstorff and Fohlman, 1984). Details on MS parameters and MRM transitions are reported in Table 6. Full-scan and product ion mass spectra are necessary to identify and characterize each peptide. The full-scan electrospray mass spectra of targeted peptides showed a base peak pseudo molecular ions at m/z 564.5 (3+) for β -tachykinin₅₈₋₇₁ and 565.9 (3+) for d₅- β -tachykinin₅₈₋₇₁; 674.7 (2+) for SP and 677.2 (2+) for d₅-SP; 548.3 (2+) for SP₃₋₁₁ and 550.8 (2+) for d₅-SP₃₋₁₁; 869.6 (1+) for SP₅₋₁₁ and 872.4 (1+) for d₃-SP₅₋₁₁; 567.8 (2+) for NKA and 569.7 (2+) for d₅-NKA. Fig. 3 presents product ion spectra (MS/MS) for targeted neuropeptides obtained and typical b and y positive ion fragments were observed as well as some internal fragments. Furthermore, spectra obtained from extracted tissues were compared with reference materials and identical peak retention times, precursor ions, fragment ion patterns and respective abundances were obtained as shown in Fig. 4. The observed collision-induced dissociation spectra were all compatible with the peptide sequences. Although the data are not shown, we also selected the most abundant product ions for SP₁₋₇, SP₆₋₁₁, β -tachykinin₅₈₋₇₀ and their internal standards.

II.4.3 Analytical performance

The choice of analytical strategy is critical in order to improve the precision and the accuracy of the data measurements, and consequently enhance the sensitivity of the assay. As illustrated in a prior publication (Pailleux and Beaudry, 2012), normalization with stable isotope labeled internal standards provide the best approach for sample normalization and can be used for absolute and relative peptide quantification. Targeted tachykinin peptides were labeled on glycine and/or leucine residues by incorporation of deuterium atoms. The instrument response linearity was tested using the ratio of targeted peptides with corresponding deuterated labeled peptide internal standards at concentrations from 10 to 500 pg/ μ L, using isotopic dilution technique. Correlation assessments between measured concentrations and nominal concentrations were performed. As illustrated in Fig. 5, the correlations were excellent ($R^2 \geq 0.9963$). The method precision and accuracy were determined as previously described (Beaudry *et al.*, 2009). Rat spinal cord and brain tissues were fortified at a concentration of 50, 100 and 250 pg/mg and analyzed. The Table 2 summarized the precision and accuracy obtained and overall, the precision (%CV) was comprised between 1.3% and 12.1% and the accuracy (%NOM) was contained between 92.6% and 107.5% for all targeted tachykinin peptides. Accordingly, the analytical method provides adequate figures of merit for targeted peptide analysis performed during this study.

II.4.4 Analyses of spinal cord and brain peptides

Specific peptides were analyzed in brain and spinal cord tissues from normal and neuropathic animals by HPLC-MS/MS. Fig. 6 reveals the results for targeted tachykinin peptide analyses comparing concentration of normal and neuropathic animals. When compared to normal animals, the spinal β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP and SP₃₋₁₁ concentrations were

significantly up-regulated in neuropathic animals ($p < 0.001$; $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). In contrast, the analyses of spinal SP₅₋₁₁ concentrations in neuropathic animals shown a significant down-regulation compared to normal animals ($p < 0.05$). Interestingly, no significant differences in the spinal NKA concentrations were observed ($p > 0.05$).

Results reveal that brain β -tachykinin₅₈₋₇₁ and SP concentrations were significantly up-regulated in neuropathic animals ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). On the other hand, no significant differences were observed for SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁ and NKA ($p > 0.05$) in the brain of neuropathic animals (i.e. CCI model, 7 days post-surgery). However, the brain SP₃₋₁₁ and NKA concentrations appear constant whereas the brain SP₅₋₁₁ concentrations seemed to increase slightly despite not being statistically significant. Additionally, β -tachykinin₅₈₋₇₀, SP₁₋₇ and SP₆₋₁₁ peptides were analyzed and no significant differences ($p > 0.05$) were observed in the spinal cord and brain of normal and neuropathic rats (data not shown).

II.5 Discussion

The rodent neuropathic CCI pain model is widely used and has significantly contributed to the advancement of pain pathophysiology and behavior but some frustrations exist due to the lack of translational advancement in the field of pain (Mogil, 2009). Consequently, we need to foster a better understanding of the molecular mechanisms to further advance therapeutic research from encouraging preclinical assessments to clinical success. In this study, the CCI model clearly induces neuropathic pain in animals therefore meeting the prerequisite for tachykinin peptides analyses to test our hypothesis of increased levels of β -tachykinin₅₈₋₇₁, substance P and its metabolites, in the spinal cord and brain of neuropathic animals.

Abnormal pain transmission in the PNS and CNS plays a significant role in neuropathic pain. Following a peripheral tissue injury, pronociceptive mediators sensitize

sensory fibers leading to central neurogenic changes in the spinal cord, affecting the transmission and modulation of pain. Thus, the spinal cord plays a fundamental role in the processing of noxious information (Coggeshall and Carlton, 1997; Costigan and Woolf, 2002; Furue *et al.*, 2004). Research has shown that spinal circuits have the capacity to modify behavior in response to differential environmental cues (Baumbauer *et al.*, 2009). This phenomenon is directly associated with quantitative molecular changes affecting presynaptic and postsynaptic molecular processes. Even a medical treatment may cause remodeling of neuronal circuits (Yamada *et al.*, 2005). This study focuses on pronociceptive tachykinin related peptides associated to an agonist effect on the postsynaptic receptor NK1. Significant differences in the expression of specific tachykinin peptides will impact the molecular event implicated in the complex synaptic signaling (Pemow, 1983; Maggio, 1988; Krause *et al.*, 1989). This will inherently affect pain transmission mechanisms, including pronociceptive and antinociceptive actions. Precise and accurate determinations of tachykinin related peptides in CNS tissues are therefore important. The method developed using deuterium labeled peptides as internal standards significantly improves the figures of merit (Hamdan and Righetti, 2002; Mirzaei *et al.*, 2009; Pailleux and Beaudry, 2012). Quantitative HPLC-MRM assays used in peptidomic studies should include a standardization method to reduce instrument variation. The technical variation, sometimes referred as analytical noise, is defined as variations in data measurements that mask or decrease the precision of a signal and consequently reduce the sensitivity of an experiment to detect biologically significant differences between samples and/or groups of samples. The method developed and used for this study was validated with acceptable linearity, precision and accuracy. Thus, we concluded that deuterium labeled peptide internal standards were the best approach to reduce the analytical noise and improve our ability to detect peptide expression differences.

As previously examined, the proteolytic cleavage of the protachykinin-1 protein will generate four tachykinin peptides including SP, NKA, NPK and NP γ . The synthesis of bioactive neuropeptides requires the action of different enzymes. It is well known that SP binds to three subtypes of neurokinin receptors: NK1, NK2 and NK3 (Maggi, 1995) and SP has the highest affinity with the NK1 receptor (Maggi and Schwartz, 1997). Following a peripheral tissue injury, it has been shown that SP agonist effect on the NK1 receptor will induce the release of the inositol triphosphate (IP₃) (Maggi, 1995; Myöhänen *et al.*, 2008). Furthermore, IP₃ affects specifically the intracellular Ca²⁺ concentration in the CNS (Ferris and Snyder, 1992; Berridge, 1993; Hokin and Dixon, 1993). PCs enzymatic activity is partially regulated by the calcium concentration (Steiner, 1998; Helwig *et al.*, 2011). PCs have an important role in proneuropeptide processing and would inherently have a central role in the biochemical processes associated to pain transmission.

PC1/3 and PC2 proteolytic processing of protachykinin-1 protein can occur specifically at dibasic and monobasic residues found within the primary structure of the protein. PC1/3 and PC2 may play a central role in the synthesis of β -tachykinin₅₈₋₇₁ and NKA but also indirectly into the synthesis of SP, SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁. Furthermore, the biological activity of these specific tachykinin peptides was previously characterized and quantitative expression differences could have a significant impact on the molecular events implicated in the synaptic processing. SP and C-terminal SP metabolites contribute to the potentiation of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by NK1 activation (Zhang *et al.*, 2007). TRPV1 acts as a transducer of noxious thermal and chemical stimuli in nociceptive sensory neurons and plays a central role in mediating enhanced heat sensitivity during inflammatory processes (Steen *et al.*, 1992; Garcia-Hirschfeld *et al.*, 1995; Caterina *et al.*, 1997). The results shown in this manuscript reveal a significant up-regulation of β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP and SP₃₋₁₁ in the spinal cord lumbar enlargement of neuropathic rats (i.e. CCI model, 7 days post-

surgery). This is an interesting finding since we believe that β -tachykinin₅₈₋₇₁ is a cleavage product associated with the action of PC1/3 and/or PC2 and it is a known precursor of SP. The β -tachykinin₅₈₋₇₁ is then processed to SP by the action of specific carboxypeptidases (Hook *et al.*, 2008), following C-terminal amidation by peptidylglycine- α -amidatingmonooxygenase (PAM) leading to the biosynthesis of SP. Additionally, the cleavage of β -tachykinin₅₈₋₇₁ and/or SP by the action of proline-specific endopeptidases (i.e. prolylendopeptidases) will result in the biosynthesis of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁. Prolylendopeptidases (PREP) catalyzed the hydrolysis of Pro-X bond of peptides with primary sequence shorter than 30 amino acids (Nolte *et al.*, 2009). The expression of PREP mRNA in the rat brain and spinal cord was characterized and it was suggested that numerous neuropeptides are hydrolyzed by PREP (Nolte *et al.*, 2009). Further studies are required to ascertain the involvement of PREP in the biosynthesis of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ from a precursor peptide. Enzyme catalyzed reaction yield and rate heavily depend on the thermodynamic stability of the enzyme-substrate complex. The reaction leading to the formation of SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ required the formation of two distinct enzyme-substrate complexes suggesting that one structure is thermodynamically more favorable compare with the other. This is interesting since the genotype and phenotype can have a profound impact on the PREP enzyme catalyzed reactions outcome. C-terminal SP metabolites play an important role in the overall SP pronociceptive effect favoring the release of the excitatory amino acids (Skilling *et al.*, 1990). However, SP and C-terminal SP metabolites have distinctive binding affinities with the NK1 receptor and the resulting effect will depends greatly on the relative abundance of metabolite fragments. Agonists of NK1 receptor affect the postsynaptic membrane and provoke a sustained slow depolarization that significantly contributes to the development of secondary hyperalgesia. The relative expression of β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP, SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ will inherently

affect pain transmission mechanisms, including pronociceptive and most likely antinociceptive actions. Differences in the metabolic fate of neurotransmitters and neuromodulators might be an important contributor to the lack of conversion of promising preclinical results to successful clinical outcomes. This is particularly true for tachykinin related peptides since they are known to be important elements in pain transmission mechanisms.

Analyses of tachykinin related peptides in rat brain were performed. The results demonstrate that only β -tachykinin₅₈₋₇₁ and SP were up-regulated. No significant differences were observed for SP₃₋₁₁ and SP₅₋₁₁ as well as β -tachykinin₅₈₋₇₀, SP₆₋₁₁ and SP₁₋₇ (data not shown) in neuropathic rat brains (i.e. CCI model, 7 days post-surgery). The involvement of brain SP, NKA and NK1 in neuropathic pain remains a subject of debate. SP and its action on the NK1 receptor were associated to several pathophysiological conditions, including pain, movement disorders, memory, anxiety, stress and depression (Quartara and Maggi, 1998). However, depression and anxiety occurs months after the onset of neuropathic pain in animals (Seminowicz *et al.*, 2009). Intracerebral injection in rats of NK1 agonist has produced anxiogenic (De Araujo *et al.*, 1999) and NK1 antagonist anxiolytic effects (Varty *et al.*, 2002). These results suggest that the regulation of SP in rat brain is closely related to anxiety but these effects are linked with specific brain regions associated with an up-regulation of SP. Further studies indicated that SP and its C-terminal metabolites have anxiogenic effects following an injection into the periaqueductal grey (De Araujo *et al.*, 1999). It has been demonstrated that depression and anxiety are important clinical signs in animal suffering from chronic pain and environmental enrichment has both antidepressant and anxiolytic effects in mice (Pittenger and Duman, 2008; Vachon *et al.*, 2011; Tajerian *et al.*, 2013). The up-regulation of β -tachykinin₅₈₋₇₁ and SP in brain tissues may certainly contribute to an increase level of anxiety in neuropathic rats. Other C- and N-terminal SP metabolites were not

significantly up or down-regulated in the brain. Interestingly, microinjection of SP₅₋₁₁ into the dorsal raphe nucleus (DRN) neurons provoked a marked and sustained analgesia (Krupina *et al.*, 2010). DRN is an important serotonergic structure of the endogenous antinociceptive systems. Our data suggest that the SP₅₋₁₁ concentration tends to increase in neuropathic rat brains (i.e. CCI model, 7 days post-surgery) but it might become significant when neuropathy is developing from early to late stages. However, no clear conclusion can be made as to their function since the CCI model has both a pain and a motor deficit component.

The analysis of β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP, C-terminal SP metabolites were performed along with NKA since it has been shown that SP and NKA are co-localized (Ando *et al.*, 2001). Moreover, it was reported that SP and NKA are released as co-neurotransmitters and co-neuromodulators in the PNS and CNS (Takeda *et al.*, 1990; Maggi, 2000). However, our NKA levels remain unchanged in the CNS of neuropathic rats (i.e. CCI model, 7 days post-surgery). This is interesting since both peptides are synthesized from the proteolytic processing of the protachykinin-1 protein. SP is synthesized from its precursor β -tachykinin₅₈₋₇₁ partly by the action of carboxypeptidase E an exopeptidase widely distributed and active in the CNS and PAM. NKA is synthesized from a different precursor (i.e. NPK) and required specific proteolytic processing steps but they are not well characterized. However, PC1/3 and/or PC2 could be involved as illustrated in Fig. 1. At this point, we can only conclude that different enzymatic processes are involved in the maturation of the protachykinin-1 protein to generate SP and NKA and further research is necessary to explain the differences in regulation from these two peptides in the CNS of neuropathic animals. The quantitative analysis of the protachykinin-1 protein could be interesting and would provide TAC1 gene expression information. Our data do not provide information on the expression of the protachykinin-1 protein. However, we believe the expression of the protachykinin-1 protein in tissues is a poor indicator of the neuropeptide regulation. Endogenous tachykinin related

peptide concentrations heavily depend on the proteolytic processing of precursor peptides. Despite β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP and SP₃₋₁₁ up-regulation, NKA concentration remains unchanged highlighting the importance to consider the enzymatic processes rather than TAC1 gene expression. Moreover, tachykinins are effectors of pain transmission. Thus, it is important to consider the contribution of specific metabolites in order to define a multiparametric profile used for diagnostic and prognostic purposes.

II.6 Conclusions

The outcome of this study relies on a state of the art quantitative HPLC-MRM MS assay that used deuterium labeled peptides as an internal standard strategy to reduce analytical noise and improve our ability to detect peptide expression differences. Our results reveal the β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP and SP₃₋₁₁ up-regulation are closely related to pain behavior. Interestingly, β -tachykinin₅₈₋₇₁, SP and C-terminal SP metabolites share some common proteolytic processes but dissimilarity with the synthesis of N-terminal SP metabolites and NKA could explain the reason why no significant differences were observed. Clearly, more studies are required to better understand the maturation of the protachykinin-1 protein and unveil possible new drug targets. SP and C-terminal SP metabolites are pronociceptive peptides but may also be involved in anxiety and depression which are important clinical symptoms associated with later stage of the development of chronic pain. SP and C-terminal SP metabolites could potentially serve as drug efficacy markers in early drug discovery.

II.7 Acknowledgements

This work was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry NSERC Discovery Grant No.386637-2010). F. Pailleux received a scholarship from the Région Rhône-Alpes in France (CMIRA Explora'doc 2011).

II.8 References

Ando, R., Watanabe, C., Kawamura, S., Yonezawa, A., Sakurada, T., 2001. Involvement of spinal NK2 and NMDA receptors in aversive behavior induced by intra-arterial injection of capsaicin. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 68, 105–113.

Basbaum, A.I., 1999. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 24 (1), 59–67.

Baumbauer, K.M., Young, E.E., Joynes, R.L., 2009. Pain and learning in a spinal system: contradictory outcomes from common origins. *Brain Research Reviews* 61, 124–143.

Beaudry, F., 2010. Stability comparison between sample preparation procedures for mass spectrometry-based targeted or shotgun peptidomic analysis. *Analytical Biochemistry* 407, 290–292.

Beaudry, F., Ferland, C.E., Vachon, P., 2009. Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 23, 940–950.

Beaudry, F., Ross, A., Lema, P.P., Vachon, P., 2010. Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Phytotherapy Research* 24, 525–530.

Bennett, G.J., Xie, Y.K.A., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87–107.

Berridge, M.J., 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315–325.

Carr, J.A., Lovering, A.T., 2000. Mu and delta opioid receptor regulation of proopioidmelanocortin peptide secretion from the rat neurointermediate pituitary in vitro. *Neuropeptides* 34 (1), 69–75.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ionchannel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824.

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods* 53 (1), 55–63.

Chappa, A.K., Cooper, J.D., Audus, K.L., Lunte, S.M., 2007. Investigation of the metabolism of substance P at the blood–brain barrier using LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (4), 1409–1415.

Coggeshall, R.E., Carlton, S.M., 1997. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Research Reviews* 24, 28–66.

Costigan, M., Woolf, C.J., 2002. No dream, no pain. Closing the spinal gate. *Cell* 108, 297–300.

Cui, Y., Jean, F., Thomas, G., Christian, J.L., 1998. BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 17, 4735–4743.

De Araujo, J.E., Silva, R.C.B., Huston, J.P., Brandao, M.L., 1999. Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not the 1-7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray. *Peptides* 20, 1437–1443.

Dickenson, A.H., 1995. Spinal cord pharmacology of pain. *British Journal of Anaesthesia* 75, 193–200.

Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Backonja, M., Farrar, J.T., Finnerup, N.B., Jensen, T.S., Kalso, E.A., Loeser, J.D., Miaskowski, C., Nurmikko, T.J., Portenoy, R.K., Rice, A.S.C., Stacey, B.R., Treede, R.D., Turk, D.C., Wallace, M.S., 2007. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132, 237–251.

Felippotti, T.T., de Freitas, R.L., Coimbra, N.C., 2012. Endogenous opioid peptidemediated neurotransmission in central and pericentral nuclei of the inferior colliculus recruits μ -opioid receptor to modulate post-ictal antinociception. *Neuropeptides* 46 (1), 39–47.

Ferland, C.E., Pailleux, F., Vachon, P., Beaudry, F., 2011. Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography coupled ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45 (6), 423–429.

Ferris, C.D., Snyder, S.H., 1992. Inositol phosphate receptors and calcium disposition in the brain. *Journal of Neuroscience* 12, 1567–1574.

Freed, A.L., Audus, K.L., Lunte, S.M., 2001. Investigation of the metabolism of substance P at the blood–brain barrier using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 22, 3778–3784.

Funkelstein, L., Beinfeld, M., Minokadeh, A., Zadina, J., Hook, V., 2010. Unique biological function of cathepsin L in secretory vesicles for biosynthesis of neuropeptides. *Neuropeptides* 44 (6), 457–466.

Furue, H., Katafuchi, T., Yoshimura, M., 2004. Sensory processing and functional reorganization of sensory transmission under pathological conditions in the spinal dorsal horn. *Neuroscience Research* 48, 361–368.

Gao, Z., Peet, N.P., 1999. Recent advances in neurokinin receptor antagonists. *Current Medicinal Chemistry* 6 (5), 375–388.

Garcia-Hirschfeld, J., Lopez-Briones, L.G., Belmonte, C., Valdeolmillos, M., 1995. Intracellular free calcium responses to protons and capsaicin in cultured trigeminal neurons. *Neuroscience* 67 (1), 235–243.

Gauthier, M.L., Beaudry, F., Vachon, P., 2012. Intrathecal [6]-gingerol administration alleviates peripherally induced neuropathic pain in male Sprague–Dawley rats. *Physiotherapy Research*. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4837>.

Guénette, S.A., Ross, A., Marier, J.F., Beaudry, F., Vachon, P., 2007. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *European Journal of Pharmacology* 562, 60–67.

Hamdan, M., Righetti, P.G., 2002. Modern strategies for protein quantification in proteome analysis: advantages and limitations. *Mass Spectrometry Review* 21 (4), 287–302.

Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77–88.

Harrison, S., Geppetti, P., 2001. Substance P. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 33, 555–576.

Helwig, M., Vivoli, M., Fricker, L.D., Lindberg, I., 2011. Regulation of neuropeptide processing enzymes by catecholamines in endocrine cells. *Molecular Pharmacology* 80, 304–313.

Hofmann, H.A., De Vry, J., Siegling, A., Spreyer, P., Denzer, D., 2003. Pharmacological sensitivity and gene expression analysis of the tibial nerve injury model of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology* 470, 17–25.

Hokin, L.E., Dixon, J.F., 1993. The phosphoinositide signalling system. I. Historical background. II. Effects of lithium on the accumulation of second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate in brain cortex slices. *Progress in Brain Research* 98, 309–315.

Honore, P., Rogers, S.D., Schwei, M.J., Salak-Johnson, J.L., Luger, N.M., Sabino, M.C., Clohisy, D.R., Mantyh, P.W., 2000. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience* 98 (3), 585–598.

Hook, V.H., Affolter, H.U., 1988. Identification of zymogen and mature forms of human carboxypeptidase H. *FEBS Letters* 238 (2), 338–342.

Hook, V., Funkelstein, L., Lu, D., Bark, S., Wegrzyn, J., Hwang, S.R., 2008. Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 48, 393–423.

Igwe, O.J., Kim, D.C., Seybold, V.S., Larson, A.A., 1990. Specific binding of substance P aminoterminal heptapeptide [SP(1–7)] to mouse brain and spinal cord membranes. *Journal of Neuroscience* 10 (11), 3653–3663.

Jin, W., Fuki, I.V., Seidah, N.G., Benjannet, S., Glick, J.M., Rader, D.J., 2005. Proprotein convertases are responsible for proteolysis and inactivation of endothelial lipase. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 36551–36559.

Jorgensen, J.T., 2011. A challenging drug development process in the era of personalized medicine. *Drug Discovery Today* 16 (19–20), 891–897.

Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210.

Krause, J.E., MacDonald, M.R., Takeda, Y., 1989. The polyprotein nature of substance P precursors. *Bioessays* 10, 62–69.

Krumins, S.A., Kim, D.C., Seybold, V.S., Larson, A.A., 1989. Modulation of [³H]DAGO binding by substance P (SP) and SP fragments in the mouse brain and spinal cord via mu1 interactions. *Neuropeptides* 13 (4), 225–233.

Krupina, N.A., Khlebnikova, N.N., Orlova, I.N., Grafova, V.N., Smirnova, V.S., Rodina, V.I., Kukushkin, M.L., Kryzhanovsky, G.N., 2010. Experimental model of combined pain and depression status in rats. *Bulletin of Experimental Biology and medicine* 149 (4), 479–484.

Kuepper, U., Musshoff, F., Hilger, R.A., Herbstreit, F., Madea, B., 2011. Pharmacokinetic properties of succinylmonocholine in surgical patients. *Journal of Analytical Toxicology* 35 (5), 302–311.

Lecci, A., Giuliani, S., Tramontana, M., Carini, F., Maggi, C.A., 2000. Peripheral actions of tachykinins. *Neuropeptides* 34 (5), 303–313.

Lee, J.M., Han, J.J., Altwerger, G., Kohn, E.C., 2011. Proteomics and biomarkers in clinical trials for drug development. *Journal of Proteomics* 74 (12), 2632–2641.

Levine, J.D., Fields, H.L., Basbaum, A.I., 1993. Peptides and the primary afferent nociceptor. *Journal of Neuroscience* 13 (6), 2273–2286.

- Lionnet, L., Beaudry, F., Vachon, P., 2010. Intrathecal eugenol administration alleviates neuropathic pain in male Sprague–Dawley males. *Phytotherapy Research* 24, 1645–1653.
- MacDonald, M.R., McCourt, D.W., Krause, J.E., 1988. Posttranslational processing of a-, b- and c-preprotachykinins. *The Journal of Biological Chemistry* 263 (29), 15176–15183.
- Machelska, H., 2007. Targeting of opioid-producing leukocytes for pain control. *Neuropeptides* 41 (6), 355–363.
- Maggi, C.A., 1995. The mammalian tachykinin receptors. *General Pharmacology* 26 (5), 911–944.
- Maggi, C.A., 2000. Principles of tachykininergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. *Regulatory Peptides* 93, 53–64.
- Maggi, C.A., Schwartz, T.W., 1997. The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 18, 351–353.
- Maggio, J.E., 1988. Tachykinins. *Annual Review of Neuroscience* 11, 13–28.
- Mantyh, P.W., Gates, T., Mantyh, C.R., Maggio, J.E., 1989. Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *The Journal of Neuroscience* 9 (1), 258–279.

Mika, J., Obara, I., Przewlocka, B., 2011. The role of nociceptin and dynorphin in chronic pain: implications of neuro-glial interaction. *Neuropeptides* 45 (4), 247–261.

Mirzaei, H., Brusniak, M.Y., Mueller, L.N., Letarte, S., Watts, J.D., Aebersold, R., 2009. Halogenated peptides as internal standards (H-PINS): introduction of an MS based internal standard set for liquid chromatography–mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* 8 (8), 1934–1946.

Mogil, J.S., 2009. Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 194–283.

Moreira, T.H., Cruz, J.S., Weinreich, D., 2009. Angiotensin II increases excitability and inhibits a transient potassium current in vagal primary sensory neurons. *Neuropeptides* 43 (3), 193–199.

Myöhänen, T.T., Venäläinen, J.I., Garcia-Horsman, J.A., Männistö, P.T., 2008. Spatial association of prolyl oligopeptidase, inositol 1,4,5-triphosphate type 1 receptor, substance P and its neurokinin-1 receptor in the rat brain: an immunohistochemical colocalization study. *Neuroscience* 153, 1177–1189.

Nolte, W.M., Tagore, D.M., Lane, W.S., Saghatelian, A., 2009. Peptidomics of prolyl endopeptidase in the central nervous system. *Biochemistry* 48 (50), 11971–11981.

Okamoto, K., Martin, D.P., Schmelzer, J.D., Mitsui, Y., Low, P.A., 2001. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Experimental Neurobiology* 169, 386–391.

Otsuka, M., Yoshioka, K., 1993. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiological Reviews* 73 (2), 229–308.

Pailleux, F., Beaudry, F., 2012. Internal standard strategies for relative and absolute quantification of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 26 (8), 881–891.

Pailleux, F., Lemoine, J., Beaudry, F., 2012. Quantitative mass spectrometry analysis reveals that deletion of the TRPV1 receptor in mice alters substance P and neurokinin A expression in the central nervous system. *Neurochemical Research* 37 (12), 2678–2685.

Patacchini, R., Maggi, C.A., 1995. Tachykinin receptors and receptor subtypes. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie* 329 (1), 161–184.

Pemow, B., 1983. Substance P. *Pharmacological Reviews* 35, 85–141.

Pitcher, G.M., Ritchie, J., Henry, J.L., 1999. Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *Pain* 83, 37–46.

Pittenger, C., Duman, R.S., 2008. Stress, depression and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33 (1), 88–109.

Quartara, L., Maggi, C.A., 1998. The tachykinin NK1 receptor. Part II: distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides* 32 (1), 1–49.

Roepstorff, P., Fohlman, J., 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry* 11 (11), 601.

Sakurada, C., Watanabe, C., Sakurada, S., Tan-No, K., Sakurada, T., 1999. Major metabolites of substance P degraded by spinal synaptic membranes antagonize the behavioral response to substance P in rats. *Journal of Pharmaceutical Science* 88 (11), 1127–1132.

Seidah, N.G., Mayer, G., Zaid, A., Rousset, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R., Prat, A., 2008. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40, 1111–1125.

Seminowicz, D.A., Laferriere, A.L., Millicamps, M., Yu, J.S.C., Coderre, T.J., Bushnell, C.M., 2009. MRI structural brain changes associated with sensory and emotional function in a rat model of long-term neuropathic pain. *NeuroImage* 47, 1007–1114.

Seybold, V.S., 2009. The role of peptides in central sensitization. in: *Handbook of Experimental Pharmacology* vol. 194, pp. 451-491. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-79090-7_13.

Skilling, S.R., Smullin, D.H., Larson, A.A., 1990. Differential effects of C- and N-terminal substance P metabolites on the release of aminoacid neurotransmitters from the spinal cord: potential role in nociception. *Journal of Neuroscience* 10 (4), 1309–1318.

Sluka, K.A., Milton, M.A., Willis, W.D., Westlund, K.N., 1997. Differential roles of neurokinin 1 and neurokinin 2 receptors in the development and maintenance of heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *British Journal of Pharmacology* 120 (7), 1263–1273.

Stanojevic, S., Vujic, V., Mitic, K., Kustrimovic, N., Kovacevic-Jovanovic, V., Miletic, T., Dimitrijevic, M., 2008. Methionine-enkephalin modulation of hydrogen peroxide (H₂O₂) release by rat peritoneal macrophages involves different types of opioid receptors. *Neuropeptides* 42 (2), 147–158.

Steen, K.H., Reeh, P.W., Anton, F., Handwerker, H.O., 1992. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro. *Journal of Neuroscience* 12 (1), 86–95.

Steiner, D.F., 1998. The proprotein convertases. *Current Opinion in Chemical Biology* 2, 31–39.

Tajerian, M., Alvarado, S., Millecamps, M., Vachon, P., Crosby, C., et al., 2013. Peripheral nerve injury is associated with chronic, reversible changes in global DNA methylation in the mouse prefrontal cortex. *PLoS ONE* 8 (1), e55259.

Takeda, Y., Takeda, J., Smart, B.M., Krause, J.E., 1990. Regional distribution of neuropeptide c and other tachykinin peptides derived from the substance P gene in the rat. *Regulatory Peptides* 28, 323–333.

Vachon, P., Low, L.A., Millecamps, M., Thompson, S.J., Stone, L.S., Bushnell, M.C., 2011. Environmental enrichment modulates chronic neuropathic pain in SNI mice. Program No. 72.02, 2011 Neuroscience Meeting, Society for Neuroscience Washington, DC.

Varty, G.B., Cohen-Williams, M.E., Morgan, C.A., Pylak, U., Duffy, R.A., Lachowicz, J.E., Carey, G.J., Coffin, V.L., 2002. The gerbil elevated plus-maze II: anxiolytic-like effects of selective neurokinin NK1 receptor antagonists. *Neuropsychopharmacology* 27 (3), 371–379.

Vigna, S.R., 2001. The N-terminal domain of substance P is required for complete homologous desensitization but not phosphorylation of the rat neurokinin-1 receptor. *Neuropeptides* 35 (1), 24–31.

Von Frey, M., Ueber den Gebrauch von Reizhaaren., 1986. In: *Untersuchungen über die sinnesfunctionen der menschlichen haut. Erste abhandlung: druckempfindung und schmerz. Abhandlungen der mathematisch-physischen classe der königlich sächsischen gesellschaft der wissenschaften vol. 23, pp.208–217.*

Walczak, J.S., Pichette, V., Leblond, F., Desbiens, K., Beaulieu, P., 2005. Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a model neuropathic pain. *Neuroscience* 132, 1093–1102.

Yamada, M., Yamada, M., Higuchi, T., 2005. Antidepressant-elicited changes in gene expression: remodeling of neuronal circuits as a new hypothesis for drug efficacy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 29 (6), 999–1009.

Yokokawa, A., Yamamoto, K., Omori, Y., Shibasaki, H., Shinohara, Y., Kasuya, Y., Furuta, T., 2009. Simultaneous determination of androstenedione, 11betahydroxyandrostenedione, and testosterone in human plasma by stable isotope dilution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877 (7), 621–626.

Yu, X.H., Zhang, E.T., Craig, R., Shigemoto, R., Ribeiro-da-Silva, A., 1999. NK-1 receptor immunoreactivity in distinct morphological types of lamina I neurons of the primate spinal cord. *The Journal of Neuroscience* 19 (9), 3545–3555.

Zhang, H., Cang, C.L., Kawasaki, Y., Liang, L.L., Zhang, Y.Q., Ji, R.R., Zhao, Z.Q., 2007. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCe : a novel pathway for heat hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience* 27 (44), 12067–12077.

Zheng, M., Streck, R.D., Scott, R.E., Seidah, N.G., Pintar, J.E., 1994. The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. *Journal of Neuroscience* 14, 4656–4673.

II.9 Table legends

Peptide	Precursor ion	Precursor ion charge state (z)	Product ion	Fragment ion	Collision energy (%)
SP	674.7	2+	253.9	b ₂	32
d ₅ -SP	677.2		600.3	b ₁₀ ²⁺	
NKA	567.8	2+	493.2	b ₉ ²⁺	32
d ₅ -NKA	569.7		544.5	int [3-8]	
SP ₃₋₁₁	548.3	2+	946.4	b ₈	30
d ₅ -SP ₃₋₁₁	550.8		949.2	z ₈	
SP ₅₋₁₁	869.6	1+	704.1	b ₆ *	33
d ₃ -SP ₅₋₁₁	872.4		721.2	b ₆ *	
β-tachykinin ₅₈₋₇₁	564.5	3+	661.1	y ₆	33
d ₅ -β-tachykinin ₅₈₋₇₁	565.9		808.2	y ₇	
			666.1	y ₆	
			813.0	y ₇	

* b_n is equivalent to b_n^{-NH₃}

Table 1 : Summary of peptide quantification parameters used for HPLC-MS/MS analysis and post processing MRM.

Peptides	Spinal cord		Brain	
	Accuracy (% NOM)	Precision (%CV)	Accuracy (% NOM)	Precision (%CV)
β-Tachykinin ₅₈₋₇₁	95.0-101.9	1.3-7.0	96.5-106.9	4.1-10.5
SP	98.8-103.5	1.3-9.4	99.0-106.7	2.6-9.3
SP ₃₋₁₁	92.6-100.5	2.8-6.3	95.3-101.7	2.8-8.7
SP ₅₋₁₁	95.9-104.2	4.4-5.2	94.1-107.5	5.7-12.1
NKA	96.6-104.1	3.2-4.1	96.8-105.3	3.0-5.5

Table 2 : Summary of peptide quantification figure of merits obtained in fortified rat spinal cords and brains.

II.10 Figure legends

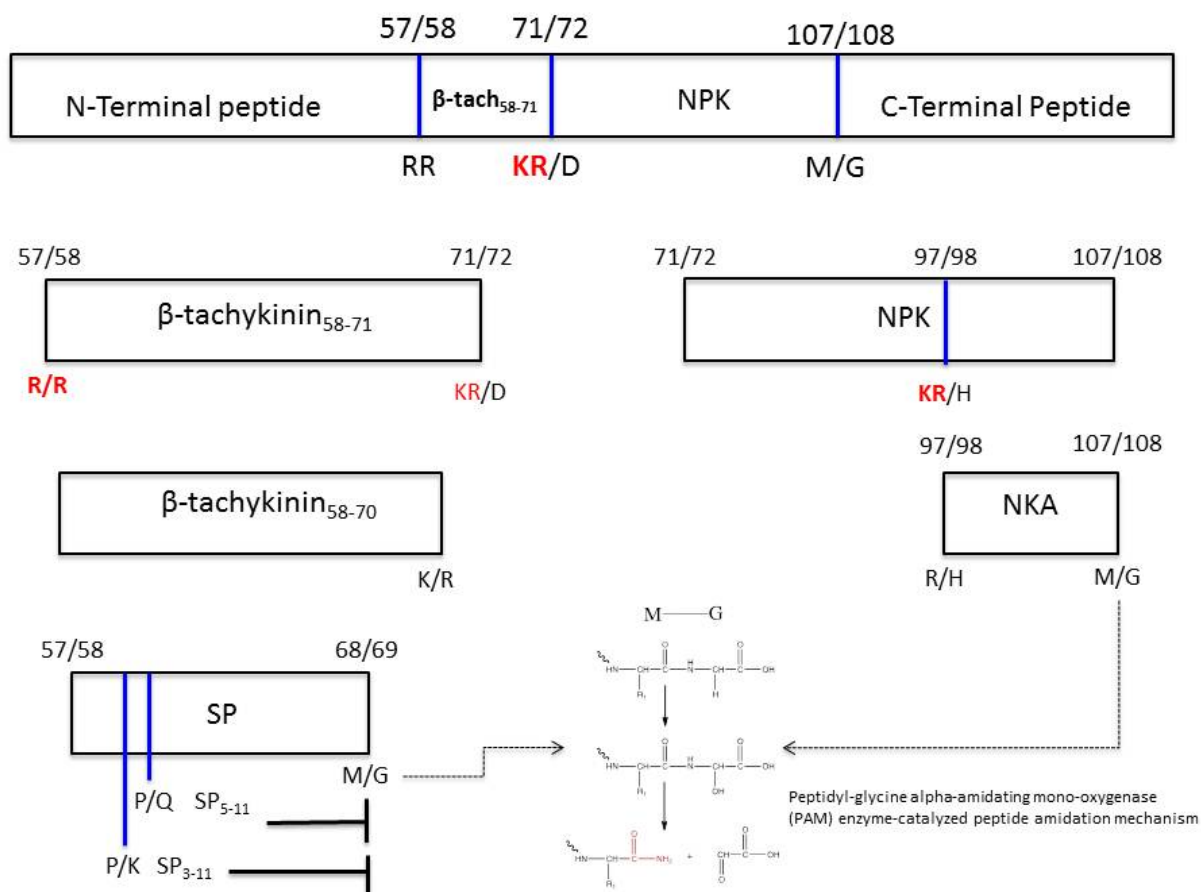


Figure 1 : Schematic representation of rat protachykinin-1 protein metabolism. PC1/3 and PC2 recognize motives composed of a pair of basic amino acids (KR-, RR-, RK- and KK-), or a single basic residue as R- (PC2). Carboxypeptidase E (CPE) catalyzes the release of C-terminal R or K residues. Peptidyl-glycine alpha-amidating ono-oxygenase (PAM) enzyme catalyzed peptide amidation mechanism at C-terminal G.

Prolylendopeptidases catalyzed the hydrolysis of P-X bond of peptides. Localization of targeted tachykinin peptides namely, β -tachykinin₅₈₋₇₁, β -tachykinin₅₈₋₇₀, SP, SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, NPK and NKA within the primary sequence of the protachykinin-1 protein.

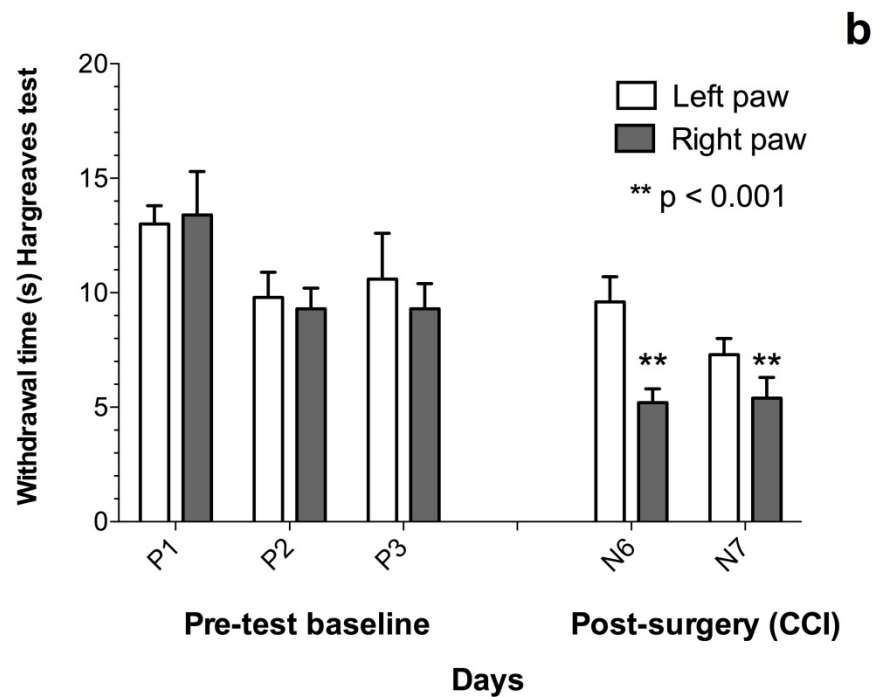
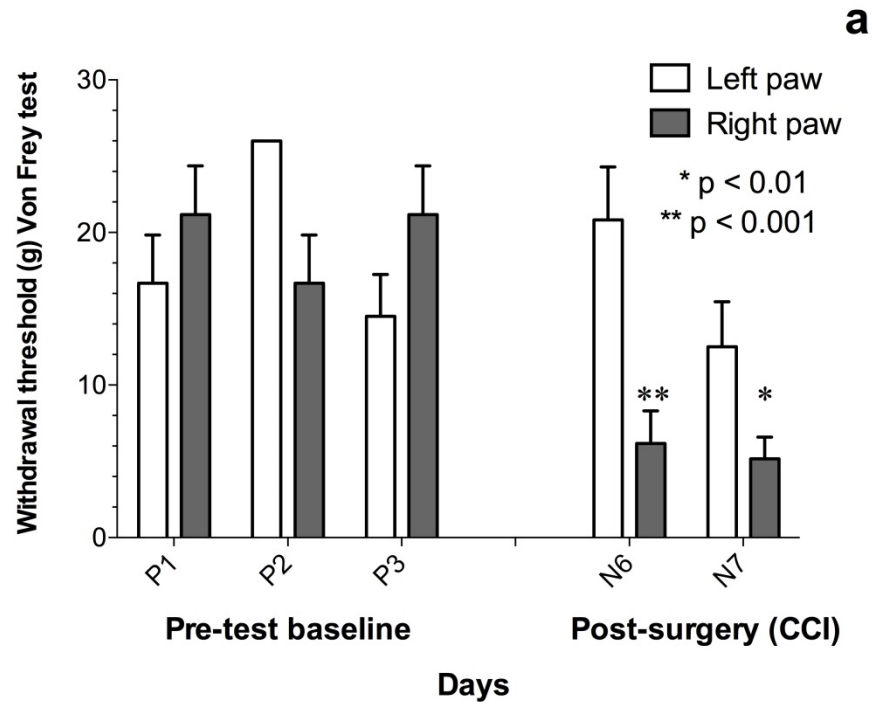


Figure 2 : Histograms demonstrating the behavioral modulation over time with von Frey (a) and Hargreaves (b) tests. Von Frey and Hargreaves results (mean \pm SE) for baseline (before surgery) and neuropathy following CCI surgery of the right sciatic nerve in male Sprague–Dawley rats (n = 6). The rats were tested prior to surgery for baseline values during 3 consecutive days (P1 to P3) and 2 consecutive days after the CCI surgery (N6 and N7) for the establishment of neuropathy. Hyperalgesia and allodynia were clearly established for the right paw (black bars), whereas the left paw (white bars) remained similar to the baseline value.

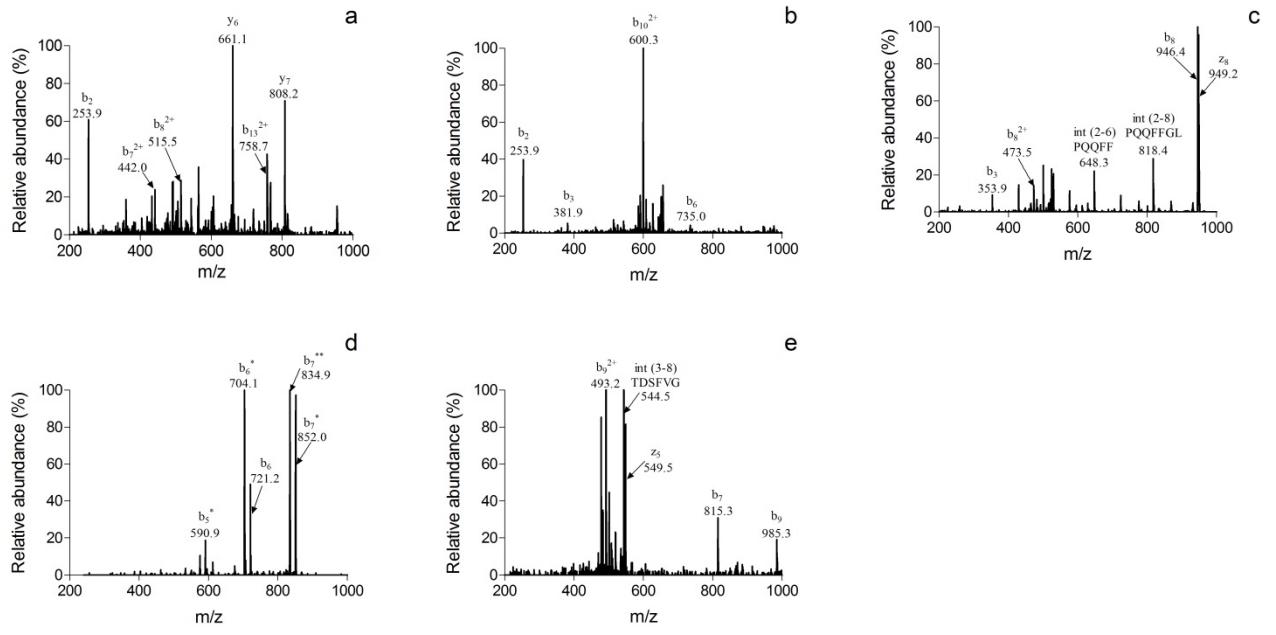


Figure 3 : Product ion spectra (MS²) of β -tachykinin₅₈₋₇₁ (a), SP (b), SP₃₋₁₁ (c), SP₅₋₁₁ (d) and NKA (e).

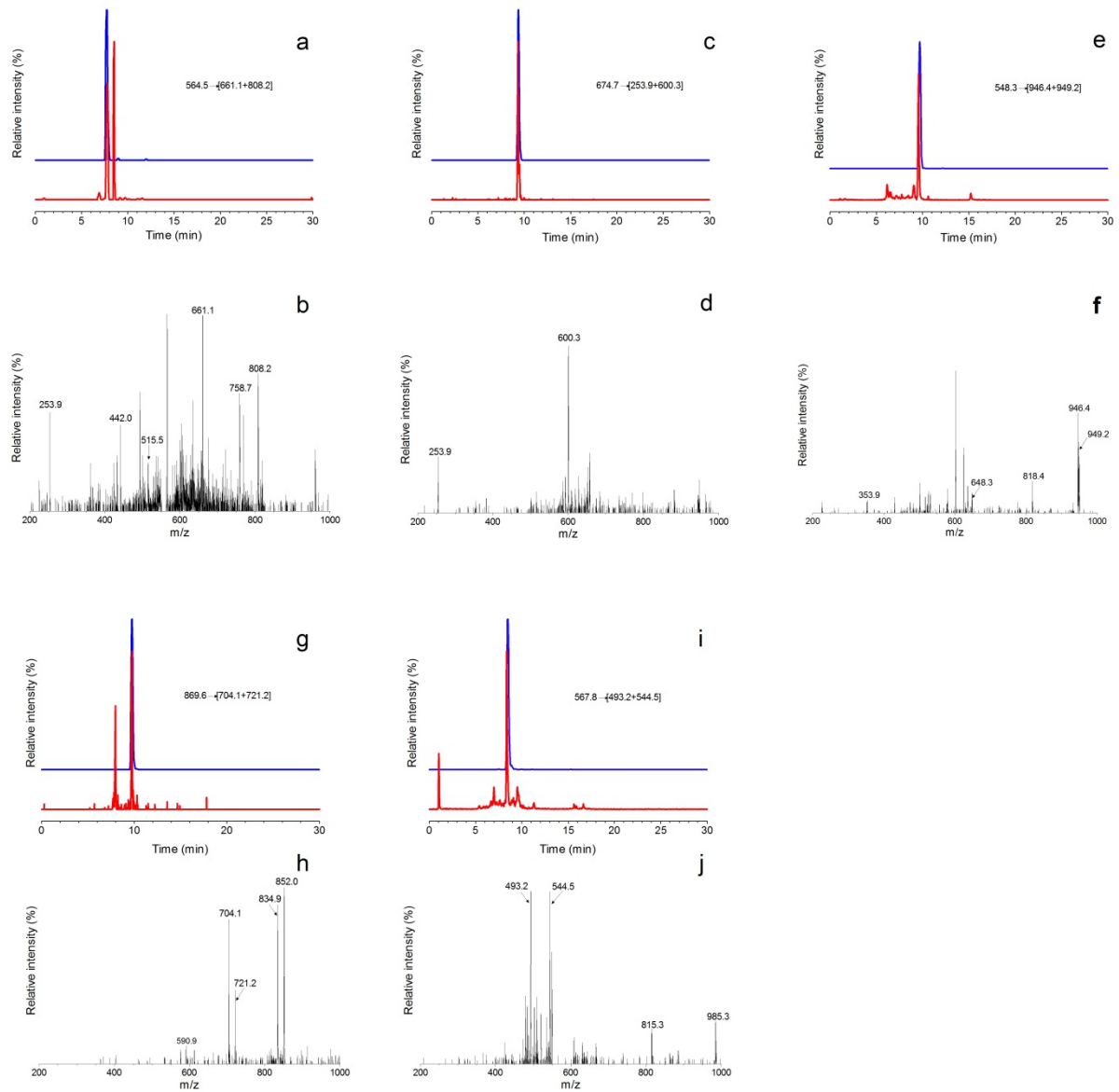


Figure 4 : Detection of targeted tachykinins in tissues from neuropathic rats. b-tachykinin58–71 overlay MRM extracted ion chromatograms of a reference (blue) and a spinal cord tissue (red) (a) and MS/MS spectrum (b). SP overlay MRM extracted ion chromatograms of a reference (blue) and a spinal cord tissue (red) (c) and MS/MS spectrum (d). SP3–11 overlay MRM extracted ion chromatograms of a reference (blue) and a spinal cord tissue (red) (e) and MS/MS spectrum (f). SP5–11 overlay MRM extracted ion chromatograms of a reference (blue) and a spinal cord tissue (red) (g) and MS/MS spectrum (h). NKA overlay MRM extracted ion chromatograms of a reference (blue) and a spinal cord tissue (red) (i) and MS/MS spectrum (j).

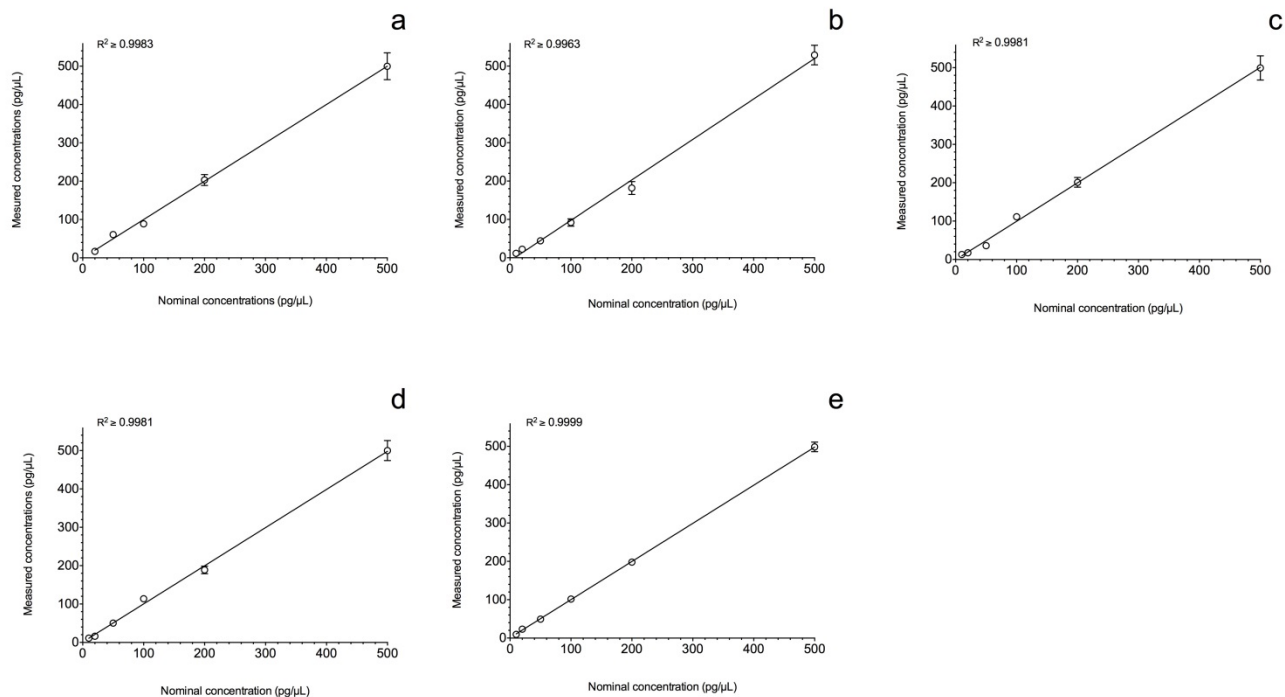


Figure 5 : LC-MS/MS quantitative analysis of standard peptide mixtures. Comparison of the measured and nominal concentrations of six non-zero standards of β -tachykinin₅₈₋₇₁ (a), SP (b), SP₃₋₁₁ (c), SP₅₋₁₁ (d) and NKA (e). Measured concentrations were determined using peptide/deuterated peptide analog internal standard peak area ratios.

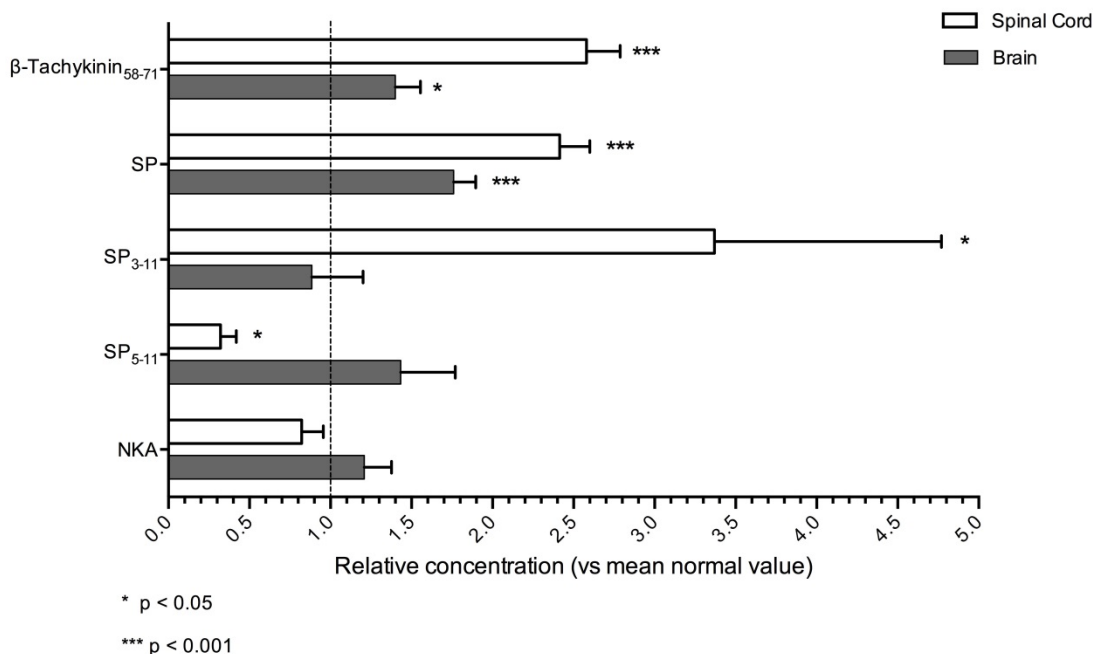


Figure 6 : Relative quantification of targeted tachykinin related peptides in neuropathic rat spinal cord and brain. Peptide concentrations were determined by peak area ratio of targeted peptides with corresponding deuterated peptide analog internal standards. The relative concentration was determined using the ratio with the mean peptide concentration values obtained following the analysis of normal rat spinal cords (n = 8) and brains (n = 8).

III. Article 3 : Quantitative mass spectrometry analysis reveals that deletion of the TRPV1 receptor in mice alters substance P and neurokinin A expression in the central nervous system

F. Pailleux^{a,b}, J. Lemoine^b, F. Beaudry^a

Neurochemical Research. 2012;37(12):2678-2685.

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2012), with permission from Springer.

^aGroupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

^bUMR 5280 CNRS, Université Claude Bernard de Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne Cedex, France

III.1 Abstract

Vanilloid receptors have a central role in the processing of nociceptive stimuli. TRPV1 null mice showed significant decrease in response to heat noxious stimuli. However, thermal sensitivity is still present suggesting that the TRPV1 is not an exclusive transducer of thermal stimuli. Additionally, tachykinin peptides play a central role in pain processing and expression levels may also contribute in modifying the pain threshold. The LC-MS/MS analysis revealed that SP and NKA were significantly down-regulated in TRPV1^{-/-} in spinal cord and brain tissues. In spinal cord, SP concentrations were 23.4 % lower ($p < 0.0049$) and NKA concentrations were 22.0 % lower ($p < 0.0022$) in TRPV1 null mice. Additionally, brain SP concentrations were 26.9 % lower ($p < 0.0260$) and brain NKA concentrations were 31.9 % lower ($p < 0.0063$) in TRPV1 null mice. These results clearly demonstrate that TRPV1 null mice exhibit lower SP and NKA concentrations in the central nervous system. The deficit of thermal responses may also be related to the down-regulations of SP and NKA.

III.2 Introduction

Vanilloid receptors have a central role in the processing of nociceptive stimuli. More specifically, the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) acts as a transducer of noxious thermal and chemical stimuli in nociceptive sensory neurons and plays a central role in mediating enhanced heat sensitivity during inflammatory processes [1-3]. Interestingly, the TRPV1 can be activated by exogenous and endogenous vanilloids. The first exogenous substance identified as a ligand of the TRPV1 was capsaicin, the most abundant pungent molecule present in chili peppers [4]. Actually, the investigations of capsaicin and its specific actions on sensory neurons revealed the existence of a “pain receptor” and additional research allowed the identification of vanilloid receptors and more specifically the TRPV1 [5]. The cellular effects of capsaicin and other related compounds are well characterized [6]. However, not only exogenous chemicals can activate the TRPV1, various endogenous compounds (i.e. endovanilloids) and other inflammatory mediators (e.g. bradykinin, extracellular ATP, arachidonic acid derivatives, leukotrienes, etc.) can directly activate the receptor [7]. The concentration modulation of endovanilloids and other inflammatory mediators may indirectly regulate the function of the TRPV1 through the modification of intracellular signal transduction pathways and subsequently affect the release of neurotransmitters. Consequently, it may significantly contribute in changing the heat threshold of the TRPV1 and thus influence the development of primary and secondary hyperalgesia.

The activation of TRPV1 triggers the propagation of sensory information back to the central nervous system, which leads to pain sensation. Alongside this process, proinflammatory sensory neuropeptides, such as calcitonin gene related peptide (CGRP) and tachykinins including specifically substance P (SP) and neurokinin A (NKA) are released from these activated nerve endings, which induce vasodilation and plasma protein

extravasation resulting in neurogenic inflammation [8]. At the spinal level, aspartate and glutamate are predominant classical excitatory neurotransmitters released at the central terminals of primary afferent neurons but neuropeptides including SP and NKA play an important role in pain transmission [9]. SP and NKA are pronociceptive peptides. They are both agonists of the receptor neurokinin 1 (NK1) present in the lamina I of the spinal cord [10]. However, NKA binds preferentially to the NK2 receptor expressed at the lower level in the central nervous system but its expression correlates with intensity, frequency, and duration of pain [11, 12]. The widespread release of NKA can occur following certain types of noxious stimulation leading to the activation of NK2 receptors directly implicated in pain transmission [13]. Interestingly, antagonists of NK2 receptor produce antidepressant-like effects [14] and recently, anti-depressant medications were commonly used to alleviate chronic pain [15, 16]. Agonists of NK1 and NK2 affect the postsynaptic membrane and provoke a prolonged slow depolarization that significantly contributes to the development of secondary hyperalgesia [9, 13, 17]. Moreover, there is a close link between the up-regulation of SP and NKA with an increase release of excitatory amino acids in the intersynaptic space [18]. Altogether, these phenomena are essential elements in central sensitization and pain hypersensitivity.

Recent pain related studies uncovered interesting findings in TRPV1^{-/-} mice. Experiments with TRPV1^{-/-} mice suggested that their response to noxious stimuli induced using with vanilloid compounds, acids (H⁺), or heat was hampered [19]. The authors concluded that TRPV1 is an essential nociceptive transduction channel and plays a central role in tissue injury-induced thermal hyperalgesia. Further research from this group reported similar findings [20] but showed a distinctive nociceptive processing between laminae I and V correlating with specific behavioral responses, and underlined the significant contribution of lamina I in transmitting nociceptive signals from primary afferents to the brain. Interestingly,

lamina I neurons involved in heat hyperalgesia expressed the NK1 receptor [21] and SP and NKA released from primary afferent A δ and C-fibers upon intense noxious stimulation will contribute to cellular excitability [9, 18]. Consequently, pronociceptive neuropeptides SP and NKA expression may play an important role differentiating nociceptive processing between laminae I and V. It also suggests that any concentration modulation of SP and NKA in the spinal cord may affect the nociceptive information processing.

The hypothesis surrounding our investigation is that TRPV1 null mice will have a different level of expression of tachykinin peptides SP and NKA and thus, central pain processing will be altered and the pain threshold modified. TRPV1 is activated by various endogenous compounds (e.g. endovanilloids and other inflammatory mediators), triggering the release of tachykinins, essential neurotransmitters implicated in secondary hyperalgesia. To test our hypothesis, we developed a selective and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method to measure neuropeptide concentrations in wild-type (WT) and TRPV1^{-/-} mice spinal cord and brain.

III.3 Experimental

III.3.1 Chemicals and reagents

Substance P and neurokinin A were purchased from Phoenix Pharmaceutical (Belmont, CA, USA). The chemicals acetic anhydride 99.5 % (Ac₂O) and ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃) were obtained from Sigma Aldrich, Inc (Saint-Louis, MO, USA). Acetonitrile was purchased from Fisher Scientific (NJ, USA) and trifluoroacetic acid (TFA), formic acid (FA) and ammonium hydroxide (NH₄OH) 28.0–30.0 % were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Standard solutions were prepared in 0.25 % TFA solution.

III.3.2 Synthesis of the internal standards

Acetylated substance P was used as internal standard. Ac₂O reacts principally with the N-terminal primary amine but also with the lysine primary amine. The reaction was performed as previously described [22]. Briefly, SP was diluted in a 0.2 M ammonium bicarbonate buffer (pH 7.5). 200 μL of SP solution were mixed with 10 μL of Ac₂O (≈ 10,000 molar excess) in a microcentrifuge vial. 10 μL of NH₄OH were added and the reaction was stopped after 30 min by further diluting the peptides with a 0.25 % TFA solution to obtain a final concentration of 500 pg/μL. The internal standard mixture was tested by HPLC–MS/MS prior usage.

III.3.3 Sample preparation

Brain and spinal cord tissues from wild type (C57BL/6 J) and TRPV1^{-/-} mice (product #003770) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) and kept frozen at -80°C until analysis. As we described previously [23], tissue processing is an important step to preserve the sample integrity and adequately stabilize the peptides. Mice tissues were weighed accurately and homogenized using a tissue tearor following the addition of 0.25 % TFA solution at a ratio of 1:5 (w/v). The samples were sonicated for 20 min and 150 μL of the homogenate were mixed with 150 μL of acetonitrile to precipitate high molecular weight proteins. The samples were vortexed and centrifuged at 12,000g for 10 min and 150 μL of the supernatant were transferred into an injection vial then spiked with 150 μL of the internal standard solution. Vials were capped and vigorously vortexed prior to analysis.

III.3.4 Instrumentation

The HPLC-MS/MS system included a Thermo Surveyor autosampler, a Thermo Surveyor MS pump and a Thermo LCQ Advantage Ion Trap Mass Spectrometer (San Jose,

CA, USA). Data were acquired and analyzed with Xcalibur 1.4 (San Jose, CA, USA), and regression analyses were performed with PRISM (version 5.0d) GraphPad software (La Jolla, CA, USA) using the nonlinear curve fitting module with an estimation of the goodness of fit. The calibration lines were constructed from the peak-area ratios of targeted neuropeptides and the acetylated substance P analogue internal standard.

III.3.5 Bioanalytical methods

The chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column Thermo Biobasic C₈ 100x1 mm with a particle size of 5 µm. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.4 % of formic acid) at a ratio of 5:95. From 0 to 1 min, the ratio was maintained at 5:95. From 1 to 12 min, a linear gradient was applied up to a ratio of 60:40 and maintained for 5 min. The mobile phase composition ratio was reverted during to the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 15 min for a total run time of 32 min. The flow rate was fixed at 75 µL/min. All targeted neuropeptides and acetylated SP eluted between 9.8 and 12.2 min. 2 µL of sample were injected using full loop mode. The mass spectrometer was coupled with the HPLC system using a pneumatically assisted electrospray ion source (ESI). The sheath gas was set to 10 units and the ESI electrode was set to 4000 V in positive mode. The capillary temperature was set at 300°C and the capillary voltage to 34 V. All scan events were acquired with a 300 ms maximum injection time and the isolation width used for the precursor ions was 3 Da. The mass spectrometer operated for quantitative analysis in full scan MS/MS and the quantification was based on specific MRM extracted ion chromatograms. Analysis details are presented in Table 1.

III.3.6 Statistical analysis

All data were analyzed using non-parametric Mann-Whitney test that does not assume Gaussian distribution to compare WT and TRPV1 null mouse values. Significance was set a priori to $p < 0.05$. The statistical analyzes were performed with PRISM (version 5.0d).

III.4 Results and discussion

III.4.1 Mass spectrometry

Full-scan and product ion mass spectra of SP, NKA and acetylated SP (internal standard) were obtained in positive ion mode. The full-scan electrospray mass spectrum of SP showed the formation of characteristic pseudo molecular ions at m/z 1348 (+1), 674 (+2) and 450 (+3) compatible with the expected ions derived from the primary structure of SP. Product ion spectrum of m/z 674 (2+) revealed specific b and y fragment ions at m/z 1094 (y_9), 1087 (b_9), 882 (b_7), 735 (b_6), 607 (b_5), 600 (b_{10}^{2+}), 515 (b_8^{2+}), 382 (b_3), and 254 (b_2) (Fig. 1). The product ion spectrum of SP showed predominant fragment ions at m/z 600 and 254 that will be used to generate MRM extracted ion chromatograms for quantitative analyses. Full-scan electrospray mass spectrum of NKA showed the formation of characteristic pseudo molecular ions at m/z 1134 (1+) and 567 (2+). Product ion spectrum of m/z 567 (2+) revealed specific b and y fragment ions at m/z 985 (b_9), 815 (b_7), 716 (b_6), 493 (b_9^{2+}), 484 (b_9^{*2+}) and 482 (b_4) (Fig. 1). The product ions selected were m/z 815 and 493 to generate MRM extracted ion chromatograms for quantitative analyses of NKA. Acetylated SP was produced in our laboratory and tested by HPLC-MS/MS at a relevant concentration of 500 pg/ μ L (i.e. the internal standard concentration used). The completeness of acetylation reaction was assessed by monitoring 674-600 and 674-254 MRM channels, which demonstrated the lack of native SP. Full scan spectrum of acetylated SP showed an intense ion at m/z 716 (2+). The product ion spectrum showed a base peak at m/z 642 (b_{10}^{2+}) and it was selected to generate MRM

extracted ion chromatograms used to calculate peak area ratios of the peptide and the internal standard. Figure 2 illustrates representative MRM extracted ion chromatograms for the LOQ (A), an extracted spinal cord tissue (B) and an extracted brain tissue (C).

III.4.2 Analytical performance

The instrument response linearity was tested using the ratio of the peptides with the acetylated SP internal standard from 25 to 500 fmol/ μ L. The analytical performance in terms of linearity, precision and accuracy are summarized in Table 1. Assessments of the correlation between measured concentrations and nominal concentrations were performed. As illustrated in Fig. 3, the correlations were excellent ($R^2 \geq 0.9920$). In order to determine the assay accuracy, the endogenous levels were taken into account as described previously [24]. The accuracy (% NOM) observed was ranging from 86.8-109.2 % to 91.2-105.6 % for SP and NKA respectively. The precision (% CV) observed was ranging from 0.6-10.5 % to 0.9-8.4 % for SP and NKA respectively. Accordingly, the analytical method provides adequate figures of merits for targeted peptide analysis performed during this study.

RIAs and ELISA's are the most widely used methods to measure proteins and peptides in biological fluid and many commercial kits are available. However, these kits are not specifically validated for tissue analysis and therefore, equivalency comparison between two and more fully validated methods could not be performed. Moreover, commercial RIAs and ELISA's methods do not address the issue of peptide stability and thus sample integrity remains an issue. The method of analysis proposed in this manuscript significantly improves the specificity by using tandem MS (MS/MS), and the data obtained shows acceptable accuracy, precision and sensitivity. Moreover, the sample preparation procedure proposed stabilizes the targeted peptides and the data generated is then more reliable. The development of LC-MRM peptide assays is rapid compared with the time and cost associated with the

generation and characterization of antibodies for ELISA development. An additional advantage is the ease with which LC-MRM assays can be multiplexed over traditional immunoassays. This is an important advantage for targeted or shotgun peptidomic studies.

III.4.3 Analysis of mouse tissues

Following the analysis of SP and NKA in mouse spinal cord and brain, significantly altered concentrations were observed between TRPV1^{-/-} and WT groups. The analysis of mouse spinal cord tissues revealed concentrations of 99.9-165.8 and 60.3-103.3 fmol/mg for SP and NKA respectively. The analysis of mouse brain tissues revealed concentrations of 137.4-258.5 and 83.9-158.3 fmol/mg for SP and NKA respectively. Differential concentrations were measured using relative concentration ratios between TRPV1^{-/-} and WT. As illustrated in Fig. 4, SP and NKA were significantly down-regulated in TRPV1^{-/-} in both tissues. In spinal cord, SP concentrations were 23.4 % lower ($p<0.01$) and NKA concentrations were 22.0 % lower ($p<0.01$) in TRPV1 null mice. Additionally, brain SP concentrations were 26.9 % lower ($p<0.05$) and brain NKA concentrations were 31.9 % lower ($p<0.01$) in TRPV1 null mice. These results clearly demonstrated that TRPV1 null mice exhibited significantly lower SP and NKA concentrations in the central nervous system.

SP and NKA are produced by post-translational proteolysis of a single precursor, the TAC1 gene protein [25]. Interestingly, while the behavioral response to mildly painful stimulus is intact in TAC1 null mice, the response to moderate and intense pain stimuli is significantly reduced with a more significant impact on thermal and chemical pain [19, 20]. To a certain extent, TRPV1 null mice showed similar pain behavior compared to TAC1 null mice [26] and both transgenic mice cannot adequately integrate heat and chemical peripheral stimuli. It is well established that the persistent interactions of tachykinins related peptides with NK1 and NK2 receptors are an important contributor to secondary hyperalgesia. Our

findings show that TRPV1 null mice are SP and NKA deficient compared to WT animals suggesting that transmission and production of moderate to intense pain messages could be hampered. Eckert *et al.* reported some discrepancies following laminae I and V electrophysiological recording in TRPV1 null mice [20]. Thermal response deficits were noted at temperatures between 40 and 45°C but residual pain behavior following tissue injury at relatively higher temperatures (45-49°C) in mutant mice were observed and they suggested it was mediated by a small proportion of noxious heat-responsive lamina I neurons [20]. Further results showed a decrease of thermal and mechanical hyperalgesia following careful neurotoxin ablation of a small subset of lamina I neurons (expressing NK1 receptor) indicating that pain threshold was modified as a consequence of the reduction of substrate-ligand interactions [27]. Likewise, our results may suggest that lower pronociceptive peptide SP and NKA concentrations will most likely produce a similar effect in TRPV1 null mice. SP and NKA bind to the NK1 receptors affecting the postsynaptic membrane and it is central to the phenomenon termed central sensitization. It is responsible for pain hypersensitivity including secondary hyperalgesia but also allodynia.

Moreover, endogenous TRPV1 agonists (e.g. endovanilloids) play a role in inflammatory responses and are detected at concentrations that can activate TRPV1 in local tissue environments particularly following an injury. As mention earlier, the activation of TRPV1 triggers the release of SP and NKA. Consequently, endogenous TRPV1 agonists may contribute to the maintenance of endogenous SP and NKA concentrations. Additionally, following tissue injuries, endovanilloids and other inflammatory mediators cannot activate TRPV1 receptors, thus SP and NKA release might be hindered affecting the sensitization mechanism (primary hyperalgesia) and the development of secondary hyperalgesia in TRPV1 null mice. In the brain, the roles of SP, NKA and NK1 systems in the regulation of chronic pain, including neuropathic pain, remain a subject of controversy. However, the significant

decrease of SP and NKA concentrations in brain can disturb pain regulation in TRPV1 null mice.

The analysis of tissues with immunohistochemistry methods were used in the past and could potentially help to ascertain the localization of the down-regulation observed, particularly in specific regions of the dorsal horn. It could significantly contribute in the interpretation of the data presented in this manuscript. However, the accuracy of these analyses is jeopardized due mainly to the poor stability of the peptides following tissue harvesting and dissection [23]. Currently, the immunohistochemistry methods are not validated using tissue stabilization treatments necessary to maintain sample integrity.

The results presented in this manuscript are particularly interesting when considering the development of new pain medicines. The CNS down-regulation (22–32 %) of SP and NKA in TRPV1 null mice may suggest that full or partial antagonist of TRPV1 receptors will not completely suppress pain transmission but will positively modify the pain threshold since both are important in nociceptive information processing. This is an attractive strategy for patients suffering of pain associated to injuries since pain sensation is essential for avoiding accidental added damages. Moreover, the results presented in this manuscript are in line with our previous findings on the modulation of tachykinins following the administration of TRPV1 ligands in articular pain models [28, 29]. In our opinion, these results grant further interest in the development of new therapeutic strategies targeting the TRPV1 receptor.

III.5 Conclusions

A quantitative LC-MS/MS method has been developed allowing simultaneous measurements of SP and NKA in mouse spinal cord and brain tissues. The results clearly demonstrate that TPRV1 null mice exhibit lower SP and NKA concentrations in the central

nervous system. Consequently, the observed deficits of thermal responses in TRPV1 null mice may also be related to the down-regulations of SP and NKA. These two peptides are strongly associated to primary and secondary hyperalgesia.

III.6 Acknowledgements

This work was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry NSERC Discovery grant No. 386637-2010). F. Pailleux received a scholarship from the Coopération et mobilité Internationales Rhône-Alpes (CMIRA).

III.7 References

1. Steen KH, Reeh PW, Anton F, Handwerker HO (1992) Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptor in rat skin, in vitro. *J Neurosci* 12(1):86–95
2. Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C, Valdeolmillos M (1995) Intracellular free calcium responses to protons and capsaicin in cultured trigeminal neurons. *Neuroscience* 67(1):235–243
3. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824

4. Yoshimura M, Yonehara N (2001) Influence of capsaicin cream in rats with peripheral neuropathy. *Pharmacol Res* 44(2):105–111
5. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824
6. Szallasi A, Blumberg PM (1999) Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51(2):159–211
7. Van Der Stelt M, Di Marzo V (2004) Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem* 271:1827–1834
8. Holzer P (1988) Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24:739–768
9. Levine JD, Fields HL, Basbaum AI (1993) Peptides and the primary afferent nociceptor. *J Neurosci* 13(6):2273–2286
10. Martin WJ, Cao Y, Basbaum AI (2004) Characterization of wide dynamic range neurons in the deep dorsal horn of the spinal cord in preprotachykinin-a null mice in vivo. *J Neurophysiol* 91(5):1945–1954
11. Patacchini R, Maggi CA (1995) Tachykinin receptors and receptor subtypes. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 329(1):161–184

12. Trafton JA, Abbadie C, Basbaum AI (2001) Differential contribution of substance P and neurokinin A to spinal cord neurokinin-1 receptor signaling in the rat. *J Neurosci* 21(10):3656–3664
13. Baumbauer KM, Young EE, Joynes RL (2009) Pain and learning in a spinal system: contradictory outcomes from common origins. *Brain Res Rev* 61(2):124–143
14. Louis C, Stemmelin J, Boulay D et al (2008) Additional evidence for anxiolytic- and antidepressant-like activities of saredutant (SR48968), an antagonist at the neurokinin-2 receptor in various rodent-models. *Pharmacol Biochem Behav* 89(1):36–45
15. Saarto T, Wiffen PJ (2010) Antidepressants for neuropathic pain: a Cochrane review. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 81(12):1372–1373
16. Mico J, Ardid D, Berrocoso E (2006) Antidepressants and pain. *Trends Pharmacol Sci* 27(7):348–354
17. Dickenson AH (1995) Spinal cord pharmacology of pain. *Br J Anaesth* 75:193–200
18. Seybold VS (2009) The role of peptides in central sensitization. *Handb Exp Pharmacol* 194:451–491

19. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288(5464):306–313
20. Eckert WA III, Julius D, Basbaum AI (2006) Differential contribution of TRPV1 to thermal responses and tissue injury-induced sensitization of dorsal horn neurons in laminae I and V in the mouse. *Pain* 126(1–3):184–197
21. Craig AD, Lamina I (2004) But not lamina V, spinothalamic neurons exhibit responses that correspond with burning pain. *J Neurophysiol* 92:2604–2609
22. Che FY, Fricker LD (2002) Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. *Anal Chem* 74(13):3190–3198
23. Beaudry F (2010) Stability comparison between sample preparation procedures for mass spectrometry-based targeted or shotgun peptidomic analysis. *Anal Biochem* 407(2):290–292
24. Beaudry F, Ferland CE, Vachon P (2009) Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 23:940–950
25. Nawa H, Kotani H, Nakanishi S (1985) Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature* 312:729–734

26. Zimmer A, Zimmer AM, Baffi J, Usdin T, Reynolds K, König M, Palkovits M, Mezey E (1998) Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(5):2630–2635
27. Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, Simone DA (1997) Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 278:275–279
28. Ferland CE, Beaudry F, Vachon P., Antinociceptive effects of eugenol evaluated in a monoiodoacetate-induced osteoarthritis rat model. *Phytother Res* (in press)
29. Ferland CE, Pailleux F, Vachon P, Beaudry F (2011) Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides* 45:423–429

III.8 Table legends

Peptide	Precursor Ion	Product ion	Collision energy (%)	Analytical Range (fmol/mg)	R ²	% NOM	%CV
SP	674 (2+)	254 (b ₂) 600 (b ₁₀ ²⁺)	32	25 - 500	≥0.9898	86.8-109.2	0.6-10.5
NKA	567 (2+)	493 (b ₉ ²⁺) 815 (b ₇)	32	25 - 500	≥0.9965	91.2-105.6	0.9-8.4
Acetylated SP (IS)	716 (2+)	642 (b ₁₀ ²⁺)	30	N/A	N/A	N/A	N/A

Table 1 : Summary of peptide quantification parameters and figure of merits

III.9 Figure legends

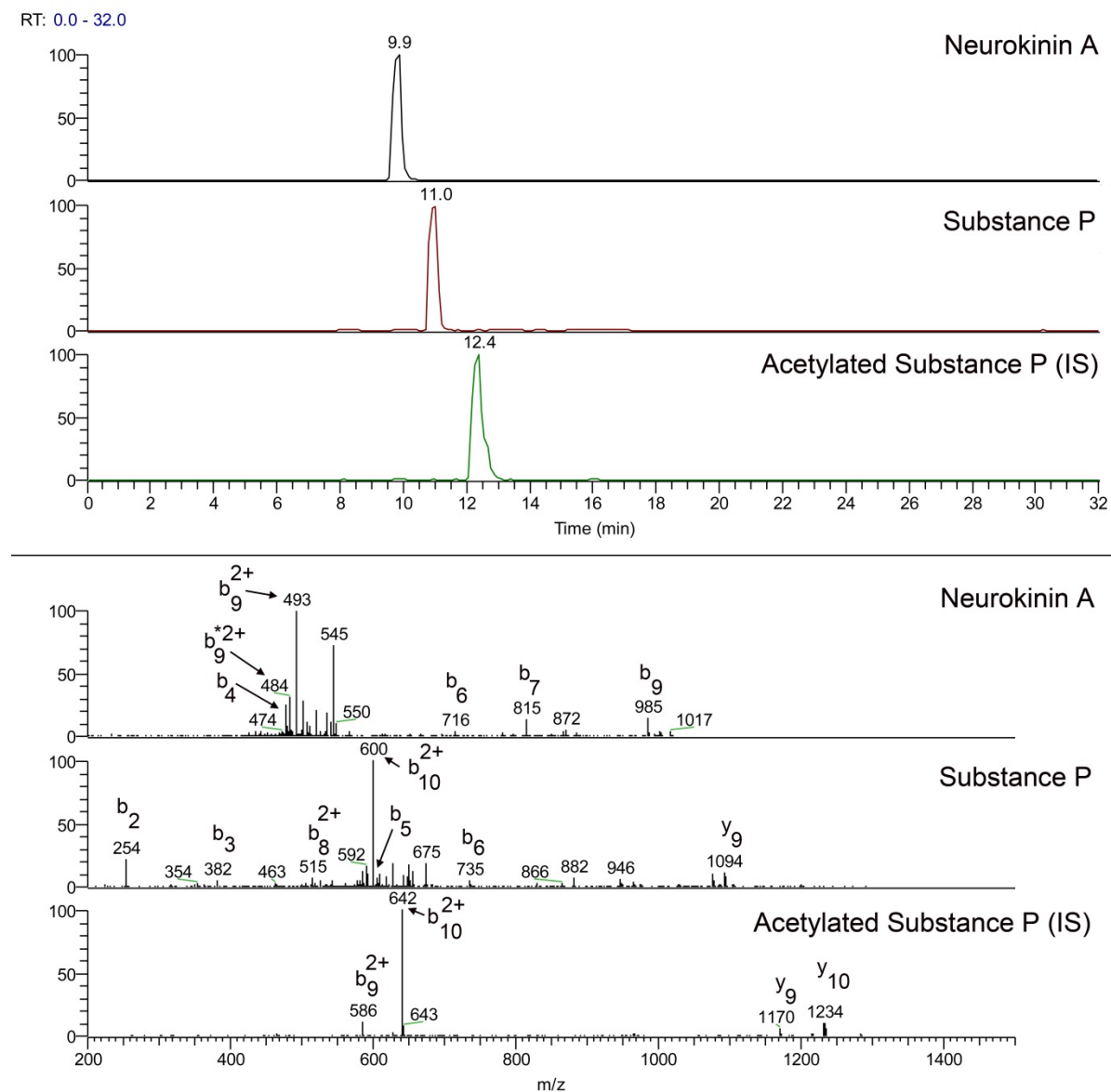


Figure 1 : Product ion spectra of SP, NKA and acetylated SP (IS)

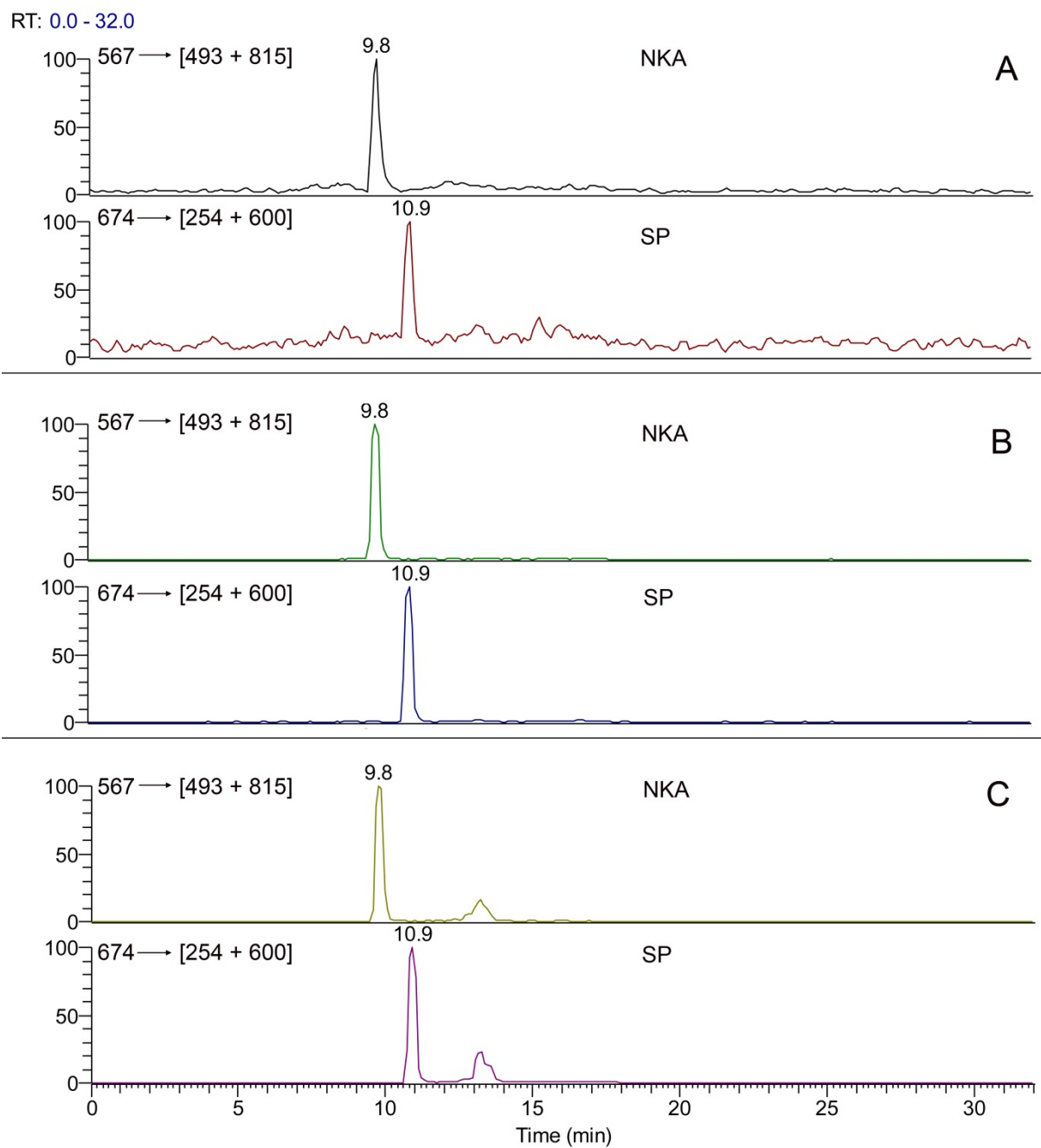


Figure 2 : Comparison of MRM extracted ion chromatograms obtained from injection (a) of a reference LOQ sample (25 fmol/ μ L), (b) an authentic spinal cord tissue sample and (c) a brain tissue sample

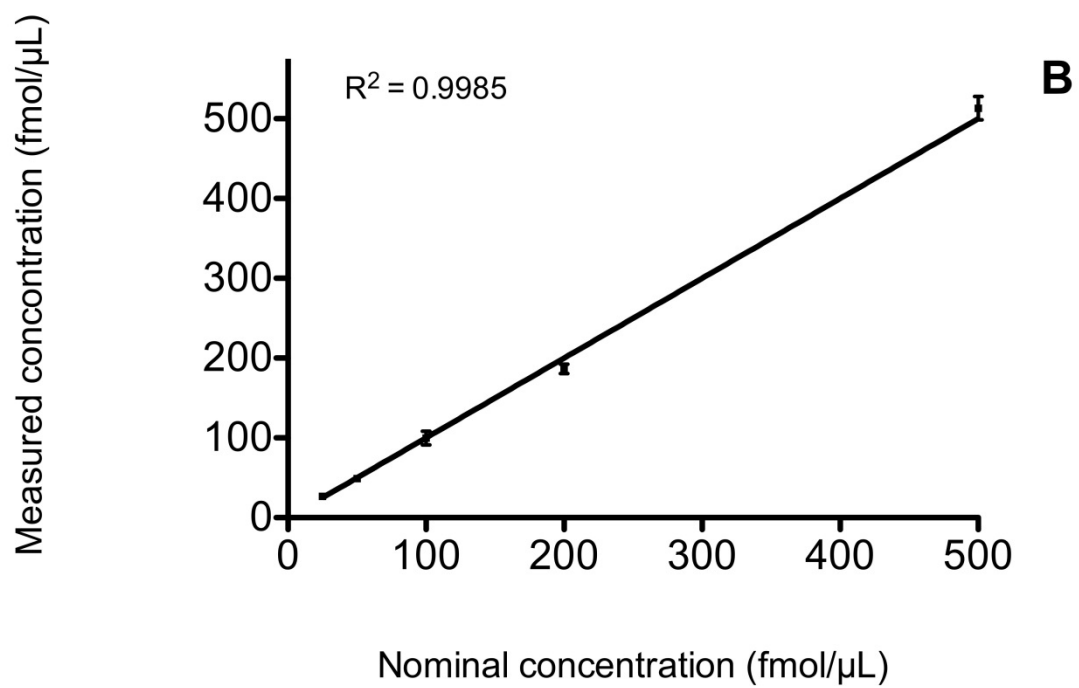
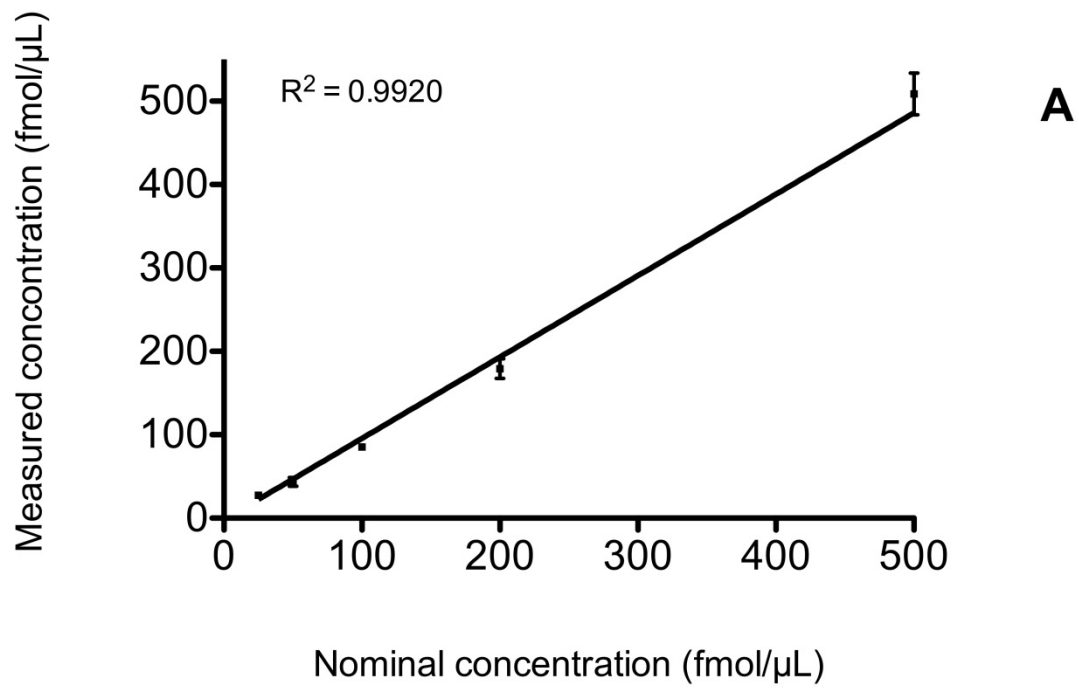


Figure 3 : LC-MS/MS quantitative analysis of a standard peptide mixture. Comparison of the measured and nominal concentrations of five non zero standard of SP (a) and NKA (b). Measured concentrations were determined using peptide/IS peak area ratios

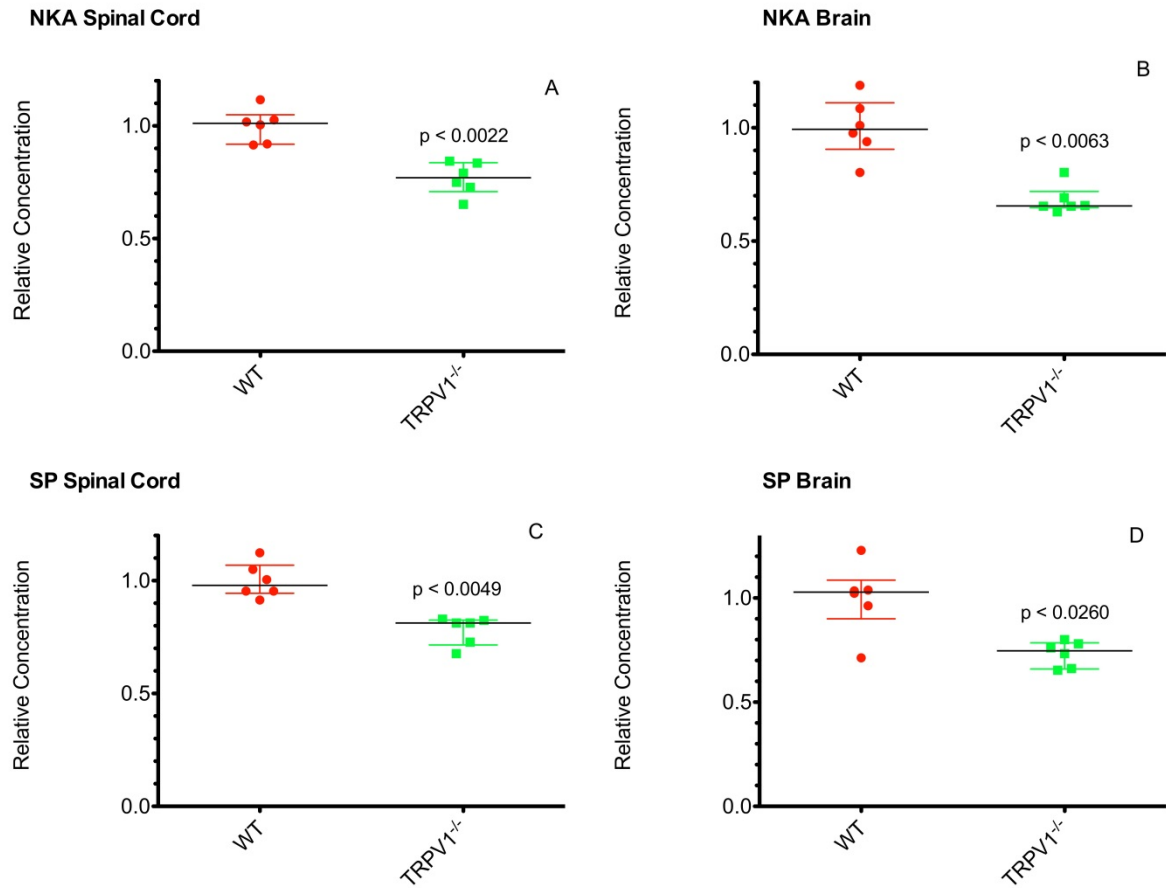


Figure 4 : Vertical scatter chart representing SP and NKA modulation in TRPV1^{-/-} (n = 6) and WT mice (n = 6) (Median with interquartile range). Data represent the relative ratios with mean WT concentration. (a) Relative NKA concentration observed in TRPV1^{-/-} and WT spinal cord mice. (b) Relative NKA concentration observed in TRPV1^{-/-} and WT brain mice. (c) Relative SP concentration observed in TRPV1^{-/-} and WT spinal cord mice. (d) Relative SP concentration observed in TRPV1^{-/-} and WT brain mice.

IV. Article 4 : Investigation of the metabolic biotransformation of substance P in liver microsomes by liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry

F. Pailleux^{a,b}, J. Lemoine^b, F. Beaudry^a

Biomedical Chromatography. 2013;27(1):39-47.

Reprinted from Publication, Copyright Owner, Copyright (2012), with permission from Wiley.

^aGroupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

^bUMR 5280 CNRS, Université Claude Bernard de Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, 69622 Villeurbanne Cedex, France

IV.1 Abstract

Substance P (SP) belongs to the tachykinin family and plays an essential role in pain transmission and in neurogenic inflammation. It can be detected in the central and peripheral nervous systems. The objectives of this study were to establish SP metabolic stability in liver microsomes in three species (rat, mouse and human), and identify and characterize SP metabolites by LC-MS/MS. Endogenous peptide metabolism is not well documented and this is particularly true for neuropeptides participating in neurogenic inflammation. *In vitro*, $T_{1/2}$ results in pooled liver microsomes were 9.2, 5.6 and 18.6 min for rat, mouse and human liver microsomes, respectively. Five major SP metabolites were identified and quantified, including C-terminal SP fragments SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, SP₆₋₁₁, SP₈₋₁₁ as well as N-terminal fragment SP₁₋₇. The results suggest significant differences between species in SP metabolite concentrations.

Consequently, the metabolic profile of each species is distinctive and may have a significant impact on biomolecular mechanisms involved in specific pathophysiological changes.

IV.2 Introduction

Tachykinin precursor 1 (TAC1) gene encodes the protachykinin-1 protein containing the sequence of four tachykinin peptides, including substance P (SP) and neurokinin A (Basbaum, 1999), as well as related peptides neuropeptide K and neuropeptide gamma (Otsuka and Yoshioka, 1993). SP is a peptide containing 11 amino acids (HRPKPQQFFGLM-NH₂) and can be detected largely in the central and peripheral nervous systems (Chang *et al.*, 1971; Harrison and Geppetti, 2001). Despite lack of direct demonstration, it is believed that SP is released from its precursor protein by the actions of proprotein convertases and endopeptidases during axonal transport (Harrison and Geppetti, 2001). Although a number of enzymes are involved in the *in vivo* metabolism of protachykinin-1 protein and tachykinin peptides, neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme are probably the enzymes most commonly involved within the peripheral nervous systems as well as in the blood stream (Nadel and Borson, 1991). SP is an important neurotransmitter (Nichols *et al.*, 1999; Todd *et al.*, 2002) that plays a significant role in the rapid contractions of the gastrointestinal smooth muscle (Hokfelt *et al.*, 2001), and is a major modulator of inflammatory and immune reactions (Szallasi and Blumberg, 1999; Mantyh and Yaksh, 2001).

Neurogenic inflammation implies both increased vascular permeability and vasodilatation caused by the release of neuropeptides by capsaicin-sensitive sensory neurons (Martling *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1995; Herbert and Holzer, 2002). It is a nervous system-induced physiological process of inflammation in which neuropeptides play a fundamental role (Donnerer *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1993; Pennefather *et al.*, 2004). Released

neuropeptides act on the vasculature at the peripheral level to cause the vasodilatation of arterioles, the extravasation of plasma protein from post-capillary venules, and the adhesion of leukocytes to endothelial cells of venules (Holzer, 1988; Baluk *et al.*, 1995). Tissue-specific responses produced by neurogenic inflammation include smooth muscle relaxation/contraction in the urinary bladder, urethra and iris, inotropic and chronotropic effect on the heart, bronchoconstriction in the airways and other minor effects (Ricciardolo *et al.*, 1994a,b). Primary sensory neurons expressing TAC1 gene are portrayed by their characteristic sensitivity to capsaicin and, specifically, it was demonstrated that the expression of transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1 (TRPV1) and TAC1 genes are closely related (Zimmer *et al.*, 1998). Capsaicin is a selective agonist of TRPV1 and the activation of TRPV1 provokes the release of SP (Colpaert *et al.*, 1983; Szallasi and Blumberg, 1999). Subsequently, it has been demonstrated that SP plays a central role in inflammatory mechanisms (Dimitriadou *et al.*, 1994; Vergnolle *et al.*, 2001) and thus systemic SP concentrations may increase significantly. Like SP, other neuropeptides are involved in neurogenic inflammation including neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y (Lu *et al.*, 2005). In fact, following tissue damage, these inflammatory peptides are released and act on nociceptors close to the injury site and cause the sensitization, a mechanism central to primary hyperalgesia (Julius and Basbaum, 2001).

SP acts on several receptors; however, it has greater affinity for the NK1 receptor (Maggi, 2000). The NK1 receptor is particularly expressed in the lamina I neurons (Craig, 2004) and SP is released from primary afferent A δ - and C-fibers upon a noxious stimulation (Levine *et al.*, 1993; Seybold, 2009). The persistent interaction of SP and NK1 is an important contributor to secondary hyperalgesia (Sandkühler, 2009).

Circulating endogenous peptide metabolism is not well documented and this is particularly true for neuropeptides participating in neurogenic inflammation. SP metabolism in the central nervous system and at the blood-brain barrier was previously investigated (Chappa *et al.*, 2007). One major organ contributing to metabolism is the liver and interestingly, to our knowledge, there is no study reporting SP liver metabolism, particularly metabolisms related to microsomal enzymes. The objectives of this study were to establish SP metabolic stability in liver microsomes, and identify and characterize SP metabolites by HPLC-MS/MS. This is acutely important since previous results showed that SP₁₋₇ and SP₅₋₁₁ have pharmacological activities as well as other N- and C-terminal SP fragments (Sakurada *et al.*, 1999). Consequently, interspecies differences in SP metabolic stability may play an important role in the development of primary and possibly secondary hyperalgesia.

IV.3 Material and methods

IV.3.1 Chemicals and reagents

The chemicals acetic anhydride 99.5% (Ac₂O) and ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃) were obtained from Sigma Aldrich Inc. (St Louis, MO, USA). SP, SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, SP₆₋₁₁ and SP₈₋₁₁ were purchased from Phoenix Pharmaceutical (Belmont, CA, USA). SP₁₋₇ was synthesized and characterized by CanPeptide Inc. (Pointe-Claire, Quebec, Canada). Acetonitrile was purchased from Fisher Scientific (NJ, USA) and trifluoroacetic acid (TFA), formic acid and ammonium hydroxide (NH₄OH) 28.0-30.0% were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Standard solutions were prepared as previously performed (Beaudry *et al.*, 2009). Rat, mouse and human liver microsomes were obtained from BD Biosciences (Woburn, MA, USA). Total protein content and the characterization for the level of activity for a series of CYP, flavin monooxygenase, carboxylesterases, UGT and other enzymes were

provided in the product insert. The microsomes were stored and used as recommended by BD Biosciences.

IV.3.2 Synthesis of the internal standard

Acetylated substance P was used as internal standard for the quantitative analysis of SP and metabolites. Ac₂O reacts principally with the N-terminal primary amine, but also with the lysine primary amine. The reaction was performed as previously described (Che and Fricker, 2002). Briefly, the targeted peptides were diluted in a 0.2 M ammonium bicarbonate buffer (pH 7.5). Two-hundred microliters of standard peptide solution was mixed with 10 μ L of Ac₂O (~10,000 molar excess) in a microcentrifuge vial. Ten microliters of NH₄OH was added and the reaction was stopped after 30 min by further diluting the peptides with a 0.25% TFA solution to obtain a final concentration of 500 pg/ μ L. The internal standard mixture was tested by HPLC-MS/MS and no residual substance P was detected.

IV.3.3 Instrumentation

The HPLC-MS/MS system comprises a Thermo Surveyor autosampler, a Thermo Surveyor MS pump and a Thermo LCQ Advantage Ion Trap Mass Spectrometer (San Jose, CA, USA). Data were acquired and analyzed with Xcalibur 1.4 (San Jose, CA, USA), and regression analysis was performed with Prism (version 5.0d) GraphPad software (La Jolla, CA, USA) using the nonlinear curve-fitting module with an estimation of the goodness of fit. The calibration lines were constructed from the peak-area ratios of the peptides and the acetylated substance P analog internal standard.

IV.3.4 Bioanalytical methods

The analytical method developed was based on a previously published method (Beaudry *et al.*, 2009). The chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a microbore column, Thermo Biobasic C₈ 100x1 mm, with a particle size of 5 µm. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.4% of formic acid) at a ratio of 5:95, respectively. From 0 to 1 min, the ratio was maintained at 5:95. From 1 to 30 min a linear gradient was applied up to a ratio of 60:40 and maintained for 2 min. The mobile phase composition ratio was reverted to during the initial condition and the column was allowed to re-equilibrate for 14 min for a total run time of 47 min. The flow rate was fixed at 75 µL/min. Two microliters of sample were injected using full loop mode. The mass spectrometer was coupled with the HPLC system using a pneumatic assisted electrospray ion source (ESI). The sheath and auxiliary gas were set to 5 units and the ESI electrode was set to 4000 V in positive mode. The capillary temperature was set at 300°C and the capillary voltage to 34 V. The mass spectrometer operated for quantitative analysis in multiple reaction monitoring (MRM) mode and the mass transitions and collision energies are presented in Table 1. Metabolite identification was performed in full scan MS mode (m/z 200-1500) and molecular characterization was performed using product ion spectra.

IV.3.5 Microsomal incubations

The incubations were performed as previously described (Chanda *et al.*, 2008) and all incubations were performed in triplicate. The incubations were performed in a microcentrifuge tube, and contained 10 mM of SP and 1 mg/mL of microsomal proteins diluted in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Microsomal suspensions were preincubated with NADPH (1 mM) for 5 min at 37°C prior to fortification with SP. Immediately after fortification of SP in the microsomal suspension containing NADPH, the sampling point for

t=0 was taken, and further sampling points were taken at 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min. One hundred microliters of samples were taken and mixed with 10 μ L of internal standard solution (10 mM of acetylated SP in 0.25% TFA) and 100 μ L of acetonitrile in a 1.5 mL centrifuge tube. Samples were centrifuged at approximately 12,000g for 10 min and 150 μ L of the supernatant was transferred into an injection vial for LC-ESI/MS/MS analysis.

IV.3.6 Determination of metabolic stability

Following sample analysis, the SP/acetylated SP peak area ratio was used to determine SP concentration. The test compound disappearance shows first order kinetics when $[S] < K_m$ since the K_m of CYP substrates are generally high (Masimirembwa *et al.*, 2001). All depletion data were fitted with a monoexponential decay model, described in equation (1), including a 1/y weighting.

$$C(t) = C_0 e^{-kt} \quad (1)$$

Consequently, in vitro half-life was obtained using equation (2) :

$$T_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad (2)$$

SP concentrations were determined for each sample taken at 0, 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min following fortification of microsomal mixtures. SP depletion profiles were normalized using the measured SP concentration at time 0 and percentage remaining was calculated for the other sampling points. The regression analyses were performed with Prism (version 5.0d) GraphPad software (La Jolla, CA, USA) using the nonlinear curve-fitting module with an estimation of the goodness of fit. The basis of this approach was demonstrated from the derivation of the integrated Michaelis-Menten equation (Segel, 1975; Obach, 1999).

IV.3.7 SP metabolite identification by HPLC-MS/MS

SP was incubated at a concentration of 10 μM in rat, mouse and human liver microsomes and the supernatant was precipitated with acetonitrile at a ratio of 1:1. Ten-microliter aliquots were chromatographed under the same conditions as described above. The mass spectrometer was operating in full-scan MS [200-1500] mode and product ion spectra were collected for all peaks of interest at a collision energy varying from 30 to 35%. The identification was based on specific relative mass shift and the main fragmentation paths of peptides observed in collision-induced dissociation (CID) tandem MS (Steen and Mann, 2004).

IV.4 Results

IV.4.1 Analytical performances

The instrument response linearity using the ratio of the peptides to acetylated SP internal standard was tested from 0.1 to 10 μM . The selection of peptides and expected pseudo-molecular ions and MRM transitions used for quantification were based on the data obtained following the incubation of SP in microsomes. The summary of the linearity, precision and accuracy is described in Table 2 and showed that measured concentrations correlate ($R^2 \geq 0.9906$) very well with the nominal concentrations of targeted peptides. Accordingly, the analytical method provides adequate figures of merits for targeted peptide analysis performed during this study.

IV.4.2 SP metabolic stability assessment in liver microsomes

SP metabolic stability was evaluated in rat, mouse and human liver microsomes and SP was quantified by LC-MS/MS in MRM mode. The data presented in Fig. 1 were fitted with a mono-exponential decay model as described in equation (1) (weighted 1/y). The

coefficient of correlation (r) was >0.97 for each fitted data series of samples, suggesting that SP concentrations were significantly lower than K_m ($[SP] < K_m$) and thus first-order kinetics was observed. *In vitro*, $T_{1/2}$ results in pooled liver microsomes were 9.2, 5.6 and 18.6 min for rat, mouse and human liver microsomes, respectively. The extent of degradation in liver microsomes was significant for all three species tested, but significant differences were noted between rodents and human.

IV.4.3 Characterization of SP metabolites by HPLC-MS/MS

Chromatograms of Fig. 2(A–C) were used to profile components with relative retention time, while pseudo-molecular ions ($[M+nH]^{n+}$) were selected based on N and C ladder *in silico* peptide mass lists. Furthermore, structural information was collected by HPLC-MS/MS for each peptide with sufficient ion abundance. Full-scan MS spectra (m/z 200-1500) were collected following a 30 min incubation of SP in rat, mouse and human liver microsomes. The ion pattern features the presence of SP at m/z 675, SP₃₋₁₁ at m/z 548, SP₅₋₁₁ at m/z 869, SP₆₋₁₁ at m/z 741, SP₈₋₁₁ at m/z 466 and SP₁₋₇ at m/z 451, as illustrated in Fig. 2. Other metabolites, like SP₁₋₄ and SP₁₋₅, were detected but with significantly weaker ion abundance. Product ion spectra (MS/MS) of SP and metabolites were recorded and typical b and y positive ion fragments were observed as well as some internal fragments, as illustrated in Fig. 3. Note that the product ions were labeled according the Roepstorff nomenclature for classifying N- and C-terminal peptide fragment ions (Roepstorff and Fohlman, 1984). The results shown in Fig. 3 are derived from rat liver microsomes, but identical spectra were observed in mouse and human. Furthermore, spectra were compared with reference materials and identical peak retention times, precursor ions and fragment ion patterns and respective abundances were assessed. The observed collision-induced dissociation spectra were all compatible with the proposed peptide sequences for SP metabolites.

IV.4.4 Interspecies SP comparative metabolic profiles

Species comparison of endogenous hormones metabolism can help in deciphering interspecies pathophysiological differences. First, we compared SP metabolic stability and showed that SP half-lives in liver microsomes were significantly different in rat, mouse and human species. Metabolic profiles are also essential information since some metabolites may retain pharmacological activity and/or interact with different receptors. The patterns of detected SP metabolites from rat, mouse and human liver microsomes were identical, but focusing on the comparison of their relative concentrations may unveil important differences since potential pharmacologic effects would be proportional to concentration. Hence, to better compare the metabolic profiles between species, we normalized the concentration against the mean SP concentration while all incubations were performed at 37°C for 30 min. SP and N- and C-terminal substance P metabolites lead to a very complex synaptic signaling and strongly depend on the number and the characteristics of the metabolites as well as their relative abundance. The results displayed in Fig. 4 suggest significant differences between rodent species and human, with noticeable lower concentrations of SP metabolites in human. Moreover, the concentrations of SP₅₋₁₁ and SP₆₋₁₁ largely predominate in rat liver microsomes and show significant differences compared with mouse liver microsomes. Consequently, the metabolic profiles of each species are distinctive and may have significant impact on biomolecular mechanisms involved in specific pathophysiological changes.

IV.5 Discussion

SP metabolic stability in liver microsomes obtained from three species, namely, rat, mouse and human was performed. The data suggests that SP degrades rapidly when exposed to microsomal enzymes and differences were noted between species. SP concentrations were higher in human compared with rat and mice at all time points evaluated. This is an important

observation since it suggests that systemic SP concentrations might be significantly different between species and consequently influence the proinflammatory effects of SP. Moreover, at the moment of an injury, chemicals are released from damaged cells, triggering the process of inflammation. Blood vessels become locally dilated and blood flow increases at the site of tissue damage. If SP is thus rapidly metabolized, the local concentrations will reduce considerably following its release and will hinder the ability to activate the NK1 receptor, an important element of neurogenic inflammation. Disparity of SP concentrations between species may indicate the distinctive role of SP in the process of inflammation and physiological changes following tissue damage could then be different. Therefore, it may impact the development of the pathological state. This is an important consideration since animal models are extensively used to study pain and develop new therapeutic strategies. As a consequence, extrapolation of pre-clinical results obtained with animal models to human might represent an added challenge. Additionally, neurogenic inflammation plays an essential role in the pathogenesis of several diseases, including psoriasis (Saraceno *et al.*, 2006), asthma, fibromyalgia (Sann and Pierau, 1998), eczema, rosacea, dystonia (Maihofner *et al.*, 2010), multiple chemical sensitivity and migraine (Geppetti *et al.*, 2012). Species difference in SP metabolic stability may also impact the development of these diseases and should be considered when choosing an animal model to study the efficacy of new medicines.

The difference in SP depletion is one aspect, but differences in metabolites ratios were observed between each species. Metabolites may retain pharmacological activity and also be more active than SP or even act on other receptors. This is why it is important to consider the contribution of active metabolites when evaluating pathophysiological states, particularly if these molecules are used as biomarkers within a defined multiparametric profile used for diagnostic and prognostic purposes. Recent literature has revealed significant biological activity of N- and C-terminal SP fragments (Hall *et al.*, 1987). Exploratory studies showed

SP₅₋₁₁ produces similar effects to SP suggesting that SP₅₋₁₁ interacts with NK1 receptor (Geraghty and Burcher, 1993). Additional studies also demonstrated that C-terminal SP fragments SP₃₋₁₁, SP₆₋₁₁ and SP₈₋₁₁ have an affinity with NK1 receptor (Michael-Titus *et al.*, 1999). C-terminal SP fragments play an important role in the total SP pronociceptive effect, favoring the release of the excitatory amino acids (Skilling *et al.*, 1990). As suggested by other studies, SP fragments do not only interact with the NK1 receptor, illustrating that N-terminal SP metabolites SP₁₋₇ produce naloxone-reversible antinociception (Krummins *et al.*, 1989), a phenomenon mediated by opioid-receptors (Freed *et al.*, 2001). But, it has been suggested that N-terminal fragments could also stimulate an isoform of the NK1 receptor (Velazquez *et al.*, 2002) though, low affinity of N-terminal fragments for NK1 sites were generally reported in traditional binding assays (Vigna, 2001). Systemic SP metabolites may exert their pharmacological activity in the peripheral nervous system, but also in the central nervous system (CNS). Arterial blood supplies the CNS and transports nutrients and molecules, including SP and its meta-bolites. Additionally, further SP metabolism was observed at the blood-brain barrier, contributing significantly to the exposition of the CNS to N- and C-terminal SP fragments (Freed *et al.*, 2002). Consequently, the simultaneous presence in the extracellular fluid of SP and N- and C-terminal substance P metabolites may lead to a very complex synaptic signal. Its nature will depend on the panel and characteristics of the metabolites but also on their relative abundances, which appear to be species-dependent according to our *in vitro* results.

Five major SP metabolites were identified and quantified including C-terminal SP fragments SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, SP₆₋₁₁, SP₈₋₁₁ as well as N-terminal fragment SP₁₋₇. While qualitatively similar, the relative metabolite abundances were significantly different when comparing rat, mouse and human microsome metabolic profiles. The combined discrepancies of both SP stability and relative abundances of fragment metabolites between rodents and

human may induce differences in the molecular event implicated in the complex synaptic signaling. This will inherently affect pain transmission mechanisms, including pronociceptive and antinociceptive actions. As suggested in a recent review (Mogil, 2009), pain researchers are frustrated with the lack of translational advancement in the field of pain. While considerable advancements were obtained in basic pain science using animal models, they have not yet translated into effective medicines. Differences in the metabolic fate of neurotransmitters and neuromodulators might be an important contributor to the lack of conversion of promising pre-clinical results to successful clinical outcomes. This is particularly true for SP since it is an important element in pain perception.

IV.6 Conclusion

High-performance liquid chromatography mass spectrometry was successfully used to identify, characterize and quantify SP and N- and C-terminal SP metabolites. The metabolic stability of SP is relatively short-lived in liver microsomes for all tested species. The observed short half-lives for SP were correlated with rapidly appearing metabolites in the mixture, which suggest in consequence that metabolites will be present in the systemic circulation. Five major SP metabolites were identified by LC-MS/MS, including C-terminal SP fragments SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, SP₆₋₁₁, SP₈₋₁₁ as well as N-terminal fragment SP₁₋₇. These metabolites were quantified and their relative abundances were significantly different after incubation in rat, mouse or human microsomes. These discrepancies may lead to distinctive molecular mechanism for the complex synaptic signal across species and consequently increase the challenges when performing pain studies using nonhuman animal models in drug discovery.

IV.7 Acknowledgments

This project was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry discovery grant no. 386637–2010). F. Pailleux received a scholarship from the Coopération et Mobilité Internationales Rhône-Alpes.

IV.8 References

Baluk P, Bertrand C, Geppetti P, McDonald DM and Nadel JA. NK1 receptors mediate leukocyte adhesion in neurogenic inflammation in the rat trachea. *American Journal of Physiology* 1995; 268(2 Pt 1):L263–269.

Basbaum AI. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 1999; 24(1): 59–67.

Beaudry F, Ferland CE and Vachon P. Identification, characterization and quantification of specific neuropeptides in rat spinal cord by liquid chromatography electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 2009; 23(9): 940–950.

Chanda S, Bashir M, Babbar S, Koganti A and Bley K. In vitro hepatic and skin metabolism of capsaicin. *Drug Metabolism and Disposition* 2008; 36: 670–675.

Chang MM, Leeman SE and Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nature: New Biology* 1971; 232(29): 86–87.

Chappa AK, Cooper JD, Audus KL and Lunte SM. Investigation of the metabolism of substance P at the blood-brain barrier using LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007; 43(4):1409–1415.

Che FY and Fricker LD. Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 2002; 74(13): 3190–3198.

Colpaert FC, Donnerer J and Lembeck F. Effects of capsaicin on inflammation and on the substance P content of nervous tissues in rats with adjuvant arthritis. *Life Sciences* 1983; 32(16): 1827–1834.

Craig AD. Lamina I, but not lamina V, spinothalamic neurons exhibit responses that correspond with burning pain. *Journal of Neurophysiology* 2004; 92(4): 2604–2609.

Dimitriadou V, Rouleau A, Dam Trung Tuong M, Newlands GJ, Miller HR, Luffau G, Schwartz JC and Garbarg M. Functional relationship between mast cells and C-sensitive nerve fibres evidenced by histamine H3-receptor modulation in rat lung and spleen. *Clinical Sciences (London)* 1994; 87(2): 151–163.

Donnerer J, Schuligoi R, Stein C and Amann R. Upregulation, release and axonal transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in adjuvant inflammation and regulatory function of nerve growth factor. *Regulatory Peptides* 1993; 46(1–2): 150–154.

Freed AL, Audus KL and Lunte SM. Investigation of the metabolism of substance P at the blood-brain barrier using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 2001; 22(17): 3778–3784.

Freed AL, Audus KL and Lunte SM. Investigation of substance P transport across the blood-brain barrier. *Peptides* 2002; 23: 157–165.

Geppetti P, Rossi E, Chiarugi A and Benemei S. Antidromic vasodilatation and the migraine mechanism. *The Journal of Headache and Pain* 2012; 13: 103–111.

Geraghty DP and Burcher E. Two classes of binding sites for [3H]substance P in rat cerebral cortex. *Brain Research* 1993; 601: 34–40.

Hall ME, Miley FB and Stewart JM. Modulation of blood pressure by substance P: opposite effects of N- and C-terminal fragments on anesthetized rats. *Life Sciences* 1987; 40: 1909–1914.

Harrison S and Geppetti P. Substance P. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2001; 33(6): 555–576.

Herbert MK and Holzer P. Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology. *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* 2002; 37(6): 314–325.

Hökfelt T, Pernow B and Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *Journal of Internal Medicine* 2001; 249(1): 27–40.

Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988; 24(3): 739–768.

Julius D and Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413(6852): 203–210.

Kim C, Roberts AM and Joshua IG. Differences in the capsaicin-induced dilation of arterioles and venules in rat striated muscle. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1995; 273(2): 605–610.

Krummins SA, Seybold VS and Larson AA. Effects of substance P (SP) and SP fragments on opioid receptor binding in mouse and spinal cord: interaction of the N-terminal portion of SP with μ sites. *Advances in the Biosciences* 1989; 75: 383.

Levine JD, Fields HL and Basbaum AI. Peptides and the primary afferent nociceptor. *Journal of Neurosciences* 1993; 13(6): 2273–2286.

Lu CL, Pasricha PJ, Hsieh JC, Lu RH, Lai CR, Wu LL, Chang FY and Lee SD. Changes of the neuropeptides content and gene expression in spinal cord and dorsal root ganglion after noxious colorectal distension. *Regulatory Peptides* 2005; 131(1–3): 66–73.

Maggi CA. Principles of tachykininergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. *Regulatory Peptides* 2000; 93(1–3): 53–64.

Maihöfner C, Seifert F and Markovic K. Complex regional pain syndromes: new pathophysiological concepts and therapies. *European Journal of Neurology* 2010; 17: 649–660.

Mantyh PW and Yaksh TL. Sensory neurons are PARTial to pain. *Nature Medicine* 2001; 7(7): 772–773.

Martling CR, Saria A, Fischer JA, Hökfelt T and Lundberg JM. Calcitonin gene-related peptide and the lung: neuronal coexistence with substance P, release by capsaicin and vasodilatory effect. *Regulatory Peptides* 1988; 20(2): 125–139.

Masimirembwa CM, Thompson R and Andersson TB. In vitro high throughput screening of compounds for favorable metabolic properties in drug discovery. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* 2001; 4(3): 245–263.

Michael-Titus AT, Blackburn D, Connolly Y, Priestley JV and Whelpton R. N- and C-terminal substance P fragments: differential effects on striatal [3H]substance P binding and NK1 receptor internalization. *Neuroreport* 1999; 10(10): 2209–2213.

Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience* 2009; 10: 283–294.

Nadel JA and Borson DB. Modulation of neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. *The American Review of Respiratory Disease* 1991; 143(3 Pt 2): S33–36.

Nichols ML, Allen BJ, Rogers SD, Ghilardi JR, Honore P, Luger NM, Finke MP, Li J, Lappi DA, Simone DA and Mantyh PW. Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 1999; 286(5444): 1558–1561.

Obach RS. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* 1999; 27: 1350–1359.

Otsuka M and Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiological Review* 1993; 73(2): 229–308.

Pennefather JN, Lecci A, Cadenas ML, Patak E, Pinto FM and Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sciences* 2004; 74(12): 1445–1463.

Ricciardolo FL, Nadel JA, Graf PD, Bertrand C, Yoshihara S and Geppetti P. Role of kinins in anaphylactic-induced bronchoconstriction mediated by tachykinins in guinea-pigs. *British Journal of Pharmacology* 1994a; 113(2): 508–512.

Ricciardolo FL, Nadel JA, Yoshihara S and Geppetti P. Evidence for reduction of bradykinin-induced bronchoconstriction in guinea-pigs by release of nitric oxide. *British Journal of Pharmacology* 1994b; 113(4): 1147–1152.

Roepstorff P and Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry* 1984; 11(11): 601.

Saraceno R, Kleyn CE, Terenghi G and Griffiths CEM. The role of neuropeptides in psoriasis. *British Journal of Dermatology* 2006; 154: 876–882.

Sakurada C, Watanabe C, Sakurada S, Tan-No K and Sakurada T. Major metabolites of substance P degraded by spinal synaptic membranes antagonize the behavioral response to substance P in rats. *Journal of Pharmaceutical Science* 1999; 88(11): 1127–1132.

Sandkühler J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiological Review* 2009; 89(2): 707–758.

Sann H and Pierau FK. Efferent functions of C-fiber nociceptors. *Zeitschrift für Rheumatologie* 1998; 57(Suppl. 2): 8–13.

Segel I. Enzyme Kinetics. Behavior Analysis of Rapid Equilibrium and Steadystate Systems, Segel I (ed.). JohnWiley & Sons: Chichester, 1975; 54–55.

Seybold VS. The role of peptides in central sensitization. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2009; 194: 451–491.

Skilling SR, Smullin DH and Larson AA. Differential effects of C- and N-terminal substance P metabolites on the release of aminoacid neurotransmitters from the spinal cord: potential role in nociception. *Journal of Neuroscience* 1990; 10(4): 1309–1318.

Steen H. and Mann M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2004; 5(9): 699–711.

Szallasi A and Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacology Review* 1999; 51(2): 159–212.

Todd AJ, Puskar Z, Spike RC, Hughes C, Watt C and Forrest L. Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance p-containing afferents and respond to noxious stimulation. *Journal of Neuroscience* 2002; 22(10): 4103–4113.

Velazquez RA, McCarson KE, Cai Y, Kovacs KJ, Shi Q, Evensjo M and Larson AA. Upregulation of neurokinin-1 receptor expression in rat spinal cord by an N-terminal metabolite of substance P. *European Journal of Neuroscience* 2002; 16: 229–241.

Vergnolle N, Wallace JL, Bunnett NW and Hollenberg MD. Proteaseactivated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends in Pharmacological Sciences* 2001; 22(3): 146–152.

Vigna SR. The N-terminal domain of substance P is required for complete homologous desensitization but not phosphorylation of the rat neurokinin-1 receptor. *Neuropeptides* 2001; 35(1): 24–31.

Zimmer A, Zimmer AM, Baffi J, Usdin T, Reynolds K, König M, Palkovits M and Mezey E. Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95(5): 2630–2635.

IV.8 Table legends

Peptide	Precursor Ion	Precursor ion charge state (z)	Product ion	Fragment ion	Collision energy (%)
SP	675	2+	254 601	b ₂ ²⁺ b ₁₀ ²⁺	32
SP ₃₋₁₁	548	2+	946 950	b ₈ z ₈	30
SP ₅₋₁₁	869	1+	704 591	b ₆ [*] b ₅ [*]	33
SP ₆₋₁₁	741	1+	576 463	b ₅ [*] b ₄ [*]	33
SP ₈₋₁₁	466	1+	421 318	a ₄ b ₃	33
SP ₁₋₇	451	2+	647 254	y ₅ b ₂	32
Acetylated SP (IS)	716	2+	642	b ₁₀ ²⁺	30

b_n^{*} is equivalent to b_n^{-NH₃}

Table 1 : The ion transitions for quantitation in multiple reaction monitoring mode

Peptides	Sequence	Analytical Range (μM)	R ²	% NOM	% CV
SP	RPKPQQFFGLM (NH ₂)	0.1 - 10	≥ 0.9914	91.0 – 107.6	4.2 – 7.9
SP ₃₋₁₁	KPQQFFGLM (NH ₂)	0.1 - 10	≥ 0.9991	97.6 – 102.1	0.4 – 10.1
SP ₅₋₁₁	QQFFGLM (NH ₂)	0.1 - 10	≥ 0.9969	90.5 – 108.6	0.2 – 8.8
SP ₆₋₁₁	QFFGLM (NH ₂)	0.1 - 10	≥ 0.9964	90.6 – 108.6	0.7 – 7.7
SP ₈₋₁₁	FGLM (NH ₂)	0.1 - 10	≥ 0.9983	95.5 – 104.1	0.4 – 9.3
SP ₁₋₇	RPKPQQF	0.1 - 10	≥ 0.9906	90.6 – 108.5	2.2 – 16.0

Table 2 : Summary of linear range, linearity, accuracy and precision for substance P and metabolites in microsomal media

IV.9 Figure legends

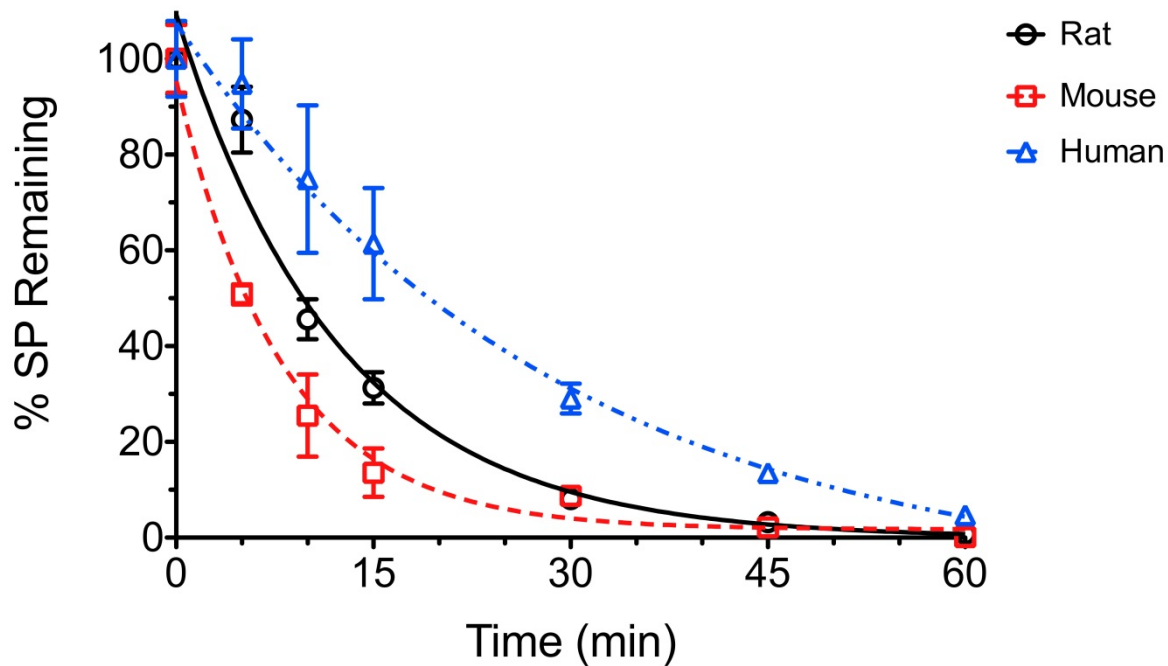


Figure 1 : Depletion profiles of SP in pooled rat, mouse and human liver microsomes. Data presented in a linear scale and each point represents the mean (\pm SD) of three replicate determinations. SP concentrations were determined in multiple reaction monitoring (MRM) mode.

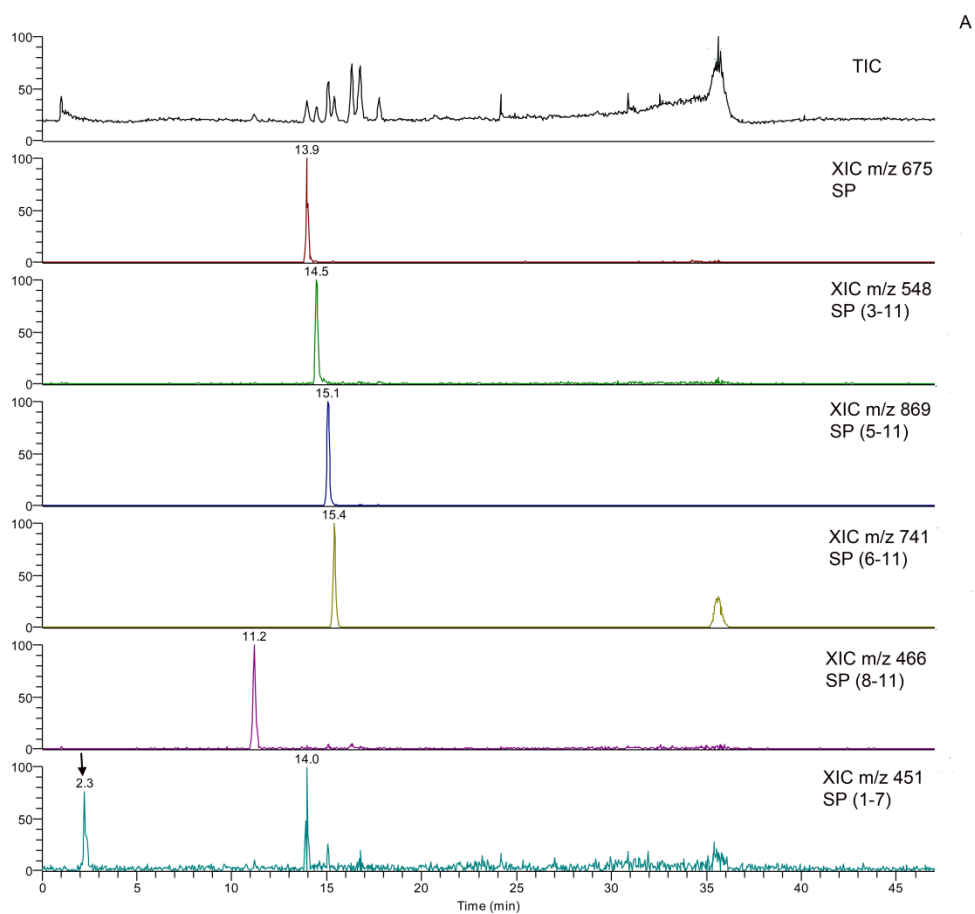
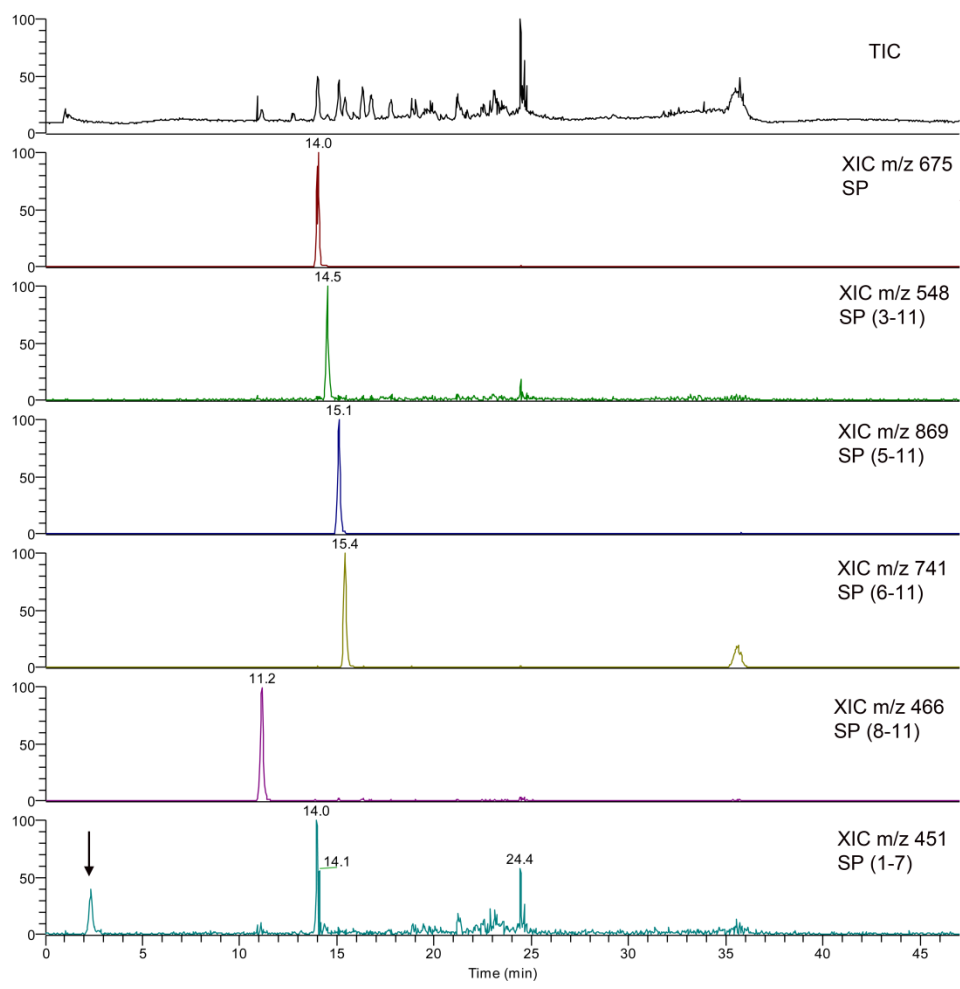
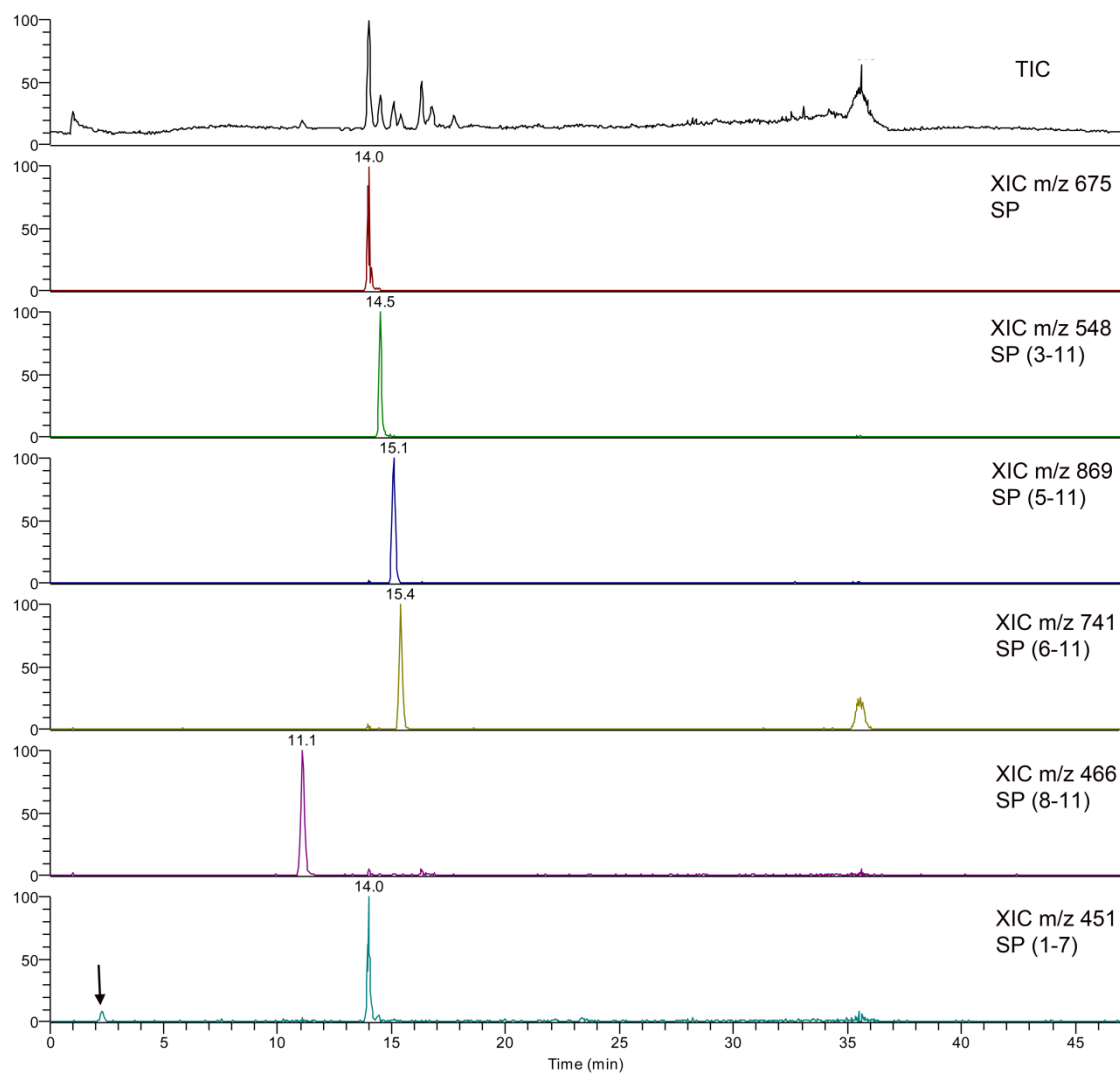


Figure 2 : Chromatograms of SP and detected metabolites in liver microsomes. (A) TIC and XIC of SP and metabolites after 30 minutes incubation at 37°C in rat liver microsomes. (B) TIC and XIC of SP and metabolites after 30 minutes incubation at 37°C in mouse liver microsomes. (C) TIC and XIC of SP and metabolites after 30 minutes incubation at 37°C in human liver microsomes.

B





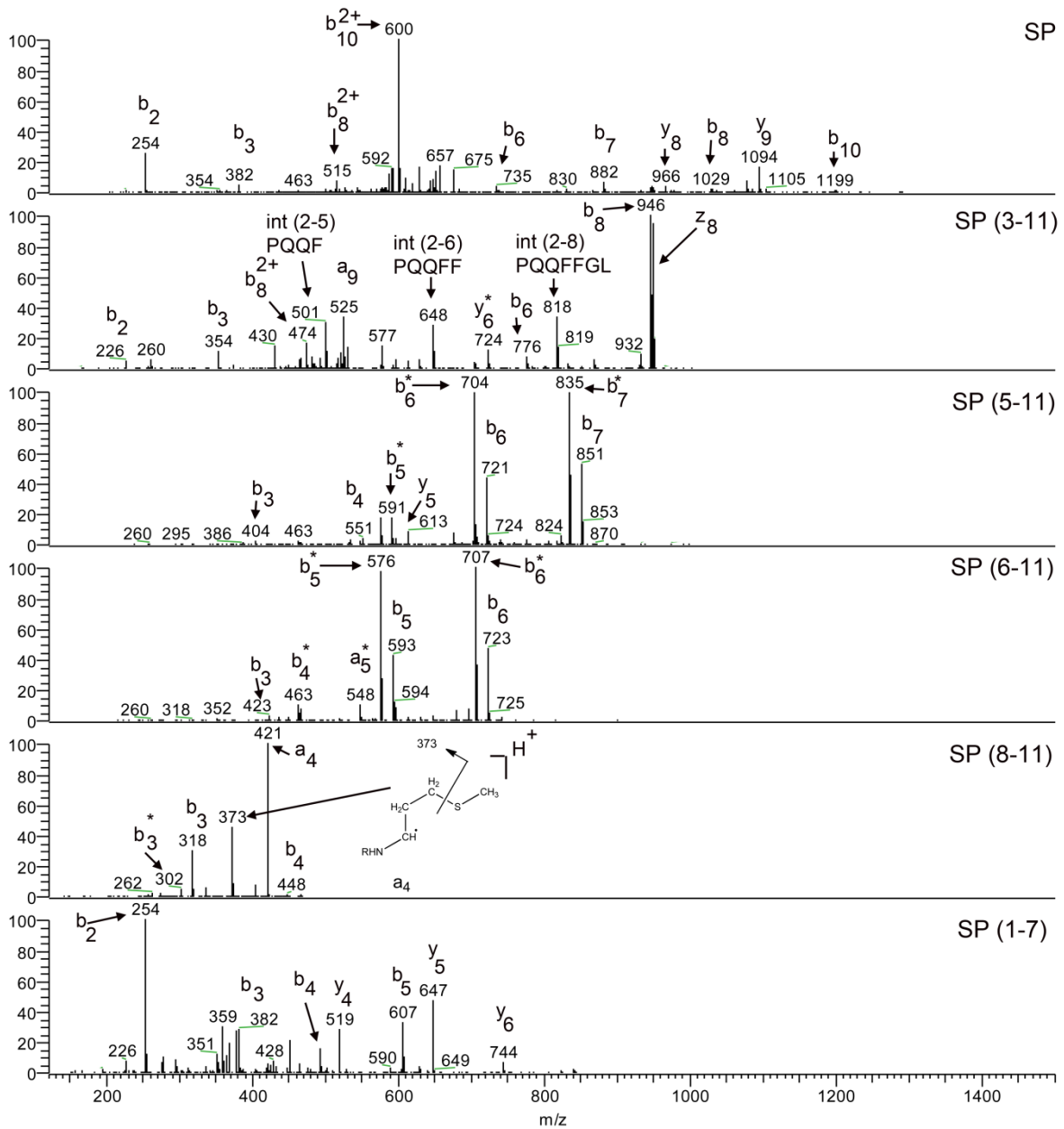


Figure 3 : MS/MS spectra for SP and metabolites detected after 30 minutes incubation at 37°C in liver microsomes.

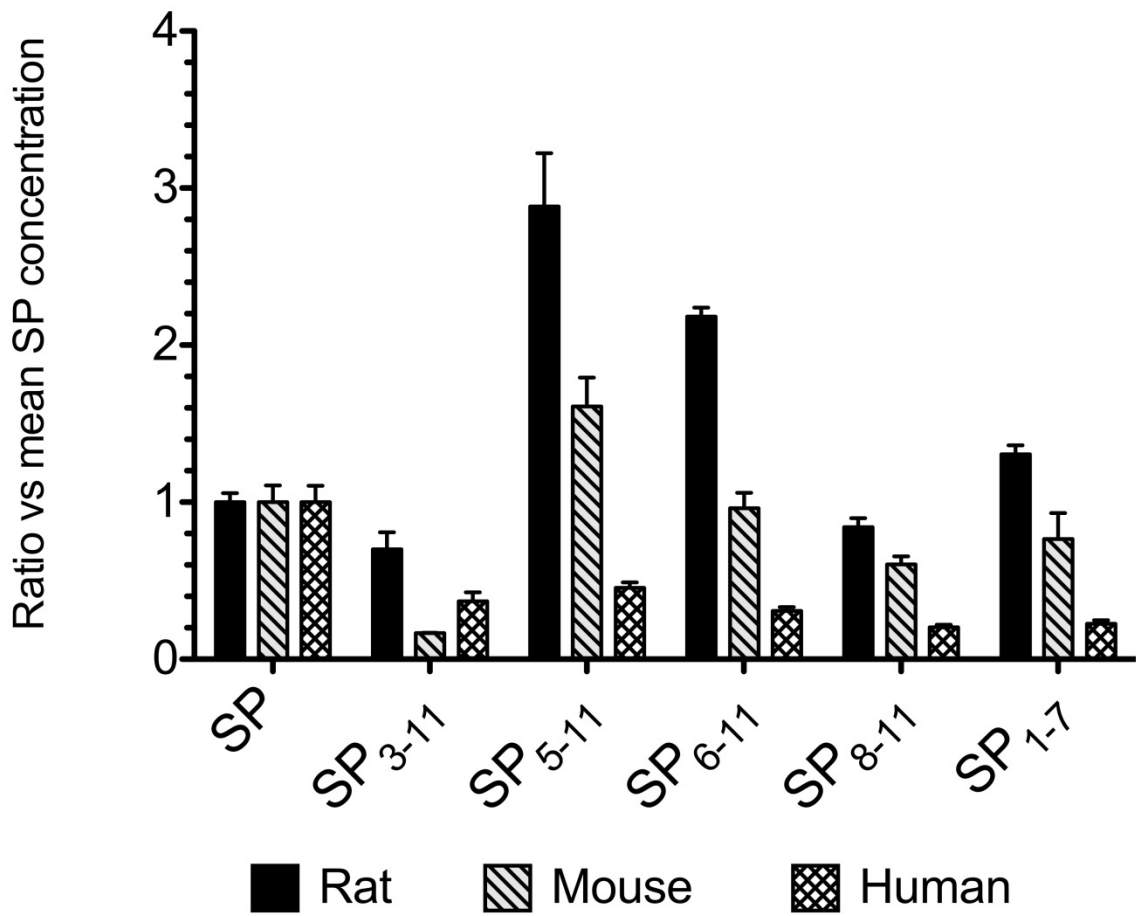


Figure 4 : Interspecies comparison of liver microsomes contribution to the metabolism of SP. Relative concentration of metabolites vs mean SP after 30 minutes incubation at 37°C in rat, mouse and human liver microsomes.

V. Article 5 : Development of an HPLC-MS/MRM method for the quantification of tachykinin related peptides in rat plasma

F. Pailleux^{1,2}, F. Beaudry², R. Carrière¹, A. Salvador¹, J. Lemoine¹

Biomedical Chromatography. 2013;submitted.

¹UMR 5280 CNRS, Institut des Sciences Analytiques, Université de Lyon, Lyon 1, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

²Groupe de Recherche en Pharmacologie Animal du Québec (GREPAQ), Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada

V.1 Abstract

Tachykinin related peptides have several physiological functions, especially substance P (SP) and neurokinin A (NKA). They are both neurotransmitters and involved in neurogenic inflammation. The release of SP and NKA is mediated by capsaicin-sensitive sensory neurons. The development of a sensitive and selective assay to quantify SP and NKA in plasma is therefore required in order to validate and use these peptides as biomarkers. Here is presented a HPLC-MS-based assay using multiple reaction monitoring mode (MRM) and internal standardization with deuterated peptides. The assay has a limit of detection of 31.3 pg/mL or 0.6 pg injected on column, both for SP and NKA. The precision (%CV) of the measurements varied between 3.4 to 7.6 % for both peptides while the accuracy (%NOM) was comprised between 81.7-99.0%. Endogenous peptide levels in rat plasma were finally estimated at 63.7 (\pm 14.9) and 58.8 (\pm 10.2) pg/mL for SP and NKA, in line with reported values in the literature.

V.2 Introduction

The tachykinin precursor 1 (TAC1) gene encodes the protachykinin-1 protein containing the sequence of four tachykinin peptides including substance P (SP) and neurokinin A (NKA) (Basbaum, 1999), as well as related peptides neuropeptide K and neuropeptide gamma (Otsuka and Yoshioka, 1993). SP and NKA are peptides containing 11 and 10 amino acids, respectively, and can be detected largely in the central and peripheral nervous systems (Chang *et al.*, 1971; Harrison and Geppetti, 2001). SP and NKA are important neuropeptides implicated in neurogenic inflammation. Neurogenic inflammation implied both increased vascular permeability and vasodilatation caused by the release of neuropeptides by capsaicin-sensitive sensory neurons (Herbert and Holzer, 2002). Neurogenic inflammation is a nervous system-induced physiological process of inflammation where SP, NKA and calcitonin gene-related peptide (CGRP) play an essential role (Pennefather *et al.*, 2004). Thus, released neuropeptides could potentially be analyzed in plasma and used as biomarkers. Several previous studies have already reported SP and NKA concentrations in plasma with different techniques such as radioimmunoassay (Li *et al.*, 2009), enzyme immunoassay (Fehder *et al.*, 1998), liquid chromatography (Rissler, 1995), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Otsuka *et al.*, 2011). However, these studies reported very different SP and NKA plasmatic concentrations. The published data indicate concentrations ranging from 10 to 400 pg/mL (Bondy *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2006) and from 10 to 100 pg/mL (Shang *et al.*, 2003; Gallai *et al.*, 1995) for SP and NKA, respectively.

Targeted peptide quantitation is a quickly emerging field in mass spectrometry due to its specificity, sensitivity and speed. Generally, quantitative peptide methods rely on the development and validation of Multiple Reaction Monitoring (MRM) assays that can comply with a high level of sensitivity, specificity, accuracy and reproducibility in complex biological samples (Addona *et al.*, 2009). As previously noted, the analysis of SP and NKA is usually

performed using ELISA assays. However, these methods are prone to cross reactivity, particularly with related peptides. Many tachykinin related peptides share the same C- or N-terminal amino acid sequences, thus worsening the problems associated with the cross reactivity with the antibody used in ELISA assays. Commercially available ELISA kits for the analysis of SP and NKA lack adequate demonstration of selectivity, particularly with propeptides and metabolites. Consequently, the development of a new HPLC-MS/MRM assay with adequate figure of merits should enable the quantitation SP and NKA in plasma with a higher degree of specificity, selectivity and sensitivity, as recently illustrated for weakly concentrated protein biomarkers (Simon *et al.*, 2010). There are several animal models used during the drug discovery process. More specifically, the use of validated animal models of pain is very common and the availability of biomarker assays is increasingly important, always at earlier stage of the discovery phase to improve success rate. The selective, precise and accurate determination of SP and NKA in rat plasma has the potential to leverage the development of new therapeutic strategies.

V.3 Experimental

V.3.1 Chemicals and reagents

Substance P, neurokinin A and formic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). Deuterium labeled analogue peptides were synthesized and used as internal standards (CanPeptide, Inc., Pointe-Claire, QC, Canada). Acetonitrile and water (all HPLC-MS grade) were obtained from Fisher Scientific (Strasbourg, France).

V.3.2 Sample preparation

Deuterium labeled peptides, tagged on glycine (G-d₂) and leucine (L-d₃) residues, were mixed together and diluted in water/acetonitrile/formic acid (90/10/0.1, v/v/v) at a final

concentration of 20.0 ng/mL (internal standard solution). The calibration curve was established by spiking the blank matrix (water/acetonitrile/formic acid; 90/10/0.1, v/v/v) with known concentration of the analyte to provide final concentrations of 31.3, 62.5, 125.0, 250.0, 500.0, 750.0 and 1000 pg/mL (data not shown). The limit of detection (LOD) of this analytical method was determined with these standard solutions. SP and NKA were quantified applying a standard addition technique, in order to compensate for adverse matrix effects and to determine plasmatic endogenous levels of SP and NKA. In a 1.5 mL Eppendorf tube, 50 μ L of rat plasma were spiked with 45 μ L of SP and NKA standard solutions to obtain fortified concentrations ranging from 66.0 to 526.0 pg/mL. Five μ L of internal standard solution (final concentration of 500.0 pg/mL), and 100 μ L of acetonitrile were sequentially added and samples were then vortexed vigorously and allowed to rest for 10 minutes at room temperature prior to centrifugation. The samples were centrifuged at approximately 12,000 g for 20 minutes at 20°C. Then, 450 μ L of supernatant were transferred in a clean tube and evaporated to dryness at 37°C. The dry residue was dissolved in 200 μ L water/acetonitrile (90/10, v/v) containing 0.1% formic acid and transferred into an injection vial for analysis.

V.3.3 Bioanalytical method

The HPLC-MS/MRM analysis was performed using a HP 1290 series HPLC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a AB SCIEX API 5500 QTRAP[®] hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (AB SCIEX, Foster City, CA, USA). Instrument control, data acquisition and processing were performed using Analyst 1.6 software. The chromatography was achieved using a gradient mobile phase along with a Waters XBridge BEH Technologies C₁₈ 100 x 1 mm column, with a particle size of 3.5 μ m. The initial mobile phase condition consisted of acetonitrile and water (both fortified with 0.1% of formic acid) at a volume ratio of 5:95. From 0 to 1 min, the ratio was maintained at

5:95. From 1 to 12 min, a linear gradient was applied up to a ratio of 60:40 and maintained for 3 min. The mobile phase composition ratio was reverted to the initial conditions and the column was allowed to re-equilibrate for 15 min. The flow rate was fixed at 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 20 μL of sample were injected. The AB SCIEX API 5500 QTRAP[®] instrument was interfaced with a Turbo VTM source and the ion spray voltage was set to 5500V operating at 450°C. The nebulizer and the curtain gas flows were both set to 40 psi. Details on MS parameters and MRM transitions are reported in Table 1. The MRM transitions were acquired at unit resolution for Q1 and Q3. The dwell times were fixed to 140 ms for SP and d₅-SP, and 120 ms for NKA and d₅-NKA. Regression analyses were performed with PRISM (version 5.0d) GraphPad software (La Jolla, CA, USA) using nonlinear curve-fitting module with an estimation of the goodness of fit. The calibration lines were constructed from the light and heavy peptide isotopes peak-area ratios of targeted neuropeptides.

V.4 Results and discussion

Full-scan and MS/MS spectra are necessary to determine adequate MRM transitions to be used for the quantification of both peptides. Full-scan and product ion mass spectra for substance P (SP) and neurokinin A (NKA) peptides and internal standards were obtained in positive ion mode. The full-scan electrospray mass spectrum of each peptide showed the formation of characteristic pseudo molecular ions $[\text{M}+\text{nH}]^{\text{n}+}$ with triply charged species being the most abundant species. Product ion mass spectra of triply charged species were used to select suitable MRM transitions as listed in Table 1. MRM transitions were selected using the most abundant ions. Spectra were annotated based on the Roepstorff and Fohlman nomenclature (Roepstorff and Fohlman, 1984). Figures 1A and 1B present the product ion spectra obtained for SP and NKA, respectively. The observed collision-induced dissociation spectra were compatible with the peptide sequences and are dominated by y, z and b -type

fragment ions. Since the ability to perform analysis of endogenous peptides in plasma is generally hampered by intrinsic instrument sensitivity, those were thoroughly optimized (Table 1). Then, linearity and limit of detection (LOD) were first determined from serial dilutions of the peptide targets in a mixture of water/acetonitrile/formic acid (90/10/0.1, v/v/v). The resulting calibration curves for SP and NKA drawn from a 20 μ L injection of each peptide solution are depicted in Figures 1E and F. Response linearity is observed over the studied concentration range and the LOD was estimated to 31.3 pg/mL (equivalent to 0.6 pg injected on column) with signal to noise ratio of 3.8 and 3.4 for SP and NKA, respectively.

As illustrated in a prior publication (Pailleux and Beaudry, 2012), normalization with stable isotope labeled internal standards usually provides the most efficient approach for absolute and relative peptide quantification. Spiking rat plasma with various amounts of SP and NKA over relevant putative concentration ranges between 66.0, 132.0, 263.0 and 526.0 pg/mL similarly assessed the method performances regarding linearity, accuracy and precision. Assay standardization was carried out using the peak area ratio between the light SP and NKA peptides and their heavy isotope-labeled counterparts. In order to simplify the precision and accuracy calculation, the peptide endogenous levels were set arbitrary to zero since all fortified samples from a specific analytical run were prepared from the same pool of rat plasma. The precision and accuracy were evaluated with using four replicates of the fortified samples (75.0 and 300.0 pg/mL) analyzed on three independent analytical runs along with calibration standards prepared in plasma (66.0 to 526.0 pg/mL). The precision (%CV) observed was 7.0% and 3.4% for SP at 75.0 and 300.0 pg/mL, respectively; 7.6% and 4.4% for NKA at 75.0 and 300.0 pg/mL, respectively. Additionally, the accuracy observed was 81.7% and 99.0% for SP at 75.0 and 300.0 pg/mL, respectively; 82.2% and 97.7% for NKA at 75.0 and 300.0 pg/mL, respectively. The recovery was determined using samples fortified before and after the extraction. Three replicates were prepared on two different days at 500.0

pg/mL for both peptides. The recovery observed was 95.8% (\pm 6.0%) and 94.9% (\pm 3.7%) for SP and NKA, respectively. The correlation between theoretical and calculated concentrations was performed using a linear regression model. The observed correlations (R^2) were 0.9985 and 0.9992 for SP and NKA, respectively with slopes near 1 that suggests minimal analytical bias.

The determination of the rat endogenous plasmatic SP and NKA concentrations was performed from the three independent analytical runs and appropriate regression analysis as illustrated in Figures 1E and 1F. The results revealed mean endogenous concentrations in rat plasma of 63.7 (\pm 14.9) and 58.8 (\pm 10.2) pg/mL for SP and NKA, in line with previously reported values (Campbell *et al.*, 2006; Shang *et al.*, 2003). Together, the metric performances and relevancy of the calculated endogenous concentrations highlight the reliability of this HPLC-MS/MRM based assay for further exploratory evaluation of SP and NKA interest as potential inflammatory biomarkers.

V.5 Acknowledgements

This work was funded by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (F. Beaudry NSERC Discovery grant No. 386637-2010). F. Pailleux received a scholarship from the Région Rhône-Alpes in France (CMIRA Explora'doc 2011).

V.6 References

Addona TA, Abbatiello SE, Schilling B, Skates SJ, Mani DR, Bunk DM, Spiegelman CH, Zimmerman LJ, Ham AJL, Keshishian H, Hall SC, Allen S, Blackman RK, Borchers CH, Buck C, Cardasis HL, Cusack MP, Dodder NG, Gibson BW, Held JM, Hiltke T, Jackson A, Johansen EB, Kinsinger CR, Li J, Mesri M, Neubert TA, Niles RK, Pulsipher TC, Ransohoff D, Rodriguez H, Rudnick PA, Smith D, Tabb DL, Tegeler TL, Variyath AM, Vega-Montoto LJ, Wahlander A, Waldemarson S, Wang M, Whiteaker JR, Zhao L, Anderson NL, Fisher SJ, Liebler DC, Paulovich AG, Regnier FE, Tempst P, Carrl SA. Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nature Biotechnology* 2009;27(7):633-641.

Basbaum AI. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 1999;24(1):59-67.

Bondy B, Baghaia TC, Minova C, Schülea C, Schwarza MJ, Zwanzgera P, Rupprechta R, Möllera JH. Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results. *Biological Psychiatry* 2003;53(6):538-542.

Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nature: New Biology* 1971;232(29):86-87.

Campbell DE, Raftery N, Tustin R, Tustin NB, DeSilvio ML, Cnaan A, Aye PP, Lackner AA, Douglas SD. Measurement of plasma-derived substance P: biological, methodological and statistical considerations. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006;13(11):1197-1203.

Fehder WP, Ho WZ, Campbell DE, Tourtellotte WW, Michaels L, Cutilli JR, Uvaydova M, Douglas SD. Development and evaluation of a chromatographic procedure for partial purification of substance P with quantitation by an enzyme immunoassay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1998;5:303-307.

Gallai V, Sarchielli P, Floridi A, Franceschini M, Codini M, Glioti G, Trequattrini A, Palumbo R. Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. *Cephalalgia* 1995;15(5):384-390.

Harrison S and Geppetti P. Substance P. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2001;33(6):555-576.

Herbert MK and Holzer P. Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS* 2002;37(6):314-325.

Li L, Gao X, Zhao J, Ji X, Wei H, Luo Y. Plasma and cerebrospinal fluid substance P in poststroke patients with depression. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2009;63:298-304.

Otsuka K, Niimi A, Matsumoto H, Ito I, Yamaguchi M, Matsuoka H, Jinnai M, Oguma T, Takeda T, Nakaji H, Chin K, Sasaki K, Aoyama N, Mishima M. Plasma substance P levels in patients with persistent cough. *Respiration* 2011;82(5):431-438.

Otsuka M and Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiological Review* 1993;73(2):229-308.

Pailleux F and Beaudry F. Internal standard strategies for relative and absolute quantification of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 2012;26(8):881-891.

Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sciences* 2004;74(12): 1445-1463.

Rissler K. Sample preparation, high-performance liquid chromatographic separation and determination of substance P-related peptides. *Journal of Chromatography B* 1995;665:233-270.

Roepstorff P and Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry* 1984;11(11):601.

Shang YX, Cai XX, HanXH, Zhao SQ, Kong SQ, Wei KL. Change of neurokinin A plasma level in asthmatic children. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2003;41(6):457-459.

Simon R, Jubeaux G, Chaumot A, Lemoine J, Geffard O, Salvador A. Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). *Journal of Chromatography A* 2010;1217(31):5109-5115.

V.7 Table legend

Peptide	Precursor ion	Precursor ion charge state (z)	Product ion	Fragment ion	Collision energy (eV)	Declustering potential (V)	Cell exit potential (V)
SP	450.1	3+	600.5	b ₁₀ ²⁺	13	101	30
			543.9	b ₉ ²⁺	17		26
d ₅ -SP	451.6	3+	603.2	b ₁₀ ²⁺	13	101	30
			545.1	b ₉ ²⁺	17		26
NKA	378.7	3+	493.4	b ₉ ²⁺	11	61	30
			479.4	a ₉ ²⁺	17		26
d ₅ -NKA	379.9	3+	495.6	b ₉ ²⁺	11	61	30
			481.6	a ₉ ²⁺	17		26

Table 1 : Summary of peptide quantification parameters used for analysis in MRM mode.

V.8 Figure legends

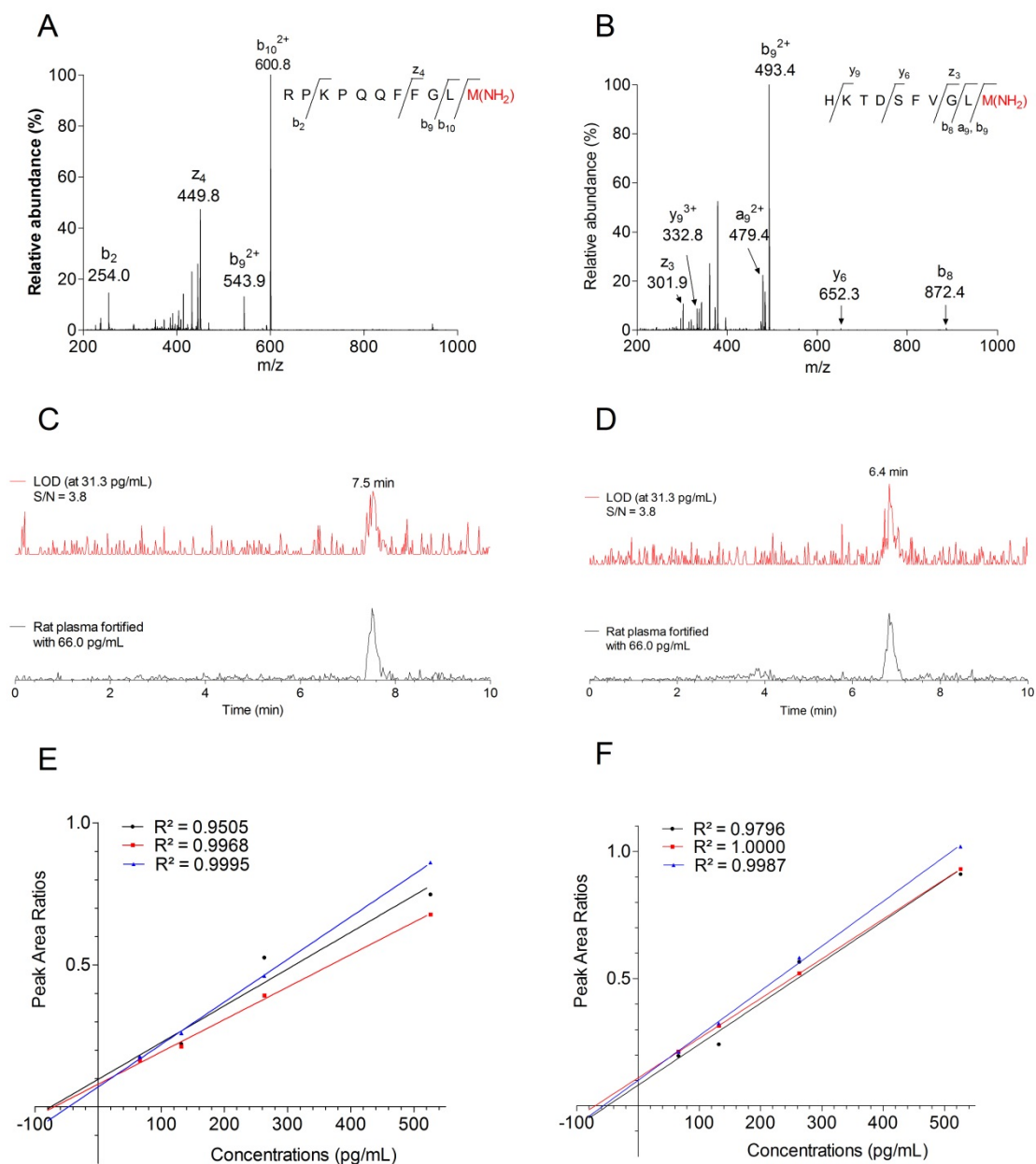


Figure 1 : Assessment parameters of the HPLC-MS/MS method for SP and NKA quantification in rat plasma. Product ion spectra (MS²) of triply charged species of SP (A) and NKA (B) shown characteristic b and y ions as well as other related fragments. HPLC-MS/MS chromatograms from rat plasma fortified with 66.0 pg/mL (red) and from a peptide solution of 31.3 pg/mL (black) are shown for SP (C) and NKA (D). Results of 3 distinct standard addition analyses for SP (E) and NKA (F) in rat plasma using concentrations comprised between 66.0 to 526.0 pg/mL are shown. The endogenous levels observed were 63.7 (\pm 14.9) and 58.8 (\pm 10.2) pg/mL for SP and NKA, respectively. The regression analysis was performed using peak area ratios of light and heavy isotopes.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GENERALE

La douleur chronique est une pathologie d'actualité puisqu'elle touche plus de six millions de Canadiens (*Statistics Canada Health Indicators*, 2008). Même si de nombreux traitements sont aujourd'hui disponibles, des effets secondaires et/ou un manque d'effet peuvent être associés à la prise chronique de ces traitements. Il devient donc nécessaire d'élucider les mécanismes moléculaires centraux et périphériques intervenant dans la transmission de ce type de douleur afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour alléger la souffrance des patients et obtenir une meilleure qualité de vie. Ces travaux de recherche se sont focalisés sur la famille des tachykinines, bien connue pour jouer un rôle critique dans le développement et le maintien du signal nociceptif.

I. Récapitulatif des résultats obtenus

La découverte de nouveaux biomarqueurs de la douleur neuropathique permet de meilleur pronostic et/ou diagnostic de la pathologie ciblée (Lagakos and Hoth, 1992 ; Nicholson *et al.*, 2002), mais aussi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés à cette pathologie afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus sécuritaires et plus efficaces (Rolan, 1997). Pour cela, il faut utiliser des méthodes analytiques fiables, précises et reproductibles afin de ne pas biaiser ni fausser les résultats.

Dans un premier temps, nous avons donc comparé plusieurs stratégies de quantification par HPLC-MS : l'utilisation d'un standard interne marqué isotopiquement, l'utilisation d'un standard interne analogue ou le marquage par « *label free* ». Nos résultats ont montré que chacune des trois stratégies était précise puisqu'un CV < 20% a été obtenu. Le marquage par un isotope stable reste la stratégie la plus précise des trois, avec un CV < 10% (Pailleux and Beaudry, 2012). En revanche, si la méthode de quantification utilisée est le marquage isotopique, il faut éviter les problèmes de pollution isotopique pouvant être

rencontrés avec des espèces multi-chargées, faussant les résultats obtenus. Il est important de définir le marquage adapté avant de commencer les expériences de l'étude.

Des marquages au deutérium ont été utilisés sur les résidus acides aminés glycine et leucine (d_2 -G₉ et d_3 -L₁₀ pour SP ; d_2 -G₈ et d_2 -L₉ pour NKA). Nos expériences ont permis d'obtenir des figures répondant adéquatement aux exigences analytiques, confirmant que la stratégie de quantification avec un standard interne marqué isotopiquement était bien l'approche analytique la plus adaptée à ce type d'expérience. Les corrélations obtenues étaient excellentes avec $R^2 > 0.9963$. La précision (%CV) était comprise entre 1.3 et 12.1% et la justesse (%NOM) entre 92.6 et 107.5% (Pailleux *et al.*, 2013). Cette stratégie a permis d'identifier et quantifier de façon fiable les peptides ciblés.

Le marquage avec un analogue de structure a aussi été utilisé puisque le CV obtenu est d'environ 15%, parfaitement acceptable d'un point de vue analytique. Ce marquage a été réalisé par dérivatisation à l'acétique anhydride sur l'amine primaire N-terminale et l'amine primaire de la chaîne latérale du résidu acide aminé lysine (Che and Fricker, 2002) et a permis aussi d'obtenir des figures répondant adéquatement aux exigences analytiques. En effet, lors de l'étude de la stabilité et du profil métaboliques de SP, cette stratégie de quantification a permis d'obtenir des CV $\leq 16.0\%$ et une justesse comprise entre 90.5 et 108.6% (Pailleux *et al.*, 2013).

Suite à l'optimisation et la validation du choix de la méthode analytique, nous avons effectué l'expérimentation animale sur des rats mâles Sprague-Dawley pesant 250-300g, âgés de sept à huit semaines. En premier lieu, nous avons opéré un groupe de rats en réalisant une CCI, modèle chirurgical validé, sur la patte droite des animaux. L'établissement de la neuropathie a été confirmé par l'utilisation des tests comportementaux de von Frey et Hargreaves. Les filaments de von Frey permettent de mettre en évidence l'apparition

d'allodynie mécanique secondaire, et le test d'Hargreaves démontre le développement d'hyperalgésie thermique. Ces deux tests ont été utilisés avant la chirurgie pour démontrer qu'aucune douleur neuropathique n'était présente, et après la chirurgie afin de s'assurer du développement de la douleur et de l'inflammation (jusqu'à 7 jours après la CCI). Avant le sacrifice, le sang des animaux appartenant au groupe contrôle et au groupe neuropathique a été prélevé en intra-cardiaque. Les animaux ont ensuite été sacrifiés par décapitation afin de collecter les élargissements lombaires des moelles épinières et les cerveaux complets. L'analyse des tissus a démontré une augmentation significative de l'expression de SP, la β -tachykinine₅₈₋₇₁ (son précurseur) et SP₃₋₁₁ dans les moelles épinières des rats neuropathiques ($p < 0.001$; $p < 0.001$ et $p < 0.05$, respectivement), et une diminution significative de l'expression spinale de SP₅₋₁₁ en comparaison avec les animaux sains ($p < 0.05$). Les concentrations cérébrales de la β -tachykinine₅₈₋₇₁ et SP ont été significativement plus élevées chez les rats neuropathiques ($p < 0.05$ et $p < 0.001$, respectivement). Tandis qu'il n'y a aucune différence significative concernant les concentrations spinales et cérébrales de NKA, la β -tachykinine₅₈₋₇₀, SP₁₋₇ et SP₆₋₁₁, ni pour les concentrations cérébrales de SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ ($p > 0.05$).

Comme les résultats de l'expérience précédente ont montré des modulations d'expression des tachykinines lors d'une induction de la neuropathie et que des chercheurs ont déjà démontré que la stimulation du récepteur TRPV1 entraîne la libération des neuropeptides incluant SP, NKA et CGRP (Lin *et al.*, 2007b), nous avons décidé d'investiguer plus particulièrement s'il y avait une relation directe entre l'expression de SP et NKA et l'activation du nocicepteur vanilloïde TRPV1. Pour cela, nous avons utilisé un génotype de souris modifié, déficient en gène TRPV1 (TRPV1^{-/-}). Les analyses ont révélé que les concentrations spinales et cérébrales de SP et NKA ont été significativement réduites dans les

tissus des souris TRPV1^{-/-}. Dans les moelles épinières, les concentrations de SP et NKA ont diminué de 23.4% ($p < 0.0049$) et 22.0% ($p < 0.0022$), respectivement. Et les concentrations de SP et NKA dans les cerveaux ont décré de 26.9% ($p < 0.0260$) et 31.9% ($p < 0.0063$), respectivement.

Lors de la quantification des moelles épinières et des cerveaux, nous avons démontré des différences d'expression entre les différents neuropeptides par rapport aux animaux sains. Ceci est expliqué par le développement d'hyperalgésie primaire au niveau du site de la lésion, qui contribue à la libération de différents facteurs inflammatoires, et plus particulièrement SP, au niveau de la moelle épinière (Beaulieu, 2005). SP contribue aussi à l'installation d'une importante vasodilatation. Il est aussi connu que certains métabolites de SP possèdent des activités pharmacologiques. Pour ces raisons, nous avons souhaité étudier la stabilité et le profil métaboliques dans les microsomes hépatiques de trois espèces (rat, souris et humain). *In vitro*, les résultats de stabilité métabolique ($T_{1/2}$) ont été de 9.2, 5.6 et 18.6 minutes pour le rat, la souris et l'humain, respectivement. Et 5 métabolites principaux ont été identifiés et quantifiés par HPLC-MS/MS, incluant les fragments C-terminaux SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, SP₆₋₁₁ et SP₈₋₁₁, ainsi que le fragment N-terminal SP₁₋₇. Les résultats ont révélé des différences significatives des concentrations de ces métabolites entre les différentes espèces, suggérant des profils métaboliques espèces dépendants.

La contribution de SP au développement et au maintien de l'hyperalgésie primaire, et l'identification de ses principaux métabolites au niveau hépatique nous ont donné l'idée d'investiguer plus profondément leurs modulations d'expressions au niveau plasmatique. Dans un premier temps, nous avons voulu quantifier SP et NKA dans le plasma des rats neuropathiques et sains car ce sont deux neuropeptides issus de la même protéine précurseur. En premier lieu, nous avons voulu mettre au point une méthode analytique avec SP et NKA

car des études avaient déjà été réalisées, nous permettant d'estimer une gamme de valeurs de concentrations endogènes plasmatiques attendues. Sachant que la concentration endogène plasmatique de SP et NKA est peu abondante, il a fallu développer une méthode HPLC-MS/MRM sensible et sélective, avec des standards internes marqués isotopiquement. La LOD de la méthode est de 31.3 pg/mL (ou 0.6 pg injectés sur la colonne) pour SP et NKA. La précision (%CV) de la méthode varie entre 3.4 et 7.6%, tandis que la justesse (%NOM) est comprise entre 81.7 et 99.0%. Finalement, cette méthode nous a permis d'estimer les niveaux endogènes à 63.7 (\pm 14.9) et 58.8 (\pm 10.2) pg/mL pour SP et NKA, respectivement, dans des plamas de rats commerciaux.

II. Résultats obtenus *versus* résultats attendus

Le marquage isotopique, associé au couplage HPLC-MS et à la quantification, permet de diminuer les variabilités analytiques et inter-individuelles, ainsi que le bruit analytique puisque chaque analyse subit les mêmes variations corrigées par la présence du standard interne qui possède les mêmes propriétés physico-chimiques que l'analyte. Nos résultats ont confirmé le choix adapté de cette stratégie de quantification qui permet d'obtenir une méthode standardisée sensible, fiable et robuste et de pouvoir obtenir les différences d'expressions des neuropeptides entre le groupe sain et le groupe pathologique.

L'utilisation d'un analogue de structure obtenu par dérivatisation chimique a aussi permis d'identifier, caractériser et quantifier les métabolites hépatiques de SP en obtenant des résultats statistiques adéquats, même si l'analogue de structure ne possède pas les mêmes propriétés physico-chimiques que l'analyte (masse, configuration spatiale).

Par nos résultats, nous nous sommes ensuite assurés de l'induction de la neuropathie après CCI grâce aux deux tests comportementaux (Pailleux *et al.*, 2013). Ces données sont conformes aux résultats obtenus précédemment (Lionnet *et al.*, 2010). Puis, nous avons pu

faire la quantification relative des tachykinines dans les moelles épinières, traduisant une significative augmentation d'expression de SP et son précurseur, la β -tachykinine₅₈₋₇₁, et SP₃₋₁₁ entre les rats neuropathiques et les rats sains. Ces données suggèrent que ces trois neuropeptides sont étroitement liés au comportement douloureux. En effet, il a précédemment été démontré que les tachykinines sont sur-exprimés en cas de douleurs chronique (Ferland *et al.*, 2011 ; Sharif Naeini *et al.*, 2005) et neuropathique (Kanai *et al.*, 2005 ; Vachon *et al.*, 2004), confortant donc nos données. En revanche, nous avons aussi observé une diminution significative de l'expression spinale de SP₅₋₁₁ entre les rats neuropathiques et les rats sains. Et aucune différence significative n'a été observée pour l'expression cérébrale de SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, β -tachykinine₅₈₋₇₀, SP₆₋₁₁ et SP₁₋₇, ni pour les concentrations spinales de β -tachykinine₅₈₋₇₀, SP₆₋₁₁ et SP₁₋₇. Jusqu'à présent, il existe peu d'études concernant la modulation d'expression de ces différents neuropeptides après CCI au niveau cérébral, et ce sujet reste controversé. Cependant, il est connu que des patients en douleur développent un stress et une anxiété importante qui rejaillissent sur la perception douloureuse.

Le TRPV1 est un nocicepteur exprimé au niveau périphérique et central par les fibres C et A δ et jouant un rôle central, lors d'un stimulus nociceptif (Steen *et al.*, 1992 ; Caterina *et al.*, 1997). Comme expliqué ci-dessus, la stimulation du récepteur TRPV1 entraîne la libération des neuropeptides, dont SP et NKA. Il est également connu que la PLC induit aussi l'activation de la PKC, phosphorylant et stimulant le récepteur TRPV1 (Zhang *et al.*, 2007 ; Tang *et al.*, 2008). Cette cascade d'évènements est activée lorsque SP se lie au récepteur NK1 (Maggi, 1995 ; Myöhänen *et al.*, 2008), stimulant l'ouverture des canaux calciques et donc transmettant la nociception (Ferris and Snyder, 1992 ; Berridge, 1993 ; Hokin and Dixon, 1993). Si le récepteur TRPV1 est activé, il mène au développement et au maintien de l'hyperalgésie et de l'allodynie qui entraînent, à leur tour, une augmentation de la régulation du récepteur NK1, rendant disponible un plus grand nombre de récepteurs NK1 qui pourront

se lier à SP et donc augmenter la nociception (Laird *et al.*, 2000). Les tachykinines sont donc connues pour moduler l'expression et l'activation du TRPV1. Par notre expérience, nous démontrons que le TRPV1 module aussi l'expression des tachykinines, puisque lors de son absence (souris de génotype TRPV1^{-/-}), les concentrations spinales et cérébrales de SP et NKA se retrouvent significativement abaissées, suggérant que les expressions du TRPV1, SP et NKA sont étroitement liées.

SP est un neurotransmetteur largement détecté au niveau central et périphérique (Chang *et al.*, 1971; Harrison and Geppetti, 2001) et jouant un rôle central dans le processus inflammatoire (Dimitriadou *et al.*, 1994 ; Vergnolle *et al.*, 2001). SP, en même temps que d'autres facteurs inflammatoires, est libérée au niveau du site de lésion et agit sur des nocicepteurs proches, entraînant la sensibilisation par le développement d'hyperalgésie primaire (Julius and Basbaum, 2001). L'intérêt d'étudier le métabolisme de SP dans les microsomes hépatiques est de définir la stabilité et le profil métaboliques de SP, puisque SP contribue au développement de l'hyperalgésie primaire. Ici, nous avons démontré la dégradation rapide de SP, peuvent être un facteur déterminant dans les processus physiologiques associés à l'inflammation neurologique et à l'hyperalgésie primaire. De plus, les concentrations de SP étant plus élevées chez l'humain comparé aux rats et souris, cela signifie que les concentrations systémiques de SP sont différentes selon les espèces, influençant les effets pro-inflammatoires de SP par un métabolisme dépendant de l'espèce considérée. Les différences de concentrations endogènes de SP peuvent indiquer un rôle distinct de SP au niveau des processus pro-inflammatoires et des modifications physiologiques. SP pourrait donc entraîner des changements phénotypiques, comme le développement de l'état physiopathologique ou le comportement douloureux, différents selon l'espèce étudiée. Ceci pourrait aussi entraîner des modifications du système immunitaire

puisque une diminution de SP réduirait la défense immunitaire et augmenterait donc le risque d'infection. Ces différences inter-espèces pourraient expliquer, en partie, les raisons de l'obtention de résultats favorables dans le traitement de la douleur lors de la phase d'étude animale, mais les difficultés de traiter l'humain avec l'apparition de nombreux effets secondaires ou d'inefficacité de certains traitements. Comme il est connu que les métabolites de SP, que ce soient les fragments N- ou C-terminaux, possèdent des activités pharmacologiques, il est d'autant plus important d'identifier les métabolites majoritaires.

Suite au déclenchement de l'hyperalgésie primaire et de l'inflammation, SP, NKA et d'autres facteurs inflammatoires sont libérés. Nous avons pensé que l'estimation des concentrations endogènes plasmatiques de SP et NKA semblait importante. De plus, l'intérêt de biomarqueurs dans l'établissement d'un diagnostic et/ou un pronostic d'une physiopathologie, comme la douleur chronique, est avantageux si des matrices biologiques facilement collectées, telles que l'urine ou le plasma, sont utilisées. Nous avons dû développer une méthode fiable et spécifique HPLC-MS/MRM, permettant d'estimer les concentrations endogènes plasmatiques de SP et NKA présentes à l'état de traces. Notre méthode a démontré sa précision et sa reproductibilité, importantes car le risque de variabilités analytiques est encore plus considérable lorsque les concentrations des analytes sont faibles. Les niveaux endogènes de SP et NKA ont été estimés à 63.7 (\pm 14.9) et 58.8 (\pm 10.2) pg/mL, respectivement, dans des plasmas de rats commerciaux. Ces concentrations correspondent à celles suggérées par de précédentes études et utilisant d'autres techniques de dosage : 10 à 400 pg/mL pour SP (Bondy *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2006) et de 10 à 100 pg/mL pour NKA (Shang *et al.*, 2003; Gallai *et al.*, 1995). En revanche, nous n'avons pas pu quantifier SP et NKA dans le plasma des rats sains et neuropathiques issus de notre étude *in vivo*, en raison de l'observation d'une importante suppression de signal. Des investigations supplémentaires

ont été effectuées sans réussir à trouver une solution adéquate permettant de détecter et de quantifier ces peptides adéquatement. Étant limité par le volume de plasma disponible, il n'a pas été possible de réanalyser ces échantillons.

III. Discussion sur l'implication des résultats obtenus

Comme nous l'avons démontré, différentes approches de quantifications sont possibles en peptidomique, dont la quantification utilisant un standard interne synthétisé marqué isotopiquement ou par dérivatisation chimique. Chaque stratégie de quantification possède ses avantages et inconvénients et le choix d'une méthode doit correspondre aux exigences analytiques de l'expérience envisagée, dans le but de réduire les variations techniques, analytiques et instrumentales afin de ne pas limiter les performances de détection et de quantification, et de ne pas engendrer de variabilité de résultats entre les différents échantillons, permettant de pouvoir comparer des échantillons ou des groupes d'échantillons. En général, la quantification avec un IS marqué isotopiquement corrige mieux les effets matrice et les variations expérimentales associées aux analyses par HPLC-MS comme les variations possibles dues au volume d'injection, les fluctuations du processus d'ionisation, la transmission des ions, la sensibilité du détecteur, et répond quasiment aux mêmes conditions d'élution que l'analyte (Häubl *et al.*, 2006 ; Elliot *et al.*, 2009). Le marquage par dérivatisation chimique est intéressant aussi, puisque la précision et l'exactitude obtenues sont conformes aux exigences analytiques. Mais un marquage modifie la configuration spatiale du peptide, peuvent entraîner des changements au niveau des interactions avec la colonne HPLC et/ou l'ionisation dans la source du spectromètre de masse. Dans nos études, ces deux méthodes ont été utilisées en apportant une précision, une justesse et une sensibilité analytique parfaitement acceptables.

De plus, l'utilisation du couplage HPLC-MS permet d'obtenir une grande spécificité et reproductibilité des analyses nécessaires pour étudier la modulation d'expression de ces neuropeptides, contrairement aux tests ELISA. Les tests ELISA sont généralement sensibles mais peu reproductibles, et ne fournissent pas d'informations précises sur les entités moléculaires (Wang, 2011). Les tests ELISA utilisent des épitopes et/ou des néo-épitopes, qui représentent des parties de la séquence d'acides aminés d'antigènes, comme une partie de l'extrémité C- ou N-terminale, susceptibles d'être reconnues par les anticorps ciblés (Fosang *et al.*, 2010 ; Tsikas and Suchy, 2012). Mais les peptides issus d'un même gène présentent des similarités de séquences, comme par exemple SP avec ses précurseurs et métabolites, faussant les résultats pouvant être obtenus *via* des kits ELISA. Par conséquent, plusieurs limitations, dont la connaissance d'anticorps spécifiques appropriés pour l'analyte cible, des problèmes de réactivité croisée, de spécificité et de sélectivité (Callahan *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 1992), expliquent notre choix pour les techniques HPLC et MS.

Dans notre étude, nous avons démontré une augmentation des concentrations spinales de SP, la β -tachykinine₅₈₋₇₁ et SP₃₋₁₁ lors du développement d'une douleur neuropathique, signifiant l'induction de l'hyperalgésie primaire et secondaire, menant au développement d'allodynie et donc à l'augmentation de la perception douloureuse. Ces trois neuropeptides sont donc étroitement reliés au comportement douloureux. Il est connu que les voies spinales jouent un rôle critique dans la transmission synaptique du message nociceptif et sont capables de modifier le comportement des animaux en douleur, en agissant au niveau moléculaire par augmentation des neurotransmetteurs de la nociception (Baumbauer *et al.*, 2009). Il est su que SP agit préférentiellement sur le récepteur post-synaptique NK1 (Yu *et al.*, 1999). Puisque la β -tachykinine₅₈₋₇₁ et SP₃₋₁₁ contiennent des parties de séquence aminée communes avec SP (côté C-terminal de SP : -KPQQFFGLM) (Krause *et al.*, 1989), il est probable qu'ils activent

aussi le récepteur NK1 selon leur affinité relative avec le récepteur post-synaptique, impactant les évènements moléculaires au niveau de la signalisation du complexe synaptique. Cependant, leur affinité avec NK1 n'est pas la même que SP, et l'impact dépendra de leur abondance relative. Nous notons aussi que le comportement de douleur est présent au fil du temps dans l'expérience. Les agonistes du récepteur NK1 affectent donc la membrane post-synaptique en déclenchant une dépolarisation qui contribue au développement de l'hyperalgésie secondaire. Chaque agoniste possède un degré d'affinité différent pour le récepteur post-synaptique NK1, amenant un degré de puissance de l'effet agoniste modulé selon le peptide qui se lie au récepteur. Puis, après leur activation, les récepteurs NK1 agissent les récepteurs des acides aminés excitateurs (e.g. récepteurs NMDA) contribuant au maintien de l'hyperalgésie secondaire, et au développement de l'allodynie. La modulation de l'expression de SP, la β -tachykinine₅₈₋₇₁, SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ affecte donc de façon critique les mécanismes spinaux de transmission de la douleur, que ce soit par des actions pro- ou anti-nociceptives.

En revanche, au niveau cérébral, l'implication des tachykinines dans la douleur neuropathique reste un sujet de controverse. En effet, il a été prouvé que la liaison de SP à son récepteur préférentiel, NK1, était associée à la douleur, des désordres moteurs, l'anxiété, le stress, la dépression (Quartara and Maggi, 1998). La dépression et l'anxiété sont deux conséquences connues de la douleur neuropathique (Seminowicz *et al.*, 2009), et l'injection intracérébrale d'agoniste de NK1 déclenche un effet anxiogène (De Araujo *et al.*, 1999), tandis que l'injection d'antagoniste entraîne un effet anxiolytique (Varty *et al.*, 2002). Ces deux études suggèrent que la modulation d'expression de SP est étroitement liée à l'anxiété au niveau de régions spécifiques du cerveau. Nos résultats suggèrent que SP et son précurseur, la β -tachykinine₅₈₋₇₁, doivent contribuer à l'induction d'anxiété chez les animaux neuropathiques. La douleur, la dépression et l'anxiété possèdent des voies biologiques

impliquées similaires (voies descendantes du SNC), de même que les neurotransmetteurs (e.g. sérotonine, norépinéphrine) (Bair *et al.*, 2003 ; Bair *et al.*, 2004). Le développement d'une douleur chronique peut aussi entraîner le développement de l'anxiété et de la dépression, menant à une boucle déclenchant ces trois phénomènes et augmentant la perception douloureuse (Von Korff *et al.*, 1998 ; Banks and Kerns, 1996). En effet, les personnes souffrant de douleur chronique sont plus susceptibles de présenter des symptômes dépressifs et d'anxiété. L'âge, le genre, le niveau scolaire, le statut marital sont des paramètres influençant ces symptômes (O'Reilly, 2011). Parallèlement, il a aussi été démontré qu'un environnement enrichi soulageait la douleur (Vachon *et al.*, 2013). Une prise en charge avec un volet plutôt psychologique axé sur les sentiments et les émotions pourrait aussi contribuer à une amélioration de la gestion de la douleur et de la qualité de vie des patients. Par exemple, la dédramatisation (Sullivan *et al.*, 2001) et l'acceptation de la douleur (McCracken, 1998 ; McCracken and Eccleston, 2003 ; Vowles *et al.*, 2008), la motivation à l'effort (Picavet *et al.*, 2002), l'enrichissement environnemental (Hadjistavropoulos *et al.*, 2000) afin d'éviter de focaliser sur la douleur sont des aspects à considérer pour améliorer la gestion de la douleur par le patient.

Dans les moelles épinières et les cerveaux, la quantification relative de SP, ses précurseurs et métabolites a été réalisée, ainsi que celle de NKA car il a déjà été démontré que SP et NKA sont issus de la même protéine précurseur protachykinine-1, qu'ils sont co-localisés (Ando *et al.*, 2001) et libérés comme co-neurotransmetteurs et co-neuromodulateurs dans les SNC et SNP (Takeda *et al.*, 1990 ; Maggi, 2000). Cependant, nous n'avons pas observé de modification d'expression endogène de NKA au niveau du SNC contrairement à la modification d'expression de SP. Ceci suggère que les processus protéolytiques de la protéine précurseur protachykinine-1 menant à la synthèse de SP et NKA sont différents. Comme

illustré sur la Figure 62, SP est synthétisée à partir des précurseurs, β -tachykinine₅₈₋₇₁ et β -tachykinine₅₈₋₇₀, par l'action de la carboxypeptidase E (CPE), une exopeptidase distribuée dans le SNC, et de la PAM (Hook *et al.*, 2008). Tandis que NKA est synthétisée à partir de l'autre moitié de la séquence de la protéine précurseur protachykinine-1 générant le NPK. La CPE catalyse la libération des résidus R- ou K- du côté C-terminal. La PAM catalyse l'amidation sur l'extrémité C-terminale du résidu G-. SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ sont synthétisées *via* l'action de prolylendopeptidases qui hydrolysent les ponts P-X. De récentes études ont aussi surligné la contribution significative des PC1/3 et PC2 dans le processus protéolytique de la synthèse des proneuropeptides (Zheng *et al.*, 1994 ; Cui *et al.*, 1998 ; Jin *et al.*, 2005). PC1/3 et PC2 clivent au niveau de motifs précis, composés d'une paire d'acides aminés basiques telle que KR-, RR-, RK- ou KK-. Et PC2 reconnaît aussi un motif constitué d'un seul acide aminé basique, R-. Comme illustré sur la Figure 60, selon les motifs de clivage notés en rouge, PC1/3 et/ou PC2 pourraient contribuer à la synthèse de la β -tachykinine₅₈₋₇₁ en clivant au niveau des motifs -R/R et -KR/D (positions 57/58 et 71/72, respectivement), de SP au niveau du motif -R/R (positions 57/58) et de NKA en clivant au niveau du motif -R/H (positions 97/98). Les enzymes PC1/3 et PC2 pourraient donc être impliquées dans la maturation protéolytique de la protéine précurseur protachykinine-1. Ces deux enzymes sont aussi impliquées dans la biosynthèse des enképhalines à partir de leur protéine précurseur la proenképhaline (Helwig *et al.*, 2011), mais aussi dans les processus protéolytiques de la protéine précurseur des dynorphines, menant à la synthèse des dynorphines bioactives (Perone and Castro, 1997 ; Day *et al.*, 1997). Actuellement, des inhibiteurs de proprotéines convertases sont étudiés en tant que traitements potentiels de maladies infectieuses (Becker *et al.*, 2012).

De plus, l'observation de la diminution d'expression spinale du fragment C-terminal SP₅₋₁₁ suggère qu'il y a sûrement des priorités au niveau des mécanismes de protéolyse puisque les prolylendopeptidases (PREP) sont impliquées dans la biosynthèse de SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ (Figure 62). La réaction préférentielle catalysée dépend de la stabilité thermodynamique du complexe intermédiaire enzyme-substrat. La réaction enzymatique menant à la synthèse de SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ requiert la formation de deux complexes différents, laissant penser qu'une des deux structures est plus favorable thermodynamiquement comparée à l'autre. Ce constat est d'autant plus intéressant que le génotype et le phénotype peuvent avoir un impact considérable sur le résultat des réactions catalysées par la PREP. En effet, lors d'une lésion, il y a maturation de la protéine précurseur protachykinine-1 afin de synthétiser les neuropeptides bioactifs. Si le complexe PREP-SP₃₋₁₁ est favorisé thermodynamiquement, la formation de SP₃₋₁₁ sera privilégiée, et sa liaison au récepteur NK1 jouera sur le phénotype, c'est-à-dire le caractère pathologique du patient et, plus précisément, le développement du comportement douloureux, car il est aussi possible que SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ possèdent des degrés d'affinité différents pour se lier au récepteur NK1. De plus, SP₅₋₁₁ semble posséder des propriétés anti-nociceptives, affectant donc le phénotype *via* le développement du comportement douloureux (Naranjo *et al.*, 1986). Ici, les mécanismes enzymatiques prennent toute leur importance et il est nécessaire de comprendre quelles enzymes sont impliquées afin de déterminer les agonistes synthétisés de façon prioritaire, puisque chaque peptide bioactif possède son degré d'effet de puissance agoniste, influençant le génotype en se liant avec son affinité au récepteur, menant à des modifications phénotypiques.

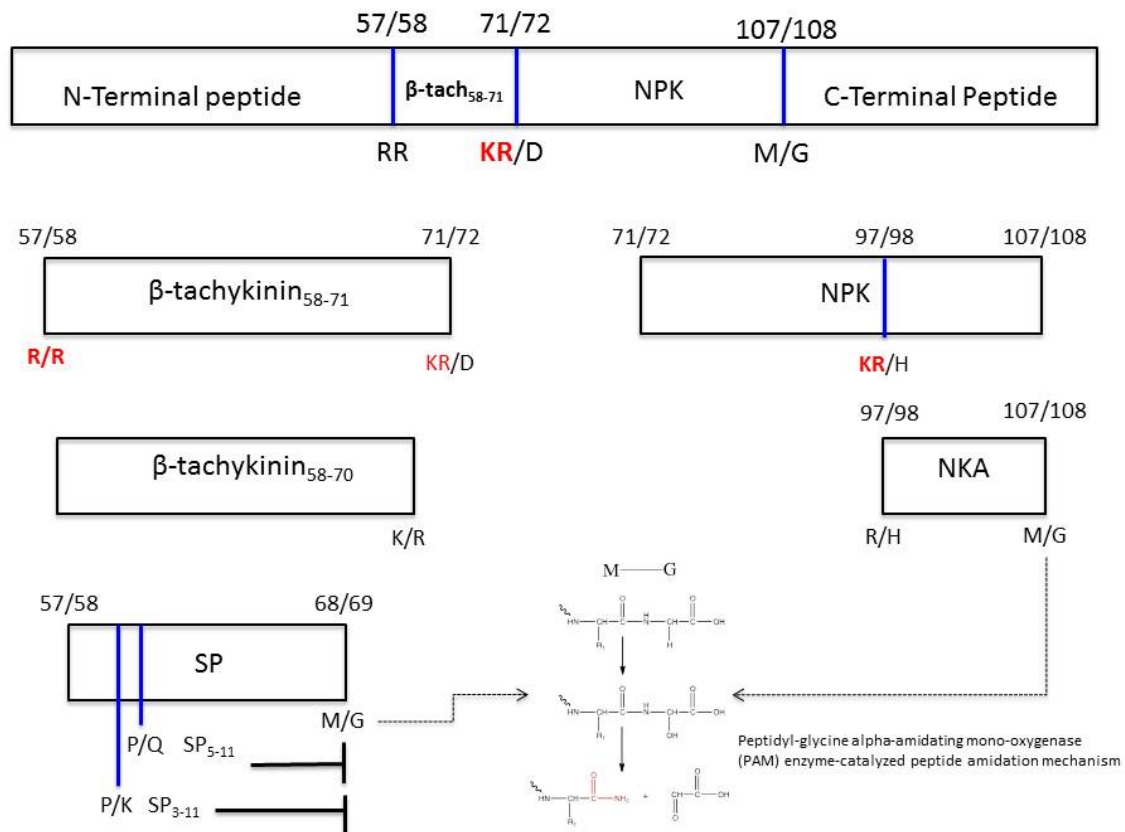


Figure 62 : Représentation schématique du métabolisme de la protéine précurseur protachykinine-1 et de l'action des différentes enzymes impliquées dans la synthèse des neuropeptides (Pailleux *et al.*, 2013). PC1/3 et PC2 reconnaissent des motifs d'une paire d'acides aminés basiques (KR-, RR-, RK- et KK-), et seule PC2 reconnaît le résidu basique seul R-. La carboxypeptidase E (CPE) catalyse la libération des résidus C-terminaux R- et K-. La peptidyl-glycine alpha-amidating mono-oxygénase (PAM) catalyse la réaction d'amidation au niveau de la glycine située C-terminal de la séquence peptidique. Les prolylendopeptidases (PREP) catalysent les hydrolyses des ponts P-X. Ce schéma présente les localisations possibles des actions enzymatiques au niveau des séquences peptidiques de la β -tachykinine₅₈₋₇₁, SP, SP₃₋₁₁, SP₅₋₁₁, NPK et NKA.

Lors d'apparition d'hyperalgésie secondaire, SP, ses métabolites et NKA se lient au récepteur post-synaptique NK1, contribuant à l'activation du récepteur TRPV1 par une cascade d'évènements (Zhang *et al.*, 2007). Le TRPV1 agit comme un nocicepteur en transmettant des stimuli thermique et chimique au niveau des neurones sensoriels nociceptifs (Steen *et al.*, 1992 ; Garcia-Hirschfeld *et al.*, 1995 ; Caterina *et al.*, 1997). Par nos résultats, nous démontrons que les concentrations spinales et cérébrales de SP et NKA sont significativement diminuées dans les tissus des souris déficientes du gène TRPV1. Ceci nous permet d'affirmer que le TRPV1 joue un rôle essentiel dans l'expression des tachykinines. SP

et NKA étant synthétisées à partir de la protéine précurseur tachykinine-1, encodée à partir du même gène TAC1, de précédentes études ont montré que la réponse comportementale suite à un stimulus légèrement douloureux est intacte chez les souris TAC1^{-/-}, tandis que la réponse comportementale est significativement altérée suite à un stimulus nociceptif thermique ou chimique intense (Eckert *et al.*, 2006). Il a aussi été déjà démontré que les souris déficientes du gène TRPV1 répondent normalement au stimulus mécanique mais ne présentent de comportement douloureux car elles ne détectent plus la douleur thermique et donc ne développent plus l'hyperalgésie thermique, mais développent une légère hypersensibilité thermique. Le récepteur TRPV1 est donc essentiel dans l'induction d'hyperalgésie thermique (Caterina *et al.*, 2000). Les résultats obtenus par ces précédentes études de modèles de souris TRPV1^{-/-} et TAC1^{-/-} semblent relier les actions des gènes TAC1 et TRPV1. Nous avons vu que lorsqu'un individu est en conditions de douleur, ses concentrations endogènes de SP et NKA sont augmentées par rapport à un individu en conditions physiologiques saines. Les interactions persistantes de SP et NKA sur leurs récepteurs post-synaptiques contribuent au développement de l'hyperalgésie secondaire. Et le seuil douloureux du patient atteint sera donc plus faible, le rendant plus sensible à la nociception. Tandis que les souris TRPV1^{-/-} voient leur seuil douloureux augmenter puisque les concentrations endogènes de SP et NKA sont réduites. Comme Eckert et Caterina l'ont démontré, les expressions des gènes TRPV1 et TAC1 sont liées, suggérant que les animaux déficients du gène TRPV1 percevront moins la douleur, et l'intensité du stimulus nociceptif devra être augmentée pour obtenir une réponse douloureuse similaire ou identique, puisque les concentrations en neuropeptides bioactifs issus de la protéine précurseur tachykinine-1 seront plus faibles.

Si le récepteur TRPV1 est activé, il pourrait mener au développement et au maintien de l'hyperalgésie et de l'allodynie, contribuant à une augmentation de la régulation du récepteur NK1. Suite à ce mécanisme, un plus grand nombre de récepteurs NK1 serait rendu

disponible pour se lier à SP, ses métabolites et précurseurs, ou NKA, faisant évoluer la nociception. En effet, lorsque le récepteur TRPV1 est activé par phosphorylation, la traduction est augmentée et le TRPV1 est transporté vers les terminaisons périphériques des nocicepteurs où il contribue à l'hypersensibilisation thermique (Calvino, 2003). La modulation d'expression des tachykinines et celle du récepteur TRPV1 sont donc étroitement liées et impliquées dans le développement de l'hypersensibilité douloureuse, incluant l'hyperalgésie secondaire et l'allodynie.

Le TRPV1 est aussi activé par des endovanilloïdes (e.g. l'anandamide, les cannabinoïdes) et exogènes (e.g. la capsaïcine, l'eugénol et le [6]-gingérol), ainsi que des médiateurs inflammatoires (e.g. bradykinine, dérivés d'acide arachidonique) (Van Der Stelt and Di Marzo, 2004). Ces endovanilloïdes sont libérés lors de la phase inflammatoire, suite à une lésion. Par exemple, l'anandamide est un endovanilloïde agoniste du TRPV1, qui active fortement le TRPV1 en augmentant la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, menant à une dépolarisation et donc à la libération de SP (Toth *et al.*, 2009). Par conséquent, l'activation du récepteur TRPV1 par ces endovanilloïdes agonistes et les médiateurs inflammatoires modifie les voies de transmission du signal intracellulaire, affectant les concentrations endogènes de neurotransmetteurs en stimulant leur libération. Ces mécanismes contribuent donc au maintien de l'hyperalgésie et de l'allodynie et transmettent le signal douloureux.

La contribution de SP au maintien de l'hyperalgésie primaire fait intervenir des mécanismes moléculaires périphériques. Notre étude révèle que SP est dégradée rapidement dans les microsomes hépatiques, mais il existe des différences notables entre les espèces. Les concentrations de SP étant plus élevées chez l'humain que chez le rat ou la souris, cela suggère que les concentrations systémiques de SP sont différentes selon les espèces, influençant les effets de SP en régulant l'expression du mécanisme SP/NK1 (Koh *et al.*,

2012). Ces observations indiquent des rôles distincts de SP dans les processus inflammatoires et les changements physiologiques au sein de chaque espèce. De plus, le métabolisme rapide de SP diminue sa concentration endogène, modifiant son interaction avec le récepteur NK1. Pourtant, par les tests comportementaux, nous avons observé un développement de la douleur neuropathique, signifiant que le signal nociceptif est transmis. Ces résultats suggèrent que les métabolites de SP semblent interagir avec NK1, puisque le comportement douloureux des animaux atteints est présent, pouvant donc contribuer à l'induction d'hyperalgésie secondaire.

Il est aussi connu que des fragments N- et C-terminaux de SP possèdent leurs propres activités pharmacologiques, anti- et/ou pro-nociceptives, et sont présents au niveau du SNC, *via* la barrière hémato-encéphalique (Freed *et al.*, 2002), et le SNP (Sakurada *et al.*, 1999 ; Hall *et al.*, 1987). L'écart entre les abondances relatives de SP et ses métabolites au sein des différentes espèces, induit des disparités dans les cascades d'évènements molécaires impliquées dans la transmission synaptique. Par leurs propriétés structurales, ces métabolites possèdent différents degrés d'affinité leur permettant de se lier au récepteur NK1, entraînant des différences de puissance des effets agonistes ou antagonistes. Ceci affectera l'hyperalgésie secondaire et donc les mécanismes de transmission de la douleur. Ces différences métaboliques inter-espèces peuvent expliquer, en partie, les problèmes rencontrés lors du passage de la phase pré-clinique à la phase clinique pendant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'implication de SP et des métabolites C-terminaux dans les phénomènes d'anxiété et la dépression est connue. Ces mêmes phénomènes sont développés lors de l'établissement d'une douleur chronique. Comme expliqué précédemment, une prise en charge des patients neuropathiques en tenant compte des émotions ressenties comme l'anxiété, pourrait peut-être contribuer à une amélioration de la gestion de la douleur et de la qualité de vie des patients.

IV. Les perspectives envisagées

Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux cibler tous les mécanismes centraux et périphériques impliqués dans la contribution de la douleur neuropathique.

Par exemple, il pourrait être intéressant de réaliser un modèle de douleur à long terme afin d'étudier la modulation d'expression des peptides pour l'établissement d'une douleur chronique (> 6 mois). De plus, l'utilisation de rats femelles pourrait aussi compléter ces études puisque nous savons aujourd'hui que le sexe du patient est important car le seuil douloureux est dépendant du sexe.

Les enzymes PC1/3 et PC2 sont importantes dans la biosynthèse des tachykinines à partir de la protéine précurseur protachykinine-1. Perone et Castro ont prouvé que PC1/3 et PC2 étaient aussi impliquées dans le processus protéolytique de la protéine précurseur des dynorphines, menant à la synthèse des dynorphines bioactives (Perone and Castro, 1997). Ce constat est d'autant plus intéressant que les dynorphines sont co-localisées avec SP dans les fibres C peptidergiques de la moelle épinière (Marvizon *et al.*, 2009). En activant les récepteurs opioïdes, les dynorphines possèdent des actions anti-nociceptives sur les voies de transmission de la douleur. Il est aussi connu que la Dynorphine-A la libération de SP dans la moelle épinière (Zachariou and Goldstein, 1997). L'expression de PC1/3 et PC2 pourrait donc être liée à la modulation de la douleur neuropathique et de la transmission de l'information nociceptive. Par conséquent, il semble intéressant d'investiguer plus profondément la modulation d'expression de PC1/3 et PC2 qui pourraient être de potentielles cibles thérapeutiques.

Nos résultats montrent que l'expression du récepteur TRPV1 influence significativement la modulation d'expression des tachykinines. En effet, les concentrations endogènes de SP et NKA sont diminuées dans les tissus des souris déficientes en gène TRPV1. Actuellement, plusieurs molécules, dont l'eugénol et le [6]-gingérol, ont montré des effets antagonistes intéressants en se liant sur le TRPV1 au niveau spinal (Morera *et al.*, 2012), allégeant la douleur neuropathique (Lionnet *et al.*, 2010). Le [6]-gingérol, issu d'une épice, est un analogue de structure de la capsaïcine (Szallasi and Blumberg, 1999). L'eugénol, un des principaux composants du clou de girofle, est connu pour ses propriétés analgésiques. En se liant au TRPV1, l'eugénol inhibe l'activation des canaux calciques (Lee *et al.*, 2005) et sodiques (Cho *et al.*, 2008), désensibilisant le récepteur TRPV1, et soulageant à long terme la neuropathie (Lionnet *et al.*, 2010) de façon proportionnelle à la diminution de la concentration en SP dans la moelle épinière (Ferland *et al.*, 2012). Ces modifications influencent le développement de l'hyperalgésie et donc le comportement douloureux, et sont déterminantes de la transmission de l'influx douloureux et la plasticité synaptique. La plasticité est reliée aux changements quantitatifs impliqués dans les processus moléculaires présynaptiques et postsynaptiques. Le remodelage fonctionnel des connexions synaptiques est très important d'un point de vue pharmacologique. Lors de la liaison TRPV1/antagoniste, la plasticité synaptique est donc modifiée. Le TRPV1 étant l'un des intégrateurs des informations nociceptives le plus connu, sa désensibilisation par un effet antagoniste entraînerait un remodelage des circuits des neurones, modifiant la transmission du signal nociceptif en allégeant la souffrance due à la douleur neurologique. La pharmacothérapie peut donc conditionner la mise en place de l'architecture du système nerveux. Toutes ces observations suggèrent donc un rôle important des tachykinines et du TRPV1 dans les mécanismes moléculaires centraux et périphériques impliqués dans la transmission de la douleur neuropathique, ce qui fait du récepteur TRPV1 une cible pharmacologique et thérapeutique

potentielle intéressante pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Et les mécanismes d'interaction entre le récepteur TRPV1 et ses antagonistes méritent d'être approfondis.

L'implication des tachykinines dans la douleur neuropathique, au niveau cérébral, est loin d'être démontrée. Le développement d'une douleur chronique peut aussi entraîner le développement de l'anxiété et de la dépression, menant à une boucle déclenchant ces trois phénomènes et augmentant la perception douloureuse. En effet, il est connu que l'exercice et l'entraînement physique agissent sur la neurochimie cérébrale, réduisant l'anxiété (Annesi, 2005) et la dépression (Backmand *et al.*, 2003). Il a aussi été mis en évidence une augmentation du métabolisme cérébrale de neuromédiateurs, dont la sérotonine, la dopamine ou le GABA, sous l'effet d'un entraînement modéré (Chaouloff *et al.*, 1986), modulant les effets comportementaux (Guezennec *et al.*, 1998). Des études épidémiologiques transversales et longitudinales ont aussi montré que des personnes actives avaient des scores plus faibles sur des échelles de dépression que des personnes peu actives (Farmer *et al.*, 1988). L'exercice physique induirait donc des modifications neurochimiques, influençant les comportements douloureux. Il convient donc d'investiguer plus profondément les mécanismes moléculaires cérébraux afin de pouvoir améliorer la qualité de vie des patients, humains ou animaux.

Nos données révèlent l'importance des tachykinines, leurs précurseurs et métabolites, dans le développement de la douleur chronique. Plus particulièrement SP, β -tachykinine₅₈₋₇₁, SP₃₋₁₁ et SP₅₋₁₁ montrent une modulation de leurs expressions et une contribution au développement et au maintien de l'hyperalgésie primaire et secondaire, après une blessure. Ces quatre neuropeptides pourraient donc servir de marqueurs efficaces dans les premières phases de découverte de traitements.

CONCLUSION

Dans un premier temps, nous avons développé des méthodes analytiques sensibles, spécifiques et fiables : HPLC-MS pour l'identification des neuropeptides, HPLC-MS/MS dans le but de caractériser et quantifier les neuropeptides ciblés dans les moelles épinières et cerveaux, et HPLC-MRM afin de caractériser et quantifier les neuropeptides d'intérêt dans le plasma. L'utilisation d'IS marqués isotopiquement a permis d'obtenir des résultats précis, justes et reproductibles au sein des différentes matrices, ainsi que de minimiser les erreurs et le bruit analytiques.

L'utilisation d'un modèle chirurgical de CCI a permis d'établir une douleur neuropathique, validée par les tests comportementaux de von Frey et Hargreaves. La collecte des différents tissus (moelles épinières, cerveaux) a servi à quantifier relativement la modulation d'expression des tachykinines (SP, ses précurseurs et métabolites, NKA), entre le groupe CCI et le groupe contrôle. Ces résultats ont révélé des différences d'expression entre les fragments N- et C-terminaux de SP, les précurseurs et NKA, suggérant des différences au niveau du processus protéolytique menant à leurs synthèses. Des études supplémentaires sont requises pour une meilleure compréhension de la maturation de la protéine précurseur.

Le modèle de souris TRPV1^{-/-} a permis de relier l'expression du récepteur TRPV1 et celle de SP et NKA. Nos résultats montrent que les souris déficientes en récepteur TRPV1, possèdent de plus faibles concentrations en SP et NKA, laissant penser que des animaux traités par inhibition de l'activité du récepteur TRPV1 (e.g. par l'action antagoniste de l'eugénol) présenteront des seuils douloureux plus élevés, car leurs concentrations endogènes en SP et NKA seront moins importantes, demandant un stimulus douloureux plus intenses pour pouvoir percevoir la douleur.

De façon générale, les résultats obtenus lors de ce projet de doctorat suggèrent que la voie des tachykinines est intimement liée à celle du récepteur TRPV1. SP, ses précurseurs et métabolites semblent être des biomarqueurs intéressants de la douleur neuropathique. Au-delà de ce constat, le récepteur TRPV1, PC1/3 et PC2 pourraient devenir des cibles thérapeutiques potentielles. Les processus nociceptif, inflammatoire et neuropathique impliqués sont étroitement liés à la genèse des protéines, leurs dérivés peptidiques et leurs rôles spécifiques. L'intégration des études protéomique, peptidomique et pharmacologique apportent des données fondamentales permettant principalement à évaluer et quantifier précocement l'efficacité de nouveaux médicaments candidats dès les phases initiales d'évaluations précliniques. Elle apportera aussi une meilleure compréhension des mécanismes biomoléculaires de la douleur chez les animaux de laboratoire facilitant le développement de modèles pathologiques plus compatibles avec les pathologies humaines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A guide to handling and storing peptides. *Peptides and Immunology*. Mimotopes. PU3-004;1-3.
- Abdulla FA and Smith PA. Nerve injury increases an excitatory action of neuropeptide Y and Y2-agonists on dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*. 1999;89:43-60.
- Acs G, Palkovits M, Blumberg PM. Specific binding of [³H]resiniferatoxin by human and rat preoptic area, locus ceruleus, medial hypothalamus, reticular formation and ventral thalamus membrane preparations. *Life Sciences*. 1996;59:1899-1908.
- Acs G and Blumberg PM. [³H] Resiniferatoxin binding to pig dorsal horn membranes displays positive cooperativity. *Life Sciences*. 1994;55:337-346.
- Aebersold R and Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.
- Altshuler D, et coll. (543 collaborateurs). A map of human genom variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010;467(7319):1061-1073.
- Amadoro G, Pieri M, Ciotti MT, Carunchio I, Canu N, Calissano P, Zona C, Severini C. Substance P provides neuroprotection in cerebellar granule cells through Akt and MAPK/Erk activation: evidence for the involvement of the delayed rectifier potassium current. *Neuropharmacology*. 2007;52(6):1366-1377.
- Anand P and Bley K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British Journal of Anaesthesia*. 2011;107(4):490-502.
- Anderson NL and Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2002;1:845-867.
- Ando R, Watanabe C, Kawamura S, Yonezawa A, Sakurada T. Involvement of spinal NK2 and NMDA receptors in aversive behavior induced by intraarterial injection of capsaicin. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2001;68:105-113.
- Annan RS. Phosphopeptide analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. SmithKline Beecham Pharmaceuticals. 1996.
- Annesi JJ. Changes in depressed mood associated with 10 weeks of moderate cardiovascular exercise in formerly sedentary adults. *Psychological Reports*. 2005;96:855-862.
- Applied Biosystems mTRAQTM Reagents Protocol. Amine-modifying labeling reagents for relative and absolute protein quantitation. Applied Biosystems Life Technologies Corporation. 2009.
- Arai H and Emson PC. Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, neurokinin B and substance P) in rat central nervous system. *Brain Research*. 1986;399(2):240-249.

- Atkinson AJ Jr, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, Oates JA, Peck CC, Schooley RT, Spilker BA, Woodcock J, Zeger SL. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Biomarkers Definitions Working Group. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2001;69:89-95.
- Backmand H, Kaprio J, Kujala U, Sarna S. Influence of physical activity on depression and anxiety of former elite athletes. *International Journal of Sports Medicine*. 2003;24:609-619.
- Baggerman G, Boonen K, Verleyen P, De Loof A, Schoofs L. Peptidomic analysis of the larval *Drosophila melanogaster* central nervous system by two-dimensional capillary liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2005;40(2):250-260.
- Banks SM and Kerns RD. Explaining high rates of depression in chronic pain: a diathesis-stress framework. *Psychological Bulletin*. 1996;119:95-100.
- Bartho L, Benko R, Patacchini R, Petho G, Holzer-Petsche U, Holzer P, Lazar Z, Undi S, Illényi L, Antal A, Horvath OP. Effects of capsaicin on visceral smooth muscle: a valuable tool for sensory neurotransmitter identification. *European Journal of Pharmacology*. 2004;500(1-3):143-157.
- Basbaum AI. Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 1999;24(1):59-67.
- Basbaum A and Jessell T. The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of Neural Science*. 4th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 2000.
- Baumbauer KM, Young EE, Joynes RL. Pain and learning in a spinal system: contradictory outcomes from common origins. *Brain Research Reviews*. 2009;61:124-143.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurosciences : à la découverte du cerveau - Chapitre 12 : Système sensoriel et somatique. Paris : Editions Pradel. 1997.
- Beaudry F. Stability comparison between sample preparation procedures for mass spectrometry-based targeted or shotgun peptidomic analysis. *Analytical Biochemistry*. 2010;407:290-292.
- Beaudry F, Ross A, Lema PP, Vachon P. Pharmacokinetics of vanillin and its effects on mechanical hypersensitivity in a rat model of neuropathic pain. *Phytotherapy Research*. 2010;24 :525-530.
- Beaulieu P. Pharmacologie de la douleur. Les Presses de l' Université de Montréal. 2005.
- Becker GL, Lu Y, Hards K, Strehlow B, Levesque C, Lindberg I, Sandvig K, Bakowsky U, Day R, Garten W, Steinmetzer. Highly Potent Inhibitors of Proprotein Convertase Furin as Potential Drugs for Treatment of Infectious Diseases. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(26):21992-22003.

- Belvisi MG, Miura M, Stretton D, Barnes PJ. Capsazepine as a selective antagonist of capsaicin-induced activation of C-fibres in guinea-pig bronchi. *European Journal of Pharmacology*. 1992;215(2-3):341-344.
- Bennett GJ and Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87-107.
- Bernard JF and Gauriau C. Brainstem and pain: A complementary role with regard to the thalamus? In: the pain system in normal and pathological states: a primer for clinicians. Villanueva L, Dickenson AH, Ollat H (ed). International Association for the Study of Pain, Seattle, Washington, USA. 2004.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 1993;361:315-325.
- Biemann K. Nomenclature for peptide fragment ions (positive-ions). *Methods in Enzymology*. 1990;193:886-887.
- Birchler J, Auger D, Riddle N. In search of the molecular basis of heterosis. *The Plant Cell*. 2003;15:2236-2239.
- Bird GC, Han JS, Adwanikar H, Willis WD, Neugebauer V. Pain-related synaptic plasticity in spinal dorsal horn neurons: role of CGRP. *Molecular Pain*. 2006;2:31.
- Biro T, Brodie C, Modarres S, Lewin NE, Acs P, Blumberg PM. Specific vanilloid responses in C6 rat glioma cells. *Molecular Brain Research*. 1998b;56:89-98.
- Biro T, Maurer M, Modarres S, Lewin NE, Brodie C, Acs G, Acs P, Paus R, Blumberg PM. Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood*. 1998a;91:1332-1340.
- Bair MJ, Robinson RL, Eckert GJ, Stang PE, Croghan TW, Kroenke K. Impact of pain on depression treatment response in primary care. *Psychosomatic Medicine*. 2004;66:17-22.
- Bair MJ, Robinson RL, Katon W, Kroenke K. Depression and pain comorbidity: a literature review. *Archives of Internal Medicine*. 2003;163:2433-2445.
- Bondy B, Baghaia TC, Minova C, Schüle C, Schwarza MJ, Zwanzger P, Rupprecht R, Möllera JH. Substance P serum levels are increased in major depression: preliminary results. *Biological Psychiatry*. 2003;53(6):538-542.
- Bonnel D, Franck J, Mériaux C, Salzet M, Fournier I. Ionic matrices pre-spotted matrix-assisted laser desorption/ionization plates for patient maker following in course of treatment, drug titration, and MALDI mass spectrometry imaging. *Analytical Biochemistry*. 2013;434(1):187-198.
- Bouhassira D. Douleurs : physiologie, physiopathologie et pharmacologie. Chapitre I : Architecture fonctionnelle des systèmes nociceptifs. Nocicepteurs et fibres afférentes primaires. Editions Arnette. France. 2009.

- Boury M. Les protéines, leur hydrolyse, les protéases. *Science et pêche. Bulletin d'information et de documentation de l'institut scientifique et technique des pêches maritimes*. 1960;88:1-9.
- Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*. 1985;13:54-56.
- Branden C and Tooze J. Introduction to protein structures. Editions Garland, 2ème édition. 1999.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain*. 2006;10:287-333.
- Breslin MB, Lindberg I, Benjannet S, Mathis JP, Lazure C, Seidah NG. Differential processing of proenkephalin by prohormone convertases 1(3) and 2 and furin. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(36):27084-27093.
- Brown T. Genomes 3. Garland Science (Ed.), New York. 2006.
- Burgess SE, Gardell LR, Ossipov MH, Malan TP Jr, Vanderah TW, Lai J, Porreca F. Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but not initiate, neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*. 2002;22:5129-5136.
- Callahan JH, Shefcheck KJ, Williams TL, Musser SM. Detection, confirmation, and quantification of Staphylococcal enterotoxin B in food matrixes using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2006;78:1789-1800.
- Calvino B. L'hypersensibilité à la chaleur au cours de l'inflammation : le rôle du récepteur TRPV1. *Erudit*. 2003;19(6-7):649-651.
- Campbell DE, Raftery N, Tustin R, Tustin NB, DeSilvio ML, Cnaan A, Aye PP, Lackner AA, Douglas SD. Measurement of plasma-derived substance P: biological, methodological and statistical considerations. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006;13(11):1197-1203.
- Canas B, Pineiro C, Calvo E, Lopez-Ferrer D, Gallardo JM. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *Journal of Chromatography A*. 2007;1153:235-258.
- Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie AM, Epstein CJ, Basbaum AI. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature*. 1998;392(6674):390-394.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitzi KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000;288(5464):306-313.

- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-824.
- Cech NB and Enke CG. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*. 2001;20(6):362-87.
- Chang WC, Huang LCL, Wang YS, Peng WP, Chang HC, Hsu NY, Chen CH. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mechanism revisited. *Analytica Chimica Acta*. 2007;582(1):1-9.
- Chaouloff F, Kennett GA, Serrurier B, Merino D, Curzon G. Amino acid analysis demonstrates that increased plasma free tryptophan causes the increase of brain tryptophan during exercise in the rat. *Journal of Neurochemistry*. 1986;46:1647-1650.
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*. 1994;53(1):55-63.
- Chappa AK, Cooper JD, Audus KL, Lunte SM. Investigation of the metabolism of substance P at the blood-brain barrier using LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;43(4):1409-1415.
- Chauvin M and Beaulieu P. Pharmacologie des opioïdes. Dans P. Beaulieu (dir.), *Pharmacologie de la douleur*. Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal. 2005:39-77.
- Che FY and Fricker LD. Quantitation of neuropeptides in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2002;74(13):3190-3198.
- Chen JC, Smith ER, Cahill M, Cohen R, Fishman JB. The opioid receptor binding of dezocine, morphine, fentanyl, butorphanol and nalbuphine. *Life Sciences*. 1993;52(4):389-396.
- Chen R, Ma M, Hui L, Zhang J, Li L. Measurement of neuropeptides in Crustacean hemolymph via MALDI mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2009;20:708-718.
- Cho JS, Kim TH, Lim JM, Song JH. Effects of eugenol on Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*. 2008;1243:53-62.
- Chu WT and Zheng QC. Chapter Five – Conformational changes of enzymes and DNA in molecular dynamics: influenced by pH, temperature, and ligand. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2013;92:179-217.
- Clynen E, De Loof A, Schoofs L. The use of peptidomics in endocrine research. *General and Comparative Endocrinology*. 2003;132(1):1-9.

- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. Molecular diversity of K⁺ channels. *Annals of the New-York Academy of Sciences*. 1999;868:233-285.
- Coggeshall RE and Carlton SM. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. *Brain Research Reviews*. 1997;24:28-66.
- Cole RB. Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation & applications. John Wiley & Sons. New York. 1997;6-63.
- Collings BA and Romaschin MA. MS/MS of ions in a low pressure linear ion trap using a pulsed gas. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2009;20(9):1714-1719.
- Collings BA, Stott WR, Londry FA. Resonant excitation in a low-pressure linear ion trap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2003;14:622-634.
- Colpaert FC, Donnerer J, Lembeck F. Effects of capsaicin on inflammation and on the substance P content of nervous tissues in rats with adjuvant arthritis. *Life Sciences*. 1983;32(16):1827-1834.
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine*. 1941;47:200-202.
- Costigan M and Woolf CJ. No dream, no pain. Closing the spinal gate. *Cell*. 2002;108:297-300.
- Creighton TE. Proteins: structures and molecular properties. Editions Freeman, 2ème édition. 1993.
- Cui Y, Jean F, Thomas G, Christian JL. BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *Journal of the European Molecular Biology Organization*. 1998;17:4735-4743.
- Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2003;14:1290-1294.
- Day R, Lazure C, Basak A, Boudreault A, Limperis P, Dong W, Lindberg I. Prodynorphin processing by proprotein convertase 2. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997;273(2):829-836.
- De Araujo JE, Silva RCB, Huston JP, Brandao ML. Anxiogenic effects of substance P and its 7-11 C terminal, but not the 1-7 N terminal, injected into the dorsal periaqueductal gray. *Peptides*. 1999;20:1437-1443.

- de Hoffmann E and Stroobant V. Mass spectrometry: principles and applications. Wiley: England, Third Edition. 2007.
- de Hoffmann ED, Charrette J, Stroobant V. Spectrométrie de masse, cours et exercices corrigés. Editions Dunod. 1999.
- De Hoog CL and Mann M. Proteomics. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2004;5:267-293.
- De Koninck Y. Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Current Opinion in Pharmacology*. 2007;7(1):93-99.
- DeSouza LV, Taylor AM, Li W, Minkoff MS, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KW. Multiple reaction monitoring of mTRAQ-labeled peptides enables absolute quantification of endogenous levels of a potential cancer marker in cancerous and normal endometrial tissues. *Journal of Proteome Research*. 2008;7(8):3525-3534.
- Dickenson AH. Spinal cord pharmacology of pain. *British Journal of Anaesthesia*. 1995;75:193-200.
- Dictionary of Cancer Terms. National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/dictionary/?searchTxt=biomarker>
- Dimitriadou V, Rouleau A, Dam Trung Tuong M, Newlands GJ, Miller HR, Luffau G, Schwartz JC, Garbarg M. Functional relationship between mast cells and C-sensitive nerve fibres evidenced by histamine H3-receptor modulation in rat lung and spleen. *Clinical Science (London:England, 1979)*. 1994;87(2):151-163.
- Docherty K and Steiner DF. Posttranslational proteolysis in polypeptide hormone biosynthesis. *Annual Review of Physiology*. 1982;44:625-685.
- Dole M, Mack LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. Molecular beams of macroions. *The Journal of Chemical Physics*. 1968;49(5):2240-2249.
- Dolisi G. http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_prevention.htm. 2013.
- Dominguez CA, Ström M, Gao T, Zhang L, Olsson T, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Piehl F. Genetic and sex influence on neuropathic pain-like behaviour after spinal cord injury in the rat. *European Journal of Pain*. 2012;16(10):1368-1377.
- Dongre AR, Opiteck G, Cosand WL, Hefta SA. Proteomics in the post-genome age. *Biopolymers*. 2001;60(3):206-211.
- Dray A and Urban L. New pharmacological strategies for pain relief. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1996;36:253-280.
- Dray A and Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends in Neurosciences*. 1993;16(3):99-104.

- Duggan AW, Hope PJ, Jarrott B, Schaible HG, Fleetwood-Walker SM. Release, spread and persistence of immunoreactive neurokinin A in the dorsal horn of the cat following noxious cutaneous stimulation. Studies with antibody microprobes. *Neuroscience*. 1990;35(1):195-202.
- Duggan AW, Hope PJ, Lang CW. Microinjection of neuropeptide Y into the superficial dorsal horn reduces stimulus-evoked release of immunoreactive substance P in the anaesthetized cat. *Neuroscience*. 1991;44:733-740.
- Eckert WA III, Julius D, Basbaum AI. Differential contribution of TRPV1 to thermal responses and tissue injury-induced sensitization of dorsal horn neurons in laminae I and V in the mouse. *Pain*. 2006;126(1-3):184-197.
- Ellinger-Ziegelbauer H, Adler M, Amberg A, Brandenburg A, Callanan JJ, Connor S, Fountoulakis M, Gmuender H, Gruhler A, Hewitt P, Hodson M, Matheis KA, McCarthy D, Raschke M, Riefke B, Schmitt CS, Sieber M, Sposny A, Suter L, Sweatman B, Mally A. The enhanced value of combining conventional and “omics” analyses in early assessment of drug-induced hepatobiliary injury. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011;252:97-111.
- Elliot MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C. Current trends in quantitative proteomics. *Journal of Mass Spectrometry*. 2009;44:1637-1660.
- Ellis JK, Athersuch TJ, Cavill R, Radford R, Slattery C, Jennings P, McMorro T, Ryan MP, Ebbels TM, Keun HC. Metabolic response to low-level toxicant exposure in a novel renal tubule epithelial cell system. *Molecular Biosystems*. 2011;7:247-257.
- Engvall E and Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin-G. *Immunochemistry*. 1971;8(9):871-874.
- Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*. 1992;258(5090):1952-1955.
- Ezan E. Académie de l’Agriculture de France – Séance du 18 juin 2008. CEA, Laboratoire d’étude du métabolisme du médicament, Service de pharmacologie et d’immuno-analyse, Institut de biologie et de technologie de Saclay, France.
- Falick AM, Hines WM, Medzihradzky KF, Baldwin MA, Gibson BW. Low-mass ions produced from peptides by high-energy collision-induced dissociation in tandem mass-spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1993;4:882-893.
- Farmer ME, Locke BZ, Moscicki EK, Dannenberg AL, Larson DB, Radloff LS. Physical activity and depressive symptoms: the NHANES I epidemiologic follow-up study. *American Journal of Epidemiology*. 1988;128:1340-1351.
- Fehder WP, Ho WZ, Campbell DE, Tourtellotte WW, Michaels L, Cutilli JR, Uvaydova M, Douglas SD. Development and evaluation of a chromatographic procedure for partial

- purification of substance P with quantitation by an enzyme immunoassay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1998;5:303-307.
- Feletou M, Galizzi JP, Levens NR. NPY receptors as drug targets for the central regulation of body weight. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*. 2006;5:263-274.
- Fenn JB. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*. 2003;42(33):3871-3894.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.
- Fenn JB, Mann M, Meng KC, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization-principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*. 1990;9(1):37-70.
- Ferland CE, Beaudry F, Vachon P. Antinociceptive effects of eugenol evaluated in a monoiodoacetate-induced osteoarthritis rat model. *Phytotherapy Research*. 2012;26(9):1278-1285.
- Ferland CE, Pailleux F, Vachon P, Beaudry F. Determination of specific neuropeptides modulation time course in a rat model of osteoarthritis pain by liquid chromatography ion trap mass spectrometry. *Neuropeptides*. 2011;45:423-429.
- Fernandez-Rodriguez AM, Prieto J, Quiroga J, Zozoya JM, Andrade A, Nunez M, Sangro B, Penas J. Plasma levels of substance P in liver cirrhosis: relationship to the activation of vasopressor systems and urinary sodium excretion. *Hepathology*. 1995;21(1):35-40.
- Ferris CD and Snyder SH. Inositol phosphate receptors and calcium disposition in the brain. *The Journal of Neuroscience*. 1992;12:1567-1574.
- Fichna J, Janecka A, Costentin J, Do Rego JC. The endomorphin system and its evolving neurophysiological role. *Pharmacological Reviews*. 2007;59:88-123.
- Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5(7):565-575.
- Förster J, Famili I, Fu P, Palsson B, Nielsen J. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Research*. 2003;13(2):244-253.
- Fortin T, Salvador A, Charrier JP, Lenz C, Bettsworth F, Lacoux X, Choquet-Kastylevsky G, Lemoine J. Multiple reaction monitoring cubed for protein quantification at the low nanogram/milliliter level in nondepleted human serum. *Analytical Chemistry*. 2009;81(22):9343-9352.
- Fosang AJ, Last K, Stanton H, Golub SB, Little CB, Brown L, Jackson DC. Neopeptide antibodies against MMP-cleaved and aggrecanase-cleaved aggrecan. *Matrix Metalloproteinase Protocols Methods in Molecular Biology*. 2010;622:305-340.

- Freed AL, Audus KL, Lunte SM. Investigation of the metabolism of substance P at the blood-brain barrier using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*. 2001;22:3778-3784.
- Fricker LD, Lim J, Pan H, Che FY. Peptidomics: identification and quantification of endogenous peptides in neuroendocrine tissues. *Mass Spectrometry Reviews*. 2006;25:327-344.
- Funkelstein L, Beinfeld M, Minokadeh A, Zadina J, Hook V. Unique biological function of cathepsin L in secretory vesicles for biosynthesis of neuropeptides. *Neuropeptides*. 2010;44(6):457-466.
- Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M. Sensory processing and functional reorganization of sensory transmission under pathological conditions in the spinal dorsal horn. *Neuroscience Research*. 2004;48:361-368.
- Gallai V, Sarchielli P, Floridi A, Franceschini M, Codini M, Glioti G, Trequatrini A, Palumbo R. Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally. *Cephalalgia*. 1995;15(5):384-390.
- Gamse R, Petsche U, Lembeck F, Jancso G. Capsaicin applied to the peripheral nerve inhibits axoplasmic transport of substance P and somatostatin. *Brain Research*. 1982;238:447-462.
- Garcia-Hirschfeld J, Lopez-Briones LG, Belmonte C, Valdeolmillos M. Intracellular free calcium responses to protons and capsaicin in cultured trigeminal neurons. *Neuroscience*. 1995;67(1):235-243.
- Gaskell SJ. Electrospray: principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry*. 1997;32(12):677-688.
- Gauthier ML, Douat J, Vachon P, Beaudry F. Characterization of [6]-gingerol metabolism in rat by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2011;25:1150-1158.
- Geppetti P and Holzer P. Neurogenic Inflammation. CRC Press, Boca Raton, FL. 1996.
- Gibbs JL, Diogenes A, Hargreaves KM. Neuropeptide Y modulates effects of bradykinin and prostaglandin E2 on trigeminal nociceptors via activation of the Y1 and Y2 receptors. *British Journal of Pharmacology*. 2007;150(1):72-79.
- Gibbs J, Flores CM, Hargreaves KM. Neuropeptide Y inhibits capsaicin-sensitive nociceptors via a Y1-receptor-mediated mechanism. *Neuroscience*. 2004;125:703-709.
- Gimpl G and Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*. 2001;81(2):629-683.

- Gintzler AR, Schnell SA, Gupta DS, Liu NJ, Wessendorf MW. Relationship of spinal dynorphin neurons to delta-opioid receptors and estrogen receptor alpha: anatomical basis for ovarian sex steroid opioid antinociception. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008;326(3):725-731.
- Goubillon ML, Forsdike RA, Robinson JE, Ciofi P, Caraty A, Herbison AE. Identification of Neurokinin B expressing neurons as a highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology*. 2000;141(11):4218-4225.
- Graves PR and Haystead TAJ. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002;66(1):39-63.
- Griffiths WJ and Wang Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chemical Society Reviews*. 2009;38(7):1882-1896.
- Guénette SA, Ross A, Marier JF, Beaudry F, Vachon P. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *European Journal of Pharmacology*. 2007;562:60-67.
- Guezennec C, Abdelmalki A, Serrurier B, Merino D, Bigard X, Berthelot M, Pierard C, Peres M. Effects of prolonged exercise on brain ammonia and amino acids. *International Journal of Sports Medicine*. 1998;19:323-327.
- Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). 2001. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *European Journal of Neuroscience*. 1999;11:946-958.
- Gygi SP and Aebersold R. Mass spectrometry and proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2000;4(5):489-494.
- Hadjistavropoulos HD, Hadjistavropoulos T, Quine A. Health anxiety moderates the effects of distraction versus attention to pain. *Behaviour Research and Therapy*. 2000;8:425-438.
- Hager JW. A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2002;16:512-526.
- Hall ME, Miley FB, Stewart JM. Modulation of blood pressure by substance P: opposite effects of N- and C-terminal fragments on anesthetized rats. *Life Sciences*. 1987;40:1909-1914.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988;32:77-88.

- Harris FM, Trott GW, Morgan TG, Brenton AG, Kingston EE, Beynon JH. S/N in electron multipliers at low ion currents. *Mass Spectrometry Reviews*. 1984;3:209-229.
- Harrison S and Geppetti P. Substance P. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2001;33(6):555-576.
- Harvey JN. Update on treatment for neuropathic pain. *Journal of Pain and Palliative Care Pharmacotherapy*. 2008;22:54-57.
- Häubl G, Berthiller F, Krska R, Schuhmacher R. Suitability of a fully ¹³C isotope labeled internal standard for the determination of the mycotoxin deoxynivalenol by LC-MS/MS without clean up. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006;384:692-696.
- Hauser KF, Foldes JK, Turbek CS. Dynorphin A (1-13) neurotoxicity in vitro: opioid and non-opioid mechanisms in mouse spinal cord neurons. *Experimental Neurology*. 1999;160(2):361-375.
- Haynes PA, Fripp N, Aebersold R. Identification of gel-separated proteins by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: comparison of methods and their limitations. *Electrophoresis*. 1998;19(6):939-945.
- Heilig M. The NPY system in stress, anxiety and depression. *Neuropeptides*. 2004;38:213-224.
- Helwig M, Vivoli M, Fricker LD, Lindberg I. Regulation of neuropeptide processing enzymes by catecholamines in endocrine cells. *Molecular Pharmacology*. 2011;80(2):304-313.
- Herbert MK and Holzer P. Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2002;37(6):314-325.
- Hogan Q. Animal pain models. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 2002;27(4):385-401.
- Hökfelt T, Pernow B, Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *Journal of Internal Medicine*. 2001;249(1):27-40.
- Hokin LE and Dixon JF. The phosphoinositide signalling system. I. Historical background. II. Effects of lithium on the accumulation of second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate in brain cortex slices. *Progress in Brain Research*. 1993;98:309-315.
- Holleman AF and Wiberg E. Inorganic Chemistry. San Diego: Academic Press. ISBN 0-12-352651-5. 2001.
- Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews*. 1991;43:143-201.
- Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisey DR, Mantyh PW. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience*. 2000;98(3):585-598.

- Hook V, Funkelstein L, Lu D, Bark S, Wegrzyn J, Hwang SR. Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2008;48:393-423.
- Hook VH and Affolter HU. Identification of zymogen and mature forms of human carboxypeptidase H. *FEBS Letters*. 1988;238(2):338-342.
- Hope PJ, Fleetwood-Walker SM, Mitchell R. Distinct antinociceptive actions mediated by different opioid receptors in the region of lamina I and laminae III-V of the dorsal horn of the rat. *British Journal of Pharmacology*. 1990;101(2):477-483.
- Hope PJ, Lang CW, Duggan AW. Persistence of immunoreactive neurokinins in the dorsal horn of barbiturate anaesthetized and spinal cats, following release by tibial nerve stimulation. *Neuroscience Letters*. 1990;118(1):25-28.
- http://fr.wikipedia.org/wiki/Spectrom%C3%A9trie_de_masse#Le_pi.C3.A8ge_ionique_quadr_ipolaire_.28.C2.AB.C2.A0trappe_d.27ions.C2.A0.C2.BB.29. Site internet consulté le 26 juillet 2013.
- http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Definitions. Site internet consulté le 29 juillet 2013.
- http://www.ninds.nih.gov/disorders/peripheralneuropathy/detail_peripheralneuropathy.htm#183593208. Site internet consulté le 29 juillet 2013.
- Hua XY, Saria A, Gamse R, Theodorsson-Norheim E, Brodin E, Lundberg JM. Capsaicin induced release of multiple tachykinins (substance P, neurokinin A and eledoisin-like material) from guinea-pig spinal cord and ureter. *Neuroscience*. 1986;19(1):313-319.
- Igwe OJ, Kim DC, Seybold VS, Larson AA. Specific binding of substance P aminoterminal heptapeptide [SP(1-7)] to mouse brain and spinal cord membranes. *Journal of Neuroscience*. 1990;10(11):3653-3663.
- Iribarne JV and Thomson BA. Evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*. 1976;64(6):2287-2294.
- Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J, Jancso N. Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat sensitive structures by capsaicin in rats. *Journal of Physiology (London)*. 1970;208:449-459.
- Jennings KR. The changing impact of the collision-induced decomposition of ions on mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2000;200:479-493.
- Ji RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R, Hokfelt T. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *The Journal of Neuroscience*. 1995;15(12):8156-8166.

- Jin W, Fuki IV, Seidah NG, Benjannet S, Glick JM, Rader DJ. Proprotein convertases are responsible for proteolysis and inactivation of endothelial lipase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:36551-36559.
- Jmeian Y and El Rassi Z. Liquid-phase-based separation systems for depletion, prefractionation, and enrichment of proteins in biological fluids for in-depth proteomics analysis. *Electrophoresis*. 2009;30:249-261.
- Johanning K, Mathis JP, Lindberg I. Role of PC2 in proenkephalin processing: antisense and overexpression studies. *Journal of Neurochemistry*. 1996;66(3):898-907.
- Johansson O, Hökfelt T, Pernow B, Jeffcoate SL, White N, Steinbusch HWM, Verhofstad AAJ, Emson PC, Spindel E. Immunohistochemical support for three putative transmitters in one neuron: Coexistence of 5-hydroxytryptamine, substance P- and thyrotropin releasing hormone-like immunoreactivity in medullary neurons projecting to the spinal cord. *Neuroscience*. 1981;6(10):1857-1881.
- Juaneda C, Dumont Y, Quirion R. The molecular pharmacology of CGRP and related peptide receptor subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000;21(11):432-438.
- Julius D and Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413:203-210.
- Julka S and Regnier FE. Quantification in proteomics through stable isotope coding: a review. *Journal of Proteome Research*. 2004;3:350-363.
- Kanai Y, Nakazato E, Fujiuchi A, Hara T, Imai A. Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology*. 2005;49: 977-984.
- Kandel ER and Siegelbaum SA. Synaptic Integration. Dans ER Kandel, JH Schwartz, TM Jessell (dir.). *Principle of Neural Science* (4e éd., p. 207-228). USA: McGraw-Hill. 2000b.
- Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H. Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1983;114(2):533-540.
- Karas M and Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*. 1988;60:2299-2301.
- Karas M and Kruger R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chemical Reviews*. 2003;103(2):427-40.
- Karp G. *Cell and molecular biology, concept and experiments*. Editions Willey & Sons. 1996.
- Kawashima Y, Fukutomi T, Tomonaga T, Takahashi H, Nomura F, Maeda T, Kodera Y. High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. *Journal of Proteome Research*. 2010;9:1694-1705.

- Khan GM, Chen SR, Pan HL. Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience*. 2002;114:291-299.
- Keller AF, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Molecular Pain*. 2007;3:27-37.
- Khawaja AM and Rogers DF. Tachykinins: receptor to effector. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1996;28(7):721-738.
- Kieffer BL and Gaveriaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in Neurobiology*. 2002;66(5):285-306.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(24):12048-12052.
- Kiguchi N, Maeda T, Tsuruga M, Yamamoto A, Yamamoto C, Ozaki M, Kishioka S. Involvement of spinal Met-enkephalin in nicotine-induced antinociception in mice. *Brain Research*. 2008;1189:70-77.
- Kim KJ, Yoon YW, Chung JM. Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Experimental Brain Research*. 1997;113(2):200-206.
- King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2000;11(11):942-950.
- Kirkpatrick DS, Gerber SA, Gygi SP. The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods*. 2005;35(3):265-273.
- Kjellqvist S, Maleki S, Olsson T, Chwastyniak M, Branca RMM, Lehtio J, Pinet F, Franco-Cereceda, Eriksson P. A combined proteomic and transcriptomic approach shows diverging molecular mechanisms in thoracic aortic aneurysm development in patients with tricuspid- and bicuspid aortic valve. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2013;12:407-425.
- Knotkova H, Pappagallo M, Szallasi A. Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *The Clinical Journal of Pain*. 2008;24(2):142-154.
- Ko MCH, Willmont KJ, Burritt A, Hrubby VJ, Woods JH. Local inhibitory effects of dynorphin A-(1-17) on capsaicin-induced thermal allodynia in rhesus monkeys. *European Journal of Pharmacology*. 2000;402:69-76.
- Koh YH, Moochhala S, Bhatia M. Activation of neurokinin-1 receptors up-regulates substance P and neurokinin-1 receptor expression in murine pancreatic acinar cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2012;16(7):1582-1592.

- Kosak ST and Groudine M. Gene order and dynamic domains. *Science*. 2004;306(5696):644-647.
- Koshimizu TA and Tsujimoto G. New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: vasopressin and pain perception. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2009;109:33-37.
- Kotani H, Hoshimaru M, Nawa H, Nakanishi S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(18):7074-7078.
- Kuepper U, Musshoff F, Hilger RA, Herbstreit F, Madea B. Pharmacokinetic properties of succinylmonocholine in surgical patients. *Journal of Analytical Toxicology*. 2011;35(5):302-311.
- Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*. 1996;384(6610):644-648.
- Kuzmin A, Madjid N, Terenius L, Ogren SO, Bakalkin G. Big dynorphin, a prodynorphin-derived peptide produces NMDA receptor-mediated effects on memory, anxiolytic-like and locomotor behavior in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(9):1928-1937.
- LaBaer J. So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue). *Journal of Proteome Research*. 2005;4:1053-1059.
- Labombarda F, Coronel MF, Villar MJ, Nicola AF, Gonzalez SL. Neuropathic pain and temporal expression of preprodynorphin, protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptor subunits after spinal cord injury. *Neuroscience Letters*. 2008;447(2-3):115-119.
- Ladokhin AS. Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Ed. RA Meyers. John Wiley & sons, NY. 2000;5762-5779.
- Lagakos SW and Hoth DF. Surrogate markers in AIDS: where are we? Where are we going? *Annals of Internal Medicine*. 1992;116:599-601.
- Lai JP, Douglas SD, Ho WZ. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *Journal of Neuroimmunology*. 1998;86:80-86.
- Lai J, Hunter JC, Porreca F. The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Current Opinion in Neurobiology*. 2003;13(3):291-297.
- Lai J, Luo MC, Chen Q, Ma S, Gardell LR, Ossipov MH, Porreca F. Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nature Neuroscience*. 2006;9(12):1534-1540.

- Lai J, Ossipov MH, Vanderah TW, Malan TP Jr, Porreca F. Neuropathic pain: the paradox of dynorphin. *Molecular Interventions*. 2001;1(3):160-167.
- Laird JMA, Olivar T, Roza C, De Felipe C, Hunt SP, Cervero F. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene. *Neuroscience*. 2000;98(2):345-352.
- Lamoureux F, Mestre E, Essig M, Sauvage FL, Marquet P, Gastinel LN. Quantitative proteomic analysis of cyclosporine-induced toxicity in a human kidney cell line and comparison with tacrolimus. *Journal of Proteomics*. 2011;75:677-694.
- Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Use of a structural analogue versus a stable isotope labeled internal standard for the quantification of angiotensin IV in rat brain dialysates using nano-liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007;21:1187-1195.
- Lathan PW. Therapeutic peptides revisited. *Nature Biotechnology*. 1999;17:755-757.
- Lebert D, Dupuis A, Garin J, Bruley C, Brun V. Production and use of stable isotope-labeled proteins for absolute quantitative proteomics. *Methods in Molecular Biology*. 2011;753:93-115.
- Le Bihan T, Goh T, Stewart II, Salter AM, Bukhman YV, Dharsee M, Ewing R, Wisniewski JR. Differential analysis of membrane proteins in mouse fore- and hindbrain using a label-free approach. *Journal of Proteome Research*. 2006;5:2701-2710.
- Lecci A, Giuliani S, Tramontana M, Carini F, Maggi CA. Peripheral actions of tachykinins. *Neuropeptides*. 2000;34(5):303-313.
- Lee MH, Yeon KY, Park CK, Li HY, Fang Z, Kim MS, Choi SY, Lee SJ, Lee S, Park μ K, Lee JH, Kim JS, Oh SB. Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. *Journal of Dental Research*. 2005;84:848-851.
- Lesur A, Varesio E, Hopfgartner G. Protein quantification by MALDI-selected reaction monitoring mass spectrometry using sulfonate derivatized peptides. *Analytical Chemistry*. 2010;82(12):5227-5237.
- Levine JD, Fields HL, Basbaum AI. Peptides and the primary afferent nociceptor. *The Journal of Neuroscience*. 1993;13(6):2273-2286.
- Levine M and Tjian R. Transcription regulation and animal diversity. *Nature*. 2003;424:147-151.
- Li L, Gao X, Zhao J, Ji X, Wei H, Luo Y. Plasma and cerebrospinal fluid substance P in post-stroke patients with depression. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 2009;63:298-304.

- Lin Q, Li D, Xu X, Zou X, Fang L. Roles of TRPV1 and neuropeptidergic receptors in dorsal root reflex-mediated neurogenic inflammation induced by intradermal injection of capsaicin. *Molecular Pain*. 2007b;3:30.
- Lionnet L, Beaudry F, Vachon P. Intrathecal eugenol administration alleviates neuropathic pain in male sprague-dawley rats. *Phytotherapy Research*. 2010;24:1645-1653.
- Liu H, Mantyh PW, Basbaum AI. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature*. 1997;386(6626):721-724.
- Liu X, Ning X, Zhang Y, Chen W, Zhao Z, Zhang Q. Peptidomic Analysis of the Brain and Corpora Cardiaca-Corpora Allata Complex in the Bombyx mori. *International Journal of Peptides*. 2012; doi: 10.1155/2012/640359.
- Liu X, Zhou JL, Chung K, Chung JM. Ion channels associated with the ectopic discharges generated after segmental spinal nerve injury in the rat. *Brain Research*. 2001;900:119-127.
- Loboda A, Krutchinsky A, Loboda O, McNabb J, Spicer V, Ens W, Standing K. Novel LINAC II electrode geometry to create an axial field in a multipole ion guide. *European Journal of Mass Spectrometry*. 2000;6:531-536.
- Loboda AV, Krutchinsky AN, Bromirski M, Ens W, Standing KG. A tandem quadrupole/time-of-flight mass spectrometer with a matrix-assisted laser desorption/ionization source: design and performance. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2000;14:1047-1057.
- Loh YP, Brownstein MJ, Gainer H. Proteolysis in neuropeptide processing and other neural functions. *Annual Review of Neuroscience*. 1984;7:189-222.
- Lundberg JM. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids, and nitric oxide. *Pharmacological Reviews*. 1996;48:113-177.
- Lundy FT and Linden GJ. Neuropeptides and Neurogenic Mechanisms in Oral and Periodontal Inflammation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2004;15(2):82-98.
- Ma M, Wang J, Chen R, Li L. Expanding the Crustacean neuropeptidome using a multifaceted mass spectrometric approach. *Journal of Proteome Research*. 2009;8:2426-2437.
- MacDonald MR, McCourt DW, Krause JE. Posttranslational processing of α -, β - and γ -preprotachykinins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(29):15176-15183.
- Maggi CA. Principles of tachykininergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. *Regulatory Peptides*. 2000;93(1-3):53-64.
- Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *General Pharmacology*. 1995;26(5):911-944.

- Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical Chemistry*. 2000;72:1156-1162.
- Makarov A. Resonance ejection from the Paul trap: a theoretical treatment incorporating a weak octapole field. *Analytical Chemistry*. 1996;68:4257-4263.
- Makarov A, Denisov E, Kholomeev A, Balschun W, Lange O, Strupat K, Hoving S. Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*. 2006;78(7):2113-2120.
- Makarov A, Denisov E, Lange O, Hoving S. Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2006;17(7):977-982.
- Malcangio M, Ramer MS, Jones MG, McMahon SB. Abnormal substance P release from the spinal cord following injury to primary sensory neurons. *European Journal of Neuroscience*. 2000;12(1):397-399.
- Malmberg AB and Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain*. 1998;76(1-2):215-222.
- Malmberg AB and Yaksh TL. Capsaicin-evoked prostaglandin E2 release in spinal cord slices: relative effect of cyclooxygenase inhibitors. *European Journal of Pharmacology*. 1994;271:293-299.
- Maloine E. Douleurs, bases fondamentales, pharmacologie, douleurs aiguës, douleurs chroniques, thérapeutiques. Neurotransmetteurs et neuromodulateurs de la douleur au niveau spinal. Editions Aigues. 1997.
- Mamyurin BA, Karataev VI, Shmikk DV, Zagulin VA. The mass-reflectron, a new non-magnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Soviet Physics – Journal of Experimental and Theoretical Physics*. 1973;64:82-89.
- Mantyh PW. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2002;63(suppl.11):6-10.
- Mantyh PW and Yaksh TL. Sensory neurons are PARTIAL to pain. *Nature Medicine*. 2001;7(7):772-773.
- Mantyh PW, Rogers SD, Honore P, Allen BJ, Ghilardi JR, Li J, Daughters RS, Lappi DA, Wiley RG, Simone DA. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science*. 1997;278:275-279.
- March RE. Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2000;200(1-3):285-312.
- Marchand S. Neurophysiologie de la douleur. Dans P. Beaulieu (dir.), *Pharmacologie de la douleur* (p. 3-37). Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal. 2005;23.

- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Zadina JE. Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin-2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *Journal of Comparative Neurology*. 1999;405:450-471.
- Martling CR, Theodorsson-Norheim E, Norheim I, Lundberg JM. Bronchoconstrictor and hypotensive effects in relation to pharmacokinetics of tachykinins in the guinea-pig-evidence for extraneuronal cleavage of neuropeptide K to neurokinin A. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1987;336(2):183-189.
- Marvizon JC, Chen W, Murphy N. Enkephalins, dynorphins, and betaendorphin in the rat dorsal horn: an immunofluorescence colocalization study. *Journal of Comparative Neurology*. 2009;517:51-68.
- Maston G, Evans S, Green M. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2006;1:29-59.
- Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KR, Pollack GM. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy*. 2001;21:778-796.
- Mathis J and Lindberg I. Posttranslational processing of proenkephalin in AtT-20 cells: evidence for cleavage at a Lys-Lys site. *Endocrinology*. 1992;131(5):2287-2296.
- Mayer G and Hudrisier D. Immunologie – Chapitre sept – Immunoglobines : réactions antigène-anticorps et tests expérimentaux pour la détection de ces réactions. Jeffrey Nelson, Rush University, Chicago, Illinois and The MicrobeLibrary. 2012 ;67-74.
- McCracken LM. Learning to live with chronic pain: acceptance of pain predicts adjustment in persons with chronic pain. *Pain*. 1998;74(1):21-27.
- McCracken LM and Eccleston C. Coping or acceptance: what to do about chronic pain? *Pain*. 2003;105:197-204.
- McFadden WH. Techniques of GC/MS. Wiley-Interscience. New-York. 1973
- McLuckey SA. Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1992;3:599-614.
- Melzack R and Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 1965;150(699):971-979.
- Mendell LM. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Experimental Neurology*. 1966;16(3):316-332.
- Merg F, Filliol D, Usynin I, Bazov I, Bark N, Hurd YL, Yakovleva T, Kieffer BL, Bakalkin G. Big dynorphin as a putative endogenous ligand for the kappa-opioid receptor. *Journal of Neurochemistry*. 2006;97(1):292-301.
- Michael-Titus AT, Blackburn D, Connolly Y, Priestley JV, Whelpton R. N- and C-terminal substance P fragments: differential effects on striatal [³H]substance P binding and NK1 receptor internalization. *Neuroreport*. 1999;10(10):2209-2213.

- Miller MS, Buck SH, Sipes IG, Yamamura HI, Burks TF. Regulation of substance P by nerve growth factor: Disruption by capsaicin. *Brain Research*. 1982;250:193-196.
- Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Chung JM, Devor M. Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain*. 1999;80(1-2):67-82.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Letters*. 1994;341(1):33-38.
- Morera E, Petrocellis LD, Morera L, Moriello AS, Nalli M, Marzo VD, Ortar G. Synthesis and biological evaluation of [6]-gingerol analogues as transient receptor potential channel TRPV1 and TRPA1 modulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012;22:1674-1677.
- Moreira TH, Cruz JS, Weinreich D. Angiotensin II increases excitability and inhibits a transient potassium current in vagal primary sensory neurons. *Neuropeptides*. 2009;43(3):193-199.
- Moron JA and Devi LA. Use of proteomics for the identification of novel drug targets in brain diseases. *Journal of Neurochemistry*. 2007;102:306-315.
- Moussaoui SM, Le Prado N, Bonici B, Faucher DC, Cuine F, Laduron PM, Garret C. Distribution of neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: comparison with neurokinin A and substance P and effects of neonatal capsaicin treatment. *Neuroscience*. 1992;48(4):969-978.
- Myöhänen TT, Venäläinen JI, Garcia-Horsman JA, Männistö PT. Spatial association of prolyl oligopeptidase, inositol 1,4,5-triphosphate type 1 receptor, substance P and its neurokinin-1 receptor in the rat brain: an immunohistochemical colocalization study. *Neuroscience*. 2008;153:1177-1189.
- Nadel JA and Borson DB. Modulation of neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. *The American Review of Respiratory Disease*. 1991;143(3 Pt 2):S33-36.
- Nakanishi S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulation. *Physiological Reviews*. 1987;67(4):1117-1142.
- Naranjo JR, Arnedo A, De Felipe MC, Del Rio J. Antinociceptive and Met-enkephalin releasing effects of tachykinins and substance P fragments. *Peptides*. 1986;7(3):419-423.
- Naveilhan P, Hassani H, Lucas G, Blakeman KH, Hao JX, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Thoren P, Ernfors P. Reduced antinociception and plasma extravasation in mice lacking a neuropeptide Y receptor. *Nature*. 2001b;409:513-517.
- Navez M, Laurent B, Nayme P. Bases physiologiques de la douleur. *Journal de Réadaptation Médicale*. 1997;17(3):86-92.

- Nelson EK. The constitution of capsaicin - the pungent principle of capsicum. *Journal of the American Chemical Society*. 1919;41:1115-1117.
- Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2002;1:153-161.
- Nolte WM, Tagore DM, Lane WS, Saghatelian A. Peptidomics of prolyl endopeptidase in the central nervous system. *Biochemistry*. 2009;48(50):11971-11981.
- Nordhoff E, Lehrach H, Gobom J. Exploring the limits and losses in MALDI sample preparation of attomole amounts of peptide mixtures. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2007;268(2-3):139-146.
- O'Reilly A. la dépression et l'anxiété dans la douleur chronique : une revue de travaux. *Journal de Thérapie Comportementale et Cognitive*. 2011;21:126-131.
- O'Shaughnessy MC, Vetsika EK, Inglis JJ, Carleson J, Haigh R, Kidd BL, Winyard PG. The effect of substance P on nitric oxide release in a rheumatoid arthritis model. *Inflammation Research*. 2006;55(6):236-240.
- Ocana M, Cendan CM, Cobos EJ, Entrena JM, Baeyens JM. Potassium channels and pain: present realities and futur opportunities. *European Journal of Pharmacology*. 2004;500:203-219.
- Ohkubo T and Shibata M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *Journal of Dental Research*. 1997;76:848-851.
- Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nature Methods*. 2007;4(9):709-712.
- Olthoff JK, Lys IA, Cotter RJ. A pulsed time-of-flight mass spectrometer for liquid secondary ion mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1988;2:171-175.
- Ong SE and Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nature Chemical Biology*. 2005;1:252-262.
- Ong SE, Foster L, Mann M. Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*. 2003;29(2):124-130.
- Otsuka M and Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiological Reviews*. 1993;73(2):229-308.
- Otsuka K, Niimi A, Matsumoto H, Ito I, Yamaguchi M, Matsuoka H, Jinnai M, Oguma T, Takeda T, Nakaji H, Chin K, Sasaki K, Aoyama N, Mishima M. Plasma substance P levels in patients with persistent cough. *Respiration*. 2011;82(5):431-438.

- Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, Manyonda IT, Lowry PJ. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature*. 2000;405(6788):797-800.
- Pailleux F and Beaudry F. Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2012;26(8):881-891.
- Pailleux F, Vachon P, Lemoine J, Beurdy F. Targeted liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry analysis of tachykinin related peptides reveals significant expression differences in a rat model of neuropathic pain. *Neuropeptides*. 2013;47(4):261-271.
- Park CE, Akhtar M, Rayman MK. Nonspecific reactions of a commercial enzymelinked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(8):2509-2512.
- Park SJ, Song JS, Kim HJ. Dansylation of tryptic peptides for increased sequence coverage in protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric peptide mass fingerprinting. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005;19:3089-3096.
- Patacchini R, Maggi CA, Holzer P. Tachykinin autoreceptors in the gut. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000;21(5):166.
- Paul W and Steinwedel H. Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *RZeitschrift für Naturforschung A*. 1953;8(7):448-450.
- Pauling L, Corey RB, Branson HR. The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1951;37:205-211.
- Paulson L, Persson R, Karlsson G, Silberring J, Bierczynska-Krzysik A, Ekman R, Westman-Brinkmalm A. Proteomics and peptidomics in neuroscience: experience of capabilities and limitations in a neurochemical laboratory. *Journal of Mass Spectrometry*. 2005;40:202-213.
- Pedrazzini T, Pralong F, Grouzmann E. Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003;60:350-377.
- Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sciences*. 2004;74(12):1445-1463.
- Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, Winget M, Yasui Y. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *Journal of the National Cancer Institut*. 2001;93(14):1054-1061.
- Perone MJ and Castro MG. Prohormone and proneuropeptide synthesis and secretion. *Histology and Histopathology*. 1997;12(4):1179-1188.

- Petrotchenko EV, Pasek D, Elms P, Dokholyan NV, Meissner G, Borchers CH. Combining fluorescence detection and mass spectrometric analysis for comprehensive and quantitative analysis of redox-sensitive cysteines. *Analytical Chemistry*. 2006;78:7959-7966.
- Picavet HSJ, Vlaeyen JWS, Schouten JSAG. Pain catastrophizing and kinesiophobia: predictors of chronic low back pain. *American Journal of Epidemiology*. 2002;156:1028-1034.
- Pierce TL and Wessendorf MW. Immunocytochemical mapping of endomorphin-2-immunoreactivity in rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2000;18:181-207.
- Pinho D, Morato M, Couto MR, Marques-Lopes J, Tavares I, Albino-Teixeira A. Does chronic pain alter the normal interaction between cardiovascular and pain regulatory systems? Pain modulation in the hypertensive-monoarthritic rat. *The Journal of Pain*. 2011;12(2):194-204.
- Porreca F. Nociceptors, the spinal dorsal horn and descending modulation. Dans J. Mogil (dir.). Pain. An updated review: refresher course syllabus. Seattle: IASP Press. 2010;3-12.
- Porreca F, Burgess SE, Gardell LR, Vanderah TW, Malan TP Jr, Ossipov MH, Lappi DA, Lai J. Inhibition of neuropathic pain by selective ablation of brainstem medullary cells expressing the mu-opioid receptor. *Journal of Neuroscience*. 2001;21:5281-5288.
- Predel R, Russell WK, Russell DH, Suh CPC, Nachman RJ. Neuropeptides of the cotton fleahopper, *Pseudatomoscelis seriatus* (Reuter). *Peptides*. 2012;34(1):39-43.
- Principles and practice of bioanalysis. Second Edition. CRC Press. Venn RF. 2008.
- Quartara L and Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor. Part II: distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides*. 1998;32(1):1-49.
- Rainville P, Bushnell MC, Duncan GH. Representation of acute and persistent pain in the human CNS: potential implications for chemical intolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;933:130-141.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Rang and Dale's Pharmacology. (6e éd.). Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier. 2007.
- Reisner L. Antidepressants for chronic neuropathic pain. *Current Pain and Headache Reports*. 2003;7(1):24-33.
- Richter R and Oehme P. Effect of substance P sequences on isolated neurons of *Lymnaea stagnalis*. *Biomedica Biochimica Acta*. 1983;42(1):73-81.
- Rissler K. Sample preparation, high-performance liquid chromatographic separation and determination of substance P-related peptides. *Journal of Chromatography B*. 1995;665:233-270.

- Riviere PJ. Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain. *British Journal of Pharmacology*. 2004;141(8):1331-1334.
- Roepstorff P and Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*. 1984;11(11):601.
- Rogeberg M, Malerod H, Roberg-Larsen H, Aass C, Wilson SR. On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.006>.
- Rolan P. The contribution of clinical pharmacology surrogates and models to drug development: a critical appraisal. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1997;44:219-225.
- Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin DJ. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2004;3(12):1154-1169.
- Rosset R, Claude M, Jardy A. Chromatographie en phase liquide et supercritique. Editions Lavoisier. 1991.
- Rowbotham DJ and Macintyre PE. Clinical pain management - Acute pain. Molecular mechanisms of nociception. Editions London, Arnold Publishers. 2003.
- Rusin KI, Ryu PD, Randic M. Modulation of excitatory amino acid responses in rat dorsal horn neurons by tachykinins. *Journal of Neurophysiology*. 1992;68(1):265-286.
- Ryu PD, Gerber G, Murase K, Randic M. Actions of calcitonin gene-related peptide on rat spinal dorsal horn neurons. *Brain Research*. 1988;441(1-2):357-361.
- Sakurada C, Watanabe C, Sakurada S, Tan-No K, Sakurada T. Major metabolites of substance P degraded by spinal synaptic membranes antagonize the behavioral response to substance P in rats. *Journal of Pharmaceutical Science*. 1999;88(11):1127-1132.
- Salvador A. Cours d'analyse d'échantillons complexes, traitement d'échantillons, couplages. Master Analyse et Contrôle Physicochimiques. 2009.
- Sasamura T, Sasaki M, Tohda C, Kuraishi Y. Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport*. 1998;9:2045-2048.
- Schaible HG and Richter F. Pathophysiology of pain. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2004;389(4):237-243.
- Schrader M and Schulz-Knappe P. Peptidomics technologies for human body fluids. *Trends in Biotechnology*. 2001;19(10 Suppl.):S55-60.

- Schreff M, Schulz S, Wiborny D, Hollt V. Immunofluorescent identification of endomorphin-2-containing nerve fibers and terminals in the rat brain and spinal cord. *Neuroreport*. 1998;9:1031-1034.
- Schulz-Knappe P, Zucht HD, Heine G, Jürgens M, Hess R, Schrader M. Peptidomics: the comprehensive analysis of peptides in complex biological mixtures. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2001;4(2):207-217.
- Schwartz JC, Senko MW, Syka JE. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society in Mass Spectrometry*. 2002;13:659-669.
- Scigelova M and Makarov A. Orbitrap mass analyzer-overview and applications in proteomics. *Proteomics*. 2006;6(Suppl 2):16-21.
- Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nassoury N, Poirier S, Essalmani R, Prat A. The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2008;40:1111-1125.
- Seminowicz DA, Laferriere AL, Millecamps M, Yu JSC, Coderre TJ, Bushnell CM. MRI structural brain changes associated with sensory and emotional function in a rat model of long-term neuropathic pain. *NeuroImage*. 2009;47:1007-1114.
- Sendur P, Ceranowicz P, Sendur R, Cieszkowski J, Warzecha Z, Dembiński A. Involvement of endogenous tachykinins in the development of jejunal mucosa injury induced by on-steroidal anti-inflammatory drugs. *Przegląd Lekarski*. 2013;70(2):48-52.
- Seybold VS. The role of peptides in central sensitization. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2009;194:451-491.
- Shang YX, Cai XX, HanXH, Zhao SQ, Kong SQ, Wei KL. Change of neurokinin A plasma level in asthmatic children. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2003;41(6):457-459.
- Sharif Naeini R, Cahill CM, Ribeiro-da-Silva A, Menard HA, Henry JL. Remodelling of spinal nociceptive mechanisms in an animal model of monoarthritis. *European Journal of Neuroscience*. 2005;22: 2005-2015.
- Shortland P, Kinman E, Molander C. Sprouting of A-fibre primary afferents into lamina II in two rat models of neuropathic pain. *European Journal of Pain*. 1997;1:215-227.
- Shukla AK and Futrell JH. Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. *Journal of Mass Spectrometry*. 2000;35:1069-1090.
- Silvestri E, Lombardi A, de Lange P, Glinni D, Senese R, Cioffi F, Lanni A, Goglia F, Moreno M. Studies of complex biological systems with applications to molecular medicine: the need to integrate transcriptomic and proteomic approaches. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;2011: doi:10.1155/2011/810242.

- Simone DA, Sorkin LS, Oh U, Chung JM, Owens C, LaMotte RH, Willis WD. Neurogenic hyperalgesia: central neural correlates in responses of spinothalamic tract neurons. *Journal of Neurophysiology*. 1991;66(1):228-246.
- Sindrup SH and Jensen TS. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain*. 1999;83(3):389-400.
- Skilling SR, Smullin DH, Larson AA. Differential effects of C- and N-terminal substance P metabolites on the release of amino acid neurotransmitters from the spinal cord: potential role in nociception. *Journal of Neuroscience*. 1990;10(4):1309-1318.
- Smith MT, Vermeulen R, Li G, Zhang L, Lan Q, Hubbard AE, Forrest MS, McHale C, Zhao X, Gunn L, Shen M, Rappaport SM, Yin S, Chanock S, Rothman N. Use of 'Omic' technologies to study humans exposed to benzene. *Chemico-Biological Interactions*. 2005;153-154:123-127.
- Soares S, Franco C, Pires E, Ventosa M, Plhinhas R, Koci K, de Almeida AM, Coelho AV. Mass spectrometry and animal science: protein identification strategies and particularities of farm animal species. *Journal of Proteomics*. 2012;75:4190-4206.
- Soreide K. Receiver-operating characteristic curve analysis in diagnostic, prognostic and predictive biomarker research. *Journal of Clinical Pathology*. 2009;62:1-5.
- Sorkin LS and McAdoo DJ. Amino acids and serotonin are released into the lumbar spinal cord of the anesthetized cat following intradermal capsaicin injections. *Brain Research*. 1993;607(1-2):89-98.
- Souza AP, Sobrinho DB, Almeida JF, Alves GM, Macedo LM, Porto JE, Vêncio EF, Colugnati DB, Santos RA, Ferreira AJ, Mendes EP, Castro CH. Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. *Clinical Science*. 2013;125(9):449-459.
- Spicher CJ, Ribordy F, Mathis F, Desfoux N, Schönenweid F, Rouiller EM. L'allodynie mécanique masque une hypoesthésie : observations topographiques de 23 patients douloureux neuropathiques chroniques. *Douleur et Analgésie*. 2008 ;21:239-251.
- Spitznagel H, Baulmann J, Blume A, Unger T, Culman J. C-fos expression in the rat brain in response to substance P and neurokinin B. *Brain Research*. 2001;916(1-2):11-21.
- Stafford JGC, Kelley PE, Syka JEP, Reynolds WE, Todd JFJ. Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 1984;60(1):85-98.
- Stahnke H, Kittlaus S, Kempe G, Hemmerling C, Aldera L. The influence of electrospray ion source design on matrix effects. *Journal of Mass Spectrometry*. 2012;47(7):875-884.
- Statistics Canada Health Indicators. <http://www.statcan.ca/english/freepub/82-221-XIE/01002/toc.htm>. Version current at November 20, 2008.

- Steen H and Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004;5:699-711.
- Steen KH, Reeh PW, Anton F, Handwerker HO. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptor in rat skin, *in vitro*. *Journal of Neuroscience*. 1992;12(1):86-95.
- Stein C, Machelska H, Schäfer M. Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2001;60(6):416-424.
- Sullivan M, Thorn B, Haythornthwaite J, Keefe F, Martin M, Bradley LA, Lefebvre JC. Theoretical perspectives on the relation between catastrophizing and pain. *The Clinical Journal of Pain*. 2001;17:52-64.
- Sun RQ, Tu YJ, Lawand NB, Yan JY, Lin Q, Willis WD. Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *Journal of Neurophysiology*. 2004;92:2859-2866.
- Sun H, Zhang A, Yan G, Piao C, Li W, Sun C, Wu X, Li X, Chen Y, Wang X. Metabolomic analysis of key regulatory metabolites in hepatitis C virus-infected tree shrews. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2013;12(3):710-719.
- Supelco, Sigma-Aldrich. Guide to Solid Phase Extraction. 1998;Bulletin 910:1-12.T197910.
- Supuran CT, Scozzafava A, Clare BW. Bacterial protease inhibitors. *Medicinal Research Reviews*. 2002;22(4):329-372.
- Szallasi A. Autoradiographic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species, including man. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1995;155 (Suppl. 629):1-68.
- Szallasi A and Blumberg PM. [³H]resiniferatoxin binding by the vanilloid receptor: species-related differences, effects of temperature and sulfhydryl reagents. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1993;347:84-91.
- Szallasi A and Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacology Review*. 1999;51(2):159-212.
- Szallasi A, Blumberg PM, Nilsson S, Hokfelt T, Lundberg JM. Visualization by [³H]resiniferatoxin autoradiography of capsaicin-sensitive neurons in the rat, pig and man. *European Journal of Pharmacology*. 1994;264:217-221.
- Szolcsanyi J, Joo F, Jancso-Gabor A. Mitochondrial changes in preoptic neurons after capsaicin desensitization of the hypothalamic thermodetectors in rats. *Nature*. 1971;299:116-117.
- Taiwo OB and Taylor BK. Antihyperalgesic effects of intrathecal neuropeptide Y during inflammation are mediated by Y1 receptors. *Pain*. 2002;96:353-363.

- Takeda Y and Krause JE. Neuropeptide K potently stimulates salivary gland secretion and potentiates substance P-induced salivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86:392-396.
- Takeda Y, Takeda J, Smart BM, Krause JE. Regional distribution of neuropeptide gamma and other tachykinin peptides derived from the substance P gene in the rat. *Regulatory Peptides*. 1990;28(3):323-333.
- Tamvakopoulos C. Mass spectrometry for the quantification of bioactive peptides in biological fluids. *Mass Spectrometry Reviews*. 2007;26(3):389-402.
- Tan-No K, Takahashi H, Nakagawasai O, Niijima F, Sato T, Satoh S, Sakurada S, Marinova Z, Yakovleva T, Bakalkin G, Terenius L, Tadano T. Pronociceptive role of dynorphins in uninjured animals: N-ethylmaleimide-induced nociceptive behavior mediated through inhibition of dynorphin degradation. *Pain*. 2005;113(3):301-309.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1988;2(20):151-153.
- Tang HB, Li YS, Miyano K, Nakata Y. Phosphorylation of TRPV1 by neurokinin-1 receptor agonist exaggerates the capsaicin-mediated substance P release from cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology*. 2008;55:1405-1411.
- Tatemoto K, Lundberg JM, Jornvall H, Mutt, V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1985;128:947-953.
- Taylor BS, Pal M, Yu JJ, Laxman B, Kalyana-Sundararri S, Zhao R, Menon A, Wei JT, Nesvizhskii AI, Ghosh D, Omenn GS, Lubman DM, Chinnaiyan AM, Sreekumar A. Humoral response profiling reveals pathways to prostate cancer progression. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2008;7(3):600-611.
- Taylor G. Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*. 1964;280(1382):383-397.
- Taylor DCM, Pierau Fr-K, Szolcsanyi J. Long-lasting inhibition of horseradish peroxidase (HRP) transport in sensory nerves induced by capsaicin pretreatment of the receptive field. *Brain Research*. 1984;298:45-49.
- Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, Neumann T, Johnstone R, Mohammed AK, Hamon C. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*. 2003;75(8):1895-1904.
- Thresh LT. Isolation of capsaicin. *The Pharmaceutical Journal*. 1846;6:941.
- Tillement JP and Albengres E. The pharmacologic basis of pain treatment. *Therapie*. 2001;56(6):687-696.

- Toledano M, Aguilera FS, Yamauti M, Ruiz-Requenac ME, Osorio R. In vitro load-induced dentin collagen-stabilization against MMPs degradation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm>.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998;21:531-543.
- Toth A, Blumberg PM, Boczan J. Chapter 15: Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitamins & Hormones*. 2009;81:389-419.
- Trafton JA, Abbadie C, Marchand S, Mantyh PW, Basbaum AI. Spinal opioid analgesia: how critical is the regulation of substance P signaling? *The Journal of Neuroscience*. 1999;19(21):9642-9653.
- Trafton JA, Abbadie C, Basbaum AI. Differential Contribution of substance P and neurokinin A to spinal cord neurokinin-1 receptor signaling in the rat. *The Journal of Neuroscience*. 2001;21(10):3656-3664.
- Trivin F and Le Bricon T. New electrophoresis techniques applied to protein and DNA analysis. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 2003;18(1):11-22.
- Trushina E and Mielke MM. Recent advances in the application of metabolomics to Alzheimer's Disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.06.014>.
- Tsikis D and Suchy MT. Assessment of urinary F2-isoprostanes in experimental and clinical studies: mass spectrometry versus ELISA. *Journal of the American Heart Association*. 2012; doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.199315.
- Tsuchida K, Shigemoto R, Yokota Y, Nakanishi S. Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. *European Journal of Biochemistry*. 1990;193(3):751-757.
- Tuchscherer MM, Knox C, Seybold VS. Substance P and cholecystokinin-like immunoreactive varicosities in somatosensory and autonomic regions of the rat spinal cord: a quantitative study of coexistence. *The Journal of Neuroscience*. 1987;7:3984-3995.
- Turk DC and Okifuji A. Pain terms and taxonomies. Dans Loeser D, Butler SH, Chapman JJ, Turk DC, Bonica's management of pain (3e édition). New York: Lippincott Williams & Wilkins. 2001;18-25.
- Urban L and Dray A. Capsazepine, a novel capsaicin antagonist, selectively antagonises the effects of capsaicin in the mouse spinal cord *in vitro*. *Neuroscience Letters*. 1991;16:134(1):9-11.

- Vachon P, Masse R, Gibbs BF. Substance P and neurotensin are upregulated in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic pain. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2004;68:86-92.
- Vachon P, Millecamps M, Low L, Thompson SJ, Pailleux F, Beaudry F, Bushnell CM, Stone LS. Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain. *Behavioral and Brain Functions*. 2013; 9:22-30.
- Valentino KL, Tatemoto K, Hunter J, Barchas JD. Distribution of neuropeptide K-immunoreactivity in the rat central nervous system. *Peptides*. 1986;7(6):1043-1059.
- Valtschanoff JG, Rustioni A, Guo A, Hwang SJ. Vanilloid receptor VR1 is both presynaptic and postsynaptic in the superficial laminae of the rat dorsal horn. *Journal of Comparative Neurology*. 2001;436:225-35.
- Van Der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *European Journal of Biochemistry*. 2004;271:1827-1834.
- Van Weemen BK and Schuurs AHW. Immunoassay using hapten-enzyme conjugates. *FEBS Letters*. 1972;24(1):77-81.
- Vandenbroek I, Sparidans RW, Schellens JH, Beijnen JH. Quantitative assay for six potential breast cancer biomarker peptides in human serum by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2010;878 :590-602.
- Vandenbrouck Y, Garin J, Jaquinod M, Bruley C. Protéomique : analyse des données issues des spectromètres de masse. *Biofutur*. 2008;250:29-31.
- Vane JR and Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The American Journal of Medicine*. 1998;104(3):2S-8S.
- Vanegas H and Schaible HG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Research. Brain Research Reviews*. 2004;46(3):295-309.
- Varty GB, Cohen-Williams ME, Morgan CA, Pylak U, Duffy RA, Lachowicz JE, Carey GJ, Coffin VL. The gerbil elevated plus-maze II: anxiolytic-like effects of selective neurokinin NK1 receptor antagonists. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27(3):371-379.
- Vatansver B , Lahrichi SL, Thiocone A, Salluce N, Mathieu M, Grouzmann E, Rochat B. Comparison between a linear ion trap and a triple quadrupole MS in the sensitive detection of large peptides at femtomole amounts on column. *Journal of Separation Science*. 2010;33:2478-2488.
- Vergnolle N, Wallace JL, Bunnett NW, Hollenberg MD. Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2001;22(3):146-152.

- Vertes A, Irinyi G, Gijbels R. Hydrodynamic model of matrix-assisted laser-desorption mass-spectrometry. *Analytical Chemistry*. 1993;65(17):2389-2393.
- Vigna SR. The N-terminal domain of substance P is required for complete homologous desensitization but not phosphorylation of the rat neurokinin-1 receptor. *Neuropeptides*. 2001;35(1):24-31.
- Vowles KE, McCracken LM, Eccleston C. Patient functioning and catastrophizing in chronic pain: the mediating effects of acceptance. *Health Psychology*. 2008;27:S136-143.
- Von Korff M, Dworkin SF, LeResche L, Kurger A. An epidemiologic comparison of pain complaints. *Pain*. 1998;32:173-183.
- Wall PD, Fitzgerald M, Gibson SJ. The response of rat spinal cord cells to unmyelinated afferents after peripheral nerve section and after changes in substance P levels. *Neuroscience*. 1981;6(11):2205-2215.
- Wang G and Cole RB. In electro spray ionization mass spectrometry. Editions Wiley: New York. 1997;137.
- Wang L. Oligonucleotide bioanalysis: sensitivity versus specificity. *Bioanalysis*. 2011;3(12):1299-1303.
- Wang LX and Wang ZJ. Animal and cellular models of chronic pain. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55(8):949-965.
- Washburn MP, Wolters D, Yates JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology*. 2001;19(3):242-247.
- Watkins LR and Maier SF. *Cytokines and Pain*. Parnham MJ. Series Editor. Basel: Birkhauser. 1999;21.
- Watson JT. Mass spectrometry instrumentation. Waller GR, Editions. Biomedical applications of Mass Spectrometry. Wiley-Interscience. New-York. 1972.
- Watson JT and Sparkman OD. Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation. 4ème édition. John Wiley & Sons. Chichester, England. 2007;497-517.
- Wattier JM. Conférence : Douleurs neuropathiques en médecine physique et de réadaptation. Secteur douleur. Clinique d'Anesthésie Réanimation. Hôpital Cl Huriez CHRU Lille. 2013.
- Weickhardt C, Draack L, Amirav A. Laser desorption combined with hyperthermal surface ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2003;75:5602-5607.

- Wells JM and McLuckey SA. Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods in Enzymology*. 2005;402:148-185.
- Werle M and Bernkop-Schnürch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids*. 2006;30:351-367.
- Werz MA and MacDonald RL. Opioid peptides selective for mu- and delta-opiate receptors reduce calcium-dependent action potential duration by increasing potassium conductance. *Neuroscience Letters*. 1983;42(2):173-178.
- Wheeler JX, Wait R, Stone T, Wootton L, Lewis S, Fowler S, Cummins WJ. Mass spectrometric analysis of maleimide CyDye labelled model peptides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2003;17(22):2563-2566.
- Whiteaker JR, Lin CW, Kennedy J, Hou LM, Trute M, Sokal I, Yan P, Schoenherr RM, Zhao L, Voytovich UJ, Kelly-Spratt KS, Krasnoselsky A, Gafken PR, Hogan JM, Jones LA, Wang P, Amon L, Chodosh LA, Nelson PS, McIntosh MW, Kemp CJ, Paulovich AG. A targeted proteomics-based pipeline for verification of biomarkers in plasma. *Nature Biotechnology*. 2011;29(7):625-634.
- Whitfield PD, German AJ, Noble PJ. Metabolomics: an emerging post-genomic tool for nutrition. *British Journal of Nutrition*. 2004;92:549-555.
- Wiffen PJ, Collins S, McQuay HJ, Carroll D, Jadad A, Moore RA. Anticonvulsant drugs for acute and chronic pain. *The Cochrane Library*. 2010. DOI:10.1002/14651858.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Review progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*. 1996;13:19-50.
- Willis WD and Chung JM. Central mechanisms of pain. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1987;191(10):1200-1202.
- Willis WD Jr. The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. *Brain Research Review*. 2007;55(2):297-313.
- Wood JN and Baker M. Voltage-gated sodium channels. *Current Opinion in Pharmacology*. 2001;1(1):17-21.
- Woodcock J, Witter J, Dionne RA. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007;6(9):703-710.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*. 1992;355:75-78.
- Wray G. The evolutionary significance of cis regulatory mutations. *Nature genetics*. 2007;8:206-216.

- Xie GX and Goldstein A. Characterization of big dynorphins from rat brain and spinal cord. *The Journal of Neuroscience*. 1987;7(7):2049-2055.
- Xu IS, Hao JX, Xu XJ, Hokfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z. The effect of intrathecal selective agonists of Y1 and Y2 neuropeptide Y receptors on the flexor reflex in normal and axotomized rats. *Brain Research*. 1999;833:251-257.
- Yamashita M and Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*. 1983;88(20):4451-4459.
- Yamashita M and Fenn JB. Negative ion production with the electrospray ion source. *The Journal of Physical Chemistry*. 1984;88(20):4671-4675.
- Yang BH, Piao ZG, Kim YB, Lee CH, Lee JK, Park K, Kim JS, Oh SB. Activation of Vanilloid Receptor 1 (VR1) by Eugenol. *Journal of Dental Research*. 2003;82:781-785.
- Yang HYT and Martin BM. Isolation and characterization of a neuropeptide from brain and spinal cord of rat. *Society for Neurosciences*. 1995;21:760.
- Yang HYT, Fratta W, Majane EA, Costa E. Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82:7757-7761.
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI. Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(14):6736-6740.
- Yatskin ON, Sazonova OV, Khachin DP, Blishchenko EY, Karelin AA, Ivanov VT. Isolation of peptides from rat tissues: peptidomics vs. degradomics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2009;611:399-400.
- Yiangou Y, Facer P, Dyer NHC, Chan CLH, Knowles C, Williams NS, Anand P. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *The Lancet*. 2001;357(9265):1338-1339.
- Yokokawa A, Yamamoto K, Omori Y, Shibasaki H, Shinohara Y, Kasuya Y, Furuta T. Simultaneous determination of androstenedione, 11betahydroxyandrostenedione, and testosterone in human plasma by stable isotope dilution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2009;877(7):621-626.
- Yoshimura M and Yonehara N. Influence of capsaicin cream in rats with peripheral neuropathy. *Pharmacological Research*. 2001;44(2):105-111.

- Yu XH, Zhang ET, Craig R, Shigemoto R, Ribeiro-da-Silva A. NK-1 receptor immunoreactivity in distinct morphological types of lamina I neurons of the primate spinal cord. *The Journal of Neuroscience*. 1999;19(9):3545-3555.
- Zachariou V and Goldstein BD. Dynorphin-(1–8) inhibits the release of substance P-like immunoreactivity in the spinal cord of rats following a noxious mechanical stimulus. *European Journal of Pharmacology*. 1997;323:159-165.
- Zajac JM and Mollereau C. RFamide peptides. Introduction. *Peptides*. 2006;27:941-942.
- Zeitl KP, Guy N, Malmberg AB, Dirajlal S, Martin WJ, Sun L, Bonhaus DW, Stucky CL, Julius D, Basbaum AI. The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22:1010-1019.
- Zhang H, Cang CL, Kawasaki Y, Liang LL, Zhang YQ, Ji RR, Zhao ZQ. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience*. 2007;31;27(44):12067-12077.
- Zhang Y, Ficarro SB, Li SJ, Marto JA. Optimized Orbitrap HCD for quantitative analysis of phosphopeptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2009;20(8):1425-1434.
- Zhang L, Hoff AO, Wimalawansa SJ, Cote GJ, Gagel RF, Westlund KN. Arthritic calcitonin/alpha calcitonin gene-related peptide knockout mice have reduced nociceptive hypersensitivity. *Pain*. 2001;89:265-273.
- Zhao S and Iyengar R. Systems pharmacology: network analysis to identify multiscale mechanisms of drug action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2012;52:505-521.
- Zheng M, Streck RD, Scott RE, Seidah NG, Pintar JE. The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. *Journal of Neuroscience*. 1994;14:4656-4673.
- Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009;2010:1-6.
- Zimmer A, Zimmer AM, Baffi J, Usdin T, Reynolds K, König M, Palkovits M, Mezey E. Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(5):2630-2635.
- Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology*. 2001;429:23-37.

Zougman A, Pilch B, Podtelejnikov A, Kiehnopf M, Schnabel C, Kurnar C, Mann M.
Integrated analysis of the cerebrospinal fluid peptidome and proteome. *Journal of
Proteome Research*. 2008;7(1):386-399.