

Université de Montréal

Évaluation de différentes composantes chromatographiques d'un
système nano-LC-MS pour des applications protéomiques

par
Anik Forest

Département de Chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du
grade de M.Sc en Chimie

Décembre, 2006

©, Anik Forest, 2006



QD

3

U54

2007

v. 025

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Évaluation de différentes composantes chromatographiques d'un système nano-
LC-MS pour des applications protéomiques

Présenté par :

Anik Forest

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

| | |
|---------------------|------------------------|
| Pr. Karen Waldron | Président-rapporteur |
| Pr. Pierre Thibault | Directeur de recherche |
| Pr. Kévin Wilkinson | Membre du jury |

SOMMAIRE

La protéomique permet d'avoir une vue d'ensemble du fonctionnement du génome au niveau d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe. L'analyse protéomique comparative vise l'identification de protéines différentiellement exprimées dans les extraits cellulaires complexes, en comparant l'intensité relative des peptides tryptiques. Le succès de cette approche analytique dépend à la fois de la reproductibilité et de la capacité chromatographique que de la sensibilité et la gamme dynamique de la détection obtenue par spectrométrie de masse utilisant l'ionisation nano-electrospray.

L'identification de protéines requiert la génération de fragments tryptiques et leur séparation par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). De façon à maximiser la sensibilité de cette approche mes travaux ont porté sur le développement de la chromatographie capillaire à faible débit (~500 nL/min) utilisant des nano-colonnes analytiques (75-250 μm i.d.) et des pré-colonnes pour l'enrichissement et le désalage de l'échantillon. Les performances des différentes colonnes ont été évaluées en étudiant leur sélectivité, leur robustesse, leur reproductibilité, et leur capacité. Pour les échantillons plus complexes, tels que les échantillons sanguins, l'optimisation d'un système multidimensionnel fut effectuée, permettant d'augmenter la résolution chromatographique du système, et d'étendre l'identification de protéines, et de biomarqueurs.

Mots clés : Protéines, peptides, spectrométrie de masse, HPLC, colonne capillaire, remplissage, 2D-LC

ABSTRACT

Proteomics provides meaningful insights on the expression and distribution of the proteome at the cellular, tissue or organ level. Comparative proteomics analyses focus on the identification of proteins differentially expressed in complex cellular samples, by comparing the relative intensity of tryptic peptides. The success of this approach depends on several factors, such as reproducibility, capacity, sensibility, and dynamic range of the system LC-MS using nanoelectrospray ionization.

Protein identification requires formation of tryptic peptides and their separation by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In order to increase the sensitivity of this approach, the primary goal of this study focuses on the development of capillary liquid chromatography using low flow rate (~500nL/min) with nano-analytical columns (75-250 μm i.d.) and pre-columns for sample enrichment and desalting. The performance of several columns was evaluated by determining their selectivity, robustness, reproducibility, and capacity. For complex samples, such as plasma proteins, optimization of a multidimensional system was performed to yield an increase in chromatographic resolution and in the identification of proteins and biomarkers.

Keywords: proteins, peptides, mass spectrometry, HPLC, capillary column, packing, 2D-LC

TABLES DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| SOMMAIRE | I |
| ABSTRACT | II |
| TABLE DES MATIERES | III |
| LISTE DES FIGURES | VI |
| LISTE DES TABLEAUX | IX |
| LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS | XII |
| REMERCIEMENTS | XIII |
| | |
| CHAPITRE 1 : INTRODUCTION | 1 |
| 1.1 PROTEOMIQUE | 2 |
| 1.2 APPROCHE D'EXPRESSION DIFFERENTIELLE QUANTITATIVE | 3 |
| 1.3 OBJECTIFS DES TRAVAUX | 4 |
| | |
| CHAPITRE 2 : THÉORIE | 6 |
| 2.1 INTRODUCTION | 7 |
| 2.2. DIGESTION ENZYMATIQUE | 7 |
| 2.3 ROLE DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE DANS L'ANALYSE PROTEIQUE | 8 |
| <i>2.3.1 SOURCE D'ELECTRONEBULISATION (ESI)</i> | 8 |
| <i>2.3.2 ANALYSEURS DE MASSE</i> | 12 |
| <i>2.3.3 SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM</i> | 15 |
| <i>2.3.4 IDENTIFICATION DES PROTÉINES</i> | 16 |
| 2.4 TECHNIQUES DE SÉPARATIONS | 18 |
| <i>2.4.1 L'ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL</i> | 18 |
| <i>2.4.2 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE</i> | 18 |
| <i>2.4.3 PARAMETRES D'UN SYSTEME CHROMATOGRAPHIQUE</i> | 23 |
| <i>2.4.4 REMPLISSAGE DES COLONNES</i> | 27 |
| | |
| CHAPITRE 3 : MATÉRIAUX ET MÉTHODES | 29 |
| 3.1 FABRICATION DES PRE-COLONNES ET COLONNES CAPILLAIRES | 30 |
| <i>3.1.1 SYSTÈME DE REMPLISSAGE</i> | 30 |
| <i>3.1.2 SUPPORTS DES PRÉ-COLONNES « ARTISANALES »</i> | 31 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 3.1.3 | SUPPORTS DES COLONNES CAPILLAIRES « ARTISANALES » | 31 |
| 3.1.4 | LE DISQUE FRITTÉ | 31 |
| 3.1.5 | SOLUTION DU MATERIEL DE REMPLISSAGE | 32 |
| 3.1.6 | METHODE DE REMPLISSAGE ET D'ASSEMBLAGE DES COLONNES ET PRE-COLONNES « ARTISANALES » | 32 |
| 2.1.7 | MODELES DE PRE-COLONNES « ARTISANALES » TESTEES. | 33 |
| 3.2 | COLONNES COMMERCIALES ET PHASES STATIONNAIRES | 34 |
| 3.3 | SYSTÈMES ANALYTIQUES | 35 |
| 3.3.1 | CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES | 35 |
| 3.3.2 | ANALYSES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE | 37 |
| 3.4 | ÉCHANTILLONS D'ANALYSE | 39 |
| 3.4.1 | LE MÉLANGE DE 8 PROTÉINES | 39 |
| 3.4.2 | ÉCHANTILLON D'APOMYOGLOBIN | 39 |
| 3.4.3 | ÉCHANTILLON DE PROTEINES SERIQUES HUMAINES | 39 |
| 3.4.4 | PEPTIDES UTILISES POUR L'OPTIMISATION DE LA SEPARATION SUR LA COLONNE SCX | 41 |
| 3.5 | OUTILS BIOINFORMATIQUES | 42 |
| CHAPITRE 4 : ANALYSE DE COMPOSANTES CHROMATOGRAPHIQUES POUR UN SYSTEME 2D-LC-MS | | 47 |
| 4.1 | INTRODUCTION | 48 |
| 4.2 | PRÉSENTATION DU SYSTÈME 1D-LC | 49 |
| 4.3 | PRÉ-COLONNES | 50 |
| 4.3.1 | ÉVALUATION DES PRÉ-COLONNES COMMERCIALES | 50 |
| 4.3.2 | FABRICATION DES PRE-COLONNES | 52 |
| 4.3.3 | ÉVALUATION DES PRÉ-COLONNES « ARTISANALES » | 52 |
| 4.4 | COLONNES ANALYTIQUES CAPILLAIRES | 59 |
| 4.4.1 | PERFORMANCES DES COLONNES CAPILLAIRES | 59 |
| 4.4.2 | DÉBIT DE LA PHASE MOBILE | 65 |
| 4.4.3 | CAPACITÉ DE CHARGE | 69 |
| 4.5 | REPRODUCTIBILITÉ DE LA COMBINAISON DE PRÉ-COLONNES ET DE COLONNES ANALYTIQUE « ARTISANALES » | 72 |
| 4.6 | CONCLUSION | 74 |

| | |
|--|----------------|
| CHAPITRE 5 : : ANALYSE DE COMPOSANTES CHROMATOGRAPHIQUES POUR UN SYSTEME 1D-LC-MS | 75 |
| 5.1 INTRODUCTION | 76 |
| 5.2 OPTIMISATION DE LA SÉPARATION SUR LA COLONNE SCX | 77 |
| <i>5.2.1 PERFORMANCES DES COLONNES SELON LE DIAMÈTRE INTERNE</i> | <i>77</i> |
| <i>5.2.3 CAPACITÉ DE CHARGE</i> | <i>80</i> |
| <i>5.2.4 FRACTIONNEMENT</i> | <i>83</i> |
| 5.3 APPLICATIONS EN 2D-LC | 85 |
| <i>5.3.1 SYSTÈME 2D-LC</i> | <i>85</i> |
| <i>5.3.2 REPRODUCTIBILITÉ</i> | <i>86</i> |
| 5.4 CONCLUSION | 103 |
| CHAPITRE 6 : CONCLUSION | 104 |
| Bibliographie | 109 |
| Annexes | xiv |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Représentation du phénomène d'électronébulisation [10] | 9 |
| Figure 2 : Intensité du signal en fonction de la concentration, pour un débit d'infusion de 1 μ L/min, de la caféine et la reserpine seules, ou mélangées avec MRFA [13]..... | 11 |
| Figure 3 : Représentation d'un analyseur quadripolaire [18]..... | 13 |
| Figure 4 : Schéma de l'analyseur à temps de vol [22] | 15 |
| Figure 5 : Schéma du Q-TOF [23] | 16 |
| Figure 6 : Nomenclature des ions fragments [24] | 17 |
| Figure 7 : Structure d'un acide aminé [31] | 19 |
| Figure 8: Isotherme de la constante de partage k, en fonction de la quantité injectée | 25 |
| Figure 9 : Représentation d'un pic non gaussien..... | 26 |
| Figure 10 : Montage du système de remplissage des colonnes. | 30 |
| Figure 11 : Assemblage de la colonne capillaire avec le frit | 33 |
| Figure 12 : Modèles de pré-colonnes testés. A) Modèle A : Capillaire de silice fondue 250 μ m x 12 mm, $v=0.59$ μ l, B) Modèle B : Tube en téflon 360 μ m x 5mm, $v=0.51$ μ l..... | 34 |
| Figure 13 : Représentation de la méthode MS/MS d'exclusion | 38 |
| Figure 14 : Carte peptidique d'un digestat trypsique de 8 protéines (80 ng injecté) analyse par nanoLC-MS. A) Représentation bidimensionnelle de m/z versus temps (min). B) Agrandissement carte peptidique d'une région (m/z= 540-650), TR= 28-38 min, ●: +1, + : +2, ▲ : +3. C) carte peptidique mettant en évidence un peptide, m/z = 575.3 (+2)..... | 43 |
| Figure 15 : Fenêtre du moteur de recherche Mascot, avec les paramètres pour l'analyse des protéines sériques humaines. | 45 |
| Figure 16: Montage d'un système de vannes multipositions..... | 49 |
| Figure 17 : Largeurs des pics à mi-hauteur des ions peptidiques communs détectés pour les différents modèles de pré-colonnes | 54 |
| Figure 18 : Reproductibilité des temps de rétention et abondance des peptides entre deux modèles de pré-colonne, A) Différence de temps de rétention entre deux modèles « artisanales » et le modèle commercial B) | |

| | |
|--|----|
| Distribution des intensités ioniques des peptides analysés avec la pré-colonne « artisanale » modèle A et la pré-colonne commerciale. | 56 |
| Figure 19: Chromatogrammes ioniques pour différents ions peptidiques, obtenus après injection de 80 ng d'un mélange de 8 protéines, A) Waters, Symmetry 300TM, 0.35 x 5 mm, B) Modèle B « artisanale » 0.35 x 5mm..... | 58 |
| Figure 20 : Chromatogrammes extraits de différents m/z obtenus après injection du mélange trypsique des 8 protéines (80 ng injecté), avec la largeur du pic à mi-hauteur. A) Colonne artisanale remplie de JupiterC18, 300Å, 5µm, 75 µm x 10 cm, B) LC-Packing, Pepmap C18, 300Å, 5µm, 75 µm x 10 cm..... | 61 |
| Figure 21: Distribution peptidique du mélange trypsique des 8 protéines pour différentes colonnes capillaires « artisanales » de 75 µm i.d., remplies avec différentes phases stationnaires. A) Zorbax C18 300Å, 3.5 µm, B) Vydac SB 218MS54, C18, 300Å, 3.5µm, C) Jupiter C18 300Å, 5µm, D) Symmetry C18, 300Å, 5µm | 62 |
| Figure 22: Nombre d'ions peptidiques détectés en fonction du débit..... | 66 |
| Figure 23: Largeurs de pics à mi-hauteurs des ions peptidiques communs pour différents débits avec une colonne de 150 µm i.d. | 66 |
| Figure 24 Analyse de l'Abondance des ions peptidiques durant la mesure pour différents débits A) Variation du nombre d'ions peptidiques durant l'analyse pour différents débits ,B) Densité peptidique dans la région m/z= 500-700, RT= 20-45min pour différents débits B1) 300nL/min, B2) 600nL/min, B3) 850 nL/min | 68 |
| Figure 25: Variation (en pourcentage) du rapport de largeur des pics à mi-hauteur par rapport à $w_{1/2}$ pour 100 ng injecté, en fonction de la quantité injectée, pour une colonne de 150 µm i.d..... | 70 |
| Figure 26 : Variation de la médiane du rapport d'intensité en fonction de la médiane du ratio de la quantité injectée pour une colonne de 150 µm i.d. | 71 |
| Figure 27 : Chromatogramme ^b du mélange des 5 peptides avec une colonne SCX 500 µm x 4cm, 1- Leucine Enkephalin , 2- Met-Arg-Phe , 3- Angiotensin II,4- Angiotensin I, 5- Procathepsin..... | 78 |

| | |
|---|-----|
| Figure 28 : Variation de l'aire du signal en absorbance en fonction de la quantité injectée pour les 3 peptides. | 82 |
| Figure 29 : Variation de la largeur des pics en fonction de la quantité injectée A) Largeur des pics à mi-hauteur de l'angiotensin I en fonction de la quantité injectée, B) Asymétrie mesurée sur les pics de l'angiotensin I en fonction de la quantité injectée. | 83 |
| Figure 30 : Chromatogramme d'un digestat trypsique (1µg) de protéines sériques séparées avec une colonne SCX 250 µm x 3cm. | 84 |
| Figure 31 : Montage d'un système de valves à 10 ports pour une séparation en 2D-LC | 85 |
| Figure 32 : Distribution d'intensité pour des groupes d'ions peptidiques pour 5 injections dans la fraction 2, de 60mM de NH ₄ COOH | 91 |
| Figure 33 : Chromatogrammes extraits de l'ion peptidique m/z=897.44 (+2) provenant de la fraction 2, pour quatre réplicatas. L'intensité mesurée de cet ion est encerclée au coin supérieur droit de chaque..... | 93 |
| Figure 34 : Nombre d'ions peptidiques communs dans plusieurs fractions . | 95 |
| Figure 35: Gain de sensibilité entre 1D-LC et 2D-LC A) Cartes peptidiques dans la région du précurseur m/z = 578.85 B) spectre obtenu de la collision du précurseur m/z= 578.85 en 2D-LC..... | 98 |
| Figure 36 : Distribution des ions peptidiques en fonction de leur charge et de la concentration de sel, en utilisant les fichiers LC-MS..... | 100 |
| Figure 37 : Distribution des peptides identifiés selon leur charge et la concentration de sel, en utilisant les fichiers LC-MS/MS | 100 |
| Figure 38 : Distribution peptidique en fonction de la charge théorique à pH=3.5..... | 101 |
| Figure 39 : Variation de l'hydrophobicité des peptides pour chaque fraction, selon leur charge théorique à pH =3.5 | 102 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I : Classification des colonnes selon leur diamètre interne [34] | 22 |
| Tableau II: Évaluation de deux pré-colonnes commerciales..... | 51 |
| Tableau III :Capacité chromatographique selon le modèle de pré-colonne . | 54 |
| Tableau IV: RSD (n=4) du RT et de l'intensité pour un ensemble représentant 90% des ions et le pourcentage d'ions peptidiques communs pour chaque modèle de pré-colonne ^a | 55 |
| Tableau V: Effet de la nature de la pré-colonne sur la sélectivité chromatographique : Nombre de protéines identifiées, et couverture de séquence pour la protéine Fibrogen Alpha A, obtenus avec les différentes pré-colonnes testées avec un échantillon de plasma humain. | 57 |
| Tableau VI: Mesure d'asymétrie pour les quatre ions peptidiques, pour la pré-colonne « artisanale » modèle A, et la pré-colonne de Waters. | 58 |
| Tableau VII: Comparaison de l'écart type relatif (%RSD) sur l'aire et RT pour quatre ions peptidiques, pour la pré-colonne « artisanale » modèle A, et la pré-colonne de Waters. | 59 |
| Tableau VIII: Comparaison des performances chromatographiques : la sélectivité et les largeurs des pics. | 60 |
| Tableau IX Hauteurs équivalentes en plateaux réduits pour quatre ions peptidiques | 61 |
| Tableau X: Pourcentage de couverture de séquence pour quatre protéines et trois systèmes chromatographiques. *PB = Phosphorylase B, ADH = Alcohol Deshydrogenase, BSA = Bovin Serum Albumin | 64 |
| Tableau XI: Reproductibilité du temps de rétention intra- et inter-colonnes. | 65 |
| Tableau XII: Fenêtre d'éluion et densité peptidique sur une période de 15 secondes pour différents débits, et avec un colonne de 150 µm i.d. | 67 |
| Tableau XIII : Débits linéaires appliqués pour les 3 diamètres de colonnes | 69 |
| Tableau XIV : Variation de la médiane du rapport d'intensité en fonction de la médiane du rapport de la quantité injectée pour une colonne de 150 µm i.d..... | 71 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Représentation du phénomène d'électronébulisation [10] | 9 |
| Figure 2 : Intensité du signal en fonction de la concentration, pour un débit d'infusion de 1 μ L/min, de la caféine et la reserpine seules, ou mélangées avec MRFA [13]..... | 11 |
| Figure 3 : Représentation d'un analyseur quadripolaire [18]..... | 13 |
| Figure 4 : Schéma de l'analyseur à temps de vol [22] | 15 |
| Figure 5 : Schéma du Q-TOF [23] | 16 |
| Figure 6 : Nomenclature des ions fragments [24] | 17 |
| Figure 7 : Structure d'un acide aminé [31] | 19 |
| Figure 8: Isotherme de la constante de partage k, en fonction de la quantité injectée | 25 |
| Figure 9 : Représentation d'un pic non gaussien..... | 26 |
| Figure 10 : Montage du système de remplissage des colonnes. | 30 |
| Figure 11 : Assemblage de la colonne capillaire avec le frit | 33 |
| Figure 12 : Modèles de pré-colonnes testés. A) Modèle A : Capillaire de silice fondue 250 μ m x 12 mm, $v=0.59 \mu$ l, B) Modèle B : Tube en téflon 360 μ m x 5mm, $v=0.51 \mu$ l | 34 |
| Figure 13 : Représentation de la méthode MS/MS d'exclusion | 38 |
| Figure 14 : Carte peptidique d'un digestat tryptique de 8 protéines (80 ng injecté) analyse par nanoLC-MS. A) Représentation bidimensionnelle de m/z versus temps (min). B) Agrandissement carte peptidique d'une région ($m/z= 540-650$), TR= 28-38 min, ●: +1, + : +2, ▲ : +3. C) carte peptidique mettant en évidence un peptide, $m/z = 575.3 (+2)$ | 43 |
| Figure 15 : Fenêtre du moteur de recherche Mascot, avec les paramètres pour l'analyse des protéines sériques humaines. | 45 |
| Figure 16: Montage d'un système de vannes multipositions..... | 49 |
| Figure 17 : Largeurs des pics à mi-hauteur des ions peptidiques communs détectés pour les différents modèles de pré-colonnes | 54 |
| Figure 18 : Reproductibilité des temps de rétention et abondance des peptides entre deux modèles de pré-colonne, A) Différence de temps de rétention entre deux modèles « artisanales » et le modèle commercial B) | |

| | |
|--|----|
| Distribution des intensités ioniques des peptides analysés avec la pré-colonne « artisanale » modèle A et la pré-colonne commerciale. | 56 |
| Figure 19: Chromatogrammes ioniques pour différents ions peptidiques, obtenus après injection de 80 ng d'un mélange de 8 protéines, A) Waters, Symmetry 300TM, 0.35 x 5 mm, B) Modèle B « artisanale » 0.35 x 5mm..... | 58 |
| Figure 20 : Chromatogrammes extraits de différents m/z obtenus après injection du mélange tryptique des 8 protéines (80 ng injecté), avec la largeur du pic à mi-hauteur. A) Colonne artisanale remplie de JupiterC18, 300Å, 5µm, 75 µm x 10 cm, B) LC-Packing, Pepmap C18, 300Å, 5µm, 75 µm x 10 cm..... | 61 |
| Figure 21: Distribution peptidique du mélange tryptique des 8 protéines pour différentes colonnes capillaires « artisanales » de 75 µm i.d., remplies avec différentes phases stationnaires. A) Zorbax C18 300Å, 3.5 µm, B) Vydac SB 218MS54, C18, 300Å, 3.5µm, C) Jupiter C18 300Å, 5µm, D) Symmetry C18, 300Å, 5µm | 62 |
| Figure 22: Nombre d'ions peptidiques détectés en fonction du débit..... | 66 |
| Figure 23: Largeurs de pics à mi-hauteurs des ions peptidiques communs pour différents débits avec une colonne de 150 µm i.d. | 66 |
| Figure 24 Analyse de l'Abondance des ions peptidiques durant la mesure pour différents débits A) Variation du nombre d'ions peptidiques durant l'analyse pour différents débits ,B) Densité peptidique dans la région m/z= 500-700, RT= 20-45min pour différents débits B1) 300nL/min, B2) 600nL/min, B3) 850 nL/min | 68 |
| Figure 25: Variation (en pourcentage) du rapport de largeur des pics à mi-hauteur par rapport à $w_{1/2}$ pour 100 ng injecté, en fonction de la quantité injectée, pour une colonne de 150 µm i.d..... | 70 |
| Figure 26 : Variation de la médiane du rapport d'intensité en fonction de la médiane du ratio de la quantité injectée pour une colonne de 150 µm i.d. | 71 |
| Figure 27 : Chromatogramme ^b du mélange des 5 peptides avec une colonne SCX 500 µm x 4cm, 1- Leucine Enkephalin , 2- Met-Arg-Phe , 3- Angiotensin II,4- Angiotensin I, 5- Procathepsin..... | 78 |

| | |
|---|-----|
| Figure 28 : Variation de l'aire du signal en absorbance en fonction de la quantité injectée pour les 3 peptides. | 82 |
| Figure 29 : Variation de la largeur des pics en fonction de la quantité injectée A) Largeur des pics à mi-hauteur de l'angiotensin I en fonction de la quantité injectée, B) Asymétrie mesurée sur les pics de l'angiotensin I en fonction de la quantité injectée. | 83 |
| Figure 30 : Chromatogramme d'un digestat trypsique (1µg) de protéines sériques séparées avec une colonne SCX 250 µm x 3cm. | 84 |
| Figure 31 : Montage d'un système de valves à 10 ports pour une séparation en 2D-LC | 85 |
| Figure 32 : Distribution d'intensité pour des groupes d'ions peptidiques pour 5 injections dans la fraction 2, de 60mM de NH ₄ COOH | 91 |
| Figure 33 : Chromatogrammes extraits de l'ion peptidique m/z=897.44 (+2) provenant de la fraction 2, pour quatre réplicatas. L'intensité mesurée de cet ion est encadrée au coin supérieur droit de chaque..... | 93 |
| Figure 34 : Nombre d'ions peptidiques communs dans plusieurs fractions . | 95 |
| Figure 35: Gain de sensibilité entre 1D-LC et 2D-LC A) Cartes peptidiques dans la région du précurseur m/z = 578.85 B) spectre obtenu de la collision du précurseur m/z= 578.85 en 2D-LC..... | 98 |
| Figure 36 : Distribution des ions peptidiques en fonction de leur charge et de la concentration de sel, en utilisant les fichiers LC-MS..... | 100 |
| Figure 37 : Distribution des peptides identifiés selon leur charge et la concentration de sel, en utilisant les fichiers LC-MS/MS | 100 |
| Figure 38 : Distribution peptidique en fonction de la charge théorique à pH=3.5..... | 101 |
| Figure 39 : Variation de l'hydrophobicité des peptides pour chaque fraction, selon leur charge théorique à pH =3.5 | 102 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I : Classification des colonnes selon leur diamètre interne [34] | 22 |
| Tableau II: Évaluation de deux pré-colonnes commerciales..... | 51 |
| Tableau III :Capacité chromatographique selon le modèle de pré-colonne . | 54 |
| Tableau IV: RSD (n=4) du RT et de l'intensité pour un ensemble représentant 90% des ions et le pourcentage d'ions peptidiques communs pour chaque modèle de pré-colonne ^a | 55 |
| Tableau V: Effet de la nature de la pré-colonne sur la sélectivité chromatographique : Nombre de protéines identifiées, et couverture de séquence pour la protéine Fibrogen Alpha A, obtenus avec les différentes pré-colonnes testées avec un échantillon de plasma humain. | 57 |
| Tableau VI: Mesure d'asymétrie pour les quatre ions peptidiques, pour la pré-colonne « artisanale » modèle A, et la pré-colonne de Waters. | 58 |
| Tableau VII: Comparaison de l'écart type relatif (%RSD) sur l'aire et RT pour quatre ions peptidiques, pour la pré-colonne « artisanale » modèle A, et la pré-colonne de Waters. | 59 |
| Tableau VIII: Comparaison des performances chromatographiques : la sélectivité et les largeurs des pics. | 60 |
| Tableau IX Hauteurs équivalentes en plateaux réduits pour quatre ions peptidiques | 61 |
| Tableau X: Pourcentage de couverture de séquence pour quatre protéines et trois systèmes chromatographiques. *PB = Phosphorylase B, ADH = Alcohol Deshydrogenase, BSA = Bovin Serum Albumin | 64 |
| Tableau XI: Reproductibilité du temps de rétention intra- et inter-colonnes. | 65 |
| Tableau XII: Fenêtre d'éluion et densité peptidique sur une période de 15 secondes pour différents débits, et avec un colonne de 150 μm i.d. | 67 |
| Tableau XIII : Débits linéaires appliqués pour les 3 diamètres de colonnes | 69 |
| Tableau XIV : Variation de la médiane du rapport d'intensité en fonction de la médiane du rapport de la quantité injectée pour une colonne de 150 μm i.d..... | 71 |

| | |
|--|----|
| Tableau XV: Capacité de charge pour des colonnes de différents diamètres internes pour l'ensemble des peptides | 72 |
| Tableau XVI: Évaluation de la reproductibilité (n=80) des composantes chromatographiques combinées (pré-colonne « artisanale »- colonnes analytiques «artisanales »)..... | 73 |
| Tableau XVII: Valeurs de k' obtenues sur un mélange de peptides pour les différents diamètres de colonnes SCX | 79 |
| Tableau XVIII: Nombre de plateaux théoriques (N) obtenu pour un mélange de peptides selon les différents diamètres de colonnes SCX..... | 80 |
| Tableau XIX: Concentration de sel des sept solutions d'élution | 84 |
| Tableau XX: Nombre d'ions peptidiques dans chaque fraction pour six aliquots injectés indépendants | 88 |
| Tableau XXI: Reproductibilité des temps de rétention et des intensités des ions peptidiques pour un ensemble représentant 90% de tous les ions observés communs détectés dans au moins 5 injections différentes, selon les différentes fractions | 90 |
| Tableau XXII: Variations du temps de rétention et de l'intensité en 1D-LC, et 2D-LC (moyenne des sept fractions) | 92 |
| Tableau XXIII: Pourcentage d'ions peptidiques communs entre deux fractions consécutives | 94 |
| Tableau XXIV : Capacité chromatographique et nombre moyen d'ions peptidiques détectés pour 6 injections, avec un système 2D-LC-MS et un système 1D-LC-MS, d'un digestat de protéines sériques humaines | 96 |
| Tableau XXV: Nombre de peptides et protéines identifiés en MS/MS dans un digestat trypsique de protéines sériques humaines analysé par un système 1D-LC et 2D-LC échantillon de plasma humain avec un système 1D-LC-MS/MS et 2D-LC-MS/MS | 99 |

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

| | |
|----------|--|
| 2D-LC-MS | Chromatographie liquide a deux dimensions couplé a la spectrométrie de masse |
| 1D-LC | Chromatographie liquide à une dimension |
| 2D-LC | Chromatographie liquide à deux dimensions |
| ESI | Electronébulisation (Electrospray Ionization) |
| FA | Acide Formique (Formic Acid) |
| HPLC | Chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography) |
| i.d. | Diamètre interne (internal diameter) |
| LC | Chromatographie liquide (Liquid Chromatography) |
| LC-MS | Chromatographie liquide couplé a la spectrométrie de masse |
| m/z | Rapport masse sur charge |
| MALDI | Désorption/ionisation laser assistée par matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) |
| MS | Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry) |
| o.d. | Diamètre externe (Outer Diameter) |
| ODS | Octadecyl Silane |
| PEEK | Polyetheretherketones |
| Q-TOF | Analyseur Quadripolaire couple a un analyseur TOF |
| RT | Temps de rétention (Retention Time) |
| RSD | Ecart type résiduel (Relative Standard Deviation) |
| SCX | Colonne échangeuse de cation à forte interaction (Strong cation exchange chromatography) |

| | |
|----------|--|
| SS | Acier inoxydable (Stainless Steel) |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamine gel electrophoresis |
| SAX | Colonne échangeuse d'anion à forte interaction (Strong Anion exchange) |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| Th | Thomson (unité de m/z) |
| TOF | Analyseur à temps de vol (Time of flight) |
| UV | Ultraviolet |
| WAX | Colonne échangeuse d'anion à faible interaction (Weak Anion exchange) |
| WCX | Colonne échangeuse de cation à faible interaction (Weak Cation exchange) |

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de recherche Dr Pierre Thibault pour son encadrement, ses nombreux conseils et son soutien constant tout au long de ma maîtrise.

Je remercie Isabelle Migneault, Sylvain Tessier, Michael Shirm, Tam Lehuu et Joanna Hunter, mes collaborateurs et amis à Caprion Pharmaceuticals Inc., Ils m'ont beaucoup soutenus, et donner de précieux conseils.

Je remercie Alain Carrier, qui m'a beaucoup aidé pour commencer les travaux de chromatographie.

Je voudrai également remercier mes anciens collaborateurs de Caprion Pharmaceuticals Inc., qui m'ont apportés un grand soutien : Marguerite Boulos, Rachel Pagé-Belanger, Karine Venne, Denis faubert, Eric Bonneil, Alexandra Furtos, Geneviève Mercier et Marie-hélène Fortier.

Et, Je tiens à remercier Caprion Pharmaceutical, Inc., qui m'a donné la possibilité de faire cette maîtrise. J'ai pu avoir accès au laboratoire, et aux instruments d'analyse pour tous mes travaux.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Proteomique

Le protéome définit l'ensemble des protéines exprimées dans une cellule donnée, dans un organisme vivant, ou dans un tissu, à un moment donné. Toutes les cellules de l'organisme possèdent le même génome, mais ont des protéomes différents selon le type de cellule et le développement cellulaire.

Une protéine est une macromolécule composée d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. Chaque protéine est composée d'un ensemble d'acides aminés (voir annexe 1) [1]. La séquence des acides aminés d'une protéine constitue la structure primaire de la protéine. Les chaînes latérales des acides aminés ont des propriétés chimiques différentes. Certaines sont hydrophobes, d'autres hydrophiles, certaines ont des groupements fonctionnels ionisables. Les protéines sont essentielles aux fonctionnements des organismes vivants. Elles jouent de nombreux rôles, tels que le mouvement, la structure, le transport de substances dans le sang ou au travers des membranes des cellules, la régulation hormonale, la défense immunitaire, et la catalyse.

La protéomique étudie l'ensemble du protéome. Elle implique l'identification, ainsi que la quantification des protéines, tout en s'intéressant à leurs localisations, modifications, et interactions. Elle permet de mettre en relation la séquence du génome et le comportement cellulaire. La composition protéique d'une cellule est dynamique. Les stratégies protéomiques permettent d'obtenir des profils d'abondance protéiques et de comparer ceux-ci afin d'identifier des protéines exprimées différemment suite à des changements cellulaires [2-4]. Cette approche permet entre autre l'identification de protéines sériques pouvant être corrélées avec l'évolution de la maladie. Ces marqueurs sériques, qu'on appelle également biomarqueurs, peuvent servir en tant qu'indicateurs de

processus biologiques normaux, de processus pathogéniques ou de réponses pharmacologiques. Cette réponse est mesurée dans un organisme et indique un changement par rapport à l'état normal [5].

1.2 Approche d'expression différentielle quantitative

Une des principales composantes de la protéomique est la capacité de quantifier et d'identifier des protéines exprimées dans des échantillons biologiques. La technologie utilisée pour ce mémoire est l'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Or, les protéines et les polypeptides possédant plus de quarante résidus sont difficilement séquençable par spectrométrie de masse. La digestion enzymatique sur les échantillons devient nécessaire pour former des peptides de taille compatible avec l'analyse par LC-MS. Ainsi, après la digestion, l'échantillon peut contenir des centaines de milliers de peptides avec des différences d'intensités de plusieurs ordres de grandeurs. Par exemple dans le cas des protéines sériques, l'abondance de celles-ci varie de l'ordre de quelques pg/mL pour les interleukines, à plusieurs mg/mL pour les protéines plus abondantes telles que les anticorps et l'albumine [6A]. Pour permettre l'analyse d'un mélange aussi complexe, une séparation efficace de peptides doit être effectuée. L'approche 2D-LC permet la séparation et l'analyse des mélanges complexes.

De façon à rendre possible la comparaison entre deux échantillons, un peptide détecté dans un échantillon, peut également être présent parmi d'autres échantillons. Ce peptide est caractérisé par un temps de rétention en chromatographie liquide et un rapport masse sur charge en spectrométrie de masse. Les intensités de ce peptide sont mesurées par spectrométrie de masse pour établir une différence d'expression entre les échantillons.

1.3 Objectifs des travaux

Pour que cette approche fonctionne, trois critères sont essentiels :

- Une grande capacité chromatographique, de façon à séparer et à détecter le maximum de peptides, et pas seulement ceux qui sont les plus abondants.
- Une bonne reproductibilité du temps de rétention, de façon à pouvoir comparer le même peptide dans différentes conditions biologiques.
- Une bonne reproductibilité de l'intensité, de façon à ce que la différence d'expression du peptide entre les deux conditions ne soit pas due à une variation au niveau de l'analyse.

Mes travaux seront ciblés sur l'optimisation de chaque composante chromatographique de façon à répondre à ces trois critères. De plus les colonnes chromatographiques seront fabriquées sur mesure au laboratoire de façon à utiliser les phases stationnaires et les dimensions voulues.

Dans le chapitre 2, j'introduirais les notions théoriques associées aux travaux de ce mémoire.

Dans le chapitre 3, les matériaux et méthodes seront décrits.

Dans la première partie de mes résultats, chapitre 4, un système chromatographique 1D-LC sera optimisé, avec une séparation sur phase inversée. Les colonnes « artisanales » seront dans un premier temps comparées aux colonnes disponibles commercialement. Puis les conditions chromatographiques seront optimisées avec les colonnes « artisanales ».

Dans la deuxième partie de mes résultats, chapitre 5, une deuxième dimension sera ajoutée à la séparation de façon à augmenter considérablement la capacité chromatographique. La méthode utilisée pour cette étude est la chromatographie à deux dimensions (2D-LC) en continu constituée d'une colonne échangeuse de cation et d'une colonne à phase inversée. Les critères d'optimisation obtenus dans la première partie seront gardés pour la séparation sur phase inversée. L'optimisation se portera dans un premier temps sur la séparation par échange de cation, puis sur la combinaison des deux modes de séparation. Ainsi, le système 2D-LC sera optimisé de façon à répondre aux trois critères du départ.

CHAPITRE 2

THÉORIE

2.1 Introduction

Grâce aux techniques actuelles d'analyse et de séparations de protéines ou de peptides, ainsi qu'à la bioinformatique, on peut étudier simultanément des milliers de protéines. On peut ainsi, par exemple identifier une protéine responsable d'une maladie pour mettre au point un médicament.

La spectrométrie de masse (MS), en combinaison avec des méthodes de séparation telle l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), sont des technologies clé pour la caractérisation de protéines et pour l'étude de leur expression spatiale et temporelle. L'analyse de masse est habituellement effectuée sur les peptides obtenus par une hydrolyse enzymatique des protéines.

2.2. Digestion enzymatique

Le traitement protéolytique appliqué à des protéines libère des fragments peptidiques caractéristiques à chacune. La trypsine qui sera utilisée pour ces travaux, est une enzyme communément utilisée pour couper, c'est-à-dire hydrolyser les liaisons peptidiques en position C-terminale des résidus Lysine et Arginine.

2.3 Rôle de la spectrométrie de masse dans l'analyse protéique

Depuis l'introduction de l'ionisation par électronébulisation (ESI) en 1984 et par MALDI en 1988, le champ d'application en bioanalyse en spectrométrie de masse s'est considérablement développé. Les anciennes méthodes d'ionisation telles que par impact d'ionisation (EI), ou chimiques (CI), requiert des échantillons volatils. Les protéines, ainsi que les peptides sont des molécules larges et polaires, qui ne peuvent être volatilisées sans induire une décomposition néfaste.

2.3.1 Source d'électronébulisation (ESI)

La technique ESI [5-9], qui sera la méthode utilisée pour ces travaux a été introduite par Yamashita et al. [9] et consiste à soumettre l'échantillon contenant les macromolécules en solution à un champ électrique intense. L'échantillon est introduit dans un capillaire qui est porté à un haut potentiel électrique (4-5kV), provoquant la formation de gouttelettes chargées. L'évaporation du solvant volatil, induit une augmentation de charges positives à la surface des gouttelettes. Des fusions coulombiennes se forment lorsque les forces de répulsions entre les composés chargés sont plus élevées que la tension de surface formant ainsi des gouttelettes plus petites. La taille critique de ces gouttelettes est donnée par la limite de Rayleigh (Équation 1). La charge de la gouttelette est proportionnelle à son rayon. Les gouttelettes filles, possèdent une densité de charge plus élevée que la gouttelette mère. Ainsi la fission se poursuit sur plusieurs générations de gouttelettes filles de plus en plus petites.

$$Q^2 = 64\pi^2 \varepsilon_0 \gamma R^3 \quad \text{Équation 1}$$

Dans cette dernière équation, Q correspond à la charge, ε_0 à la permittivité, γ à la surface de tension, et R au rayon de la gouttelette

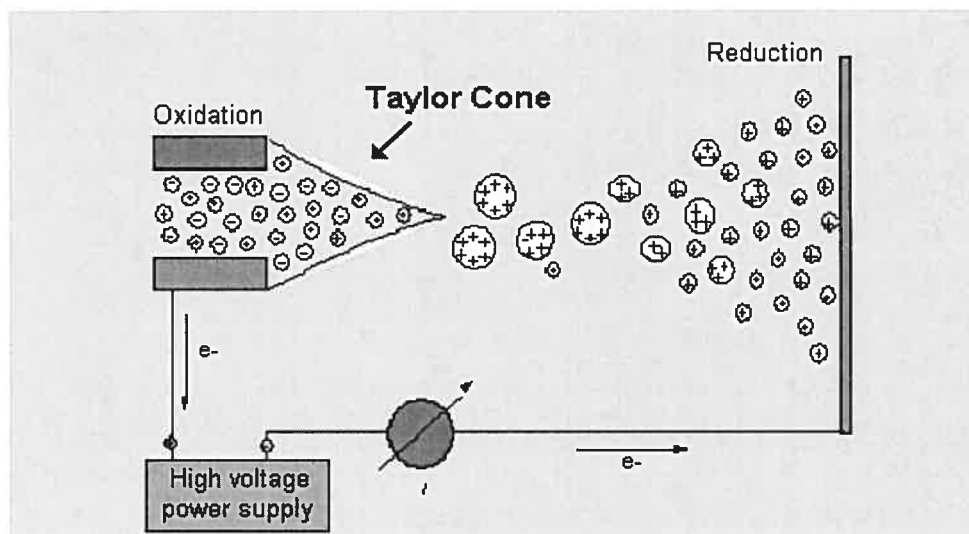


Figure 1 : Représentation du phénomène d'électronébulisation [10]

L'application d'un flux d'air ou d'azote concentrique à l'effluent liquide facilite la nébulisation des gouttelettes.

Les conditions acides utilisées en ESI pour produire les gouttelettes chargées positivement, permettent la protonation des groupements fonctionnels des molécules. Les sites primaires basiques d'un peptide sont l'amine primaire, ainsi que tous les groupes basiques que l'on retrouve chez les acides aminés suivants : lysine, arginine et histidine. Sachant que les peptides provenant d'une digestion par la trypsine possèdent soit la lysine, ou l'arginine à l'extrémité terminale, ils deviennent alors multiples protonés.

La faible quantité d'échantillons disponible pour l'analyse est un problème souvent rencontré dans les analyses protéomiques. La diminution du débit de la phase mobile permet l'émission de plus petites gouttelettes à l'extrémité du cône de Taylor [7]. Les gouttelettes de plus petites tailles possèdent un rapport surface/volume supérieur, leur conférant ainsi une plus grande densité de charge. Ceci favorise le rendement des phénomènes d'ionisation/désorption des analytes en solution. En 1994, Emmet et al. [12]

ont introduit la source micro-électrospray, travaillant à des débits de la phase mobile inférieurs à 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, puis en 1996, Wilm et al [11], présentent la source nano-électrospray fonctionnant entre 20 et 40 nL/min. Cette technique présente l'avantage d'accroître la sensibilité avec une efficacité d'ionisation plus grande tout en réduisant la consommation d'échantillon.

Le domaine linéaire de l'ionisation ESI fut l'objet de nombreuses études [13,14]. Le résultat varie selon la complexité de la solution analysée. Pour un analyte étalon en solution, la concentration maximale qui fut définie par Kebarle [8], correspond à la limite de la charge maximum de l'analyte pour un courant total fixe. Au delà de cette concentration, le signal répond à un phénomène de saturation. Pour des échantillons ayant plusieurs analytes, le domaine linéaire de ESI peut être affecté par la compétition de charge. La concentration limite d'un analyte pouvant être détectée par le spectromètre de masse, peut varier selon la complexité de la matrice dans laquelle l'analyte est dissout. D'après le graphe de la Figure 2 (page 11), provenant d'une expérience de Tang et al. [13], la concentration de saturation de la caféine en mélange avec MRFA (Met-Arg-Phe-Ala) est inférieure à celle de la caféine étalon pour la même concentration. Les résultats montrent que le domaine linéaire des analytes peut être affecté par la présence d'autres analytes.

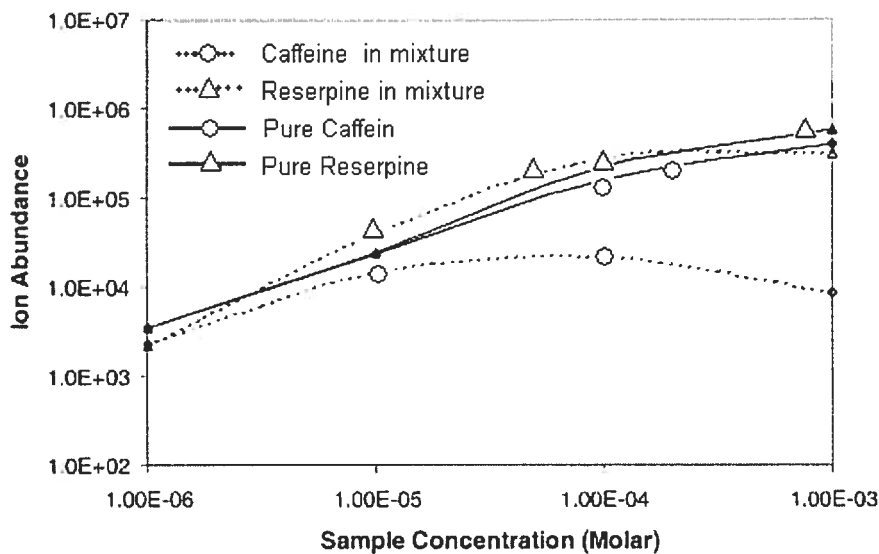


Figure 2 : Intensité du signal en fonction de la concentration, pour un débit d'infusion de 1µL/min, de la caféine et la reserpine seules, ou mélangées avec MRFA [13]

Une analyse théorique réalisé par Tang et al., introduit la capacité de charge C_i , de l'ionisation par électrospray (Équation 2).

$$C_i = \frac{I_{total}}{I_A} = \frac{\beta(\epsilon)}{eA \sum_{j=1}^N (\sum_{z=1}^{(j)} z X_j)} \cdot \left(\frac{k\gamma}{\epsilon Q}\right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Équation 2}$$

Dans cette équation, k est la conductivité électrique du liquide, γ est la tension de surface du liquide, ϵ est la constante diélectrique, $\beta(\epsilon)$ est un coefficient expérimental, Q est le débit de l'éluent, et X_j la concentration molaire de l'analyte j .

Ce rapport C_i prédit le début d'une compétition de charge significative, et la concentration limite maximale correspondant à la saturation du signal. Trois cas se présentent. Lorsque C_i est très supérieure à 1, l'échantillon est trop dilué pour qu'il y ait compétition de charge. Lorsque C_i est voisin de 1, la compétition de charge commence à être perçue. Les composés ayant des

efficacités d'ionisations différentes, auront une réponse variable par le spectromètre de masse. Certains composés du mélange pourront ne pas être détectés. Lorsque les concentrations des analytes augmentent, C_i devient très inférieur à 1. Dans ce cas, la réponse du détecteur peut devenir indépendante de la concentration des analytes.

Une façon d'obtenir de bonnes efficacités d'ionisation ($C_i > 1$) pour tous les analytes de l'échantillon, est soit de réduire le débit de l'éluent (Q dans l'équation 2), et d'opérer ainsi en mode nano-electrospray, soit de diluer au maximum l'échantillon.

2.3.2 Analyseurs de masse

Les analyseurs ont pour fonction de séparer les ions précédemment créés en fonction de leur rapport m/z . Le choix d'un analyseur dépend de la gamme de masse, de sa précision dans la mesure de la masse des analytes, et de sa résolution. De plus en plus d'appareils sont équipés d'analyseurs hybrides associant plusieurs types d'analyseurs. La source ESI est compatible avec un grand nombre d'analyseurs, tels que les quadripôles, les trappes ioniques, les secteurs magnétiques, les analyseurs à temps de vol.

Dans cette section je décrirais uniquement les analyseurs de l'instrument utilisé pour la réalisation de ce travail de maîtrise. Le spectromètre de masse de cette étude est le Q-Tof Ultima de Waters, qui est composé d'un analyseur quadripolaire couplé à un analyseur à temps de vol.

Analyseur quadripolaire

Le quadripôle est l'analyseur le plus couramment utilisé avec la source ESI. Il est composé de quatre électrodes cylindriques parallèles connectées électriquement deux à deux. Une combinaison de voltages continus (u) et alternatifs (v), est appliquée sur chaque paire de tiges provoquant ainsi l'oscillation des ions lors de leur déplacement jusqu'à la sortie du quadripôle. A une paire est appliqué le potentiel électrique suivant :

$$F(t) = u + v.\cos(wt) \quad \text{Équation 3}$$

Dans cette équation, u est la tension continue, v est l'amplitude de la tension alternative et w est la fréquence d'oscillation. A l'autre paire d'électrodes est appliqué le potentiel opposé $-F(t)$. Le mouvement des ions est décrit par les équations de Mathieu [16], dont leurs résolutions montrent que seule une petite plage de m/z ont un chemin stable et passe au travers du filtre de masse tandis que les autres ions frappent les électrodes [17].

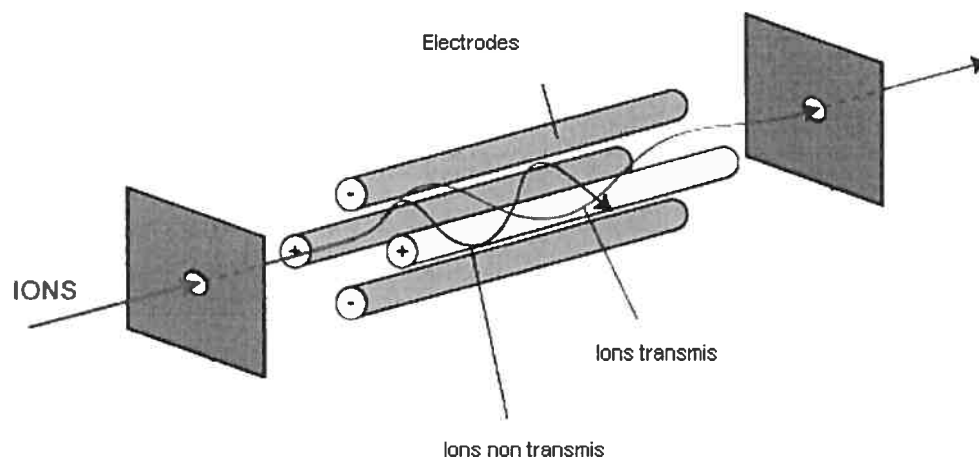


Figure 3 : Représentation d'un analyseur quadripolaire [18]

Analyseur à temps de vol

La séparation dans un analyseur à temps de vol repose sur le fait que des ions de masse différente, accélérés à une énergie cinétique uniforme, ont des vitesses différentes, et donc un temps de vol différent pour parcourir une distance donnée [19-21]. Les ions sont accélérés sous une différence de potentiel V_{acc} , et acquièrent ainsi une énergie cinétique donnée. Ils entrent ensuite dans une zone sans champs, où ils se déplacent à une vitesse inversement proportionnelle à leur m/z (Équation 4). Les ions qui auront une valeur m/z petite se déplaceront plus rapidement, que ceux pour qui cette valeur sera plus élevée. Le temps requis pour un ion de traverser la zone sans champs, appelé aussi tube de vol, est mesuré et utilisé pour déterminer le m/z de l'ion (équation 5).

$$\frac{mv^2}{2} = zV_{acc} \quad \text{Équation 4}$$

$$t = \sqrt{\left(\frac{m}{z} \cdot \frac{d^2}{2V_{acc}} \right)} \quad \text{Équation 5}$$

La résolution d'un analyseur à temps de vol est très affectée par le choix de l'instrument ainsi que des conditions d'opérations. Un des facteurs les plus limitants est la disparité des vitesses initiales des ions quand ils sont accélérés. Ces vitesses initiales sont le résultat des énergies cinétiques données dans la phase gazeuse lors du processus d'ionisation.

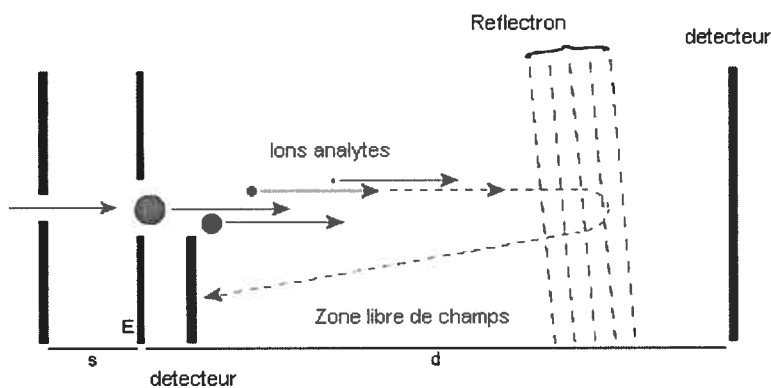


Figure 4 : Schéma de l'analyseur à temps de vol [22]

Une méthode permettant de diminuer l'effet de ces distributions cinétiques, est l'utilisation d'un réflectron. Le réflectron comprend une série d'électrodes régulièrement espacée auxquelles est appliquée une tension électrique croissante. Les ions qui ont le même m/z mais de énergies cinétiques élevées vont pénétrer plus profondément dans le réflectron, ce qui retardera leur arrivée au détecteur. Les ions de plus faible énergie cinétique vont faire demi-tour plus tôt. En ajustant les tensions appliquées au réflectron, tous les ions de même m/z arriveront au détecteur dans un laps de temps plus court, d'où une meilleure résolution.

2.3.3 Spectrométrie de masse en tandem

Le Q-TOF est un instrument hybride composé d'un premier analyseur quadripolaire couplé à un analyseur à temps de vol (TOF) orienté perpendiculairement (figure 5, page 16). Entre les deux se situe une cellule à collision. La spectrométrie de masse en tandem, permet d'isoler un ion précurseur avec un m/z donné. Cet ion est ensuite fragmenté dans la cellule à collision. Les ions fragments sont focalisés et séparés dans le TOF suite à leur accélération orthogonale par un système de lentilles. Les ions fragments sont alors analysés donnant ainsi des informations sur la

structure de l'ion précurseur, telle que la séquence d'acides aminés dans le cas d'ions peptidiques.

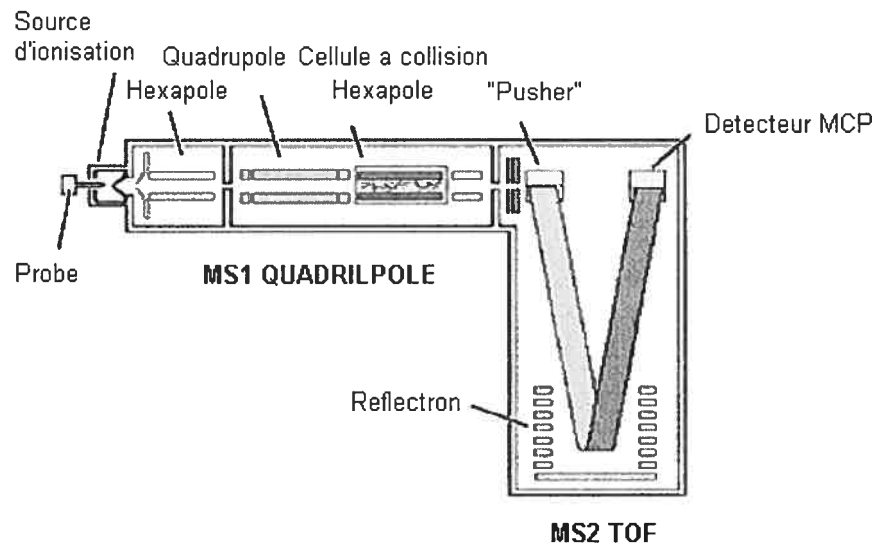


Figure 5 : Schéma du Q-TOF [23]

En mode MS, le quadripôle fonctionne en mode « RF only » : en laissant passer tous les ions. En mode MS/MS, le quadripôle assure la sélection de l'ion parent qui est par la suite fragmenté en présence d'argon dans la cellule à collision.

2.3.4 Identification des protéines

L'empreinte peptidique est la méthode la plus utilisée pour l'identification des protéines [24, 25]. Elle combine, la digestion génomique, la spectrométrie de masse, et un algorithme lié à une base de données. Lors de la digestion trypsique, un ensemble de peptides spécifiques sera obtenu pour chaque protéine. La masse de chacun des peptides correspondants représente une empreinte spécifique à chaque protéine et peut être utilisé pour identifier celle-ci dans un mélange simple en utilisant

des outils de recherche de base de données. Par contre cette méthode d'identification est inefficace pour les mélanges complexes de plus de trois protéines, alors la spectrométrie de masse à tandem vient en recours pour obtenir une identification plus précise.

La spectrométrie en tandem permet la fragmentation et l'analyse des fragments peptidiques. Les peptides se fragmentent principalement au niveau de la liaison peptidique. Si, la charge reste du cote N-terminale, les ions sont désignés par: « a, b, c » en fonction de la liaison qui s'est rompue (figure 6). Par contre, si la charge reste du coté C-terminale, les ions détectés sont nommés : « x, y, z » [24].

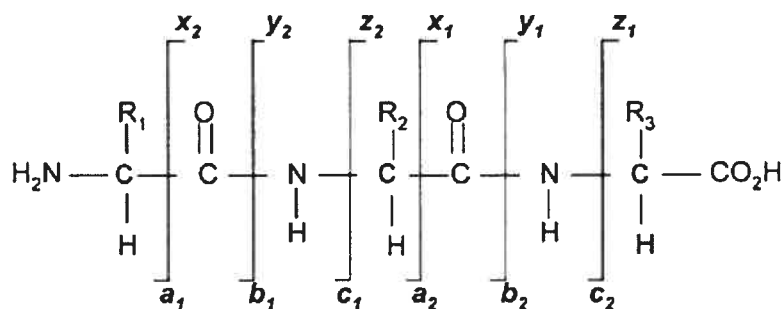


Figure 6 : Nomenclature des ions fragments [24]

Les ions 'y' et 'b' sont majoritaires lors de l'activation par collision a basse énergie (<100 eV) pour les peptides tryptiques [24]. Si une série y, ou b est détectée, alors, la différence de masse entre chacun correspond à un acide aminé, et la séquence peut être ainsi identifiée de façon manuelle ou lors de la recherche de base de données.

2.4 Techniques de séparations

2.4.1 L'électrophorèse sur gel

L'électrophorèse sur gel bi-dimensionnelle, introduit par O'Farrell [26], est l'outil de séparation le plus utilisé en protéomique. L'échantillon déposé sur le gel, est séparé dans une première dimension selon le point isoélectrique des protéines, et dans une seconde dimension en fonction de leur masse moléculaire. Malheureusement, l'électrophorèse bidimensionnelle ne permet pas de séparer efficacement les protéines de pH extrêmes, ou hydrophobes [27, 28]. Une technique alternative consistant au couplage du gel SDS (sodium dodecylsulfate) PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) suivi d'une séparation en chromatographie liquide sur phase inversée a été développée. Le gel SDS permet de séparer les protéines en fonction de leur masse. Il est ainsi possible de détecter les protéines basiques et hydrophobes. Pour pouvoir être analysé par spectrométrie de masse, le gel est découpé, puis les protéines contenues dans chaque morceau sont digérées par des enzymes protéolytiques extraites et les peptides correspondants séparés par chromatographie liquide. La sensibilité, ainsi que la quantité totale pouvant être chargée sur le gel, typiquement de l'ordre de 10 à 50 µg, restent limités [29].

2.4.2 Chromatographie liquide à haute performance

Grâce à son pouvoir de résolution, sa reproductibilité, et sa compatibilité avec la source ESI, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), est très utilisée en protéomique. Un autre aspect intéressant, est la variété de phases stationnaires, et de phases mobiles. Contrairement, à la méthode sur gel, la préparation des échantillons se trouve simplifiée.

organique augmente. Ce sont les peptides les plus polaires qui seront les moins retenus et élueront en premiers.

La phase inversée est composée par des chaînes linéaires de 4 à 18 atomes de carbones (C4, C18) greffée à des billes de silice. Il est possible de différencier plus de 600 phases stationnaires en phase inversées. Provenant de manufacturiers différents, elles permettent des séparations d'un même mélange, mais avec des sélectivités différentes.

Séparation par chromatographie d'échangeuse d'ions

Les peptides ainsi que les protéines, possèdent une charge positive lorsque le pH est inférieur à leur pI, et négative dans le cas inverse. La chromatographie par échange d'ions utilise le principe de la variation de charge en fonction du pH [31, 32]. Elle dépend des interactions électrostatiques (ou ioniques), entre les solutés chargés (et sels) dans la phase mobile, et les groupes chargés de la résine (phase stationnaire). Les échangeurs de cations regroupent les résines à faibles interactions (WCX) comprenant entre autres des groupes carboxyliques, ainsi que les résines de fortes interactions ayant par exemple des groupes sulfoethyl (SCX). Les échangeurs d'anions regroupent les résines à faibles interactions (WAX), comprenant des groupes amines secondaires alors que les résines de fortes interactions (SAX) possèdent des polymères ayant des amines quaternaires. En chromatographie à échange d'anions, les peptides chargés négativement font compétition avec les ions chargés négativement de la phase mobile pour les groupes positifs de la phase stationnaire. Inversement, la chromatographie à échangeurs de cations implique la compétition entre les peptides chargés positivement et les ions positifs de la phase mobile pour les sites chargés négativement de la phase stationnaire. Le principe de séparation des colonnes échangeuse d'ions repose sur la désorption des analytes selon les interactions électrostatiques

s'opérant avec la phase stationnaire. Ainsi, les peptides chargés à pH acide ($\text{pH} < 3.5$) sur une résine échangeuse de cations seront élués selon leur ordre croissant de charge lors de l'augmentation de la concentration de sel (exemple : $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$) avec la phase mobile.

C) Nano-chromatographie liquide

Le développement de la nano-LC a deux objectifs principaux : i) améliorer la limite de détection afin de pouvoir travailler avec de plus petites quantités d'échantillons, ii) augmenter la sensibilité de l'ionisation en utilisant les sources nano-electropray.

La concentration des analytes en sortie de colonne est décrite par l'équation 5. La concentration maximale, en sortie de colonne est inversement proportionnelle au volume mort de la colonne, soit au carré du diamètre interne de la colonne. Une réduction du diamètre interne, produit une augmentation du signal [34].

$$C_{\max} = \frac{mN^{\frac{1}{2}}}{(2\pi)^{\frac{1}{2}}V_0(1+k)} \quad \text{Équation 6}$$

C_{\max} est la concentration en sortie de colonne, m la quantité absolue d'analyte, N l'efficacité de la colonne, V_0 le volume mort de la colonne, k le facteur de rétention.

Différentes classifications de colonnes HPLC sont disponibles dans la littérature. Le tableau I, montre une classification selon le diamètre interne et le débit correspondant de la phase mobile.

Tableau I : Classification des colonnes selon leur diamètre interne [34]

| Colonnes Conventionnelles | i.d.(mm) | Débits ($\mu\text{L}/\text{min}$) |
|---------------------------|---------------|-------------------------------------|
| Wide-bore (préparative) | > 4.6 | > 3000 |
| Normal-bore (analytique) | 3 – 4.6 | 500 – 3000 |
| Narrow-bore | 1 – 2 | 20 – 300 |
| Microbore | 0.150 – 0.800 | 2 – 20 |
| Nanobore | 0.020 – 0.100 | 0.1 – 1 |

L'analyse des peptides par spectrométrie de masse peut être améliorée en pre-concentrant les analytes avant son analyse par LC-MS étape, avec une pré-colonne [35]. En principe, le volume d'injection optimum, et la capacité de charge sont réduits proportionnellement au carré du diamètre interne de la colonne analytique [34]. Pour des colonnes analytiques de diamètre interne inférieur à 1 mm, des volumes d'injection inférieurs à 1 μL sont nécessaires. Pour une concentration identique, cela réduit la quantité totale à injecter. Il devient nécessaire d'utiliser un système de concentration à l'aide d'une pré-colonne. Il est ainsi possible d'injecter des volumes relativement grand sans détérioration de la chromatographie. Les pré-colonnes sont très utiles pour concentrer mais également pour éliminer des contaminants, tels que les sels non volatils qui pourraient perturber l'ionisation par ESI [36]. Le diamètre interne de la colonne analytique étant relativement petit (75 μm - 250 μm), il est important de bien définir les dimensions de la pré-colonne, pour avoir une capacité de charge suffisante tout en maintenant une séparation efficace dans la colonne analytique qui suit.

De grandes avancées techniques ont été réalisées au niveau des nano colonnes (technique de remplissage, taille des particules) et au niveau de la chromatographie utilisant un débit de la phase mobile inférieur à 1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

D) Systèmes chromatographiques multidimensionnels

Afin d'augmenter la capacité du système chromatographique pour l'analyse par spectrométrie de masse, une technique alternative a été élaborée: la chromatographie multidimensionnelle [26, 37, 38]

Les peptides sont d'abord séparés sur une colonne d'échange de cations suivi de leur séparation sur colonne de phase inversée. Dans un premier temps, les peptides sont élués de la résine d'échangeuse de cations par paliers de sels, ou par un gradient de sels [39], pour se déposer en tête de la seconde colonne remplie de phase inversée. Ils sont ensuite élués une seconde fois en fonction de leur hydrophobicité croissante vers le spectromètre de masse. Si la majorité des couplages allient colonne échangeuse de cations et colonnes de phase inversée, il est également possible d'utiliser des colonnes d'affinité ou d'échange d'anions selon les protéines étudiées.

2.4.3 Paramètres d'un système chromatographique

Pour avoir une bonne séparation des constituants d'un mélange, trois critères doivent être satisfait [40]:

- Tous les constituants du mélange doivent être retenus
- Les pics doivent être bien séparés
- L'analyse doit être rapide

L'éluion d'un analyte se caractérise par : i) le temps de rétention, RT : temps correspondant au sommet du pic; ii) le temps mort, RT_0 : temps entre l'injection et la sortie de l'analyte non retenu, iii) la largeur à la base, w : largeur du pic à 10% du pic ; iv) la largeur à mi-hauteur, $w_{1/2}$: largeur à la mi-hauteur du pic.

Facteur de capacité

Le facteur de capacité k' représente l'affinité relative de l'analyte pour la phase stationnaire versus la phase mobile et peut être calculé par :

$$k' = \frac{RT_r - RT_0}{RT_0} \quad \text{Équation 7}$$

Plus k' est grand, plus l'analyte sera retenu longtemps dans la colonne.

Sélectivité

La sélectivité α est caractérisé par la distance séparant les sommets de deux pics a et b, consécutifs et est défini par la relation :

$$\alpha = \frac{k'_b}{k'_a} \quad \text{Équation 8}$$

Nombre de plateaux théoriques

Une autre mesure caractérisant le système chromatographique est donnée par le nombre de plateaux théoriques N , qui est une mesure de l'élargissement des bandes chromatographiques pendant une analyse. Le nombre de plateaux théoriques N est calculé par:

$$N = 5.54 \left(\frac{RT_r}{W_{\frac{1}{2}}} \right)^2 \quad \text{Équation 9}$$

D'une façon générale, plus grand est N , plus fins sont les pics, et meilleure est la résolution des pics ayant des valeurs k' proches

La hauteur équivalente à un plateau théorique est défini par :

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Équation 10}$$

Où L est la longueur de la colonne

La hauteur de plateaux théorique réduit est défini par :

$$h = \frac{N}{d_p} \quad \text{Équation 11}$$

Où d_p est la taille des particules de la phase stationnaire.

Capacité de charge

Pour obtenir une bonne élution, il faut en plus de séparer tous les analytes, que les pics soient gaussiens et symétriques.

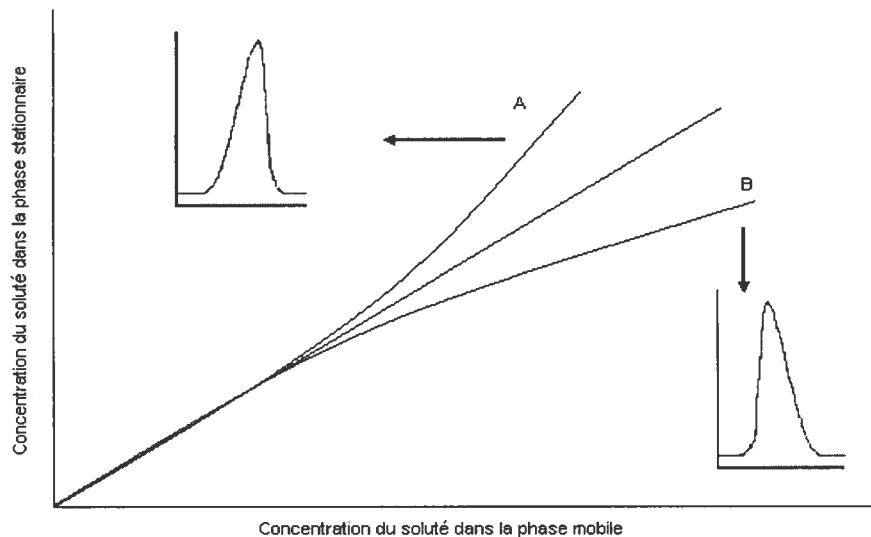


Figure 8: Isotherme de la constante de partage k , en fonction de la quantité injectée

L'élution est linéaire si la constante de partage k ne dépend pas de la quantité injectée. Une élution linéaire donne des pics symétriques, et une élution non linéaire donne des pics asymétriques. Deux cas se présentent pour l'élution non linéaire. Dans le premier cas (courbe A, de la figure 8) : le

temps le soluté est plus retenu sur la phase stationnaire, et le temps de rétention augmente avec une augmentation de la quantité injectée. Dans le deuxième cas (courbe B de la figure 8), c'est la situation inverse.

L'asymétrie du pic A_s est calculée en utilisant la relation suivante :

$$A_s = \frac{B}{A} \quad \text{Équation 12}$$

A et B sont définis à la figure 9

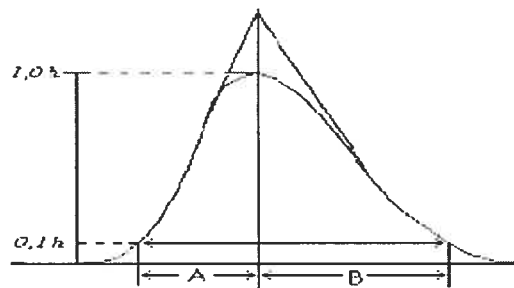


Figure 9 : Représentation d'un pic non gaussien

La capacité de charge d'une colonne est atteinte lorsque l'élution n'est plus linéaire.

Capacité chromatographique

La capacité chromatographique est définie comme le nombre maximum de pics pouvant théoriquement être séparés, pour des conditions chromatographiques données [41].

$$n = \frac{RT - RT_0}{w_{1/2}} \quad \text{Équation 13}$$

2.4.4 Remplissage des colonnes

La partie la plus importante des systèmes chromatographiques, est la colonne qui représente le cœur de la séparation. Un bon choix de phase stationnaire, et de phase mobile est essentiel pour obtenir la séparation attendue. De plus, une efficacité élevée du remplissage de la colonne permet d'obtenir une meilleure résolution. En fait, le procédé de remplissage influence considérablement les performances de la colonne. La miniaturisation des colonnes LC a commencée dans les années 1960, avec les travaux de Horvitz, qui utilisaient des colonnes de 1 mm de diamètre interne. Une décennie plus tard Ishii et al. [42] remplissaient des colonnes de 0.5 mm de diamètre interne, et démontrèrent leur efficacité accrue en terme de plateaux théoriques. Les avantages d'utiliser des colonnes de micro volumes sont nombreux, tels que nous l'avons vu précédemment dans la section 1.2.3.2, le plus important étant une quantité réduite d'échantillon à analyser, mais de plus nous pouvons inclure une consommation réduite de phase mobile, l'utilisation d'une plus petite quantité de phase stationnaire, une meilleure efficacité d'interface avec le spectromètre de masse.

Les colonnes capillaires peuvent être produites par de nombreuses procédures. La technique de remplissage par un mélange en suspension « slurry packing », qui sera celle utilisée lors de mes travaux est la plus utilisée [43- 46].

Plusieurs paramètres peuvent influencer le remplissage des colonnes capillaires. Voici quelques uns des plus cités :

La concentration du mélange en suspension est un facteur important dans le remplissage. Gluckman et al. [47], étudièrent les effets sur les performances des colonnes. Ils varièrent la concentration entre 30 et 260 mg/ml, et observèrent une meilleure efficacité de colonnes pour celles remplies avec les concentrations les plus faibles

L'influence de la pression lors du remplissage ne semble pas être importante. Vissers et al. [45] ainsi que Zimina et al. [48] ont étudiés les performances chromatographiques pour différentes pressions appliquées, et n'ont trouvés aucunes différences significatives. Par contre, au delà des résultats expérimentaux, une méthode de simulation a permis d'étudier l'influence de la vitesse d'impact des particules sur la formation du lit de particules obtenu pour des particules de diamètre supérieur à 5 μm [44]. Ces simulations indiquent qu'une plus petite vitesse de fluide crée un lit plus dense. La vitesse des particules suspendues est influencée par les forces colloïdales à proximité du lit stationnaire. Elle sera donc fortement dépendante de l'influence des effets de répulsions. Les porosités externes de la structure simulée, sont inférieures à cela si un remplissage au hasard est effectué. Les performances chromatographiques seraient d'avantage liées à la durée du processus de remplissage, qu'à la vitesse des particules. La concentration du mélange en suspension semble plus importante que la pression appliquée aux particules.

Différentes sortes de disques frittés sont utilisés par différents groupes de recherche, telles que les particules de silice agglomérées, des disques frittés en céramiques, ou des filtres de fibre de verre [49, 50].

Les procédures de remplissages des colonnes chromatographiques donnent des résultats reproductibles [51], et seront évaluées lors des travaux de ce mémoire.

CHAPITRE 3

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

3.1 Fabrication des pré-colonnes et colonnes capillaires

3.1.1 Système de remplissage

Le système de remplissage utilisé pour les travaux de ce mémoire est composé d'une bonbonne de gaz d'air comprimé de Praxair (Mississauga, ON, Canada), livrant une pression de 1500 psi. Un réservoir en acier inoxydable, provenant de Swagelok (Ville St Laurent, QC) est connecté à une valve à trois voies, et au support de remplissage de la colonne tel que du tube en PEEK, ou un capillaire (voir section : 2.1.2 et 2.1.3). Un disque fritté en acier inoxydable de porosité 5 μm provenant de SPE Limited (North York, ON, Canada), est connecté à la sortie du support grâce à une union en PEEK, Bobby Nanotight provenant de SPE. La figure 10 représente le montage de compression.

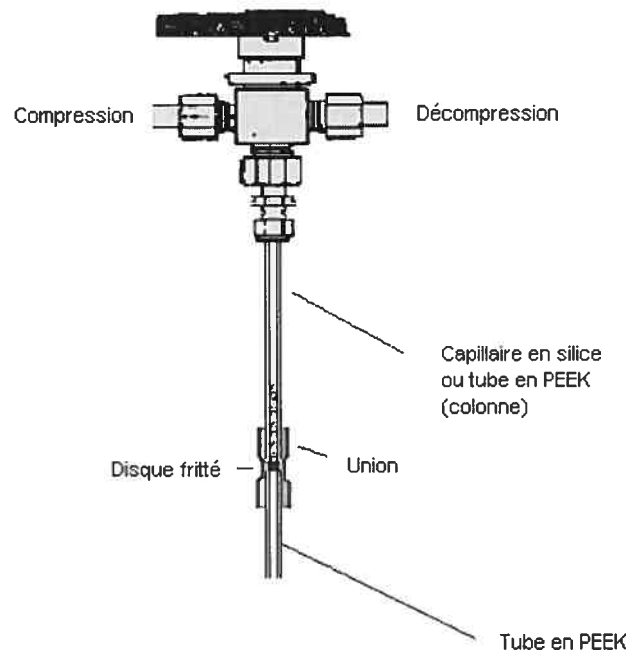


Figure 10 : Montage du système de remplissage des colonnes.

3.1.2 Supports des pré-colonnes « artisanales »

Trois différents matériaux furent utilisés comme support des pré-colonnes. Le Tube PEEK, distribué par SPE Limited (North York, ON, Canada) fut utilisé pour les pré-colonnes SCX. Les différents diamètres internes suivants furent testés : 250 μm , 400 μm , 500 μm , 750 μm . Tous ont un diamètre externe de 1.8 mm. Le capillaire de silice fondu provient de Polymicro Technologies Inc. (Phoenix, AZ). Des capillaires de 250 μm i.d., 360 μm o.d. furent utilisés pour les pré-colonnes C18 (chapitre 3), et les pré-colonnes SCX (chapitre 4). Le tube en Téflon 360 μm i.d., 1.58 mm o.d. provenant de Supelco (Bellefonte, USA) fut aussi utilisé pour les pré-colonnes C18 (chapitre 3). Une fois remplis, tous furent coupés aux longueurs désirées pour l'analyse.

3.1.3 Supports des colonnes capillaires « artisanales »

Les colonnes capillaires analytiques furent remplies en utilisant des capillaires de silice fondue (Polymicro Technologies Inc). Les différents diamètres internes testés, furent 75 μm , 150 μm , et 250 μm . Tous ont un diamètre externe de 360 μm .

3.1.4 Le disque de verre poreux « le frit »

Les frits utilisés pour les capillaires sont des disques d'extraction C18 et SCX pour les colonnes C18 et SCX respectivement. Les deux proviennent de 3M Empore (St Paul, MN, USA). Pour les pré-colonnes remplies dans du tube PEEK, le frit, ainsi que l'union utilisés pour le remplissage sont maintenus en place et utilisés lors de l'analyse.

3.1.5 Solution du matériel de remplissage

La suspension de particules C18 (voir section 2.2, pour les informations de la phase stationnaire) fut préparée à une concentration de 10 mg/mL dans l'acétonitrile (Fisher, Ottawa, Canada). Pour le matériel SCX, une suspension de 20 mg/mL dans l'eau purifiée (HPLC grade, Fisher, Ottawa, Canada) fut utilisée. Le matériel SCX est du Polysulfoethyl, 300 Å, 5 µm provenant de PolyLC (Southborough, MA, USA).

3.1.6 Méthode de remplissage et d'assemblage des colonnes et pré-colonnes « artisanales »

Un volume de suspension « slurry » de phase stationnaire est introduit dans le réservoir selon le diamètre de la colonne, et de façon à obtenir une colonne d'une longueur 10 cm au minimum. Pour les colonnes capillaires C18, 70 µL, de la solution de C18 est nécessaire pour les capillaires de 75 µm i.d., 140 µL pour les colonnes de 150 µm, et 200 µL pour les colonnes de 250 µm. Ces volumes furent déterminés expérimentalement afin d'obtenir des colonnes de 10 à 13 cm, afin de pouvoir couper la colonne à 10 cm.

Pour les pré-colonnes C18, 150 µL de la solution de C18 furent utilisés. Pour les pré-colonnes SCX, de 200 à 400 µL de la solution SCX furent utilisés pour les colonnes de 250 à 700 µm. Le réservoir est complété avec de l'acétonitrile. La pression est appliquée, le solvant passe au travers du disque fritté, tandis que le matériel reste dans le capillaire ou dans tout autre support utilisé.

Pour les colonnes capillaires, le support en silice est enlevé de la bonbonne. Puis le bout du capillaire, est pressé sur la membrane C18 (ou SCX) qui est utilisé en tant que disque fritté. Le capillaire rempli de phase

stationnaire est connecté à un autre capillaire de 50 μm i.d., grâce à un tube en téflon de 360 μm i.d. L'assemblage est représenté à la Figure 11.

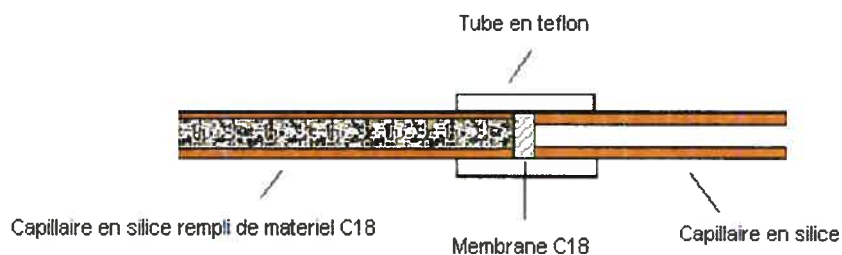


Figure 11 : Assemblage de la colonne capillaire avec le frit

Pour les pré-colonnes remplies dans des tubes en PEEK, le tube est déconnecté de la bonbonne, mais le frit et l'union utilisé lors du remplissage reste connecté à la pré-colonne, et seront utilisés lors de l'analyse.

2.1.7 Modèles de pré-colonnes « artisanales » testées.

Différents modèles de pré-colonnes furent produits, optimisés et testés. Deux modèles sont présentés à la figure 12 (page 34) Les procédures pour remplir les pré-colonnes sont similaires à celles utilisées pour remplir les colonnes analytiques. La sortie est ajustée contre un capillaire de silice fondue de 50 μm i.d., en utilisant un tube en téflon servant d'union, créant ainsi un volume mort minimal.

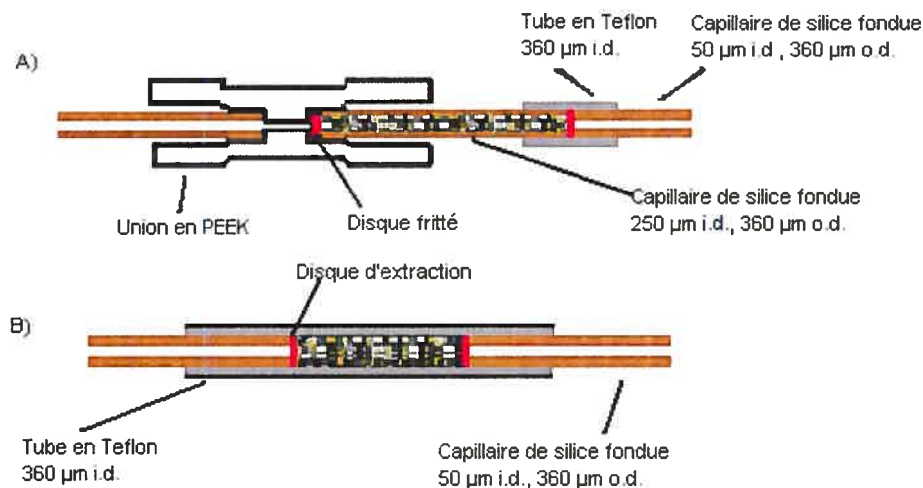


Figure 12 : Modèles de pré-colonnes testés. A) Modèle A : Capillaire de silice fondue 250 µm x 12 mm, $v=0.59 \mu\text{l}$, B) Modèle B : Tube en téflon 360 µm x 5mm, $v=0.51 \mu\text{l}$

3.2 Colonne commerciales et phases stationnaires

La colonne C18 analytique commerciale testée est la « Nano Series Column » 75 µm i.d. de LC Packing (San Francisco, USA). La phase stationnaire étant le matériel Inertsil, ODS-3, 3 µm, 75 µm i.d.

Les pré-colonnes commerciales sont : NanoEase C18 Symmetry, 350 µm i.d., 5 mm, C18, 5 µm, 300 Å, 5 Waters (Milford, USA), NanoEase, C18 Symmetry, C18, 5 µm, 300 Å, 180 µm i.d., 23.5 mm, C18 Waters (Milford, USA); Micro-pre-column, C18, 5 µm, 100 Å, 300 µm, i.d., 1 mm LC Packing, (San Francisco, USA).

Les phases stationnaires de phase inversées testées sont les suivantes : C18 **Symmetry** Waters 300 Å, 5 µm; **Stable bond** SB-C18, 300 Å, 3.5 µm; **Zorbax** Agilent (Wilmington, USA); **Jupiter** C18, 300 Å, 5 µm, Phenomenex (Torrance, Canada); **218MS54** C18 300 Å 3.5 µm, Vydac distribué par Mendel scientific Company (Guelph, Canada). Le matériel

SCX testé est du Polysulfoethyl, 300 Å, 5 µm provenant de PolyLC (Columbia, USA)

3.3 Systèmes analytiques

Les analyses MS furent effectuées avec un Q-Tof Ultima de Waters (Manchester, UK). La pompe HPLC, est un CapLC de Waters (Manchester, UK) pouvant fournir des débits de l'ordre de quelques µL/min. La colonne analytique est connectée à un capillaire de silice fondue de 20 µm i.d., 90 µm o.d. provenant de Polymicro Technologies Inc. (Phoenix, AZ) permettant la formation d'un jet de nébulisation, au voisinage de la source ESI. Le voltage du cône de la source ESI fut fixé à 3.8 kV.

Pour la mesure de capacité des colonnes SCX, le system Waters CapLC 2487, dual λ absorbance detector fut utilisé (λ= 274nm).

3.3.1 Conditions Chromatographiques

Les solvants utilisés pour l'élution des peptides sont l'eau Optima provenant de Fisher (New Jersey, USA), l'acétonitrile de grade HPLC provenant de Fisher (Canada), l'acide formique (FA) provenant de EMD Chemicals (Darmstadt, Allemagne), le TFA et le Formate d'ammonium (97%) provenant de Sigma (Oakville, Canada).

2.3.1.1 Élution de la colonne C18 :

Les deux solutions utilisées pour l'élution sont :

Solution A : H₂O-FA (99.8 : 0.2, v/v)

Solution B : Acetonitrile-FA (99.8:0.2, v/v).

Le gradient utilisé pour l'élution des peptides, est 10 % B, durant 3 minutes, puis 10 à 40% B durant 53 minutes, de 40 à 60 % B durant 2 minutes, puis de retour à 10% B.

Une période de rééquilibrage de 10 minutes fut utilisée. Le débit sortant des pompes est de 5 μ L/min. Un diviseur de débit est inséré avant la pré-colonne C18, de façon à pouvoir ajuster le débit à 600 nL/min.

3.3.1.2 Éluion de la colonne SCX (chapitre 4, section 4.2)

Les solutions tampons utilisés pour le gradient de sels lors de l'optimisation de la séparation sur la colonne SCX sont :

Solution A : 5 mM de formate d'ammonium, dans une solution H₂O-acetonitrile (90:10, v/v). Puis, un volume d'acide formique a été ajouté et ajusté pour chaque solution de façon à obtenir un pH égal à 3.5 de la solution finale.

Solution B : 1M de formate d'ammonium dans une solution H₂O-acetonitrile (90:10, v /v). Puis, un volume d'acide formique a été ajouté et ajusté pour chaque solution de façon à obtenir un pH égal à 3.5 de la solution finale.

Deux gradients ont été utilisés :

Pour l'élution du mélange des 5 peptides, le gradient est de 2 % B, pendant 2 minutes, puis de 2 à 50% B pendant 40 minutes, puis de 50 à 2% B pendant 2 minutes, suivie d'une rééquilibrage de 20 minutes.

Pour l'élution de l'échantillon de protéines sériques humaines, le gradient est de 2 % B, pendant 2 minutes, puis de 2 à 30% B pendant 70 minutes, suivie d'une rééquilibration de 20 minutes.

3.3.1.3 Éluion de la colonne SCX pour la 2D-LC (chapitre 4, section 4.3)

Les solutions utilisées pour la séparation en 2D-LC sont des solutions de 40 mM, 60 mM, 85 mM, 125 mM, 160 mM, 250 mM, 500 mM de formate d'ammonium dans 95% H₂O-acetonitrile (95:5, v/v). Puis, un volume d'acide formique a été ajouté et ajusté pour chaque solution de façon à obtenir un pH égal à 3.5 pour chaque solution finale.

L'élution des peptides sur la colonne SCX est effectuée en injectant une des solutions de formate d'ammonium, pendant 5 minutes avec un débit de 8 µL/min.

3.3.2 Analyses par spectrométrie de masse

Les analyses MS et MS/MS sont effectuées de 8 à 60 minutes. Les acquisitions en mode MS se font sur une fenêtre de masse de m/z de 400 à 1600, celles en MS/MS de 100 à 1999 da. Pour les méthodes en MS/MS par exclusion, les paramètres diffèrent pour chacune des acquisitions. Le cycle de 9 s d'acquisition MS/MS, comprend 1 s en mode MS, 2 s pour chacun des spectres MS/MS pour les quatre ions précurseurs les plus abondants avant de recommencer le cycle. Chaque ion séquencé n'est plus fragmenté pendant les 60 secondes suivantes, pour permettre de séquencer des ions de plus faibles intensités. Le seuil d'intensité pour qu'un ion soit séquencé est de 30 "counts" d'intensité ionique. Les paramètres de la méthode de la deuxième MS/MS sont identiques à la première, sauf pour le seuil d'intensité qui passe à 20 "counts".

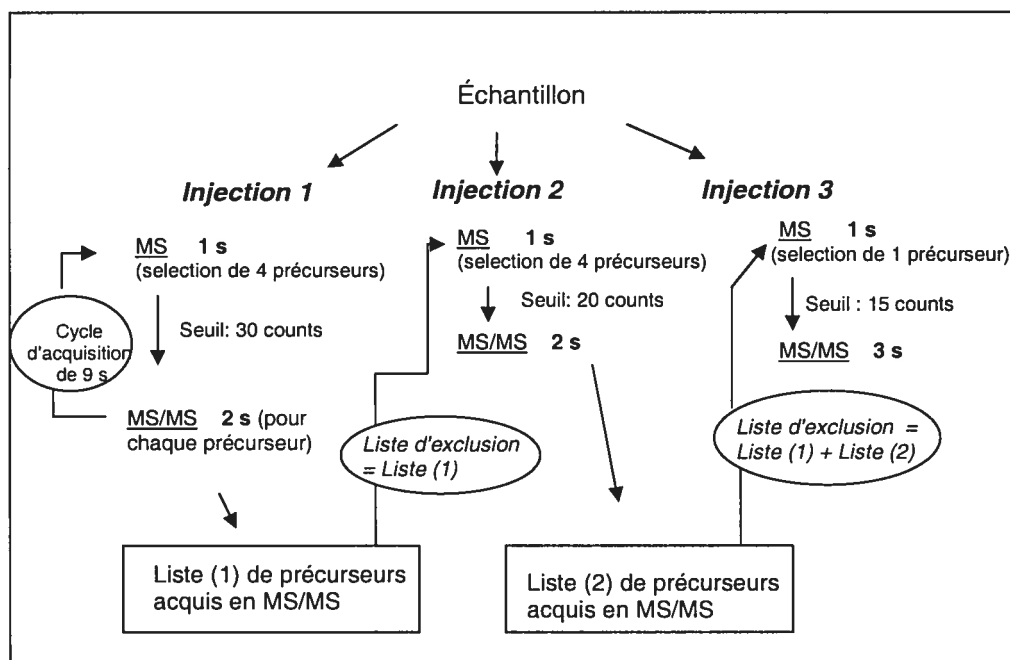


Figure 13 : Représentation de la méthode MS/MS d'exclusion

De plus cette méthode utilise une liste d'exclusion qui est composée de tous les précurseurs qui ont été séquencés lors de la première MS/MS. La troisième MS/MS balaye en mode MS pendant 2 secondes, puis en mode MS/MS pendant 3 secondes sur l'ion le plus intense restant, puis retourne immédiatement en mode MS. Le seuil d'intensité est de 15 "counts". La liste d'exclusion dans ce cas est composée de tous les précurseurs séquencés dans les deux premières acquisitions. La figure 13 illustre la méthode d'exclusion. La fenêtre d'exclusion en temps de rétention (ΔTr) pour toutes les méthodes est de 3 minutes. La fenêtre d'exclusion en m/z ($\Delta m/z$) est 1.1 Th.

3.4 Échantillons d'analyse

3.4.1 Le mélange de 8 protéines

Le mélange de l'étude est composé des 8 digestats tryptiques suivantes provenant de Michrom BioResources (Auburn, CA, USA) :

Conalbumin Tryptic Digest (500pmol), Michrom BioResources, Carbonic anhydrase Tryptic Digest (500pmol), Lactoperoxydase Tryptic Digest (500pmol), Enolase Tryptic Digest (500pmol), Hexokinase Tryptic Digest (500pmol), Phosphoglucose isomerase Tryptic Digest (500pmol), Lysozyme Tryptic Digest (500pmol), Alcohol Dehydrogenase Tryptic Digest (500pmol).

Les huit protéines digérées ont été solubilisées dans un mélange de H₂O-acétonitrile-TFA (88.2: 9.5 : 0.2, v/v).

3.4.2 Échantillon d'apomyoglobin

L'échantillon d'apomyoglobin de cheval provient de Sigma. L'échantillon est solubilisé dans une solution de H₂O-acétonitrile-TFA (88.2: 9.5 : 0.2, v/v).

3.4.3 Échantillon de protéines sériques humaines

Cet échantillon fut préparé par Tam Lehuu (Caprion Pharmaceutique).

L'échantillon de plasma humain brut provient de Bioreclamation (Hicksvill, NY, USA). La colonne MARS (Multiple Affinity Removal System) provient d'Agilent Technologies, Inc., 10 x 10 mm, les Tampons A (liant), et B (élution) proviennent d'Agilent Technologies, Inc. Le bicarbonate

d'ammonium provient de Sigma, l'Urée de Sigma, l'eau et l'acetonitrile de Fisher, l'enzyme Lys-C de Wako, l'enzyme Trypsine de Promega, le TCEP de Pierce .

Dans un premier temps l'échantillon brut est mélangé avec un tampon de 150 mM de bicarbonate d'ammonium, puis centrifugé de façon à précipiter les larges particules. Le surnageant est chargé sur une colonne d'affinité MARS, de façon à éliminer les protéines abondantes. Cette colonne est capable de lier par affinité avec 6 protéines du plasma : soit l'albumine, les immunoglobulines IgG et IgA, l'haptoglobine, la transferrine et l'antitrypsine. Durant les dix premières minutes, le tampon A est à 100% avec un débit de 1 mL/min, puis de 10 à 13.50 min avec un débit de 2.5 mL/min le tampon B passe à 100 %. Les protéines sont collectées durant les 10 premières minutes, transférées dans des tubes puis lyophilisées.

L'échantillon est ensuite digéré avec les enzymes Lys-C et trypsine, en utilisant la procédure suivante. Trois solutions tampon sont nécessaires.

Tampon #1 : 200 mM de bicarbonate d'ammonium dans H₂O, pH=7.8

Tampon #2: H₂O-acetonitrile (90 :10, v/v), pH=5

Tampon #3 :0.05mM ammonium bicarbonate dans H₂O-acetonitrile (95 :5, v/v), pH=5.3

Une solution d'urée de 8M fut préparée dans la solution tampon #1. Un aliquot de 1300 µL de la solution tampon #3 est ajouté dans le tube de trypsine lyophilisé de 260 µg, pour obtenir une concentration de 0.2 µg/µL. Un aliquot de 2700 µL de la solution tampon #3 est ajouté au tube de Lys C pour obtenir une concentration de 0.2 µg/µL. Un aliquot de 323 µL de la solution de 8M d'urée est ajouté à l'équivalent de 750 µg de protéines à digérer. Le tube est agité durant 30 minutes. Un aliquot de 323 µL de la solution tampon #2 est ajouté pour obtenir une concentration en urée de

4M. Un aliquot de 75 μL de la solution de Lys C est ajouté. Le tube est placé dans un incubateur à 37°C pendant 3.5 heures. Un aliquot de 1865 μL de la solution tampon #3 est ajouté pour obtenir une concentration en urée de 1M. Un aliquot de 150 μL de la solution de trypsine est ajouté. Le tube est de nouveau placé dans l'incubateur à 37°C, mais pour une durée de 16 heures. L'échantillon est ensuite évaporé.

L'échantillon est suspendu dans une solution H_2O -acétonitrile-TFA (88.2: 9.5 : 0.2, v/v) pour obtenir une solution de concentration de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (pour le spectromètre de masse), et une solution de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (pour le système UV).

3.4.4 Peptides utilisés pour l'optimisation de la séparation sur la colonne SCX

Les cinq peptides suivant ont été obtenus de Sigma: leu-enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu), procathepsin B fragment 36-50 (Ser-Tyr-Leu-Lys-Lys-Leu-Cys-Gly-Thr-Val-Leu-Gly-Pro-Lys-NH₂), Angiotensin I, (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), Angiotensin II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe). Alors que le peptide H-Met-Arg-Phe-OH a été acheté de Bachem (California, USA).

Une solution de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de chaque peptide fut réalisé avec une solution de H_2O -acétonitrile-TFA (88.2: 9.5 : 0.2, v/v).

Puis un mélange de 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de chaque peptide avec la même solution de dilution fut réalisé.

3.5 Outils Bioinformatiques

L'analyse exhaustive des performances analytiques des systèmes chromatographiques développés nécessite l'utilisation d'outils bioinformatiques. Ces outils permettent entre autres de comparer les différences entre les populations peptidiques de différents échantillons biologiques.

Lors de l'analyse, les informations enregistrées sont les m/z , l'intensité ionique, et le temps de rétention. Ces informations sont visualisées en deux dimensions selon le m/z et le temps de rétention, pour former une carte peptidique. Cette carte permet de déduire l'état de charge des peptides, grâce au patron isotopique du peptide. Par exemple, une différence de m/z de 0.5 ou de 0.33, entre deux isotopes successifs permet d'identifier un peptide doublement ou triplement chargé respectivement.

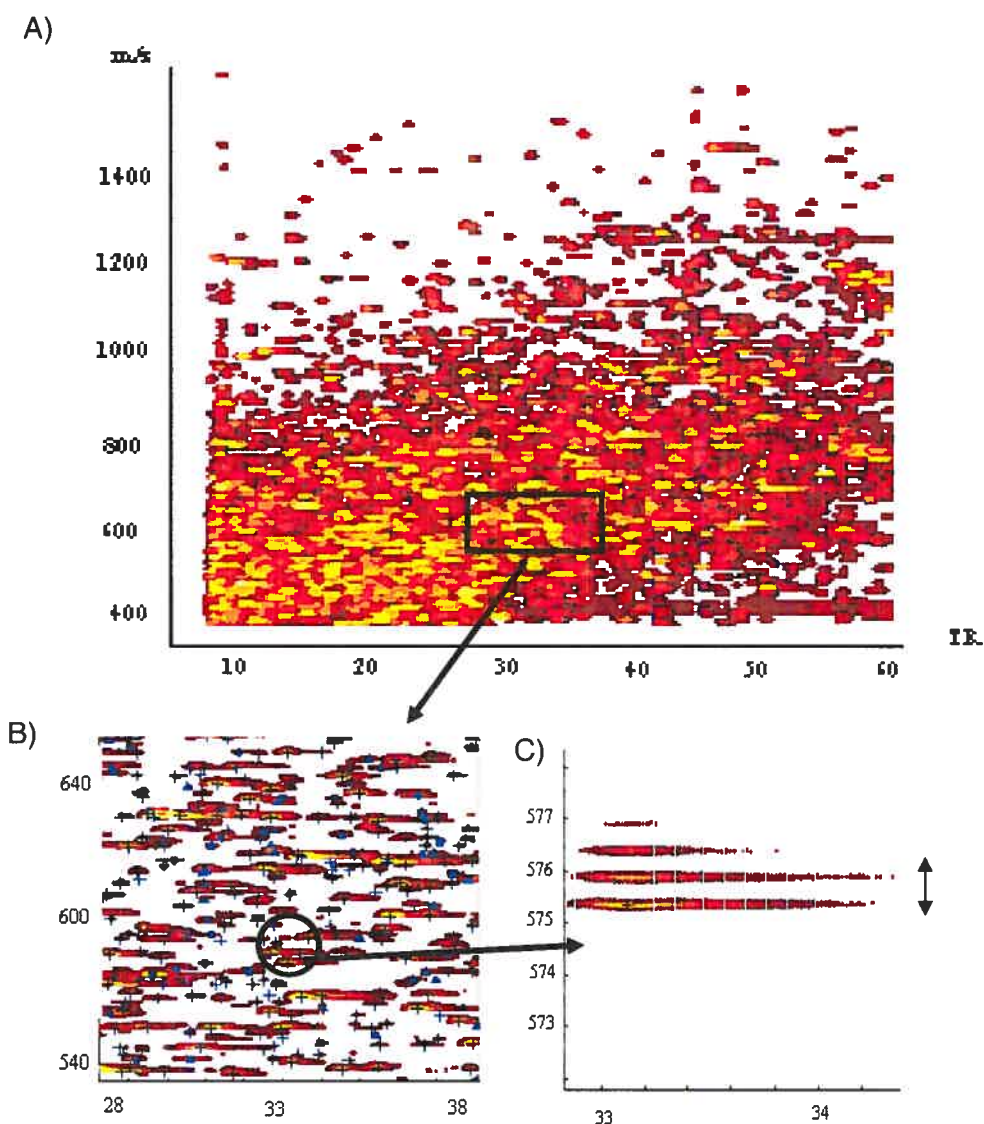


Figure 14 : Carte peptidique d'un digestat trypsique de 8 protéines (80 ng injecté) analyse par nanoLC-MS. A) Représentation bidimensionnelle de m/z versus temps de rétention (Tr, min). B) Agrandissement carte peptidique d'une région (m/z= 540-650), TR= 28-38 min, où la charge des peptides sont ● : +1, + : +2, ▲ : +3. C) carte peptidique mettant en évidence un peptide, m/z = 575.3 (+2)

La figure 14 A) montre une carte peptidique représentant tous les m/z durant l'analyse nanoLC-MS. L'intensité est représentée selon une échelle logarithmique de couleur du noir au rouge au jaune pour représenter les ions de faibles à haute intensité. La figure 14 B) représente un agrandissement de l'analyse. A chaque peptide est attribué une charge, représenté par un rond, une croix, ou un triangle, selon que l'ion soit simplement, doublement, ou triplement chargé

respectivement. La figure 14 C) montre l'agrandissement sur un peptide en particulier soulignant le profil isotopique utilisé pour déterminer la charge.

Le logiciel « Peptides Detect » attribue une charge sur chaque m/z analysé, et compte le nombre d'ions +2, +3, et +4. Les précurseurs +1, ne sont pas considérés pour éviter l'interférence avec les ions non spécifiques de la phase mobile ou la dégradation de la phase stationnaire.

Le logiciel « Eclipse » compare deux cartes peptidiques différentes ou identiques, et relit les ions identiques trouvés pour chacune des mesures.

Le logiciel « Sherpa » calcule les RSD des intensités et des temps de rétentions sur les précurseurs en communs de plusieurs mesures.

Les résultats de séquençages furent analysés en utilisant le moteur de recherche Mascot (<http://www.matrixscience.com>), et la base donnée NCBLnr (dernière mise à jour: 3 juillet 2005) du National Center for Biotechnology Information

Mascot Parameters

| | | | |
|--------------------------|--|------------------------|---|
| 2DLC | | Customize | |
| What is this? | | | |
| MS/MS Ions Search | | | |
| Search Category | Protein | Database | NCBI nr |
| Taxonomy |Homo sapiens (human) | | |
| Enzyme | Trypsin | Allow up to | 1 mixed cleavages |
| Fixed Modifications | <ul style="list-style-type: none"> Acetyl (N-term) Acetyl (K) Amide (C-term G) Acryl (C) Biotinylated (N-term) Biotinylated (K) Carbamidomethyl (C) | Variable Modifications | <ul style="list-style-type: none"> Carbamyl (N-term) Carboxymethyl (C) Cysteic Acid (C) Deamidation (N) Deamidation (Q) Deoxyhexose Deoxyhexose (S) Deoxyhexose (T) |
| Protein mass | | kDa | |
| * Peptide tol. ± | 0.25 | Da | |
| Peptide charge | 2+ and 3+ | | |
| Data format | Micromass (.PKL) | | |
| Instrument | ESI-QUAD-TOF | | |
| Report top | 3000 | hits | |
| * MS/MS tol. ± | 0.25 | Da | |
| Monoisoto... | <input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/> | | |
| Precursor | | m/z | |

Figure 15 : Fenêtre du moteur de recherche Mascot, avec les paramètres pour l'analyse des protéines sériques humaines.

Dans tous les cas, ils identifient des protéines potentiellement présentes dans l'échantillon. Chaque protéine est identifiée sur la base d'un certain nombre de spectres MS/MS, auxquels sont attribués des séquences de peptides tryptiques de la protéine.

Les paramètres utilisés pour la recherche Mascot lors de l'analyse des protéines sériques sont mentionnés à la figure 15. Les modifications variables acceptées sont :

-Oxydation (M), qui représente l'oxydation du résidu méthionine lors de la digestion enzymatique

-Déamidation (N), qui représente la déamidation du résidue asparagine

-Wrong Mass Assignement +1, qui est utilisée lorsque la MS/MS a été effectuée sur le deuxième isotope au lieu du premier isotope.

Pour l'analyse du mélange des 8 protéines, la taxonomie est changée pour : « All species ».

CHAPITRE 4

ANALYSE DE COMPOSANTES CHROMATOGRAPHIQUES POUR UN SYSTÈME 1D-LC-MS

4.1 Introduction

Les analyses protéiques nécessitent la séparation de mélange complexe de peptides de différentes hydrophobicité, de différentes masses et de différentes valeurs de pI. La reproductibilité à des débits de l'ordre du $\mu\text{L}/\text{min}$ est un point critique mais nécessaire pour l'identification et la quantification de protéines provenant de mélange complexe de protéines digérées. La chromatographie liquide capillaire est devenue une composante importante pour la séparation des peptides présents à des concentrations de l'ordre du fmole [28, 52].

Différentes colonnes capillaires sont disponible commercialement. Il est encore difficile de trouver des colonnes capillaire de $150\ \mu\text{m}$ et $75\ \mu\text{m}$ pour tous les matériaux d'adsorption (exemple : C18 Jupiter de Phenomenex). Quand aux pré-colonnes seulement quelques compagnies en fabrique dont les dimensions sont compatibles avec des débits aussi bas que $600\ \text{nL}/\text{min}$. L'utilisation de colonnes capillaires remplies est de plus en plus populaire dans différents laboratoires.

Lors du chapitre suivant, j'étudierais la robustesse, la reproductibilité des composantes chromatographiques, pré-colonnes, et colonnes capillaire analytiques que j'aurai fabriquées, dans un système LC/MS à une dimension, pour les comparer à des produits commerciaux. Le travail est divisé en trois parties principales : i) évaluation des pré-colonnes, ii) évaluation des colonnes capillaires analytiques et iii) évaluation de la combinaison des pré-colonnes et colonnes capillaires

4.2 Présentation du système 1D-LC

De faibles débits sont nécessaires pour obtenir une bonne sensibilité en ESI-MS. Cependant, les boucles d'injections sont problématiques à des débits de quelques $\mu\text{L}/\text{min}$. En effet, le volume d'injection relativement large, nécessite des périodes de chargement longues, et peut créer un élargissement des pics [53]. Dans ces conditions, une pré-colonne offre la possibilité de séparer l'injection de l'échantillon, du débit appliqué à la colonne analytique, en utilisant un système de vannes [54] (voir figure 16).

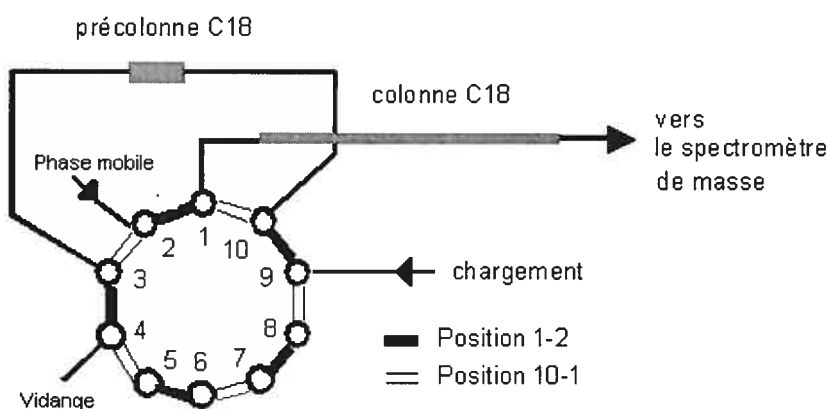


Figure 16: Montage d'un système de vannes multipositions

Avec ce système de vannes, la séparation se fait en deux temps. Lors du chargement, la vanne se trouve en position 1-2. L'échantillon est piégé sur la pré-colonne. La fraction non retenue, pouvant contenir des sels, est dirigée vers la vidange. Puis la vanne est déplacée en position 10-1, et un gradient croissant de solvant organique élut l'échantillon de la pré-colonne vers la colonne analytique.

4.3 Pré-colonnes

4.3.1 Évaluation des pré-colonnes commerciales

La première partie de cette étude consiste à comparer les performances analytiques des produits commerciaux avec les pré-colonnes artisanales pour la séparation de mélanges peptidiques. Ces performances peuvent affecter la séparation dans son ensemble. Une pré-colonne idéale devrait répondre aux différents points suivants: reproductibilité des performances analytiques, capacité de chargement, et flexibilité du choix du matériel d'adsorption.

Les deux produits testés sont : les cartouches Symmetry 300TM C18 de Waters (5 μm , 0.35 x 5 mm), et les cartouches μ -Pre-column de LC Packings (5 μm , 0.3 x 5 mm)¹. Les deux pré-colonnes furent testées pour évaluer leur sélectivité, leur reproductibilité, leur durée de vie, et leur robustesse. Le tableau II présente les résultats obtenus pour les deux pré-colonnes.

Les performances furent obtenues à l'aide de 10 injections d'une solution de 500 fmoles d'un digestat trypsique d'apomyoglobin. La reproductibilité fut évaluée en calculant le pourcentage RSD obtenu sur l'aire des pics. La colonne analytique utilisée est la « Nano Serie Column» 75 μm i.d., de LC Packings, avec un débit de 400 nL/min

1 Nomenclature de description des cartouches : A μm x B x Cum, ou A = diamètre de particules de la phase stationnaire en μm , B = i. d. de la cartouche en mm, C = longueur de la cartouche en mm

Tableau II: Évaluation de deux pré-colonnes commerciales

| Type | W 1/2 (min) moyenne | Capacité de chargement (μg)* | Reproductibilité de l'intensité ionique (% RSD, n=10) | Robustesse |
|---|---------------------|---|---|------------------------------|
| LC Packings, μ -Pre-column, C ₁₈ 5 μm Cartridge 0.30 x 5 mm | 0.68 | 2 | m/z 536.3 → 52% m/z 636.3 → 33% m/z 689.9 → 40% | Faible (taux de rejet > 50%) |
| Waters Symmetry300TM C ₁₈ 5 μm , 0.35 x 5 mm | 0.74 | 2 | m/z 536.3 → 20% m/z 636.3 → 17% m/z 689.9 → 12% | Bonne |

* Selon le manufacturier

Les performances furent obtenues à l'aide de 10 injections d'une solution de 500 fmoles d'un digestat trypsique d'apomyoglobin. La reproductibilité fut évaluée en calculant le pourcentage RSD obtenu sur l'aire des pics. La colonne analytique utilisée est la « Nano Series Column » 75 μm i.d., de LC Packings, avec un débit de 400 nL/min

Les résultats montrent que les performances analytiques des deux pré-colonnes sont similaires. Malgré tout, une importante différence est observée au niveau de la reproductibilité. Les pré-colonnes de Waters donnent de meilleurs pourcentages RSD. La reproductibilité entre groupe donne une variation en réponse de signal inférieure à 20% pour les pré-colonnes de Waters, alors qu'elle est supérieure à 50% pour les pré-colonnes de LC Packings. Même si le pourcentage RSD est plus faible pour les colonnes Waters il reste élevé (<20%). Cela peut s'expliquer par le faible débit appliqué de 400 nL/min dans la colonne analytique.

Les pré-colonnes de LC Packings ont un taux élevé de rejets. Les raisons de ces rejets, sont la variabilité en sélectivité, la présence

d'impuretés polymériques, la valeur trop élevée de pression obtenue sur le système. De plus ces dernières ont nécessitées une période de conditionnement plus élevée, plus de 10 cycles furent en général nécessaires pour d'obtenir des données reproductibles. Les différents paramètres évalués ont démontrés qu'entre les deux produits commerciaux, la pré-colonne Symmetry de Waters donne des résultats plus reproductibles. La prochaine étape de l'étude fut d'évaluer la possibilité de produire des pré-colonnes « artisanales ».

4.3.2 Fabrication des pré-colonnes

Différents modèles de pré-colonnes furent produits, optimisés et testés. Deux modèles sont présentés à la figure 12 (page 34). Les procédures pour remplir les pré-colonnes sont décrites au chapitre 3 (page 33), et sont similaire à celles utilisées pour remplir les colonnes analytiques. La sortie est ajustée contre un capillaire de silice fondue de 50 μm i.d., en utilisant un tube en téflon servant d'union, créant ainsi un volume mort minimal.

4.3.3 Évaluation des pré-colonnes « artisanales »

Les données obtenues avec les colonnes de Waters, montraient les meilleurs résultats lors du paragraphe 4.3.1. Elles seront utilisées comme base de comparaison pour évaluer les pré-colonnes « artisanales ». Pour tester les performances associées à la conception du modèle de la pré-colonne, le matériel C18 Symmetry de Waters a été utilisé pour remplir la pré-colonne. Puis le matériel C18 Jupiter de Phenomenex a été utilisé pour des fins de comparaison.

Une série d'injections de 80 ng d'un mélange de 8 protéines digérées au préalable fut effectuée. La même colonne analytique fut utilisée afin de

minimiser la variabilité des résultats. La reproductibilité de certains indicateurs chromatographiques tels que la largeur et l'intensité des pics, le temps de rétention, et la sélectivité furent étudiés pour chaque injection. La figure 17 (page 54) représente les largeurs de pics à mi-hauteur des peptides en communs pour les différentes pré-colonnes utilisées. La largeur des pics est similaire pour toutes les pré-colonnes « artisanales », et inférieure à celle obtenue avec la pré-colonne commerciale de Waters. Les disques frittés ont un volume mort non négligeable et sont reconnus pour être une source d'élargissement des pics [55]. L'utilisation d'une membrane d'extraction en tant que disque fritté, permettrait de réduire les volumes morts post-colonnes et réduire ainsi la largeur des pics. La conséquence de l'élution de pics moins larges pour les pré-colonnes artisanales est une meilleure capacité chromatographique pour ces pré-colonnes (voir Tableau III, page 51).

La largeur de pics n'est pas affectée par le choix de la phase stationnaire. Les pré-colonnes confectionnées selon le modèle A, et remplie avec le matériel et symmetry et Jupiter donne des largeurs de pics semblables.

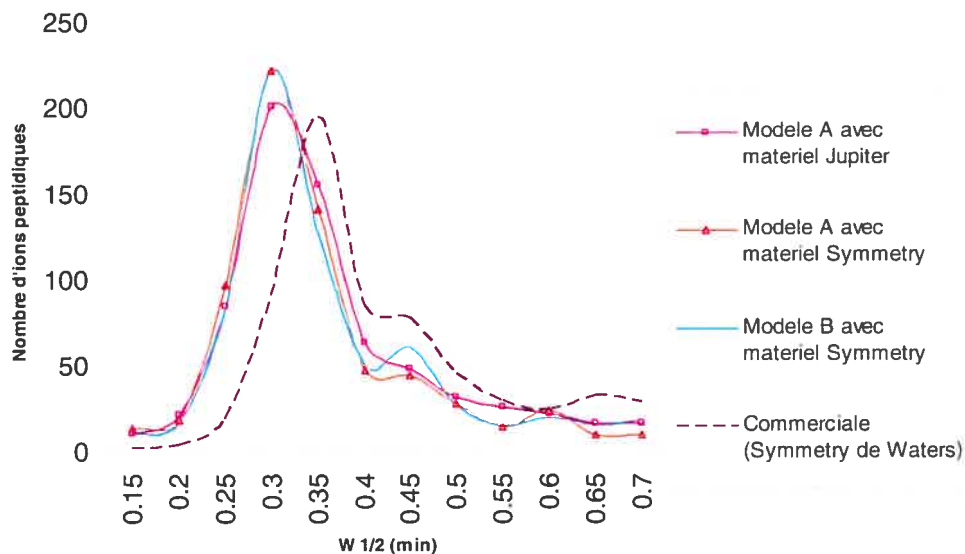


Figure 17 : Largeurs des pics à mi-hauteur des ions peptidiques communs détectés pour les différents modèles de pré-colonnes

Tableau III : Capacité chromatographique selon le modèle de pré-colonne

| Modèle de pré-colonne | Capacité chromatographique |
|----------------------------------|----------------------------|
| Artisanale, modèle A et modèle B | 135 |
| Commerciale, Symmetry de Waters | 117 |

De plus, les temps de rétention ainsi que la réponse du signal obtenue montrent de grandes similitudes. 80 % des ions peptidiques observés sont communs entre les pré-colonnes. Un ion peptidique correspond à une forme ionisée d'un peptide, soit un ion ayant un ou plusieurs protons et apparaissant à un temps de rétention, un rapport m/z et une charge précise. Le tableau IV (page 52) montre les résultats obtenus pour quatre acquisitions consécutives de protéines sériques humaines en utilisant la

même pré-colonne. Toutes les pré-colonnes sont remplies avec du matériel Symmetry de Waters.

Tableau IV: RSD (n=4) du RT et de l'intensité pour un ensemble représentant 90% des ions et le pourcentage d'ions peptidiques communs pour chaque modèle de pré-colonne^a.

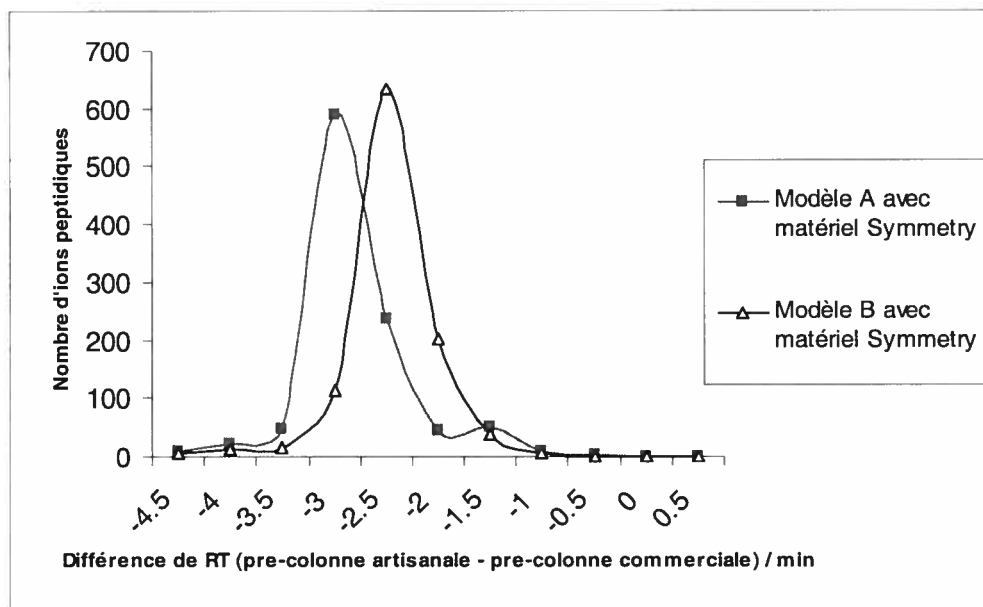
| | RSD (RT) n=4 | RSD (Intensité) n=4 | Capacité de charge (µg) ^b |
|----------------------|--------------|---------------------|--------------------------------------|
| Modèle A | 0.61 | 15 | 3.3 |
| Modèle B | 0.65 | 15 | 3.2 |
| Commerciale (Waters) | 1.05 | 18 | 2.0 |

^a Voir Figure 13 pour les dimensions, phase stationnaire = Symmetry de Waters, ^b Estimée grâce au volume de chaque colonne, et la capacité de chargement connue des pré-colonne commerciale Waters

Les RSD du temps de rétention de la pré-colonne commerciale sont légèrement supérieures par rapport à ceux obtenus avec les pré-colonnes « artisanales ». Les RSD en intensité sont similaires. Les graphes des ratios d'intensité ainsi que la variation du temps de rétention sont montrés en annexe 2, 3, 4.

Les résultats sont similaires entre les deux pré-colonnes « artisanales ». La figure 18 A) (page 56) montre les différences de temps de rétention entre chaque pré-colonne « artisanale » avec la pré-colonne commerciale.

A)



B)

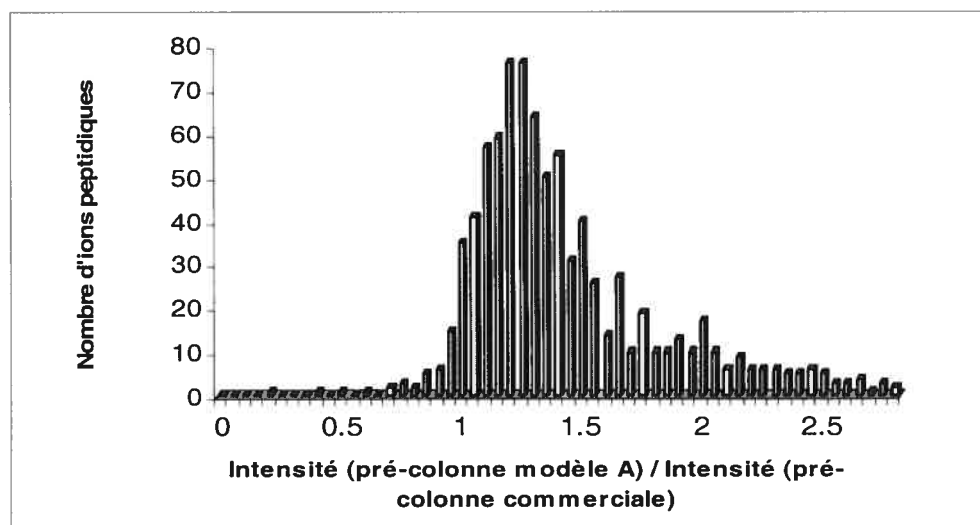


Figure 18 : Reproductibilité des temps de rétention et abondance des peptides entre deux modèles de pré-colonne, A) Différence de temps de rétention entre deux modèles « artisanales » et le modèle commercial B) Distribution des intensités ioniques des peptides analysés avec la pré-colonne « artisanales » modèle A et la pré-colonne commerciale.

Le facteur de réponse entre ces deux pré-colonnes est représenté par la figure 18 B). Il est voisin de 1, et donne 25% plus d'intensité de signal

pour la pré-colonne « artisanale » comparé à celle de Waters, où les deux contiennent la phase stationnaire Symmetry de Waters.

La sélectivité chromatographique fut évaluée pour deux pré-colonnes « artisanales » confectionnées tel le modèle A, et remplies avec deux matériaux différents : Symmetry300 C18 de Waters, et Jupiter C18 de Phenomenex, ainsi qu'un modèle B rempli avec Jupiter C18 de Phenomenex, et une pré-colonne commerciale de Waters. Un digestat tryptique de protéines sériques humaines fut analysé avec ces différentes pré-colonnes, et avec la même colonne analytique, tout en utilisant les conditions d'élution standard. L'identification des peptides ainsi que les couvertures obtenues sont similaires pour tous les modèles considérés. Les résultats (Tableau V) obtenus avec ces échantillons, montrent qu'aucune différence n'est observée en terme de nombre de protéines identifiées.

Tableau V: Effet de la nature de la pré-colonne sur la sélectivité chromatographique : Nombre de protéines identifiées, et couverture de séquence pour la protéine Fibrogen Alpha A, obtenus avec les différentes pré-colonnes testées avec un échantillon de plasma humain.

| Modèle | Phase stationnaire | Nombre de protéines identifiées | Nombre de peptides identifiés | Couverture (%) de Fibrogen Alpha A |
|---------------------|--|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| A | Symmetry C18, Waters 300Å, 5 µm | 105 | 1137 | 22 |
| A | Jupiter C18, Phenomenex, 300Å, 5 µm | 124 | 1308 | 27 |
| B | Symmetry C18, Waters 300Å, 5 µm | 122 | 1467 | 30 |
| Commercial (Waters) | Symmetry C18, Waters 300Å, 5 µm | 105 | 999 | 24 |

La figure 19 représente un chromatogramme obtenu pour la séparation du mélange des huit protéines digérées en utilisant une pré-

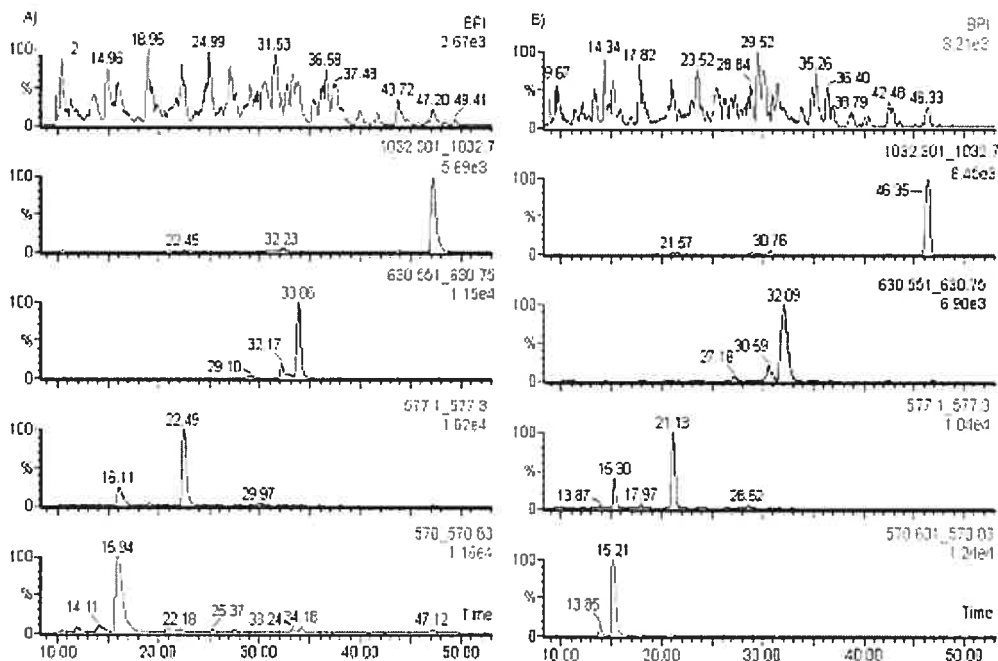


Figure 19: Chromatogrammes ioniques pour différents ions peptidiques, obtenus après injection de 80 ng d'un mélange de 8 protéines, A) Waters, Symmetry 300TM, 0.35 x 5 mm, B) Modèle B « artisanale » 0.35 x 5mm

colonne commerciale ou une pré-colonne « artisanale ». Les profils chromatographiques sont similaires pour chacune des pré-colonnes, bien que les pics obtenus avec la pré-colonne « artisanale » soient légèrement plus asymétriques. Les mesures d'asymétrie des quatre ions peptidiques, pour chaque modèle de pré-colonnes sont reportées dans le tableau VI.

Tableau VI: Mesure d'asymétrie pour les quatre ions peptidiques, pour la pré-colonne « artisanale » modèle A, et la pré-colonne de Waters.

| | As | | | |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | m/z = 570.7 | m/z = 631.7 | m/z = 577.3 | m/z = 1032.5 |
| Modèle A | 1.94 | 1.27 | 1.17 | 1.09 |
| Commerciale (Waters) | 3.58 | 1.63 | 1.53 | 2.63 |

Les résultats de reproductibilité sur 16 injections consécutives sont mentionnés au tableau VIII.

Tableau VII: Comparaison de l'écart type relatif (%RSD) sur l'aire et RT pour quatre ions peptidiques, pour la pré-colonne « artisanale » modèle A, et la pré-colonne de Waters.

| | % RSD (n=16) | | | | | | | |
|----------------------|--------------|-----|-------------|-----|-------------|-----|--------------|-----|
| | Aire | RT | Aire | RT | Aire | RT | Aire | RT |
| | m/z = 570.7 | | m/z = 631.7 | | m/z = 573.3 | | m/z = 1032.5 | |
| Modèle A | 11.8 | 1.3 | 16.9 | 1.3 | 7.2 | 1.0 | 17 | 0.6 |
| Commerciale (Waters) | 9.8 | 1.8 | 13.9 | 1.1 | 7 | 0.5 | 11 | 0.4 |

Les résultats obtenus montrent que tous les modèles testés donnent des performances acceptables, le pourcentage RSD sur la variation du temps de rétention est inférieur à 2%. Malgré tout, le modèle A est plus facile à produire, et donne des performances analytiques comparables aux pré-colonnes commerciales. La reproductibilité intra pré-colonnes fera partie de l'étude dans le paragraphe 4.5.

4.4 Colonnes analytiques capillaires

4.4.1 Performances des colonnes capillaires

La deuxième partie de l'étude concerne l'évaluation et la comparaison des colonnes analytiques capillaires « artisanales » avec celles disponibles commercialement pour la séparation d'un mélange complexe de peptides. Dans un premier temps, les performances analytiques des colonnes commerciales et « artisanales » furent obtenues en analysant les mélanges peptidiques trypsiques d'une solution de 100 fmol/ μ L d'apomyoglobin, ainsi que d'un mélange de 8 protéines de 200 fmol/ μ L chacune, en utilisant les conditions standards d'élution (voir les matériaux et méthodes). La

sélectivité, le temps de rétention et la largeur de pics furent enregistrés. Les valeurs obtenues sont rapportées au tableau VIII.

Tableau VIII: Comparaison des performances chromatographiques : la sélectivité et les largeurs des pics.

| Colonnes | Phase stationnaire | W ½ (min) | W (min) | Nombre total de peptides |
|-----------------|-------------------------------------|-------------|-------------|--------------------------|
| Commerciale | LC-Packing Pepmap, 3 µm | 0.30 – 0.35 | 0.50 – 0.60 | 1765 |
| « Artisanales » | Waters Symmetry C18, 5 µm | 0.35 – 0.40 | 0.65 – 0.75 | 1939 |
| | Phenomenex, Jupiter C18, 5 µm | 0.25 – 0.30 | 0.50 – 0.60 | 1915 |
| | Vydac, MSC18, 3.5 µm | 0.30 – 0.40 | 0.70 – 0.85 | 1589 |
| | Zorbax, SB- C18, 3.5 µm | 0.25 – 0.30 | 0.50 – 0.60 | 1753 |

L'étude des profils chromatographiques de plus de 1 500 peptides, nous permet de constater que les colonnes « artisanales » Jupiter C18 de Phenomenex ainsi que Zorbax SB-C18 présentent des pics généralement plus étroits (0.25-0.30min) comparativement aux autres phases stationnaires étudiées (0.30–0.40 min). Le nombre total de peptides détectés est relativement comparable d'une colonne à l'autre et celui-ci varie de 1589 a 1939 peptides.

La figure 20 (page 61) montre les chromatogrammes d'ions extraits obtenus pour la séparation des 8 protéines digérées en utilisant la colonne « artisanale » remplie de la phase stationnaire Jupiter C18 de Phenomenex, puis la colonne commerciale PepMap de LC-Packing.

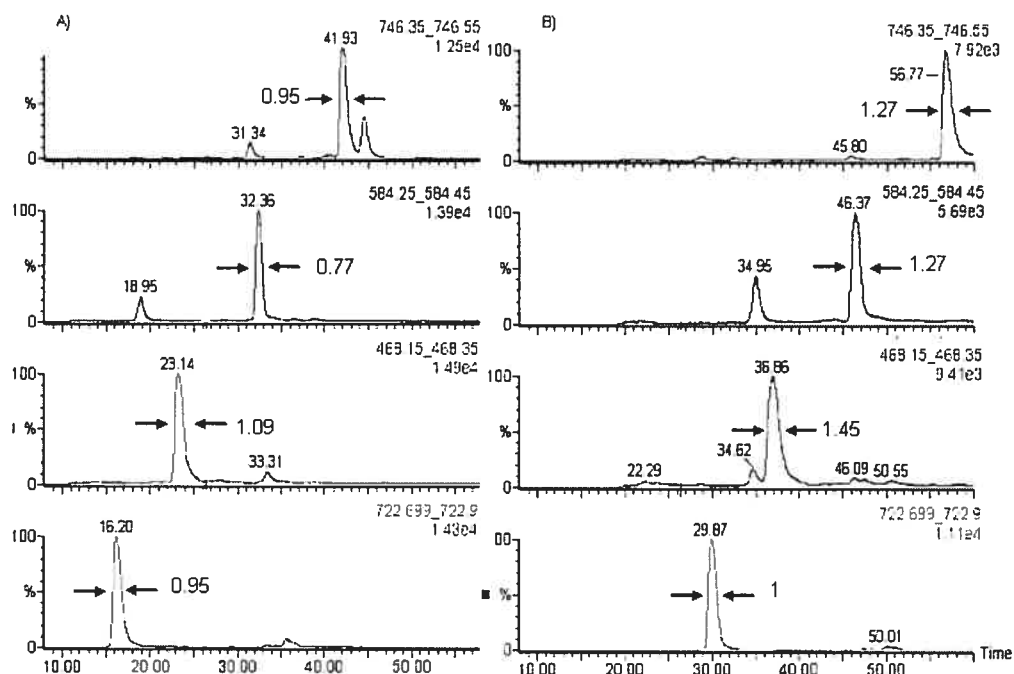


Figure 20 : Chromatogrammes extraits de différents m/z obtenus après injection du mélange tryptique des 8 protéines (80 ng injecté), avec la largeur du pic à mi-hauteur. A) Colonne artisanale remplie de JupiterC18, 300Å, 5µm, 75 µm x 10 cm, B) LC-Packing, Pepmap C18, 300Å, 5µm, 75 µm x 10 cm

Sur les chromatogrammes correspondants, les temps d'élution sont plus élevés pour les peptides éluant avec la colonne PepMAP. Les hauteurs équivalentes en plateaux réduits ont été calculés pour les 2 colonnes, et sont mentionnés au tableau IX.

Tableau IX Hauteurs équivalentes en plateaux réduits pour quatre ions peptidiques

| m/z | h | |
|-------|--|--|
| | Colonne « artisanale » rempli avec Jupiter C18, 5 µm | Colonne commerciale LC Packing C18, 3 µm |
| 722.8 | 1.8 | 3.0 |
| 468.2 | 2.0 | 4.5 |
| 584.3 | 7.9 | 9.4 |
| 746.4 | 12.4 | 6.7 |

Les hauteurs équivalentes en plateaux réduits de la colonne « artisanale », sont plus petits que celles de la colonne commerciale pour 3 pics sur 4, et montrent ainsi une meilleure efficacité

La sélectivité, en particulier, fut évaluée en étudiant la distribution peptidique au cours de l'élution. La distribution de la densité peptidique totale fut effectuée pour chaque phase stationnaire C18. Les résultats montrent des différences de sélectivité notables pour les différentes phases stationnaires. La répartition peptidique est moins uniforme pour les matériaux tels que Zorbax et Vydac comparativement à Jupiter ou Symmetry. D'après ces résultats (Figure 21), les deux phases stationnaires Jupiter et Symmetry donnent une meilleure distribution peptidique lors de la séparation. Pour Zorbax (figure 21 A), et Vydac (figure 21 B), les deux matériaux montrent des différences significatives en terme de rétention. La sélectivité de ces deux matériaux est très différente l'une de l'autre. Une fenêtre d'élution plus étroite et des temps de rétention plus long sont observés pour le matériel Vydac..

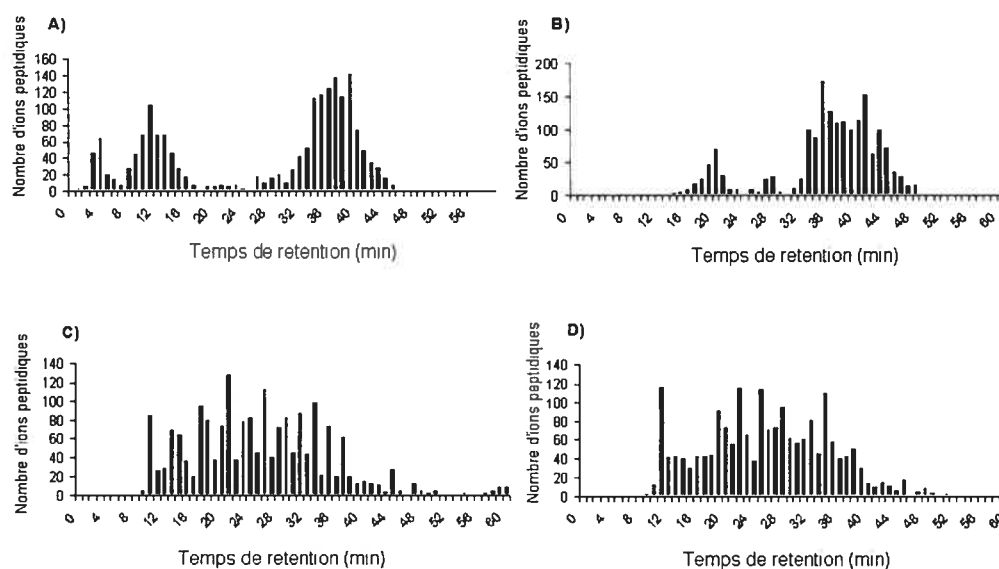


Figure 21: Distribution peptidique du mélange tryptique des 8 protéines pour différentes colonnes capillaires « artisanales » de 75 µm i.d., remplies avec différentes phases stationnaires. A) Zorbax C18 300Å, 3.5 µm, B) Vydac SB 218MS54, C18, 300Å, 3.5µm, C) Jupiter C18 300Å, 5µm, D) Symmetry C18, 300Å, 5µm

De plus, les largeurs de pics de la colonne remplie de la phase stationnaire Vydac sont plus élevées que celles obtenues avec d'autres matériaux (voir tableau VIII, page 60). Ces pics plus larges peuvent être expliqué par la difficulté de remplir des colonnes capillaires avec ce matériel de façon reproductible.

Les colonnes capillaires remplies avec du matériel Symmetry C18 de Waters ou avec du matériel Jupiter C18 de Phenomenex donnent des performances chromatographiques comparables aux produits commerciaux en terme de sélectivité. Compte tenu des meilleures performances obtenues avec le matériel Jupiter comparativement à Symmetry, les prochaines analyses seront effectuées sur la colonne « artisanale » remplie avec du matériel Jupiter et la colonne commerciale LC-Packing.

La sélectivité chromatographique fut évaluée en analysant par MS/MS le mélange tryptique des 8 protéines tout en utilisant les conditions d'élution standard. L'identification des spectres MS/MS fut effectuée avec le moteur de recherche Mascot. Dans tous les cas, ils identifient des protéines potentiellement présentes dans l'échantillon.

L'identification peptidique par MS/MS est très similaire pour toutes les colonnes capillaires testées (voir Tableau X, page 64).

Tableau X: Pourcentage de couverture de séquence pour quatre protéines et trois systèmes chromatographiques. *PB = Phosphorylase B, ADH = Alcohol Deshydrogenase, BSA = Bovin Serum Albumin

| Colonnes | % Couverture de séquence | | | |
|--|--------------------------|------|------|--------------|
| | PB* | ADH* | BSA* | Cytochrome C |
| « artisanale » remplie avec Waters Symmetry C18, 5 μm | 20 | 18 | 21 | 35 |
| « artisanale » remplie avec Phenomenex, Jupiter C18, 5 μm | 17 | 18 | 19 | 32 |
| LC-Packing Pepmap C18, 5 μm | 16 | 23 | 21 | 31 |

La reproductibilité des temps de rétention pour plusieurs répliques obtenus avec la même colonne, et entre différentes colonnes remplies avec le même matériel fut ensuite évaluée. La variation intra- et inter-colonnes fut évaluée en injectant dix aliquots d'une solution digérée d'apomyoglobin.

Les résultats présentés au tableau XI (page 65) indiquent que le pourcentage RSD pour 10 injections, est inférieur à 2%, et 5% pour les résultats intra et inter-colonnes, pour les deux colonnes : commerciale et « artisanale ». Ces résultats démontrent la reproductibilité du remplissage des colonnes.

Tableau XI: Reproductibilité du temps de rétention intra- et inter-colonnes.

| Colonne | Intra-Colonne % RSD (n=10) | | | Inter-Colonne % RSD (n=10) | | |
|---|-------------------------------|--------------|--------------|-------------------------------|--------------|--------------|
| | m/z 536.3 | m/z 636.3 | m/z 689.9 | m/z 536.3 | m/z 636.3 | m/z 689.9 |
| LC-Packing, PepMap, C18, 5 μ m, 75 μ m i.d. x 10 cm | 1.5 | 1.0 | 0.2 | 3.8 | 4.5 | 4.7 |
| Phenomenex, Jupiter, C18, 5 μ m, 75 μ m i.d x 10 cm | 1.0 | 1.2 | 0.2 | 4.3 | 3.9 | 5.1 |

Ces résultats indiquent que les deux colonnes, commerciales (LC-Packing) et « artisanale » montrent des performances similaires.

4.4.2 Débit de la phase mobile

L'optimisation du débit d'élution fut évaluée dans le but d'obtenir une meilleure performance des colonnes capillaires. Etudier le débit lorsque on utilise l'ESI joue un rôle clé dans le gain de sensibilité. Plus petites sont les gouttelettes, meilleure est la sensibilité [11, 12]. De plus, un petit débit permet de décroître le phénomène de suppression d'ionisation [13]. En utilisant un gradient d'élution fixe, des analyses du mélange de 8 protéines digérées, furent exécutées avec différents débits d'élution sur des colonnes capillaires de 75 μ m i.d., 150 μ m i.d. et 250 μ m i.d. Pour les colonnes de 150 μ m i.d., des débits de 300 nL/min à 1.2 μ L/min furent testés. Des débits inférieurs à 300 nL/min, n'étaient pas appropriés, car ils ne permettaient pas d'obtenir une nébulisation stable pour l'analyse. Une augmentation du nombre de peptides détectés, et leur intensité relative est observée en diminuant le débit : 1500 peptides avec un débit de 1.2 μ L/min, et 2700 peptides avec un débit de 300 nL/min (Figure 22, page 66).

L'augmentation en intensité du signal correspond à 25% entre le plus grand et le plus petit débit.

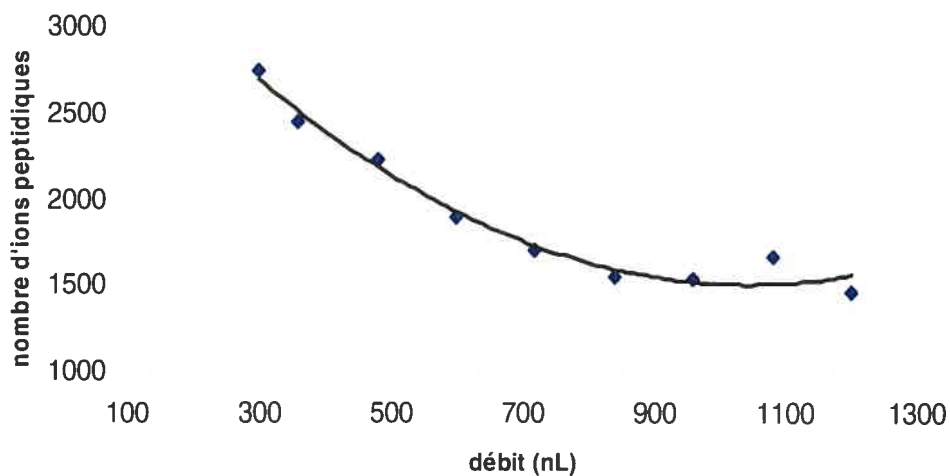


Figure 22: Nombre d'ions peptidiques détectés en fonction du débit

La figure 23 montre que les largeurs des pics des peptides élués avec un débit de 350 nL/min sont plus larges que les autres débits.

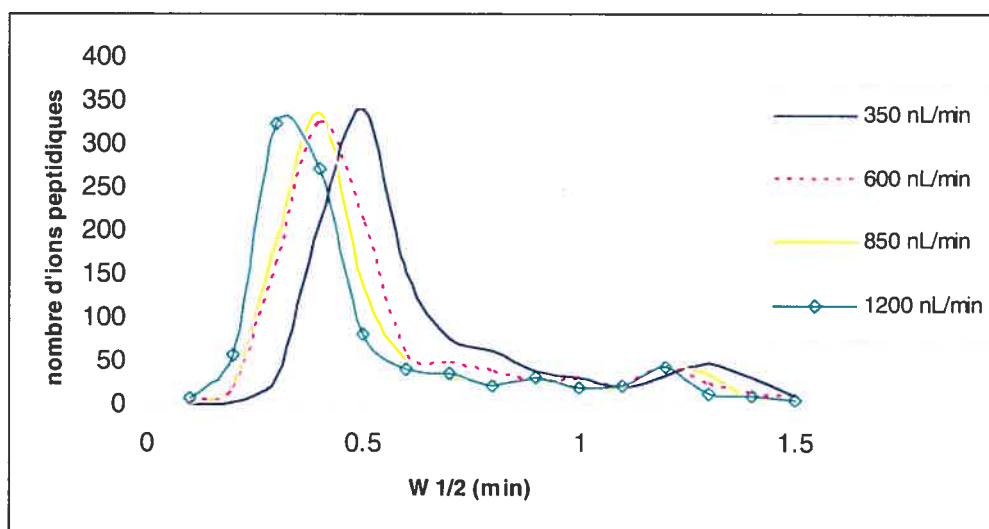


Figure 23: Largeurs de pics à mi-hauteurs des ions peptidiques communs pour différents débits avec une colonne de 150 μm i.d.

Le tableau XII et la figure 24 (page 68) représentent l'abondance des ions peptidiques durant la mesure de l'analyse pour différents débits, ainsi que la capacité chromatographique.

Tableau XII: Fenêtre d'élution et densité peptidique sur une période de 15 secondes pour différents débits, et avec un colonne de 150 μ m i.d.

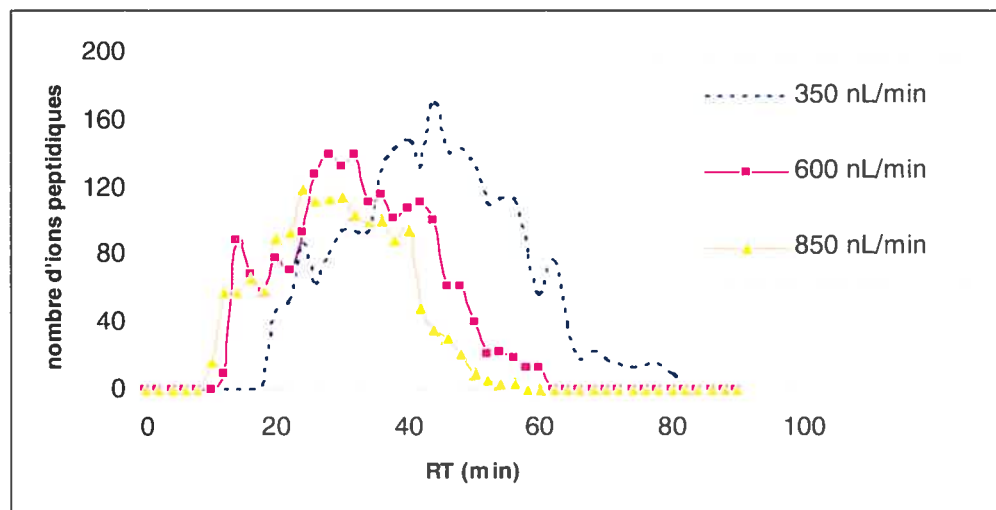
| Débit (nL/min) | Fenêtre d'élution | Densité peptidique groupe de 15 sec | capacité chromatographique |
|----------------|-------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| 350 | 17 min - 71 min | 17 | 98 |
| 600 | 11.5min - 56 min | 15 | 99 |
| 850 | 9.5 min - 50 min | 14 | 90 |
| 1200 | 7.5 min- 45-min | 14 | 107 |

Le débit de 1200 nL/min donne la meilleure capacité chromatographique, mais la densité peptidique est la plus faible, résultant d'une suppression d'ionisation importante. Les cartes peptidiques (Figure 24 B) et Figure 22), montre la diminution de la densité des peptides lorsqu'on augmente le débit.

Pour 300nL/min, l'abondance des ions est importante, mais le temps d'élution est grand, et nécessite un temps d'analyse long. Pour 850 nL/min, l'abondance des peptides est réduite.

Le débit de 600 nL/min correspond au plus petit débit qui donne une largeur de pics comparable aux débits les plus importants, tout en conservant une fenêtre d'élution acceptable et une bonne capacité chromatographique.

A)



B)

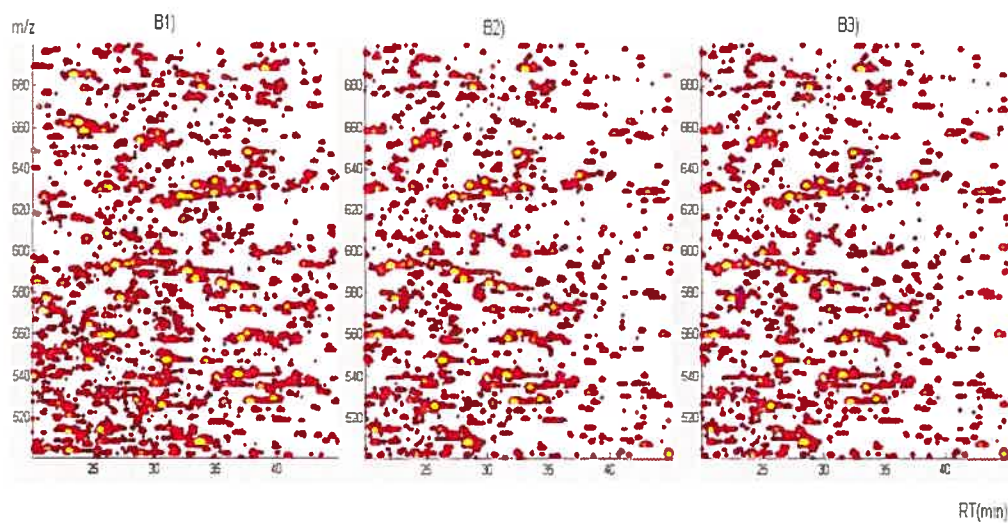


Figure 24 Analyse de l'Abondance des ions peptidiques durant la mesure pour différents débits A) Variation du nombre d'ions peptidiques durant l'analyse pour différents débits ,B) Densité peptidique dans la région $m/z= 500-700$, $RT= 20-45\text{min}$ pour différents débits B1) 300nL/min, B2) 600nL/min, B3) 850 nL/min

Le même travail fut effectué pour les colonnes de diamètres différents.
Le débit optimisé pour une colonne de 75 μm i.d. (voir annexe 5)

correspond à 400 nL/min, et pour une colonne de 250 μm i.d. (voir annexe 6) est de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Les débits linéaires correspondants à ces trois débits sont indiqués au Tableau XIII.

Tableau XIII : Débits linéaires appliqués pour les 3 diamètres de colonnes

| i.d. de la colonne analytique | débits (nL/min) | débits linéaires (mm/min) |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------|
| 75 | 400 | 110 |
| 150 | 600 | 294 |
| 250 | 1000 | 490 |

4.4.3 Capacité de charge

Afin d'optimiser les performances analytiques des colonnes capillaires pour la séparation de mélanges complexes de protéines digérées, une estimation de la capacité de charge a été faite pour les colonnes de 75 μm i.d., 150 μm i.d., 250 μm i.d.. Le temps de rétention et la largeur des pics sont indépendants de la quantité injectée, lorsque la capacité de la colonne n'est pas dépassée. La largeur des pics, fut mesurée pour déterminer la valeur limite de la capacité. Une augmentation de 5% de la largeur des pics par rapport à sa valeur moyenne est considérée comme une surcharge de la colonne.

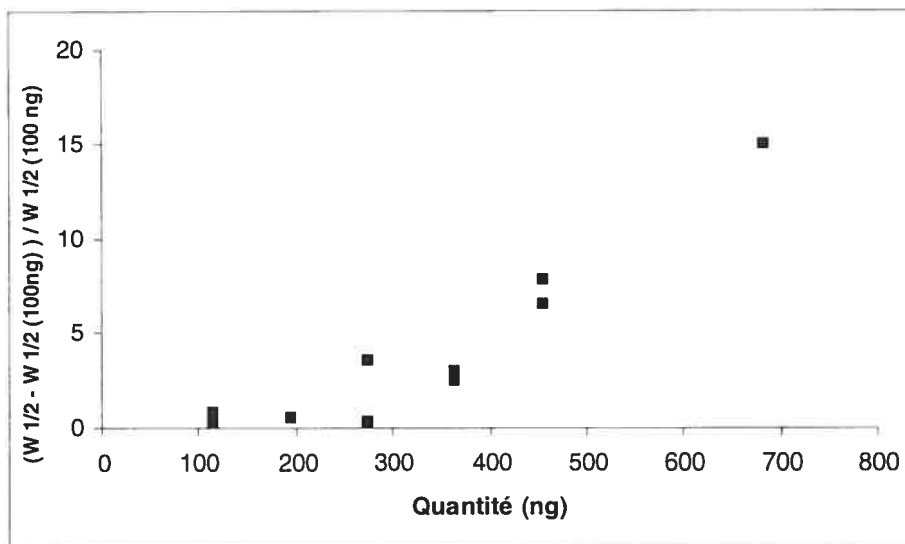


Figure 25: Variation (en pourcentage) du rapport de largeur des pics à mi-hauteur par rapport à $w_{1/2}$ pour 100 ng injecté, en fonction de la quantité injectée, pour une colonne de 150 μm i.d..

D'après la figure 25, la largeur des pics commence à varier de façon significative au delà de 400 ng.

De façon à considérer tous les peptides présents dans le mélange, le ratio d'intensité du même ion peptidique entre deux concentrations successives fut calculé grâce à l'outil bioinformatique « Peptide detect ». La médiane de ces ratios de tous les ions peptidiques fut ensuite calculée pour chaque comparaison de concentration. Les résultats sont reportés figure 26 (page 71), et montrent une saturation pour un facteur de quantité de 4.5 environ. D'après le tableau XIV (page 71), ce facteur de quantité 4.8, donne une quantité injectée d'environ 360 ng.

Tableau XIV : Variation de la médiane du rapport d'intensité en fonction de la médiane du rapport de la quantité injectée pour une colonne de 150 μm i.d.

| Quantité (ng) | Facteur quantité | Facteur Intensité |
|---------------|------------------|-------------------|
| 80 | | |
| 160 | 2 | 2.06 |
| 240 | 3 | 2.8 |
| 320 | 4 | 3.37 |
| 400 | 5 | 3.74 |
| 480 | 6 | 3.85 |
| 640 | 7 | 4.12 |
| 800 | 10 | 4.4 |

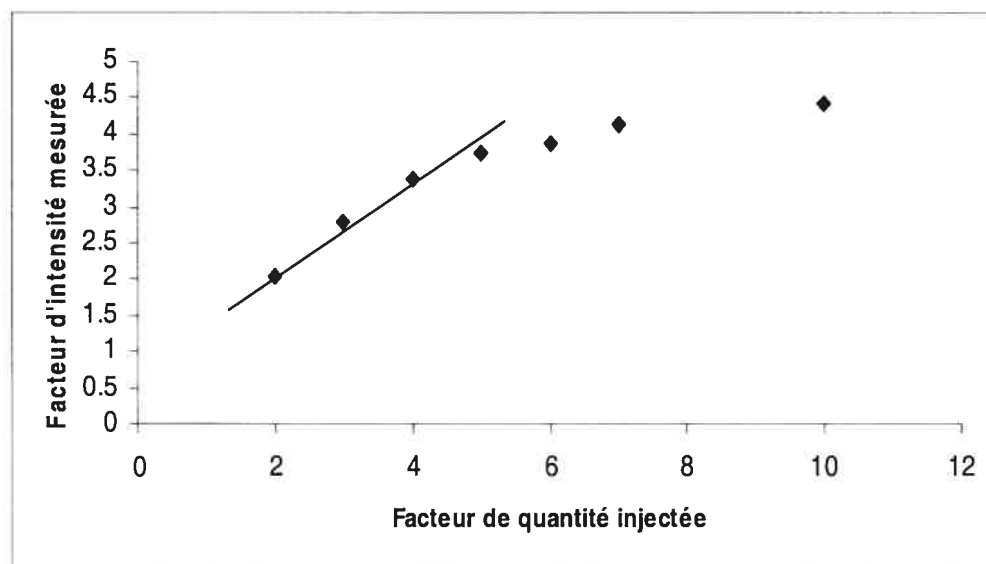


Figure 26 : Variation de la médiane du rapport d'intensité en fonction de la médiane du ratio de la quantité injectée pour une colonne de 150 μm i.d.

Le même travail a été effectué pour les colonnes de 75 μm i.d., et les colonnes 250 μm i.d.. Les résultats sont joints en annexes (#7 et #8). Le résumé des résultats est présenté au tableau XV (page 72).

Tableau XV: Capacité de charge pour des colonnes de différents diamètres internes pour l'ensemble des peptides

| Diamètre interne de la Colonne (μm) | Débit optimal (nL/min) | Capacité de la colonne (ng) |
|--|------------------------|-----------------------------|
| 75 | 400 | 125 |
| 150 | 600 | 360 |
| 250 | 1000 | 800 |

4.5 Reproductibilité de la combinaison de pré-colonnes et de colonnes analytique « artisanales »

La dernière partie de cette étude focalise sur la robustesse de la combinaison des composantes étudiée en partie 4.3: pré-colonne « artisanale », et en partie 4.4: colonne analytique « artisanale », 150 μm i.d..

Les colonnes de 150 μm i.d ont été choisies de façon à obtenir un bon compromis entre la sensibilité et la reproductibilité. Plus le diamètre de la colonne est petit, plus le débit est faible, et meilleure est la sensibilité (voir page 65). La sensibilité est meilleure avec une colonne 75 μm i.d., mais une meilleure reproductibilité est obtenue avec des diamètres plus élevés, puisque les fluctuations de débits sont alors moins significatives. De plus la pression appliquée sur le système est moins forte, et permet une logevite plus longue pour ces colonnes. Les pré-colonnes et les colonnes analytiques sont remplies avec le même matériel (C18 Jupiter), afin de maintenir la reproductibilité de l'ordre d'élution [58]. Un digestat de protéines sériques humaines fut choisi en tant qu'échantillon complexe, et le débit fut ajusté à 600 nL/min. La reproductibilité des composantes analytiques du système chromatographique furent évaluées à deux niveaux : les variations i) intra et ii) inter-composantes. L'évaluation du

système intra-composantes a été effectué en injectant plusieurs fois le même échantillon (n=80) avec le même système chromatographique (pré-colonne #1 et colonne #1), couplé au même spectromètre de masse. Afin de minimiser la variabilité, les échantillons furent mélangés ensemble, puis aliquotés individuellement. Les résultats obtenus pour trois peptides sont présentés tableau XVI. Ils indiquent que les valeurs du pourcentage RSD sont inférieurs à 1% et 14 % respectivement pour le temps de rétention et l'aire mesurée des pics.

Tableau XVI: Évaluation de la reproductibilité (n=80) des composantes chromatographiques combinées (pré-colonne « artisanale »-colonnes analytiques « artisanales »)

| Combinaison ^a | Peptide 1 (m/z 733,3, +2) | | | |
|------------------------------|---------------------------|-----------|--------------|--------------|
| | Moyenne RT(min) | RSD RT(%) | Moyenne Aire | RSD Aire (%) |
| Colonne 2 avec Pré-colonne 1 | 21,92 | 0,55 | 4523 | 4,15 |
| Colonne 2 avec Pré-colonne 2 | 22,08 | 0,92 | 4319 | 8,98 |
| Colonne 1 avec Pré-colonne 1 | 22,3 | 0,76 | 3914 | 4,44 |
| Colonne 1 avec Pré-colonne 2 | 21,47 | 0,51 | 4393 | 5,95 |
| Moyenne | 21,94 | | 4287 | |
| RSD (%) | 1,59 | | 6,13 | |
| | Peptide 2 (m/z 701,4, +2) | | | |
| Colonne 2 avec Pré-colonne 1 | 33,75 | 0,4 | 3865 | 5,19 |
| Colonne 2 avec Pré-colonne 2 | 33,98 | 0,49 | 3620 | 10,76 |
| Colonne 1 avec Pré-colonne 1 | 33,84 | 0,42 | 3301 | 8,11 |
| Colonne 1 avec Pré-colonne 2 | 32,92 | 0,52 | 3425 | 7,95 |
| Moyenne | 33,62 | | 3553 | |
| RSD (%) | 1,42 | | 6,93 | |
| | Peptide 3 (m/z 724,7, +2) | | | |
| Colonne 2 avec Pré-colonne 1 | 41,74 | 0,37 | 2635 | 6,33 |
| Colonne 2 avec Pré-colonne 2 | 42,01 | 0,36 | 2948 | 8,95 |
| Colonne 1 avec Pré-colonne 1 | 40,68 | 0,29 | 2916 | 10,81 |
| Colonne 1 avec Pré-colonne 2 | 42,24 | 0,53 | 2922 | 13,67 |
| Moyenne | 41,67 | | 2856 | |
| RSD (%) | 1,65 | | 5,16 | |

^a colonne 1 : 150um i.d. avec C18 Jupiter; colonne 2 : 150 um i.d., avec C18 Jupiter; pré-colonne 1 : modèle A; C18 Jupiter, pré-colonne 2 : modèle A; C18 Jupiter.

L'évaluation inter-composantes s'est effectuée en combinant la pré-colonne et la colonne utilisée lors de l'évaluation précédente avec une autre combinaison de pré-colonne et colonne (pré-colonne #2 et colonne #2). Les systèmes suivants furent testés et comparés : pré-colonne #1 et colonne #2, pré-colonne #2 et colonne #1 et pré-colonne #2 et colonne #2. Les résultats obtenus montrent une faible variation des indicateurs chromatographiques parmi les configurations évaluées, avec des valeurs RSD inférieures à 2% et 7%, pour les temps de rétention et l'aire des pics respectivement. Ces valeurs montrent une bonne reproductibilité entre les différentes composantes chromatographiques.

4.6 Conclusion

Le but de ce chapitre était d'évaluer les composantes chromatographiques, telles que les pré-colonnes et les colonnes analytiques capillaires « artisanales », pour des applications protéomiques en utilisant un système 1D-LC-MS. Ces composantes ont montré des performances analytiques comparables aux produits commerciaux. Il est important d'obtenir une bonne reproductibilité des temps de rétention, et de l'intensité du signal de façon à permettre une comparaison fiables des cartes peptidiques provenant de différents tissus biologiques. L'évaluation de la robustesse des systèmes chromatographiques, indique que des résultats reproductibles ont été obtenus pour les différentes combinaisons possibles entre pré-colonnes et colonnes analytiques. Un pourcentage RSD de 2% et 7% fut obtenu pour le temps de rétention et l'intensité du signal respectivement. La procédure de remplissage est simple, et permet d'obtenir une bonne reproductibilité des cartes peptidiques, pour 2 colonnes remplies avec la même phase stationnaire C18 Jupiter.

CHAPITRE 5

ANALYSE DES COMPOSANTES CHROMATOGRAPHIQUES POUR UN SYSTÈME 2D-LC-MS

5.1 Introduction

Bien que la chromatographie liquide en une dimension a prouvé son efficacité pour l'identification des peptides et protéines, son application en protéomique est relativement limitée dû à la complexité des échantillons, ceux-ci pouvant contenir des milliers de protéines. Après la digestion, l'échantillon peut contenir des centaines de milliers de peptides [58]. Ceci excède la fenêtre analytique du système 1D-LC, due à l'insuffisance de capacité chromatographique, et seulement les peptides (ou protéines) les plus abondants sont détectés. Pour augmenter la capacité chromatographique, la chromatographie multidimensionnelle fut introduite par Giddings [38], qui a démontré que celle-ci est le produit de leur capacité respective, si chaque dimension utilise un mécanisme différent de séparation (orthogonalité).

Il est possible de faire une séparation séquentielle discontinue « off-line », qui nécessite de réinjecter les fractions d'une première séparation, dans la deuxième colonne, pour obtenir les fractions finales. Cependant ce procédé est plus sensible aux pertes d'échantillons, ainsi qu'aux sources de contamination, ceci pouvant entraîner une perte en reproductibilité et sensibilité [59].

La méthode utilisée pour cette étude est la chromatographie à deux dimensions (2D-LC) en continues « on-line » constituée d'une colonne SCX (Strong Cation Exchange), et d'une colonne C18 où les peptides sont séparés sur une colonne échangeuse de cations avant leur séparation sur colonne de phase inversée.

Le but de ce chapitre est d'optimiser la méthode 2D-LC-MS à des fins protéomiques, telles que l'identification de biomarqueurs dans des échantillons de plasma, de façon à augmenter la capacité

chromatographique du système. En augmentant la capacité chromatographique nous serons capables d'identifier des protéines en plus faible quantité.

Les paramètres de séparation de la deuxième dimension, comprenant la pré-colonne C18 et la colonne C18, ont été optimisés et décrits au chapitre 3. Les paramètres de séparation de la première dimension comprenant la colonne SCX seront d'abord étudiés avant leur utilisation en continu avec la colonne C18.

5.2 Optimisation de la séparation sur la colonne SCX

La première partie de cette étude consiste à l'évaluation des paramètres analytiques influençant la performance chromatographique de la colonne SCX qui sera utilisée par la suite pour la séparation 2D-LC.

5.2.1 Performances des colonnes selon le diamètre interne

Pour évaluer l'effet des diamètres des colonnes SCX sur les performances chromatographiques j'ai utilisé les diamètres suivants: 250 μm , 400 μm , 500 μm , 750 μm . Les colonnes ont été remplies selon la méthode décrite à la section 2.1.6, avec du matériel SCX. Le support utilisé est un tube en PEEK, et un frit est placé à chaque extrémité, et sont tenus grâce à des unions. Le tube en PEEK a été choisi, car le tube capillaire de silice ayant un diamètre interne supérieur à 250 μm n'était pas disponible. Chaque colonne a une longueur de 4cm.

Pour étudier la séparation sur ces différentes colonnes, un mélange de 5 peptides ayant des valeurs de pI différentes fut utilisé. Le point isolélectrique (pI) est la valeur de pH à laquelle le peptide a une charge

nette de zéro. En milieu acide (pH 3.5), la majorité des peptides sont chargés positivement. Ces peptides vont faire compétition avec les ions positifs de la phase mobile. Les peptides vont désorbés de la phase stationnaire lorsque les ions de la phase mobile auront une force électrostatique supérieure avec la phase stationnaire. Les peptides qui auront des valeurs de pI les plus grandes, seront en théorie plus retenus sur la colonne SCX. Par contre, leur charge nette au pH de l'étude joue un rôle non négligeable. L'élution des peptides survient en augmentant la concentration de sels. Un gradient linéaire de formate d'ammonium fut utilisé. Ce sel est volatil, ce qui permet son utilisation avec la source ESI du spectromètre de masse [60].

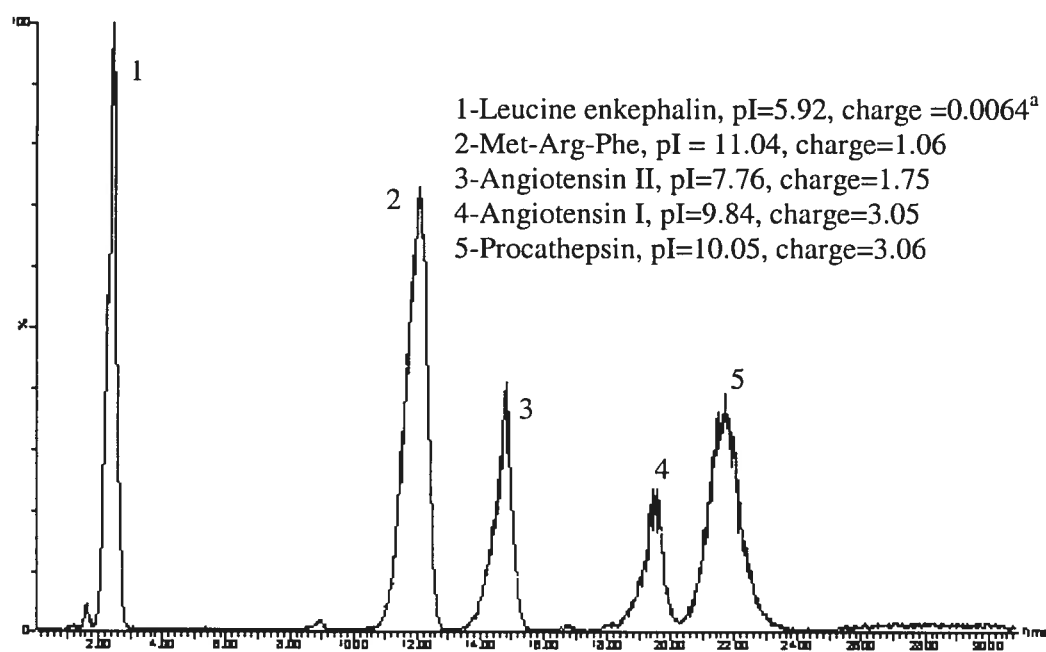


Figure 27 : Chromatogramme^b du mélange des 5 peptides avec une colonne SCX 500 μm x 4cm, 1- Leucine Enkephalin , 2- Met-Arg-Phe , 3- Angiotensin II, 4- Angiotensin I, 5- Procathepsin

^a charges calculées à pH 3.5 en utilisant le site internet : <http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>, embl gateway to isoelectric point, Toldo, 1995

^bGradient : 2 % B (2 min), 2%-50%B (40 min), 50%-2%B (2min). B= 1M NH_4COOH , A = 500mM NH_4COOH , pH 3.5

Pour chaque colonne le débit de la phase mobile a été ajusté, de façon à ce que le volume de la colonne soit élué dans une même période de temps. Les débits utilisés ont été $1\mu\text{L}/\text{min}$, $2.5\mu\text{L}/\text{min}$, $4\mu\text{L}/\text{min}$ et $9\mu\text{L}/\text{min}$, respectivement pour les colonnes de diamètre internes : $250\mu\text{m}$, $400\mu\text{m}$, $500\mu\text{m}$ et $750\mu\text{m}$. Ils ont tous une vitesse linéaire équivalente de $2\text{cm}/\text{mm}$.

La figure 27 (page 78) montre un exemple de chromatogramme de l'élution des 5 peptides sur la colonne SCX.

La largeur des pics à mi-hauteurs et les temps de rétention furent notés pour chacun des peptides. Les facteurs de capacité k' ainsi que le nombre de plateaux N furent calculés pour chacun. Le tableau XVII montre les valeurs de k' obtenues.

Tableau XVII: Valeurs de k' obtenues sur un mélange de peptides pour les différents diamètres de colonnes SCX

| Diamètre (μm) | k' | | | | |
|-------------------------------|--------------------|-----------------|-------------------|------------------|--------------|
| | Leu- enkephalin | Met-Arg- Phe | Angiotensin II | Angiotensin I | Procathepsin |
| 750 | 2.1 | 14 | 17.3 | 23.1 | 25.8 |
| 500 | 0.9 | 7.0 | 8.8 | 11.7 | 12.9 |
| 400 | 0.9 | 7.5 | 9.3 | 12 | 13.2 |
| 250 | 0.3 | 4.4 | 5.3 | 6.5 | 6.9 |

Les valeurs de k' sont plus faibles pour les colonnes de plus petit diamètre interne. Les peptides les moins chargés sont moins retenus sur des colonnes de diamètre plus grand, sachant que les débits ont été ajustés de façon à avoir un débit linéaire égal pour chacune des colonnes. Il est plus intéressant d'avoir des valeurs de k' faibles, pour avoir une analyse plus

rapide. Quant à la sélectivité elle est comparable pour chaque diamètre de colonnes et les variations de celles-ci sont de moins de 6%.

Les résultats obtenus pour le calcul du nombre de plateaux théoriques sont présentés au tableau XVIII.

Tableau XVIII: Nombre de plateaux théoriques (N) obtenu pour un mélange de peptides selon les différents diamètres de colonnes SCX

| N | | | | | |
|---------------|----------------|------------|----------------|----------------|--------------|
| Diamètre (µm) | Leu-Enkephalin | Met-ArgPhe | Angiotensin II | Angiotensin II | Procathepsin |
| 750 | 166 | 885 | 1814 | 4170 | 2108 |
| 500 | 178 | 700 | 1619 | 2703 | 2880 |
| 400 | 410 | 2044 | 2991 | 5146 | 2003 |
| 250 | 602 | 1325 | 2638 | 4553 | 4983 |

Le nombre de plateaux théoriques obtenu pour chaque peptide, est plus élevé pour les colonnes de plus petits diamètres.

En conclusion, la colonne de plus petit diamètre interne, soit 250 µm, semble la plus performante. Les analyses subséquentes ont été effectuées avec la colonne SCX de 250 µm de diamètre interne de façon à déterminer la capacité de charge.

5.2.3 Capacité de charge

Les colonnes analytique C18 de 150 µm i.d., qui seront utilisées par la suite pour les travaux de 2D-LC, sont efficaces pour des quantités d'échantillon de l'ordre de 400 ng et moins. Sachant qu'il y aura plusieurs

fractions (5-10), la quantité injectée directement sur la colonne SCX pourrait s'élever à plusieurs μg (environ 3 μg pour sept fractions).

Afin de ne pas être limité par la saturation de l'ionisation en ESI, et la saturation du détecteur du spectromètre de masse, l'évaluation de la capacité de charge a été effectuée à l'aide d'un détecteur UV. Cette série d'analyse s'effectue avec un gradient linéaire de formate d'ammonium. Les dimensions de la colonne utilisée sont 250 μm x 5 cm. Afin d'obtenir un mélange complexe, l'analyse s'est faite avec un échantillon de protéines sériques humaines digérées comprenant trois peptides standards : la leu-enkephalin (RT= 3.7 min), l'angiotensin II (RT= 27.3 min) et l'angiotensin I (RT= 35.5 min). Différentes concentrations de 1 à 310 μg ont été injectées. L'intensité des pics, ainsi que la mesure de la largeur à mi-hauteur des 3 peptides furent notés. La figure 28 représente la mesure de l'aire du signal en fonction de la quantité injectée. L'intensité du signal varie de façon linéaire en fonction de la quantité injectée et ce jusqu'à environ 200 μg injecté pour la Leu-Enkephalin, point auquel l'intensité atteint un plateau ou diminue et les peptides ne sont plus retenus quantitativement par la colonne.

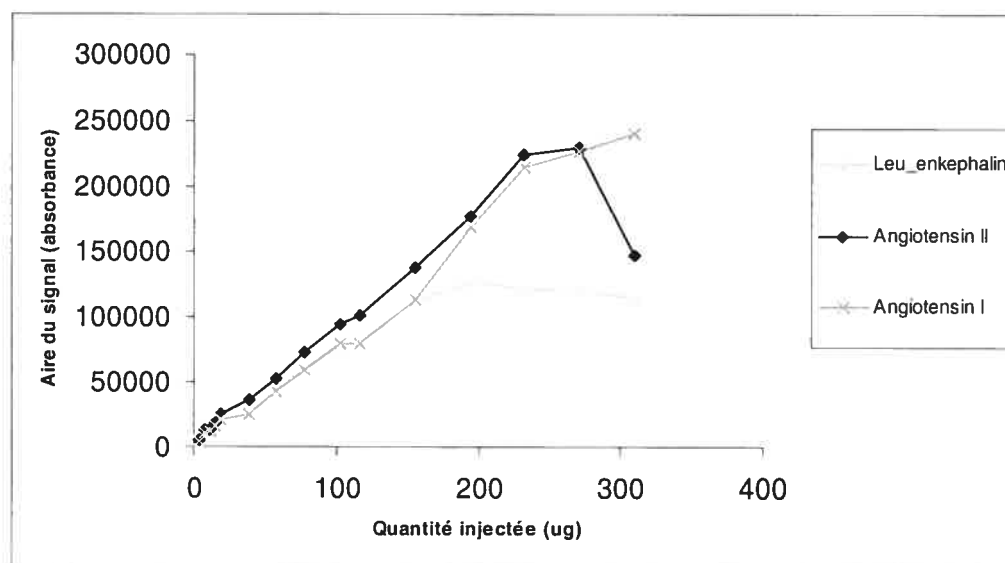
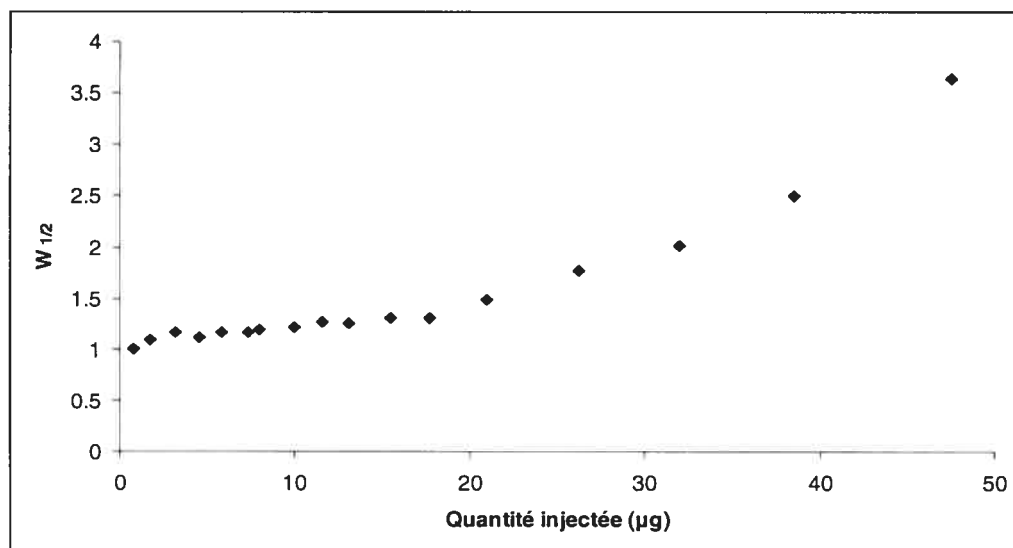


Figure 28 : Variation de l'aire du signal en absorbance en fonction de la quantité injectée pour les 3 peptides.

La capacité d'affinité d'une colonne SCX de 5cm est de 200 μg . Le volume de la colonne correspond à 2.4 μL . \ceci permet de conclure que le matériel SCX utilisé retient 83.3 μg d'échantillon par μL de volume de colonne.

A)



B)

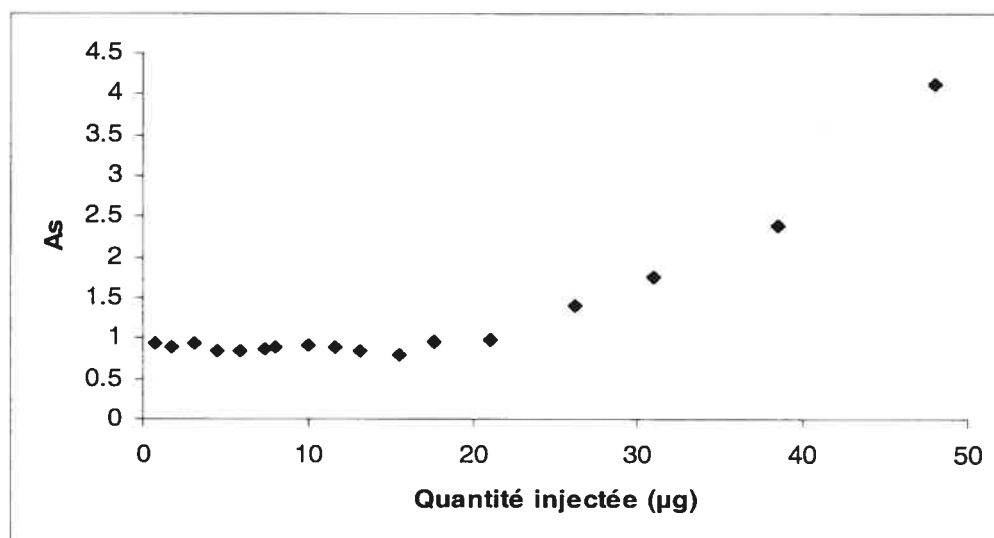


Figure 29 : Variation de la largeur des pics en fonction de la quantité injectée A) Largeur des pics à mi-hauteur de l'angiotensin I en fonction de la quantité injectée, B) Asymétrie mesurée sur les pics de l'angiotensin I en fonction de la quantité injectée.

Alpert et al., estiment à 100 mg/g de phase stationnaire poly-sulfoethyl, la capacité de charge d'un échantillon d'hémoglobine [61]. Pour remplir la colonne environ, 2 mg de phase stationnaire ont été utilisés (voir les matériaux et les méthodes, page 32). La capacité d'affinité d'un échantillon correspondrait à une estimation de 200 μg pour la pré-colonne 250 μm x 5cm. Cette estimation concorde aux résultats obtenus.

Par contre, les performances analytiques en termes de largeur de pics et d'asymétrie varient significativement pour plus de 20 μg injecté. L'asymétrie des pics de l'angiotensin I, a été calculée pour chaque quantité chargée sur la colonne. L'asymétrie, et la largeur des pics à mi-hauteur sont représentées figure 29 (page 82). D'après ces résultats, il est possible de charger jusqu'à 15 μg d'échantillon sur la colonne, sans avoir de variation significative de l'asymétrie et de la largeur des pics. Cette quantité correspond à 6.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de volume de colonne remplie SCX.

Pour une colonne de 250 μm x 3cm, qui sera utilisée pour les travaux de 2D-LC, dont le volume est de 1.44 μL , la capacité sera de 9 μg d'échantillon.

5.2.4 Fractionnement

Un échantillon de plasma fut injecté sur une colonne de 250 μm (i.d.) x 3 cm (longueur), afin de déterminer le nombre de fractions, ainsi que la concentration de formate d'ammonium nécessaire pour éluer chaque fraction.

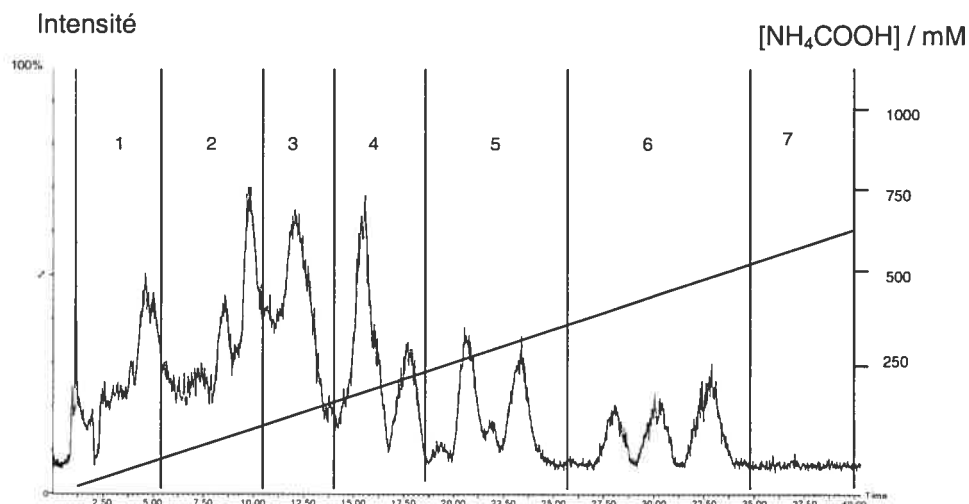


Figure 30 : Chromatogramme d'un digestat trypsique (1 μ g) de protéines sériques séparées avec une colonne SCX 250 μ m x 3cm.

Le chromatogramme obtenu (Figure 30) a été partagé en sept fractions comparables dans chacune des fractions, de façon à avoir un nombre de peptides similaires par la suite dans chacune. Les concentrations en sel ont été calculées d'après les temps de rétention obtenu, et en considérant un temps mort de 1 minute, et sachant qu'en 1 min le gradient varie de 0.41 % de phase mobile B (voir les matériaux et méthodes pour la composition des phases mobiles). Les différentes fractions seront éluées avec les sept concentrations suivantes :

Tableau XIX: Concentration de sel des sept solutions d'éluion

| | Concentration du formate d'ammonium (mM) |
|------------|--|
| Fraction 1 | 40 |
| Fraction 2 | 60 |
| Fraction 3 | 85 |
| Fraction 4 | 125 |
| Fraction 5 | 160 |
| Fraction 6 | 250 |
| Fraction 7 | 500 |

5.3 Applications en 2D-LC

5.3.1 Système 2D-LC

Les peptides sont séparés sur une colonne échangeuse de cations puis séparés sur une colonne de phase inversée. Dans un premier temps, les peptides sont élués de la résine échangeuse de cations par paliers avec un gradient croissant de concentration de sels pour se déposer en tête de la pré-colonne C18. Les peptides retenus sur la pré-colonne sont ensuite élués de celle-ci avec l'augmentation du pourcentage d'acetonitrile lorsque la valve de déviation est activée (Figure 31)

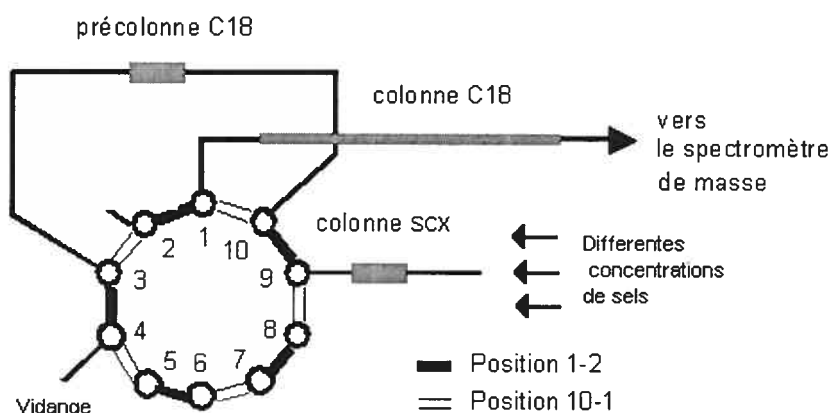


Figure 31 : Montage d'un système de valves à 10 ports pour une séparation en 2D-LC

Dans un premier temps, l'échantillon est chargé sur la colonne SCX en utilisant la position 1-2 de la vanne de multipositions (Figure 31). L'échantillon est piégé sur la colonne SCX. Un aliquot de 10 μL de la solution de sel correspondant à la première fraction, est injecté en maintenant la vanne en position 1-2. Ce volume correspond à sept fois le volume de la colonne. D'après Fujii et al. [62], un volume correspondant à quatre fois celui de la colonne SCX est suffisant pour éluer tous les peptides pour une plage de sels donnée. Les peptides de $p\text{I}$ croissant seront déplacés progressivement avec l'augmentation de la force ionique de la

solution de formate d'ammonium. Alors que les sels ne sont pas retenus par la pré-colonne C18. Le système passe en position 10-1. Un gradient linéaire eau/acétonitrile permet d'éluer les peptides de la pré-colonne C18, puis de la colonne C18 pour être analysé par le spectromètre de masse. La deuxième concentration de sel est ensuite injectée, en éluant une autre série de peptides et la méthode se poursuit jusqu'à la septième fraction. Puis une concentration de 1M de formate d'ammonium, est injectée afin de laver la colonne de tous peptides restant.

Une quantité de 3 µg de protéines sériques humaines digérées fut injecté sur la colonne SCX. Six mesures successives furent effectuées avec 3 µg et sept fractions furent ainsi analysées. Puis le même échantillon, mais à plus faible concentration c'est-à-dire 400 ng, fut analysé avec un système à une dimension en utilisant les mêmes pré-colonne et colonne analytique C18 que pour le système 2D-LC de façon à déterminer l'accroissement du nombre de peptides et protéines identifiées.

5.3.2 Reproductibilité

De façon à pouvoir comparer différents échantillons entre eux, il est nécessaire d'avoir des résultats reproductibles. Il est important de retrouver les mêmes protéines, lorsqu'on analyse le même échantillon plusieurs fois. Le séquençage, certaine fois, est basé sur des cibles qui sont caractérisée par leur temps de rétention, et leur m/z. Une bonne reproductibilité du temps de rétention s'avère donc importante pour une bonne identification.

5.3.2.1 Nombre d'ions peptidiques

Le nombre d'ions peptidiques obtenu en mode MS fut déterminé grâce à l'outil bioinformatique « Peptide Detect ».

Un aliquot d'un même digestat, est injecté six fois. Le tableau XX (page 88) présente pour chaque fraction le nombre d'ions peptidiques de différentes charges +2, +3 et +4 ainsi que le nombre total, pour chacune des injections.

Ces résultats montrent une bonne reproductibilité entre les différentes injections dans chacune des fractions. Les cartes peptidiques de la fraction 2 (annexe 9) soulignent cette reproductibilité et montrent que le nombre de d'ions peptidiques pour chaque état de charge dans chacune des fractions, est également similaire, avec une valeur RSD (n=6) moyenne de 8.5%. La bonne répartition du nombre de peptides dans chaque fraction confirme l'étude préliminaire de la figure 29 (page 82) lors de l'évaluation de chaque concentration d'élution de formate d'ammonium.

Tableau XX: Nombre d'ions peptidiques dans chaque fraction pour six aliquots injectés indépendants

| Fraction SCX (NH ₄ CCOH) | Charge | Injection 1 | Injection 2 | Injection 3 | Injection 4 | Injection 5 | Injection 6 | Moyenne | RSD % |
|-------------------------------------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------|
| Fraction 1 (40 mM) | 2+ | 1815 | 1826 | 1897 | 1928 | 1846 | 1846 | 1860 | 2.4 |
| | 3+ | 1080 | 1092 | 1182 | 1182 | 1665 | 1665 | 1305 | 21.6 |
| | 4+ | 371 | 314 | 342 | 342 | 350 | 666 | 392 | 34.9 |
| | Total | 1266 | 3232 | 3452 | 3452 | 3861 | 4177 | 3556 | 10.7 |
| Fraction 2 (60 mM) | 2+ | 3069 | 3016 | 3017 | 2989 | 3002 | 2955 | 3008 | 1.3 |
| | 3+ | 693 | 762 | 811 | 827 | 867 | 855 | 803 | 8.1 |
| | 4+ | 129 | 121 | 131 | 122 | 135 | 131 | 128 | 4.3 |
| | Total | 3891 | 3899 | 3959 | 3938 | 4004 | 3941 | 3939 | 1.0 |
| Fraction 3 (85 mM) | 2+ | 1980 | 2073 | 2094 | 2058 | 2299 | 2316 | 2137 | 6.5 |
| | 3+ | 1278 | 1263 | 1121 | 1152 | 1205 | 1063 | 1180 | 7.1 |
| | 4+ | 174 | 176 | 164 | 172 | 197 | 159 | 174 | 7.6 |
| | Total | 3432 | 3512 | 3379 | 3382 | 3701 | 3538 | 3491 | 3.5 |
| Fraction 4 (125 mM) | 2+ | 1111 | 1213 | 1264 | 1248 | 1287 | 1271 | 1232 | 5.2 |
| | 3+ | 1494 | 1603 | 1656 | 1607 | 1746 | 1227 | 1639 | 5.6 |
| | 4+ | 94 | 110 | 102 | 105 | 106 | 100 | 103 | 5.4 |
| | Total | 2699 | 2926 | 3022 | 2960 | 3139 | 3098 | 2974 | 5.3 |
| Fraction 5 (160 mM) | 2+ | 1293 | 1317 | 1377 | 1379 | 1502 | 1538 | 1401 | 7.0 |
| | 3+ | 1306 | 1263 | 1325 | 1319 | 1404 | 1550 | 1361 | 7.6 |
| | 4+ | 248 | 262 | 260 | 231 | 241 | 237 | 247 | 5.1 |
| | Total | 2847 | 2842 | 2962 | 2929 | 3147 | 3325 | 2842 | 6.3 |
| Fraction 6 (250 mM) | 2+ | 924 | 967 | 1037 | 1032 | 1142 | 1168 | 1045 | 9.1 |
| | 3+ | 1020 | 1077 | 1091 | 1123 | 1237 | 1309 | 1143 | 9.5 |
| | 4+ | 425 | 444 | 411 | 401 | 457 | 398 | 423 | 5.7 |
| | Total | 2369 | 2488 | 2539 | 2556 | 2836 | 2875 | 2611 | 7.7 |
| Fraction 7 (500 mM) | 2+ | 1060 | 1114 | 1228 | 1279 | 1336 | 1364 | 1230 | 9.9 |
| | 3+ | 1327 | 1379 | 1609 | 1595 | 1690 | 1785 | 1564 | 11.4 |
| | 4+ | 911 | 922 | 940 | 920 | 943 | 989 | 938 | 3.0 |
| | Total | 3298 | 3409 | 3777 | 3794 | 3969 | 4138 | 3731 | 8.6 |

5.3.2.2 Variation du temps de rétention et de l'intensité pour cinq injections

Vu la complexité de l'échantillon, il est très difficile de retrouver tous les ions peptidiques dans chaque injection, en particulier ceux qui sont de faibles intensités. Pour ne pas faire uniquement les mesures de reproductibilité sur les ions les plus intenses, nous allons utiliser un outil bioinformatique nommé « sherpa ». En utilisant 6 injections, cet outil est capable de retrouver le même ion peptidique au moins 5 fois. C'est à dire que parmi les 6 injections, on retrouve un même ion peptidique dans au moins 5 injections. Cet ion peptidique retrouvé dans les 5 injections forme un groupe d'ions peptidique. Un groupe d'ions peptidique est déterminé par une analyse de segmentation qui regroupe des peptides de plusieurs injections qui partagent le même m/z avec une tolérance de 0.02 da, et le même RT avec une tolérance de 4 min.

Les valeurs RSD du temps de rétention et de l'intensité des groupes peptidiques fut calculées pour 5 injections, pour chacune des fractions. Les résultats sont présentés au tableau XXI (page 90).

Cela signifie que, pour la fraction 1, parmi les 6 injections, 53 % des ions peptidiques se retrouvent dans au moins 5 injections. Et sur ces groupes d'ions peptidiques, la déviation standard résiduelle des temps de rétention de ces ions peptidiques est de 1 %, et celle de l'intensité de ces ions peptidique est de 30 %.

Tableau XXI: Reproductibilité des temps de rétention et des intensités des ions peptidiques pour un ensemble représentant 90% de tous les ions observés communs détectés dans au moins 5 injections différentes, selon les différentes fractions

| Fraction SCX ([NH ₄ COOH]) | %Peptides en communs (n=5) | RSD Temps Rétention (%) (n=5) | RSD Intensité (%) (n=5) |
|--|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| Fraction 1 (40 mM) | 53 | 1.0 | 40 |
| Fraction 2 (60 mM) | 73 | 0.9 | 20 |
| Fraction 3 (85 mM) | 64 | 1.1 | 29 |
| Fraction 4 (125 mM) | 57 | 0.8 | 41 |
| Fraction 5 (160 mM) | 55 | 1.3 | 30 |
| Fraction 6 (250 mM) | 49 | 1.0 | 27 |
| Fraction 7 (500 mM) | 45 | 1.1 | 27 |

Cela signifie que, pour la fraction 1, parmi les 6 injections, 53 % des ions peptidiques se retrouvent dans au moins 5 injections. Et sur ces groupes d'ions peptidiques, la déviation standard résiduelle des temps de rétention de ces ions peptidiques est de 1 %, et celle de l'intensité de ces ions peptidique est de 30 %.

La figure 32 (page 91) représente la distribution d'intensité pour les groupes peptidiques de 5 injections successives.

La moyenne de l'intensité des groupes d'ions peptidiques fut calculée pour 5 injections. Le rapport d'intensité entre la moyenne des groupes d'ions peptiques pour 5 injections avec l'intensité des mêmes groupes d'ions peptidiques pour une injection reste centré sur la ligne des 45^o pour la majorité des groupes peptidiques. La variation d'intensité relative est de 20% pour 90% des groupes peptidiques, pour la fraction 2 (Figure 32 page

91, tableau XXI page 90), et allant jusqu'à 41% pour la fraction 4 (tableau XXI, page 90).

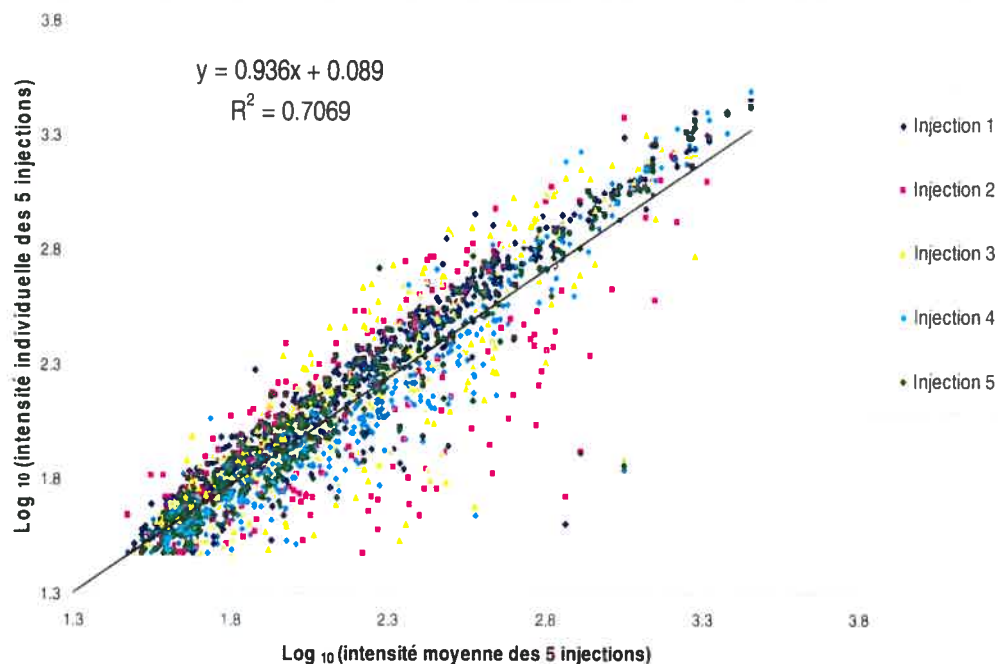


Figure 32 : Distribution d'intensité pour des groupes d'ions peptidiques pour 5 injections dans la fraction 2, de 60mM de NH₄COOH

Afin de déterminer l'erreur apportée par l'augmentation d'une dimension orthogonale, les mêmes calculs ont été réalisés sur les acquisitions provenant d'une analyse n'impliquant pas la colonne SCX, c'est-à-dire sur un système à une seule dimension. Des injections du même échantillon de protéines sériques humaines, effectués avec les mêmes colonnes C18 utilisées pour la 2D-LC, ont été utilisés pour minimiser les facteurs de variation. Le tableau XXII (page 92) montre les résultats obtenus.

Tableau XXII: Variations du temps de rétention et de l'intensité en 1D-LC, et 2D-LC (moyenne des sept fractions)

| | Peptides en communs (%) | RSD Temps Rétention (%) | RSD Intensité (%) |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------|
| 1D-LC | 74 | 1.3 | 20 |
| 2D-LC | 57 | 1.0 | 30 |

Ces analyses ont permis de constater une diminution du nombre de peptides communs en 2D-LC-MS comparativement à la 1D-LC-MS. Cette diminution est attribuée à la dispersion des peptides entre les différentes fractions de sels, de la pré-colonne SCX, pouvant montrer des variations significatives pour les peptides de faibles abondances. Ceci est naturellement minimisé lorsque les injections sont effectuées sur une seule pré-colonne. Par contre, l'addition de la colonne SCX n'occasionne pas de variation supplémentaire sur le temps de rétention des peptides. On note également, une augmentation de 51% sur la variation de l'intensité des peptides analysés par 2D-LC-MS comparativement ceux analysés par 1D-LC-MS. Il est possible que les peptides éluent sur plusieurs fractions, c'est-à-dire à plus ou moins une fraction, de leur fraction majoritaire. Ceci pourrait expliquer une augmentation de la variation de l'intensité des peptides.

La figure 33 (page 93) montre grâce aux chromatogrammes d'un ion peptidique extrait, la reproductibilité du temps de rétention et de l'intensité.

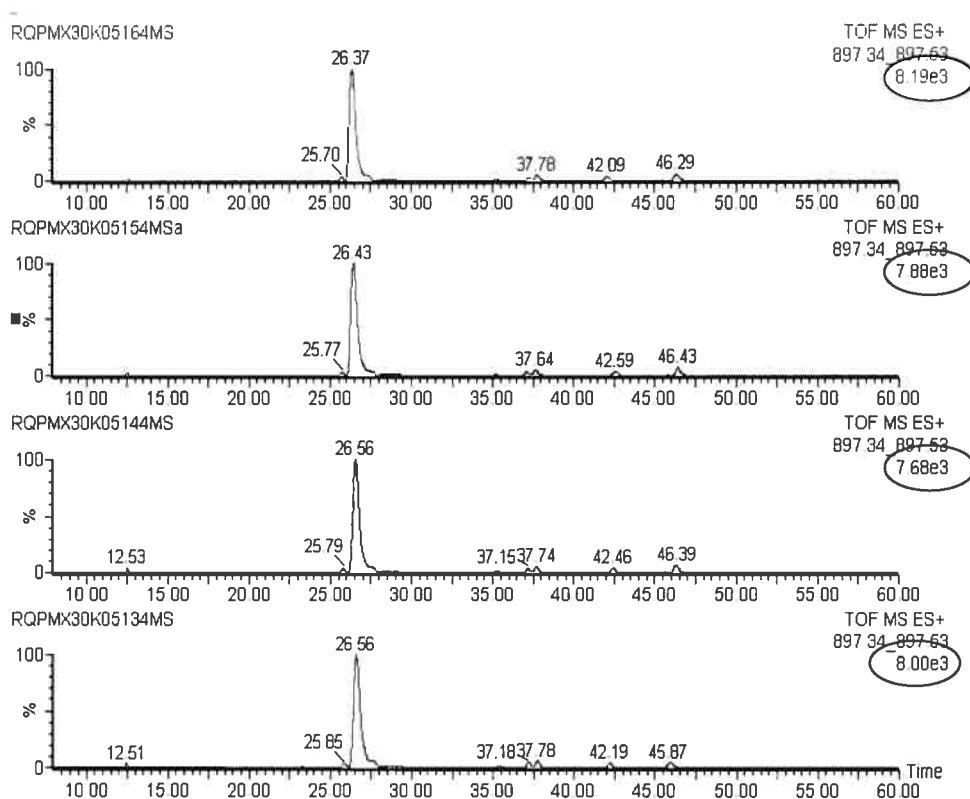


Figure 33 : Chromatogrammes extraits de l'ion peptidique $m/z=897.44 (+2)$ provenant de la fraction 2, pour quatre réplicatas. L'intensité mesurée de cet ion est encerclée au coin supérieur droit de chaque

A titre de comparaison, Masuda et al. [63], ont obtenu un pourcentage RSD ($n=5$) maximum du temps de rétention de 2.4% en utilisant un débit de 400 nL/min, avec un mélange de trois protéines, et une colonne SCX 1 mm (i.d.) x 50 mm (longueur). Volmer M. et al [64] ont étudié la reproductibilité en utilisant un système discontinu 2D-LC en utilisant un débit de 300 nL/min sur la colonne C18, et ont obtenu un pourcentage RSD ($n=3$) de 4.3% sur l'abondance, avec un mélange de 10 protéines aux concentrations similaires. Ce mélange ne représente pas la complexité d'un échantillon brut de protéines sériques. Aucun auteur n'a étudié la reproductibilité d'un tel système sur un mélange aussi complexe que celui utilisé pour ces travaux.

5.3.2.3 *Élution des peptides sur plusieurs fractions*

Une des limitations de la 2D-LC en utilisant des gradients par paliers, est le chevauchement entre fractions [65]. Or, afin de pouvoir comparer l'abondance d'un peptide d'un échantillon à l'autre, il est important que chaque peptide élu principalement dans une seule fraction, et chevauche le moins possible avec une autre fraction adjacente.

La première partie de ce chapitre visait à optimiser la séparation sur la colonne SCX, par le choix des dimensions de la colonne, et des conditions analytiques. Une meilleure séparation sur la colonne SCX devrait minimiser le chevauchement de l'élution des peptides entre fractions consécutives, et permettre une meilleure reproductibilité des résultats

Le tableau XXIII montre le pourcentage de peptides qui sont en communs entre deux fractions consécutives. La variation d'intensité entre ces peptides présents dans des fractions voisines est supérieure à 100%.

Tableau XXIII: Pourcentage d'ions peptidiques communs entre deux fractions consécutives

| | Fraction 2 | Fraction 3 | Fraction 4 | Fraction 5 | Fraction 6 | Fraction 7 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Fraction 1 | 1.8% | | | | | |
| Fraction 2 | | 10% | | | | |
| Fraction 3 | | | 11% | | | |
| Fraction 4 | | | | 14% | | |
| Fraction 5 | | | | | 17% | |
| Fraction 6 | | | | | | 9% |

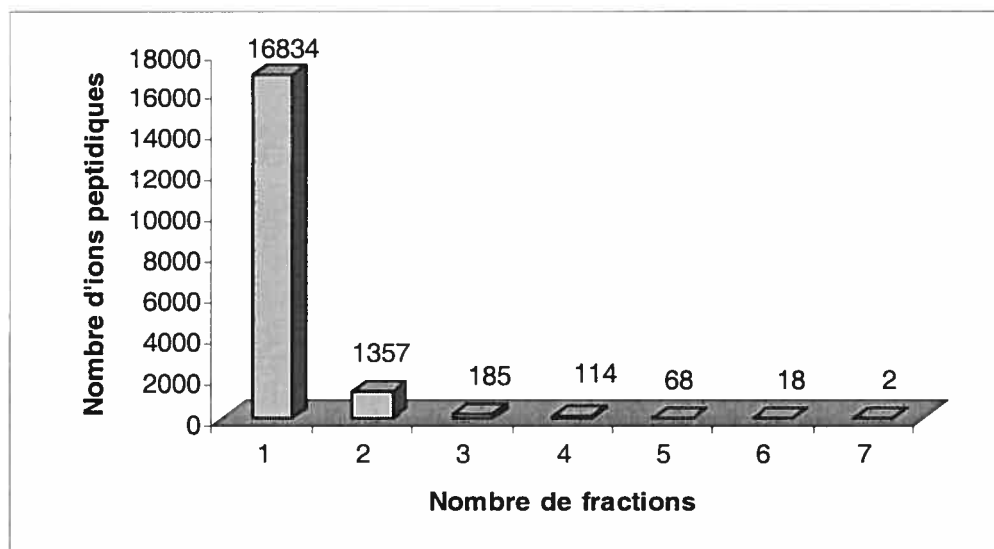


Figure 34 : Nombre d'ions peptidiques communs dans plusieurs fractions

La figure 34 montre la distribution des ions peptidiques parmi les fractions de sels lors d'une injection. Par exemple on peut observer que la majorité des ions peptidiques, soit 16 834 sur un total de 18 191, se retrouve dans une seule fraction de sel. Ainsi 1 357 sur un total de 18 191 d'ions peptidiques, soit 7%, éluent dans au moins deux fractions différentes de sels. Millea et al. [66] en étudiant ce comportement de dispersion dans différentes fractions, ont trouvés qu'un gradient linéaire créait moins de dispersions, comparativement à un gradient par paliers.

5.3.2.4 Capacité chromatographique

o A) Augmentation du nombre d'ions peptidiques détectés

La capacité chromatographique d'un système 2D-LC est la capacité chromatographique du système 1D-LC multiplié par le nombre de fractions. C'est-à-dire dans cette étude, utilisant le système 2D-LC on peut multiplier par 7 la capacité chromatographique.

Le tableau XXIV résume les capacités chromatographiques des systèmes 2D-LC et 1D-LC ainsi que le nombre moyen d'ions peptidiques détectés pour 6 injections avec ces deux systèmes, avec un échantillon de protéines sériques digérées.

Tableau XXIV : Capacité chromatographique et nombre moyen d'ions peptidiques détectés pour 6 injections, avec un système 2D-LC-MS et un système 1D-LC-MS, d'un digestat de protéines sériques humaines

| | 2D-LC-MS | 1D-LC-MS |
|------------------------------------|----------|----------|
| capacité chromatographique | 1085 | 155 |
| nombre d'ions peptidiques détectés | 23143 | 3050 |

Sept fois plus d'ions peptidiques peuvent être détecté grâce au système 2D-LC en comparaison au système 1D-LC. Pour une étude protéomique, cela permet d'étudier le comportement de peptides de plus faible abondance, qui ne seraient pas détectés avec un système 1D-LC.

o B) Identification des protéines

L'avantage de la 2D-LC est la capacité d'augmenter la sensibilité et le nombre de peptides qui sont à plus faible abondance et présents dans un mélange complexe. L'échantillon de protéines sériques humaines utilisé jusqu'à présent pour cette étude, fut analysé en 2D-LC-MS/MS. Sachant la complexité de l'échantillon, la méthode MS/MS doit être optimisée, de façon à séquencer le maximum de peptides.

Le coefficient d'utilisation du Q-TOF consiste à l'acquisition d'un balayage en mode MS pendant 1 seconde, suivie de la fragmentation des quatre ions les plus abondants. Chaque MS/MS pour chacun des ions est

enregistré pendant deux secondes. Ainsi le temps total pour un coefficient d'utilisation est de neuf secondes durant lequel 4 spectres MS/MS seront enregistrés. La fenêtre d'élution est d'environ cinquante minutes, soit 3000 secondes, durant lesquelles un maximum de 1333 spectres MS/MS pourra être enregistré. Or, lors d'une acquisition, plus de 4000 précurseurs peuvent être détectés (voir section 5.3.2.1). L'instrument n'a pas la capacité de séquencer tous les peptides en une seule analyse. Afin de séquencer le plus de peptides possible, l'analyse s'effectue en utilisant des méthodes d'exclusion itératives (voir Fig. 13, page 38). La première analyse utilise une méthode de MS/MS classique sur chaque fraction. A la fin de chaque acquisition, une liste de tous les précurseurs avec leur temps de rétention est créée automatiquement. Cette liste est utilisée ensuite en tant que liste d'exclusion pour la prochaine analyse MS/MS. Ceci permet de ne pas séquencer de nouveau les mêmes peptides. Il est donc très important d'obtenir des temps de rétention reproductibles, pour utiliser cette approche. Une troisième analyse en MS/MS est effectuée en utilisant une liste d'exclusion composée de la somme des peptides séquencés dans les deux premières analyses. Plusieurs paramètres ont été optimisés afin de d'augmenter le rendement du séquençage et la qualité des spectres. L'intensité utilisée comme seuil pour séquencer le précurseur cible diminue de la première à la troisième analyse, tandis que le temps de séquençage augmente (voir les matériaux et méthodes).

Le gain de résolution apporté par la 2D-LC, ainsi que l'augmentation de la quantité injectée, permet un accroissement du nombre de peptides identifiés. La figure 35 (page 98) souligne un exemple où l'ion peptidique $m/z=578.85$ est présent et séquencé en 2D-LC, mais absent en 1D-LC.

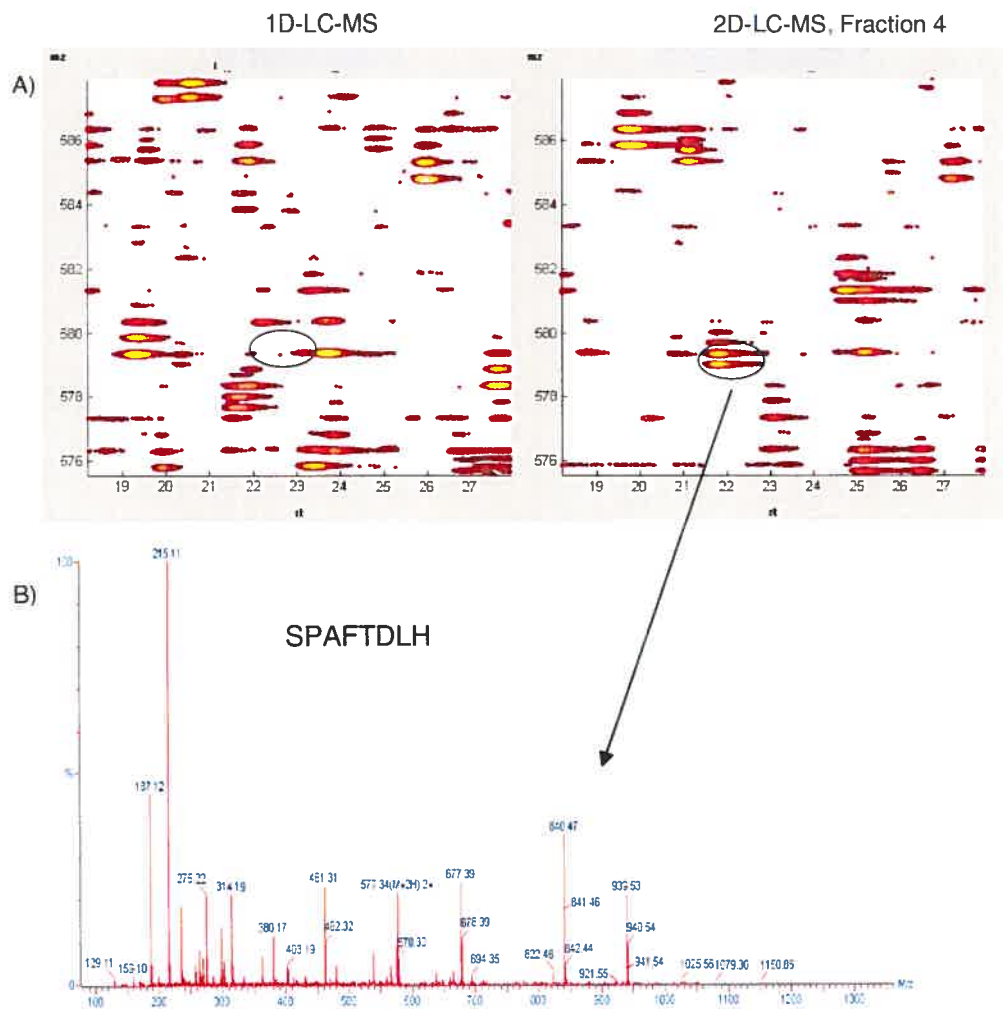


Figure 35: Gain de sensibilité entre 1D-LC et 2D-LC A) Cartes peptidiques dans la région du précurseur $m/z = 578.85$ B) spectre obtenu de la collision du précurseur $m/z = 578.85$ en 2D-LC.

L'analyse du même échantillon de protéines sériques fut effectuée avec un système 1D-LC, en utilisant le même gradient, et la même colonne C18. Trois acquisitions de MS/MS furent effectuées en utilisant des listes d'exclusion itératives. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau XXV (page 99).

Tableau XXV: Nombre de peptides et protéines identifiés en MS/MS dans un digestat trypsique de protéines sériques humaines analysé par un système 1D-LC et 2D-LC échantillon de plasma humain avec un système 1D-LC-MS/MS et 2D-LC-MS/MS

| | 2D-LC-MS/MS | | 1D-LC-MS/MS | |
|----------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | Nombre de peptides | Nombre de protéines | Nombre de peptides | Nombre de protéines |
| Après 1ère MSMS | 787 | 147 | 371 | 72 |
| Après 1 MSMS + 1 exclusion | 1063 | 209 | 553 | 89 |
| Après 1MSMS + 2 exclusions | 1292 | 217 | 650 | 107 |

L'utilisation d'un système 2D-LC permet de doubler le nombre de peptides et de protéines identifiées, en gardant une couverture peptidique identique (en moyenne 6 peptides par protéine). Fujii et al. [62] ont augmenté par un facteur de 1.6 le nombre de séquences d'un échantillon de levure, en utilisant 6 fractions, en comparaison à l'analyse avec un système 1D-LC. Quant à Kang et al. [67], ils passèrent de 229 à 452 le nombre de protéines identifiées en utilisant huit fractions.

En utilisant plus de fractions, il aurait été possible d'augmenter le nombre de protéines identifiées. Peng et al. [68] ont réussi à identifier 1504 protéines, avec 1 mg de protéines d'un échantillon de levure en utilisant 80 fractions, et un gradient de 80 minutes.

5.3.2.6 Distribution peptidique en fonction de la charge et l'hydrophobicité.

Au pH utilisé pour la séparation (pH=3.5), seulement la lysine, l'arginine, l'histidine, et le groupe amine terminal contribue à la charge du peptide. Les figures 36 et 37 soulignent la distribution peptidique dans les différentes fractions selon leurs charges.

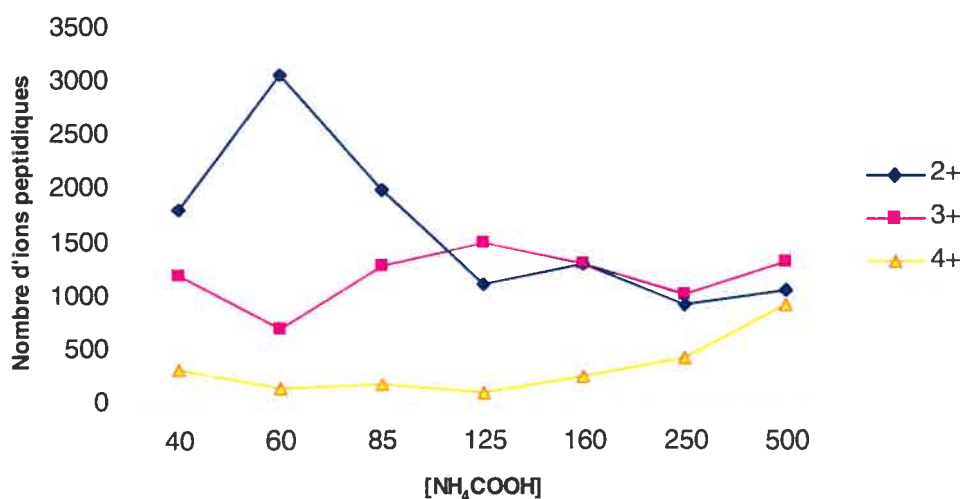


Figure 36 : Distribution des ions peptidiques en fonction de leur charge et de la concentration de sel, en utilisant les fichiers LC-MS

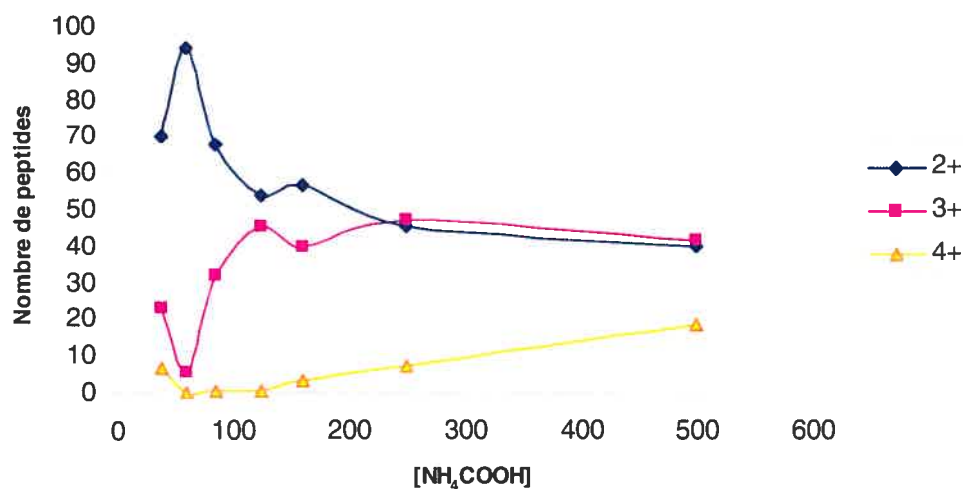


Figure 37 : Distribution des peptides identifiés selon leur charge et la concentration de sel, en utilisant les fichiers LC-MS/MS

Ainsi les peptides de charge plus élevée sont observés avec l'augmentation de la force ionique. La valeur théorique de la charge de 50 peptides identifiés dans chacune des fractions fut calculée grâce à un logiciel accessible par Internet [69]. Les résultats sont reportés à la figure 38. Cette figure, montre d'une façon différente la tendance des peptides à éluer en fonction de la charge. Ceux qui auront les charges les plus élevées auront tendance à éluer dans les dernières fractions. L'augmentation de la force ionique favorise l'élution des peptides ayant des valeurs pI élevées. D'après cette figure, certains peptides ayant la même valeur de charge, éluent dans plusieurs fractions. Il est possible que les peptides soient également séparés sur des propriétés différentes que leur charge respective. La séparation observée peut être due à une interaction secondaire hydrophobique avec le matériel SCX [41].

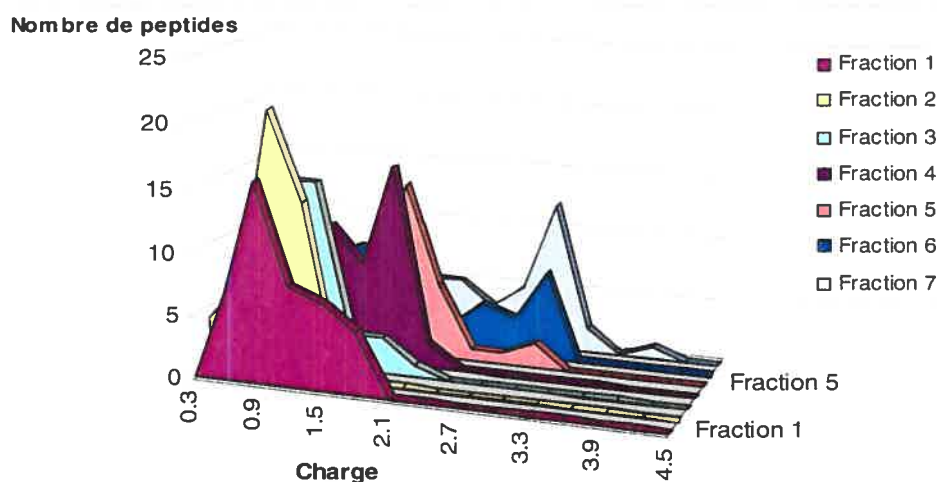


Figure 38 : Distribution peptidique en fonction de la charge théorique à pH=3.5

La moyenne de l'hydrophobicité [70, 71], fut calculée pour différents peptides ayant des valeurs de pI identiques et éluant dans des fractions différentes. La figure 39 (page 102) représente les valeurs moyennes

d'hydrophobicité de différents peptides pour trois valeurs de charges apparentes différentes.

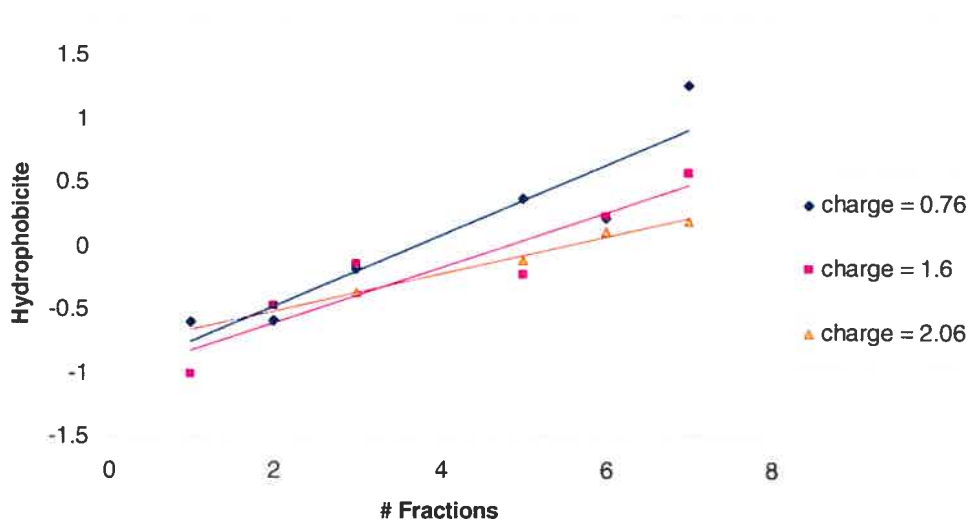


Figure 39 : Variation de l'hydrophobicité des peptides pour chaque fraction, selon leur charge théorique à pH =3.5

Ainsi on peut constater que les peptides hydrophobes sont élués avec l'augmentation de la force ionique. La variation est moins significative, lorsque la valeur de la charge apparente augmente. La même tendance a été observée dans les résultats de Peng et al [68], mais aucune explication n'a été fournie à cet effet. Par ailleurs, Alper et al. [61] ont montré que la sélectivité sur une colonne SCX pouvait être manipulée par addition de solvant organique dans la phase mobile. En diminuant les interactions hydrophobiques sur la colonne SCX, l'orthogonalité des deux dimensions de séparation augmenterait.

Une alternative serait donc d'augmenter le pourcentage d'acétonitrile dans la solution de sel [72]. Mais, cette condition est plus avantageuse pour un système 2D-LC discontinu. Pour un système en continu, les peptides les plus hydrophiles ne seraient plus retenus par la pré-colonne C18 en présence d'acétonitrile.

5.4 Conclusion

Le système 2D-nano-LC, fut évalué pour l'analyse d'échantillon complexe relié à la protéomique. Chaque composante chromatographique, fut optimisée, tout en minimisant le risque de perte d'échantillon. Les peptides qui ne se lient pas à la colonne SCX seront retenus par la pré-colonne C18, permettant la capture de la majorité des peptides provenant d'un échantillon digéré, et l'augmentation de la quantité d'information obtenue. Un gain en sensibilité est apporté en injectant une quantité plus importante d'échantillon, permettant l'identification de peptides moins abondants. Le système discontinu permet d'obtenir de meilleures conditions chromatographiques. En effet, un gradient linéaire sur la colonne SCX permettrait d'obtenir une meilleure résolution chromatographique, réduisant ainsi le chevauchement de fractions, et l'ajout de solvant organique permettrait de minimiser les interactions hydrophobiques. Par contre le système en continu peut facilement être automatisé et donne des résultats plus reproductibles, car celui-ci est moins sensible aux pertes d'échantillons ainsi qu'aux sources de contaminations potentielles, contrairement à un système discontinu.

Le système 2D-LC couplé utilisé dans le cadre de ces travaux, montre une bonne reproductibilité, autant au niveau de temps de rétention, que de l'abondance des peptides détectés. Ces performances chromatographiques permettent de faire une étude comparative de différents échantillons de façon à déterminer les changements d'abondances des protéines correspondantes, et ainsi l'identification de biomarqueurs.

CHAPITRE 6

CONCLUSION

Grâce aux progrès de la spectrométrie de masse liée aux techniques de séparations HPLC, le résultat du séquençage des génomes est un outil puissant pour l'identification des protéines. Une bonne reproductibilité des résultats est essentielle pour obtenir un profil partiel d'expression protéique entre différents échantillons. Une optimisation de toutes les composantes chromatographiques est donc indispensable.

Les mélanges peptidiques analysés sont très complexes, et l'abondance des peptides varie sur une gamme s'étalant sur plus de trois ordres de grandeur. La complexité des analyses LC-MS représente un défi analytique de taille et le développement d'une méthode chromatographique fiable et reproductible est nécessaire pour toute analyse protéomique.

Le gain en capacité chromatographique apporté par la 2D-LC, ainsi que l'augmentation de la quantité injectée, permet un accroissement du nombre de peptides détectés et identifiés. La capacité chromatographique d'un système 2D-LC est représentée par le produit de la capacité chromatographique du système 1D-LC et du nombre de fractions. Ainsi, on a pu accroître d'un facteur de 7 la capacité chromatographique du système 1D-LC en utilisant un pré-fractionnement SCX en ligne ($n=1085$ versus $n=155$ pour la 1D-LC). Nous avons également augmenté d'un facteur 7, le nombre d'ions peptidiques détectés, et d'un facteur 2, en utilisant le système 2D-LC, le nombre de protéines identifiées. A titre de comparaison, Fujii et al., ont dans leurs travaux augmenté par un facteur de 1.6 le nombre de protéines identifiées avec l'ajout d'une dimension, et 6 fractions [62].

Pour optimiser le système 2D-LC, chaque composante chromatographique, fut étudiée, de façon à obtenir un système reproductible, tout en minimisant le risque de perte d'échantillon.

Dans une première partie (chapitre 5), j'ai étudié les composantes chromatographiques pour un système à une dimension, utilisé pour des échantillons peu complexes, ou préalablement séparés sur un gel. La séparation choisie s'effectue sur phase inversée C18. Pour le remplissage des colonnes capillaires, le matériel fut dans un premier temps sélectionné pour obtenir une bonne distribution peptidique sur la gamme d'élution, ainsi qu'une bonne résolution chromatographique. Nos travaux ont permis d'identifier le garnissage Jupiter C18 comme étant celui qui permettait d'avoir une meilleure répartition peptidique pour les analyses LC-MS de digestats tryptiques.

Par ailleurs, il a été possible de déterminer que les colonnes de 150 μm i.d. opérant à un débit de 600 nL/min donnent des conditions optimales de séparations LC-MS. Par ailleurs, ces colonnes ont des capacités de charge de 360 ng et une robustesse accrue, par rapport aux colonnes de 75 μm , principalement du à une pression imposée au système plus faible. Des valeurs RSD de 1%, et 14% furent obtenues respectivement pour les variations de temps de rétention et d'intensité, pour les analyses LC-MS de digestats tryptiques.

Dans la seconde partie (chapitre 6), nous avons évalué la combinaison de la chromatographie d'échange de cations (SCX) à la chromatographie C18 afin d'augmenter la capacité chromatographique, et permettre l'analyse d'échantillons plus complexes sans aucune séparation au préalable. Afin d'obtenir deux dimensions orthogonales de séparation, les phases stationnaires de chaque dimension doivent avoir un mode de séparation complémentaire. D'après la littérature, le matériel SCX est un des plus souvent utilisés. Les paramètres d'utilisation, et les dimensions de cette colonne furent dans un premier temps établis. Des digestats tryptiques de protéines sériques furent analysés avec le système 2D-LC-MS afin de vérifier ses performances ainsi que la reproductibilité des temps

de rétention et des intensités de tous les peptides. La variation des temps de rétention est identique à celle d'un système 1D-LC-MS. Par contre la variation standard relative d'intensité augmente par rapport à un système 1D-LC, mais reste inférieure à 30% pour 90% de tous les ions peptidiques. Ceci est suffisant pour permettre des analyses de différence d'expression d'un facteur 2 entre deux échantillons biologiques.

De nombreux auteurs ont utilisé un système nano-2D-LC à des fins protéomique, mais très peu, font mention de reproductibilité de l'analyse. Masuda et al., ont obtenu un pourcentage RSD de 2.4% sur le temps de rétention, avec 4 injections. Les travaux de ce mémoire permettent d'obtenir un pourcentage RSD de 1% avec 5 injections. Les seuls auteurs mentionnant la reproductibilité sur l'intensité sont Vollmer et al. Ils ont obtenu un pourcentage RSD de 4.3% sur l'abondance avec 3 injections. Mais leur étude portait sur un mélange de 10 protéines de concentrations similaires. Cela ne représente pas la complexité d'un échantillon réel de protéines sériques, comme celui utilisé lors de ces travaux pour ce mémoire. Nous avons obtenus un pourcentage RSD de 30% sur l'intensité avec 5 injections. Ce résultat est suffisant pour confirmer une sur-expression d'un facteur 2.

Ces résultats ont été obtenus avec des colonnes artisanales. Une colonne artisanale coûte environ 10 \$ à confectionner, alors que les colonnes commerciales coûtent plusieurs centaines de dollars. Tous les auteurs utilisant un système nano-2D-LC à des fins protéomiques sur des échantillons complexes utilisent des colonnes analytiques commerciales, et aucun n'a fait d'études complètes sur chaque composante chromatographiques de façon à optimiser le système.

Cette étude donne une optimisation exhaustive sur chaque composante d'un système nano-2D-LC, pour un échantillon complexe. Les reproductibilités obtenues sur l'intensité et le temps de rétention permettent une étude protéomique pertinente, et l'obtention de profils d'abondance

peptidiques. Ainsi des échantillons complexes tels que les protéines sériques, peuvent être analysés afin d'identifier des biomarqueurs sériques en utilisant le système 2D-LC-MS/MS.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Voet D., Voet J., Biochemistry, 2nd edition, John Wiley & Sons, 1995, p 56-70
- [2] Lim M. S., Elenitoba-Johnson K. S. J., Proteomics in pathology research. *Laboratory Investigation*, (2004), 84, 1227-1244
- [3] Cash P., Proteomics in medical microbiology, *Electrophoresis*, (2000), 21, 1187-1201
- [4] Haynes P. H., Gygi S. P., Figeys D., Aebersold R., Proteome analysis: biological assay or data archives? *Electrophoresis* (1998), 10, 1862-1871
- [5] Paintaud G., Bénétou M., Watier H., Biomarkers and pharmacokinetic-pharmacodynamic studies of immunosuppressive agents, *Thérapie* (2004), 59, 2, 179-183
- [6A] Anderson N. L., Anderson N. G., The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects, *Molecular & Cellular Proteomics*, (2002), 1, 845-867
- [6] Gaskell S. J., Electrospray: principles and practices, *J. Mass. Spectrom.* (1997), 32, 677-688
- [7] Cole R. B., Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* (2000), 35, 763-772
- [8] Kebarle P., A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* (2000), 35, 804-817

- [9] Yamashita M, Fenn J. B., Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* (1984), 88, 20, 4451-4459
- [10] Kebarle P., Tang L., From ions in solutions to ions in gas phase, *Anal. Chem.*, 65, 2, 972A-986A (1993)
- [11] Wilm M., Mann M., Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* (1996), 68, 1-8
- [12] Emmet M. R., Caprioli R. M., Micro-electrospray mass spectrometry: ultra-high-sensitivity analysis of peptides and proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (1994), 5, 605-613
- [13] Tang K., Page J. S., Smith R. D., Charge competition and the linear dynamic range of detection in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (2004), 15, 1416-1423
- [14] Tang L., Kebarle P., Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Anal. Chem.* (1993), 65, 3654-3668
- [15] Enke C. G., A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes. *Anal. Chem.* (1997), 69, 4885-4893
- [16] Friedman M. H., Yergey, A. L., Campana J. E., Fundamentals of ion motions in electric radio-frequency multipole fields. *J. Phys. E: Sci. Instrum.* (1982), 15, 53-61
- [17] Kinter M., Sherman N. E., Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry, (2000), éditeur: John Wiley & Sons, inc., (2000)

- [18] Gates P., <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/quad-massspec.html>
University of Bristol, Quadrupole & triple quadrupole (QQQ) mass analysis,
(2004)
- [19] Cotter R. J., Time-of-flight mass spectrometry. Instrumentation and
applications in biological research. ACS professional reference books,
(1996)
- [20] Vestal M., Juhaz P., Resolution and mass accuracy in matrix-assisted
laser desorption ionization-time-of-flight. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*
(1998), 9, 892-911
- [21] Guilhaus M., Principles and instrumentation in time-of-flight mass
spectrometry. Physical and instrumental concept. *J. Mass Spectrom.*
(1995), 30, 1519-1535
- [22] Gates P., <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/tof-massspec.html>
University of Bristol, Time of flight mass analysis, (2004)
- [23] Van Boxclaer J. F., Castele S. F., Van Poucke C. J., Van Peteghem
C. H., Confirmation of the identity of residues using quadrupole time-of-
flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* (2005), 529, 65-73
- [24] Steen H., Mann M., The abc's (and xyz's) of peptide sequencing.
Molecular Cell Biology, (2004), 5, 699-711
- [25] Ascroft A. E., Protein and peptide identification: the role of mass
spectrometry in proteomics, *Nat. Prod. Rep.*, (2003), 20, 202-215
- [26] O'Farrel, P. H., High resolution two-dimensional electrophoresis of
proteins, *J. Biol. Chem.*, (1975), 250, 4007-4021
- [27] Nagele E., Vollmer M., Horth P., Two-dimensional nano-liquid
chromatography-mass spectrometry system for applications in proteomics.
J. Chromatogr. A. (2003), 1009, 197-205

- [28] Garbis S., Lubec G., Fountoulakis M., Limitation of current proteomics technologies. *J. Chromatogr. A.* (2005), 1077, 1-18
- [29] Neverova I., Van Eyk J. E., Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *J. Chromatogr. B.* (2005), 815, 51-63
- [30] Gauthier F., Contribution à l'étude de l'adsorption de protéines aux interfaces. Thèse. Université Joseph Fourier. (2000)
- [31] Dorsey J. G., Cooper W., Siles B. A., Foley J. P., Barth H. G., Liquid chromatography: theory and methodology, *Anal. Chem.* (1998), 70, 591R-644R
- [32] Bradshaw T. P., A user's guide, Introduction to peptide and protein HPLC, Phenomenex, (2004)
- [33] Nawrocki J., The silanol group and its role in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* (1997), 779, 29-71
- [34] Abian J., Oosterkamp A. J., Gelpi E., Comparison of conventional narrow-bore and capillary liquid chromatography/mass spectrometry for electrospray ionization mass spectrometry: practical consideration. *J. Mass Spectrom.*, (1999), 34, 244-254
- [35] Mitulovic G., Smoluch M., Chervet J.-P., Steinmacher I., Kungl A., Mechtler K., An improved method for tracking and reducing the void volume in nano HPLC-MS with micro trapping columns, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2003), 376, 7, 946-951
- [36] Gu X., Wang Y., Zhang X., Large-bore particle-entrapped monolithic precolumns prepared by a sol-gel method for on-line peptide trapping and preconcentration in multidimensional liquid chromatography system for proteome analysis, *J. Chromatogr. A.* (2005), 1072, 223-232

- [37] Wang H., Hanash S., Multi-dimensional liquid phase based separations in proteomics. *J. Chromatogr. B.*, (2003), 787, 11-18
- [38] Giddings, J. C., Concepts and comparisons in multidimensional separation, *J. High. Resolut. Chromatogr.*, (1987), 10, 319-323
- [39] Millea K. M., Kass I. J., Cohen S. A., Krull I. S., Gebler J. C., Berger S. J., Evaluation of multidimensional (ion-exchange/reversed-phase) protein separations using linear and step gradients in the first dimension, *J. Chromatogr. A.* (2005), 1079, 287-298
- [40] D'Amboise M., Notes de cours CHM6170: Chromatographie avancée, Université de Montréal, Automne 2004
- [41] Gilar M., Daly A. E., Kele M., Neue U. D., Gebler J. C., Implications of column peak capacity on the separation of complex peptide mixtures in a single- and two-dimensional high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, (2004), 1061, 183-192
- [42] Ishii D., Asai K., Jonokuchi T., Nagaya M., A study of micro-high-performance liquid chromatography. I. Development of technique for miniaturization of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, (1977), 144, 157-168
- [43] Andreoloni F., Borra C., Novotny M., Preparation and evaluation of slurry-packed capillary columns for normal-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1987, 59, 2428-2432
- [44] Shelly D. C., Antonucci V. L., Edkins T. J., Dalton, T.J, Insights into the slurry packing and bed structure of capillary liquid chromatographic columns. *J. Chromatogr.*, 458, 1989, 267-279

- [45] Vissers J. P. C. Hoeben M. A., Laven J., Classens H. A., Cramers C. A., Hydrodynamics aspects of slurry packing processes in microcolumn liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 883, 2000, 11-25
- [46] Shelly D. C., Edkins T. J, Contribution to the packing of liquid chromatographic microcolumns, *J. Chromatogr.*, 1987, 411, 185-199
- [47] Gluckman J. C., Hirose A., McGuffin V., L., Novotny, M., Performance evaluation of slurry-packed capillary columns for liquid chromatography. *Chromatographia*. 1983, 17(6), 303-309
- [48] Zimina T., Smith R. M., Highfield J. C., Myers, P., King B. W., Study of flow development during the slurry packing of microcolumns for liquid chromatography . *J. Chromatogr. A*, 728 (1996), 33-45
- [49] Cortes H. J., Pfeiffer C. D., Ritcher B. E., Steven T. S., Porous ceramic bed supports for fused silica packed capillary columns used in liquid chromatography. *J. High. Resolut. Chromatogr.* (1987), 10, 446-448
- [50] Rebscher H., Pyell U., Instrumental developments in capillary electrochromatography. *Chromatographia*, (1996), 42, 171-176
- [51] Meyer F., Hartwick R. A., Efficient packing of small particle microbore columns. *Anal. Chem.*, (1984), 2211-2214
- [52] Meiring H.D., Van der Heeft E., ten Hove G.J., de Jong A. P. J. M., Nanoscale LC-MS(n): technical design and applications to peptide and protein analysis, *J. Sep. Sci* (2002), 25, 557-568
- [53] Masuda J., Maynard D. M., Nishimi M., Ueda T., Kowalak J. A., Markey S. P., Fully automated micro- and nanoscale one- or two-dimensional high-performance liquid chromatography system for liquid chromatography-mass spectrometry compatible with non-volatile salts for ion exchange chromatography, *J. Chromatogr. A.*, (2005), 1063, 57-69

- [54] Ito S., Yoshioka S., Ogata I., Takeda A., Yamahita E., Deguchi K., Nanoflow gradient generator for capillary high-performance liquid chromatography-nanoelectrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* (2004), 1051, 19-23
- [55] Gu X., Wang Y., Zhang X., Large-bore particule-entrapped monolithic precolumns prepared by a sol-gel method for on-line peptides trapping and preconcentration in multidimensional liquid chromatography system for proteome analysis. *J. Chromatogr. A* (2005), 1072, 223-232
- [56] Lim L. W., Hirose K., Tatsumi S., Uzu H., Mizukami M., Takeuchi T. Sample enrichment by using monolithic precolumns in microcolumn liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. (2004), 1033, 205-212
- [57] Shen Y., Zhao R., Belov M. E., Conrads T. P., Anderson G. A., Tang K., Pasa-Tolic L., Veenstra T. D., Lipton M. S., Udseth H. R., Smith R. D., Packed capillary reversed-phase liquid chromatography with high-performance electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for proteomics. *Anal Chem.*, (2001), 73, 1766-1775
- [58] Shi Y., Xiang R., Horvath C., Wilkins, J. A. The role of liquid chromatography in proteomics. *J. Chromatogr. A*, (2004), 1053, 27-36
- [59] Machtejevas, E., John, H. Wagner, K., Standker, L., Marko-Varga, G., Forssmann, W.-G., Bischoff, R., Unger K. K., Automated multi-dimensional liquid chromatography: sample preparation and identification of peptides from human blood filtrate, *J. Chromatogr. B*, (2004), 803, 121-130
- [60] Le Bihan T., Duewel H. S., Figeys D., On-line strong cation exchange μ -HPLC-ESI-MS/MS for protein identification and process optimization. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom* (2003), 14, 719-727

- [61] Alper A. J., Andrews P. C., Cation exchange chromatography of peptides on poly(2-sulfoethyl aspartamide)-silica. *J. Chromatogr.*(1998), 443, 85-96
- [62] Fujii K., Nakano T., Hike H., Usui F., Bando Y., Tojo H., Nishimura T., Fully automated online multi-dimensional protein profiling system for complex mixtures, *J. Chromatogr. A.*, (2004), 1057, 107-113.
- [63] Masuda J., Maynard D. M., Nishimi M., Ueda T., Kowalak J. A., Markey S. P., Fully automated micro- and nanoscale one- or two-dimensional high-performance liquid chromatography system for liquid chromatography-mass spectrometry compatible with non-volatile salts for ion exchange chromatography, *J. Chromatogr. A.*, (2005), 1063, 57-69
- [64] Vollmer M., Horth P., Nagele E., Optimization of two-dimensional off-line LC/MS separation to improve resolution of complex proteomic samples, *Anal. Chem.* (2004), 76, 5180-5185.
- [65] Winnik W. M., Continuous pH/salt gradient and peptide score for strong cation exchange chromatography in 2D-nano-LC/MS/MS peptide identification for proteomics. *Anal. Chem.* (2005), 77, 4991-4998
- [66] Millea K. L., Kass I. J., Cohen S. A., Krull I. S., Gebler J. C., Berger S. J. Evaluation of multidimensional (ion-exchange/reversed-phase) protein separations using linear and step gradients in the first dimension. *J. Chromatogr. A.* (2005), 1079, 287-298
- [67] Kang D., Nam H., Kim Y.-S., Moon M. H., Dual-purpose sample trap for on-line strong cation-exchange chromatography/reversed-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry for shotgun proteomics. Application to the human Jurkat T-cell proteome. *J. Chromatogr. A.* (2005), 193-200

[68] Peng J., Elias J. E., Thoreen C. C., Licklider L. J., Gygi S. P., Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis : the yeast proteome. *J. Proteome Res.*, (2003), 2, 43-50.

[69] <http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>, Biochimie, Lehninger (1979)

[70] Deber C. M., Wang C., Liu I.-P., Prior A. S. Agrawal S., Muskat B. L., Cuticchia A. J., TM finder: a prediction program for transmembrane protein segments using a combinaison of hydrophobicity and nonpolar phase helicity scales. *Protein Science*, (2001), 10, 212-219

[71] <http://www.bioinformatics-canada.org/TM/>, bioinformatique-Canada, (2007)

[72] Stepnowski P. Mrozik W., Analysis of selected ionic cations by ion exchange chromatography and reverse-phase high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* (2005), 28, 2, 149-154

ANNEXES

ANNEXE 1

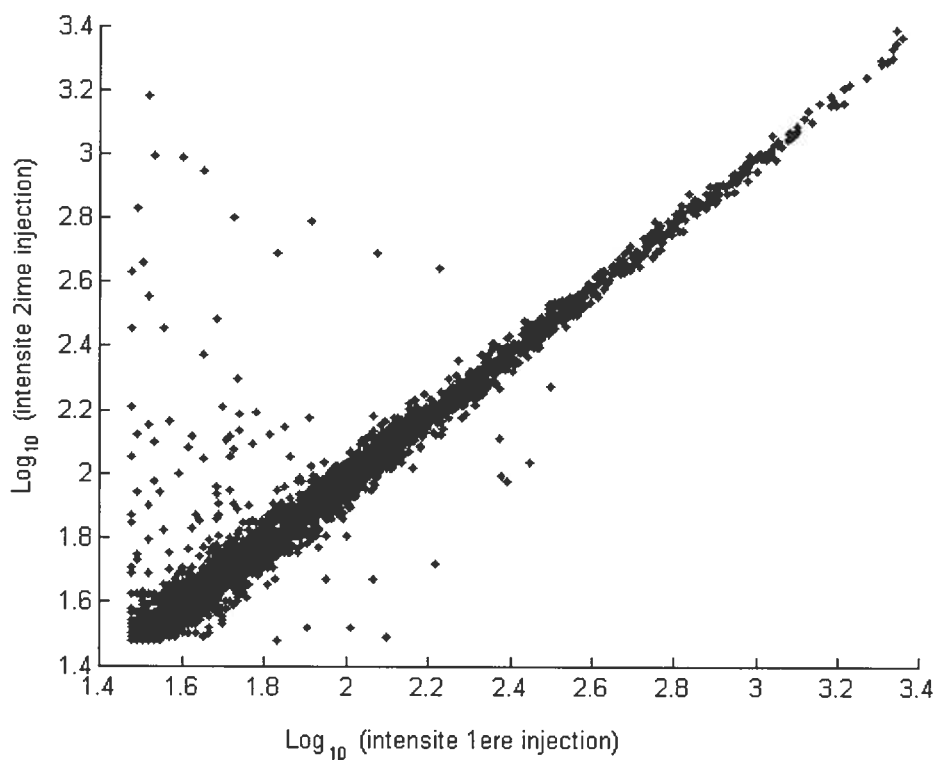
Acides Aminés

| Nom | Abréviations | | Masse mono- isotopique | Structure |
|-------------------------|--------------|---|------------------------------|---|
| <i>Alanine</i> | Ala | A | 71.08 | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ |
| <i>Arginine</i> | Arg | R | 156.1 | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{NH} \quad \text{H} \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ |
| <i>Asparagine</i> | Asn | N | 114.04 | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{O} \quad \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ |
| <i>Acide aspartique</i> | Asp | D | 115.02 | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ |
| <i>Cysteine</i> | Cys | C | 103.01 | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HS}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ |
| <i>Glutamine</i> | Gln | Q | 128.06 | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{O} \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ |
| <i>Acide glutamique</i> | Glu | E | 129.04 | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ |
| <i>Glycine</i> | Gly | G | 57.02 | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ |
| <i>Histidine</i> | His | H | 137.06 | $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HC}=\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ / \quad \backslash \quad \quad \\ \text{N} \quad \text{C} \quad \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \\ \\ \text{H} \end{array}$ |
| <i>Isoleucine</i> | Ile | I | 113.08 | $\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ |

| Nom | Abréviations | | Masse mono-isotopique | Structure |
|----------------------|--------------|---|-----------------------|---|
| | | | | |
| <i>Leucine</i> | Leu | L | 113.2 | $ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{HC} - \text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array} $ |
| <i>Lysine</i> | Lys | K | 128.09 | $ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{C} - \text{C} - \text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array} $ |
| <i>Methionine</i> | Met | M | 131.04 | $ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{S} - \text{C} - \text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array} $ |
| <i>Phenylalanine</i> | Phe | F | 147.06 | $ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 - \text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array} $ |
| <i>Proline</i> | Pro | P | 97.05 | $ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{NH} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{CH}_2 \end{array} $ |
| <i>Serine</i> | Ser | S | 87.08 | $ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array} $ |
| <i>Threonine</i> | Thr | T | 101.05 | $ \begin{array}{c} \text{HO} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array} $ |
| <i>Tryptophan</i> | Trp | W | 186.08 | $ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N} - \text{C} - \text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{CH} \quad \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array} $ |
| <i>Tyrosine</i> | Tyr | Y | 163.06 | $ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{C} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array} $ |
| <i>Valine</i> | Val | V | 99.07 | $ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{HC} - \text{C} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array} $ |

ANNEXE 2

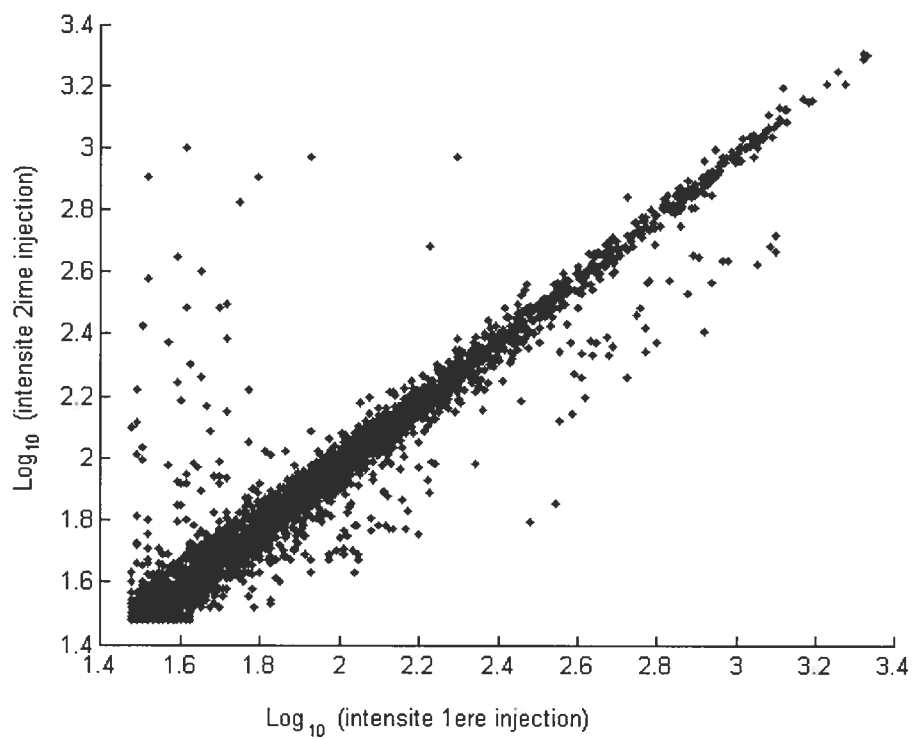
Pré-colonne, modèle A



Pré-colonne, modèle A. Variation du temps de rétention (min) des peptides communs (carrés verts) au cours de l'acquisition

ANNEXE 3

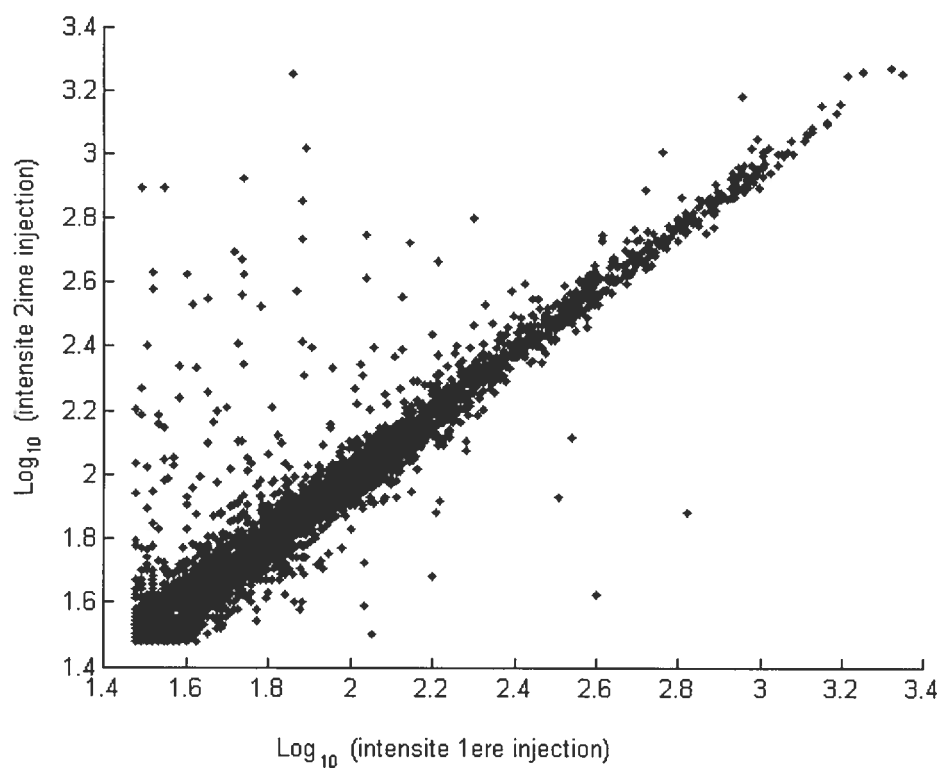
Pré-colonne, modèle B



Pré-colonnes, modèle B. A) Plot d'intensité entre deux injections consécutives

ANNEXE 4

Pré-colonne commerciale « Symmetry 300 »

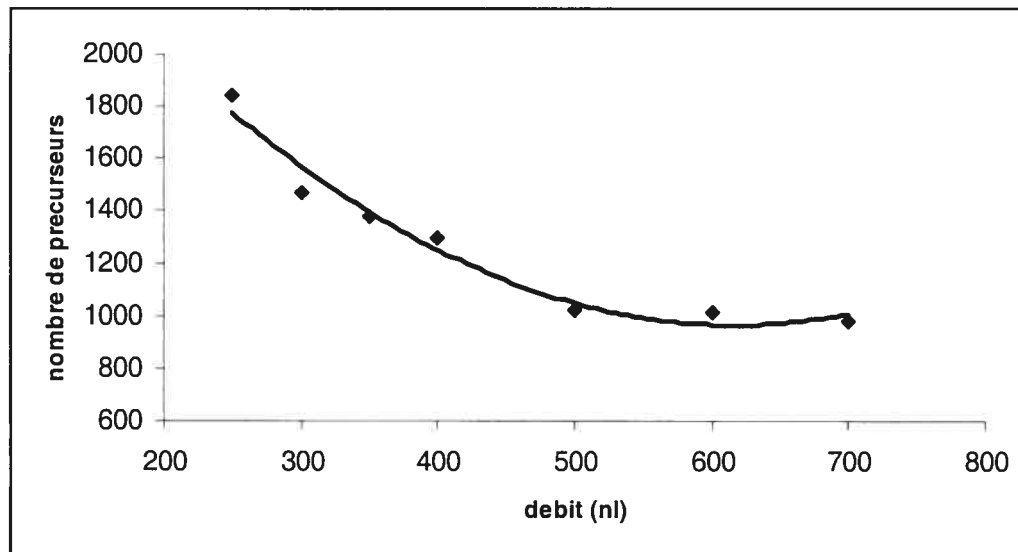


Pré-colonne commerciale Symmetry 300 Waters. A) Plot d'intensité entre deux injections consécutives,

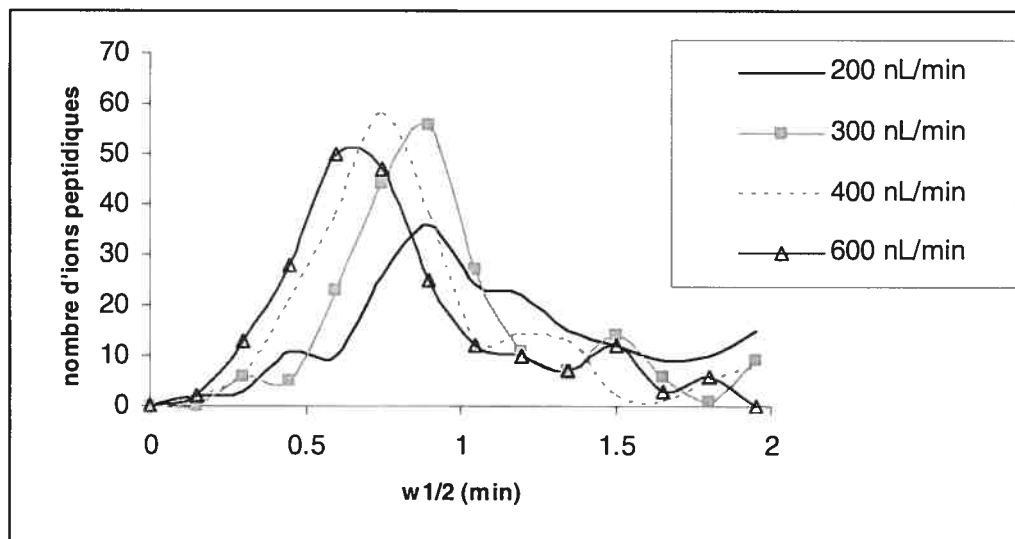
ANNEXE 5

Influence du débit pour les colonnes 75 μm i.d.

A)



B)

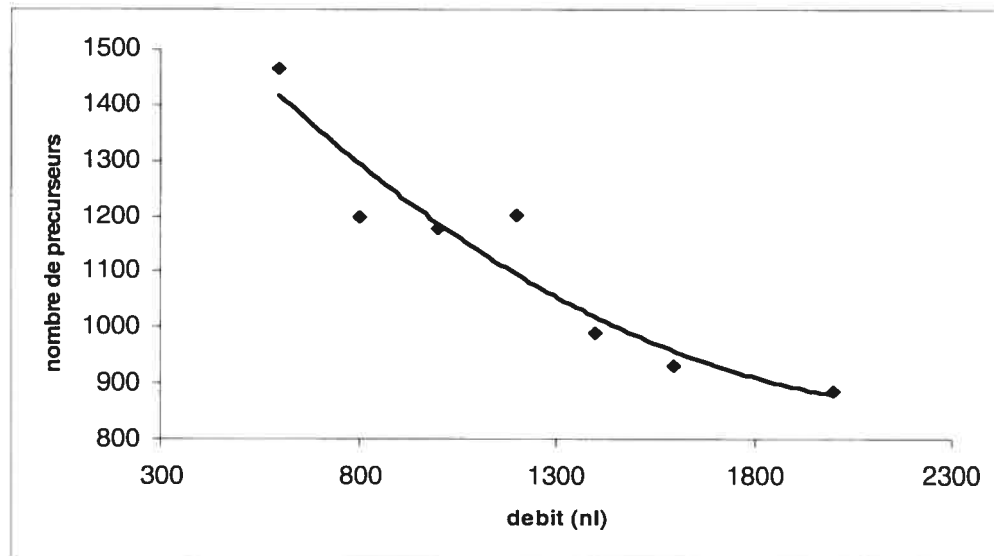


A) Nombre d'ions peptidiques détectés en fonction du débit, B) Largeurs des pics à mi-hauteur des ions peptidiques communs pour différents débits

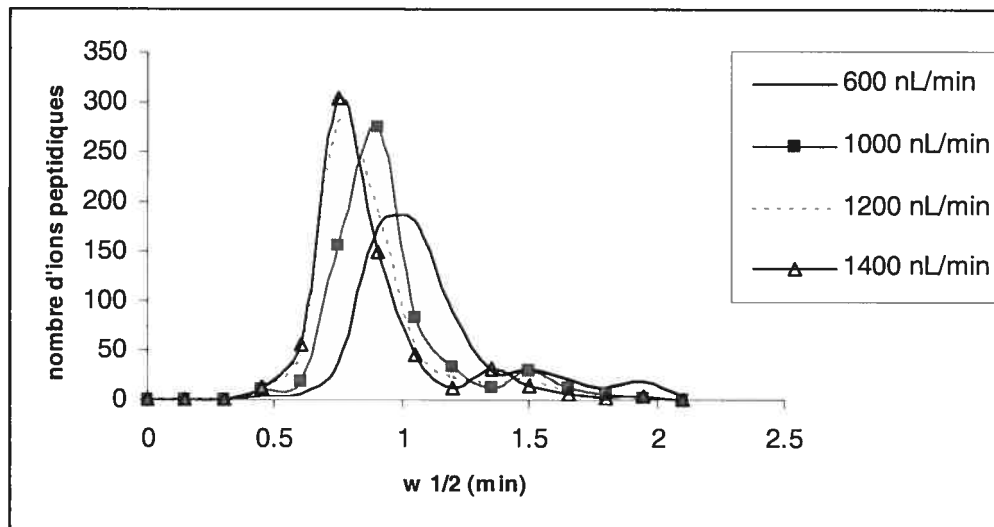
ANNEXE 6

Influence du débit pour les colonnes 250 μm i.d

A)



B)

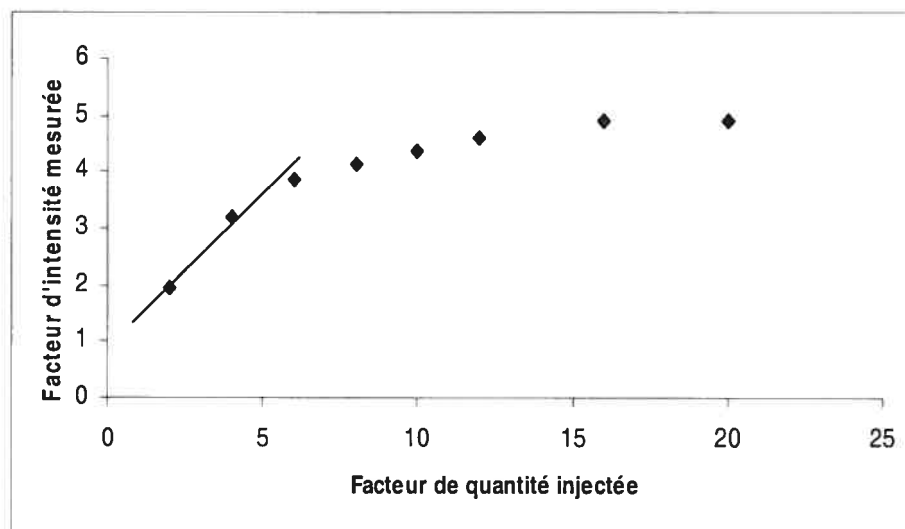


A) Nombre d'ions peptidiques détectés en fonction du débit, B) Largeurs des pics à mi-hauteur des ions peptidiques communs pour différents débits

ANNEXE 7

Capacité de charge pour une colonne de 75 μm i.d

A)

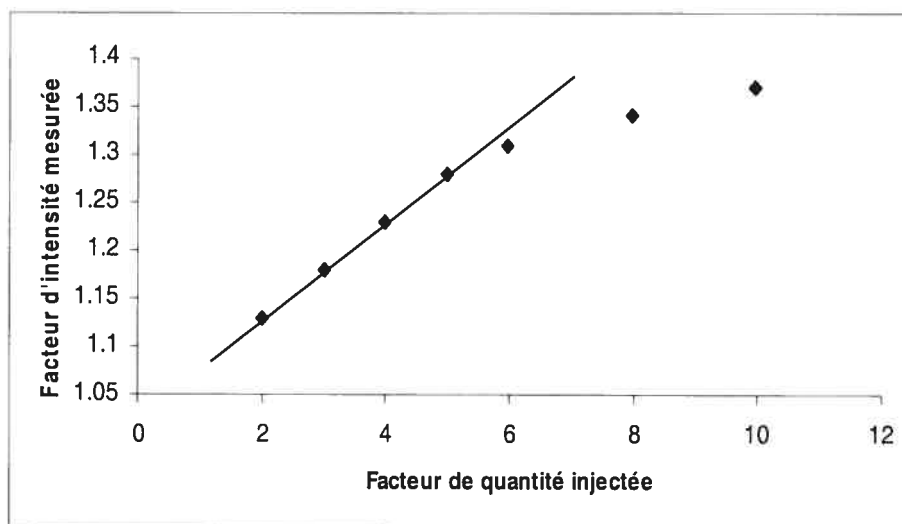


B)

| Quantité (ng) | facteur Quantité | facteur Intensité |
|---------------|------------------|-------------------|
| 25 | | |
| 50 | 2 | 1.95 |
| 100 | 4 | 3.2 |
| 150 | 6 | 3.84 |
| 200 | 8 | 4.14 |
| 250 | 10 | 4.35 |
| 300 | 12 | 4.61 |
| 400 | 16 | 4.89 |
| 500 | 20 | 4.89 |

A) Variations de la médiane du rapport d'intensité en fonction de la médiane du ratio de la quantité pour une colonne de 75 μm i.d. B) Valeurs des quantités injectées correspondant au facteur quantité.

ANNEXE 8

Capacité de charge pour une colonne de 250 μm i.d

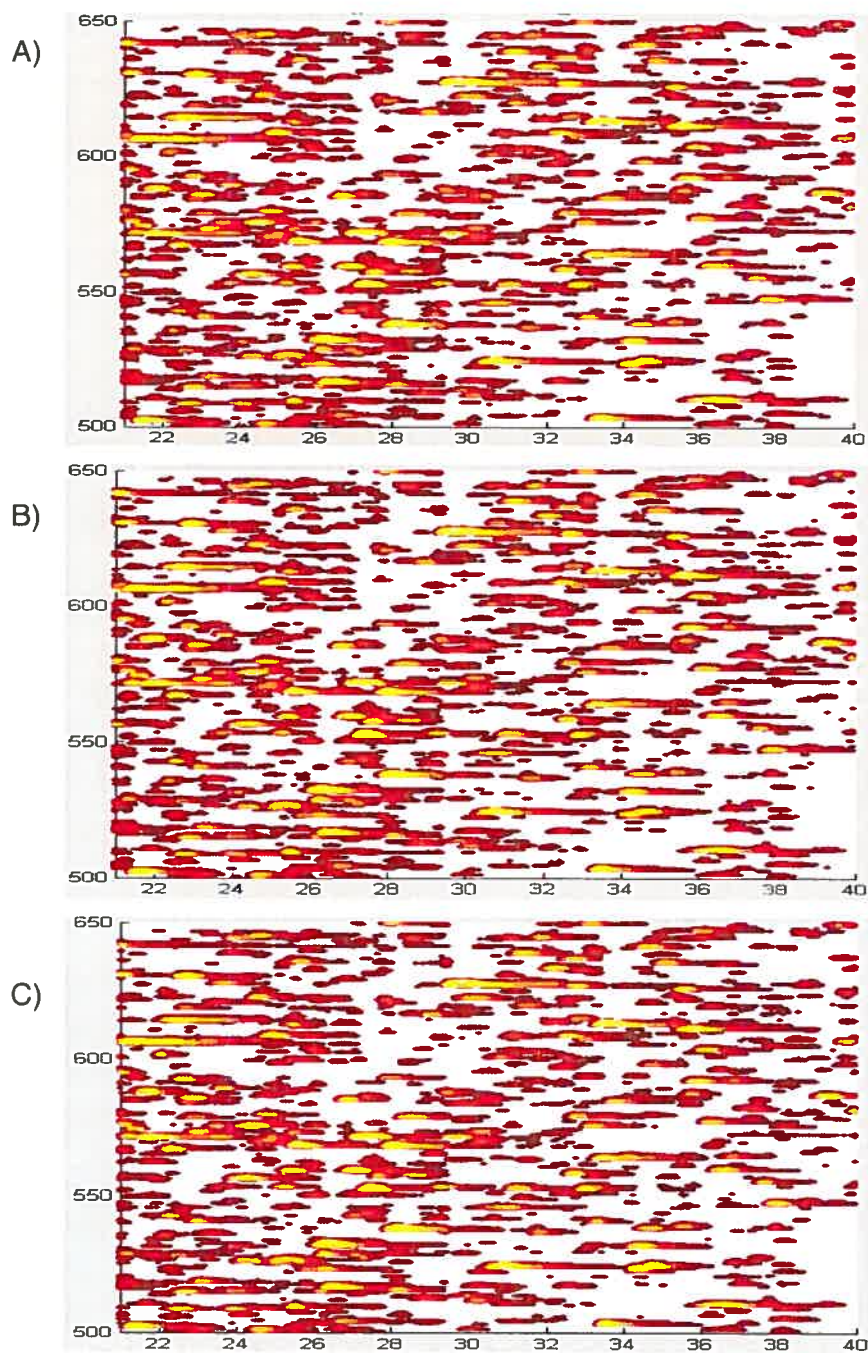
B)

| Quantité (ng) | facteur Quantité | facteur Intensité |
|---------------|------------------|-------------------|
| 160 | | |
| 320 | 2 | 1.13 |
| 480 | 3 | 1.18 |
| 640 | 3.99 | 1.23 |
| 800 | 4.98 | 1.28 |
| 960 | 5.98 | 1.31 |
| 1280 | 7.98 | 1.34 |
| 1600 | 9.97 | 1.37 |

A) Variation de la médiane du rapport d'intensité en fonction de la médiane du ratio de la quantité pour une colonne de 75 μm i.d. B) Valeurs des quantités injectées correspondant au facteur quantité.

ANNEXE 9

Reproductibilité des cartes peptidiques



Cartes peptidiques de 3 injections de la fraction 60mM, dans la région $m/z = 500-650$, RT = 20-40 minutes. A) Injection#3, B) Injection#2, C) Injection#1