

N° d'ordre : 4140



**UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNOLOGIES DE LILLE**



THESE DE DOCTORAT

Présentée par :

Kamal TOBAL

Pour obtenir le grade de **DOCTEUR** de L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE DE LILLE

Sujet de la thèse :

**Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques
pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique**

Soutenue publiquement le 25 Juin 2008 à Lille devant le jury composé de :

Pr. Claude VACCHER	Professeur à l'Université du Droit et de la Santé (Lille 2)	Président
Pr. Paul-louis DESBENE	Professeur à l'Institut Universitaire de Technologie d'Evreux	Rapporteur
Dr. Michel SABLIER	École Polytechnique, Palaiseau	Rapporteur
Pr. Said EDDARIR	Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech (FSTG)	Membre
Dr. Christian ROLANDO	Directeur de recherche au CNRS	Directeur de thèse

A mes parents

*A ceux qui ont participé
activement et m'ont offert leur soutien
matériel et moral*

A ma femme : Lalla Meriem

*A celle qui a donné à ma vie un
goût délicieux et m'a comblé d'amour, de
tendresse et de joie.*

Sommaire

Sommaire	3
Remerciements	9
Liste des abréviations	11
Avant-propos	13
Introduction générale	15
Chapitre I : Bibliographie Générale	19
A. LA PROTEOMIQUE	19
I. INTRODUCTION	19
1. Historique et définition	19
2. Les protéines	21
2.1. Structures des protéines	23
<u>Structure primaire</u>	23
<u>Structure secondaire</u>	23
<u>Structure tertiaire</u>	24
<u>Structure quaternaire</u>	25
2.2. Fonctions des protéines	26
3. Les objectifs de la protéomique	26
4. Les branches de la protéomique	27
4.1. La protéomique d'expression	27
4.2. La protéomique structurale	27
4.3. La protéomique fonctionnelle	27
4.4. La protéomique d'interaction	28
4.4.1. L'approche double-hybride	28
4.4.2. La technique TAP-TAG	29
4.4.3. L'immunoprécipitation	29
5. Les étapes principales de l'analyse protéomique	30
5.1. L'extraction des protéines	30
5.2. La séparation des protéines	30
5.2.1. L'approche classique	31
Le 2DGE	31
Le SDS-PAGE 1D couplé nano-LC	31
5.2.2. Les approches modernes	32
Chromatographie multidimensionnelle MudPIT	32
5.3. L'identification des protéines	33
5.4. La quantification des protéines	33
B. LES MONOLITHES A BASE DE METHACRYLATES	35
I. DEFINITION ET HISTORIQUE	35
1. Développement des monolithes	36
2. Composition du mélange réactionnel	36
2.1. Diversité des monomères	36
2.1.1. Famille des monomères vinyliques	37
2.1.2. Famille des monomères acrylamides	39

2.1.3. Famille des monomères méthacryliques	40
2.2. Porogène	41
2.3. Amorceurs	41
3. Techniques de Préparation des monolithes	42
II. SUPPORTS MONOLITHIQUES A BASE DE METHACRYLATES	46
1. Préparation des monolithes	46
1.1. Protocole standard de polymérisation	46
1.2. Mécanisme de polymérisation	47
1.2.1. L'amorçage	47
2. Formation et contrôle de la structure poreuse des monolithes	49
2.1. La structure poreuse des monolithes	49
2.2. Mécanisme de formation de la structure poreuse	51
2.3. Contrôle des propriétés de la structure poreuse des monolithes	52
2.3.1. La nature du porogène	52
2.3.2. La teneur de l'agent réticulant	53
2.3.3. Effet de la température	54
2.3.4. La concentration de l'amorceur	54
3. Applications des monolithes à base de méthacrylates	54
3.1. Phases stationnaires de chromatographie	54
3.1.1. Phases stationnaires pour la chromatographie liquide à haute performance	55
3.1.2. Phases stationnaires pour l'électrochromatographie capillaire	57
3.2. Bioréacteur de digestion enzymatique	57
3.3. Applications en microfluidique	57
3.3.1. Mélangeur	58
3.3.2. Phase de SPE et microréacteur enzymatique	59
C. LA CHROMATOGRAPHIE HPLC EN MODE GRADIENT	61
INTRODUCTION	61
I. L'éluion par gradient	63
II. Les avantages de l'éluion par gradient	64
III. Le modèle LSS (force linéaire du solvant)	66
1. En mode isocratique	66
2. En mode gradient	66
3. La rétention dans une éluion par gradient	68
IV. Evaluation des performances de séparation en mode gradient	69
Références bibliographiques	72
<i>Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique</i>	78
A. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	79
I. PLACE DE LA DIGESTION ENZYMATIQUE DANS L'ANALYSE PROTEOMIQUE	79
1. Digestion sur gel 2D	79
2. Digestion en solution	80

3. Immobilisation de l'enzyme	80
4. Utilisation de bras-espaceur	80
II. LES TECHNIQUES D'IMMOBILISATION D'ENZYME	80
1. Les avantages de l'immobilisation d'enzyme	80
1.1. Immobilisation par adsorption	81
1.2. Immobilisation par piégeage	81
1.3. Immobilisation covalente	82
2. L'approche monolithique	82
B. PREPARATION ET CARACTERISATION DU MICROREACTEUR DE DIGESTION ENZYMATIQUE	83
1. Préparation du support monolithique	83
1.1. Composition du mélange réactionnel	83
2. Greffage de la trypsine	84
C. ETUDE DU MICROREACTEUR DE DIGESTION ENZYMATIQUE	85
I. TESTS PRELIMINAIRES DU MICROREACTEUR	85
1. Protocole du test	85
2. Analyse MALDI-TOF	85
3. Résultats	86
3.1. Cytochrome C (Cheval)	86
3.2. Albumine de sérum bovin (Bos Taurus)	88
II. OPTIMISATION DES RESULTATS DE DIGESTIONS A TRAVERS LE MICROREACTEUR	93
1. Introduction d'une étape de dessalage	93
1.1. Digestion du Cytochrome C et de BSA	93
<u>Cytochrome C</u>	93
<u>Albumine de sérum bovine (BSA)</u>	94
1.2. Digestion d'autres protéines	95
<u>Albumine humaine AH</u>	95
<u>L'Ovalbumine (Gallus Gallus)</u>	96
1.3. Conclusion	96
2. Dénaturation des protéines avant leur digestion	97
2.1. Intérêt de la dénaturation	97
2.2. Protocole standard de dénaturation	98
2.3. Résultat	98
2.4. Conclusion	100
III. ETUDE DE LA CINETIQUE DE DIGESTION	101
1. Influence du débit d'injection des protéines	101
1.1. Description du test	101
1.2. Résultats	101
IV. MICROREACTEUR INTEGRANT UNE PHASE MONOLITHIQUE DE DESSALAGE	104
1. Préparation de la colonne monolithique	105
1.1. Polymérisation de la phase de dessalage	105

1.2. Polymérisation du support réactif et greffage de l'enzyme	106
2. Test du nouveau microréacteur	106
2.1. Résultats	106
3. Conclusion	107
Références bibliographiques	109
<i>Chapitre III : Colonnes monolithiques pour la nano-chromatographie liquide phase inverse</i>	111
A. INTRODUCTION	111
B. DEVELOPPEMENT DES COLONNES MONOLITHIQUES POUR LA NANO-LC	111
I. PREPARATION DES COLONNES MONOLITHIQUES	111
1. Composition du mélange réactionnel	111
2. Protocole standard de préparation des colonnes monolithiques	113
II. CARACTERISATION DES COLONNES MONOLITHIQUES	114
1. Caractérisation morphologique	114
<i>L'effet de traitement de parois</i>	114
<i>La mise en évidence de l'hétérogénéité des matériaux monolithiques</i>	115
2. Caractérisation hydrodynamique	116
2.1. Mesure de la perte de charge d'une colonne monolithique	116
2.2. La mise en évidence du gonflement du monolithe	118
2.3. Perméabilité des monolithes	119
3. Etude des performances séparatives des colonnes monolithiques hydrophobes	122
3.1. Présentation de l'appareillage utilisé	122
3.2. Protocole de test des colonnes monolithiques	128
<i>Préparation de la solution</i>	128
<i>Gradient d'élution utilisé</i>	128
3.3. Résultats	130
<i>Caractéristiques du gradient</i>	131
<i>Calcul des grandeurs de rétention</i>	134
III. OPTIMISATION DE LA PHASE MONOLITHIQUE C12	138
1. Etude de paramètres influençant la qualité de séparation	139
1.1. Influence de la technique de polymérisation	139
<i>Préparation des colonnes monolithiques C12_v par polymérisation vivante</i>	139
1.2. Protocole du test	140
1.3. Résultats	141
1.4. Test de répétabilité des colonnes monolithique	142
1.5. Influence du débit	145
<i>Mode opératoire</i>	145
IV. Séparation d'un digest du Plasma humain	151
1. Le plasma humain	151
2. L'étude protéique du plasma	152
3. Mode opératoire	153

3.1. Déplétion du plasma	153
<u>Gradient d'élution utilisé</u>	156
3.2. Résultats	158
4. Conclusion	162
Références bibliographiques	164
<i>Chapitre IV: Colonnes monolithiques pour la chromatographie d'affinité</i>	165
<i>Partie I: Réétention spécifique des peptides phosphorylés</i>	166
I. INTRODUCTION	167
1. La phosphorylation	167
II. L'ANALYSE DE LA PHOSPHORYLATION	169
1. La préparation des échantillons	169
2. La détection des phosphoprotéines	169
3. Quantification des phosphorylations	170
III. TECHNIQUES D'ENRICHISSEMENT DES PHOSPHOPEPTIDES	170
1. L'immunoprécipitation	170
2. Les modifications chimiques	170
3. La chromatographie d'affinité type IMAC	171
IV. APPROCHES MONOLITHIQUES	172
A. COLONNES MONOLITHIQUES IMAC	173
I. DEVELOPPEMENT DE COLONNES MONOLITHIQUES IMAC	173
1. Préparation des colonnes IMAC	173
1.1. Polymérisation du support monolithique	173
1.2. Greffage du ligand chélateur	173
1.3. Chélation de l'ion métallique	174
2. Etude des colonnes monolithiques IMAC	174
1.1. Protocole du test	174
2.1. Réétention spécifique d'un phospholipide	175
<u>Résultats du test avec la matrice DHB</u>	176
2.2. Changement du mode opératoire	178
<u>Résultats du test avec la matrice THAP</u>	180
2.4. Conclusion	180
2.5. Test sur un échantillon protéomique	180
<u>Protocole standard de digestion de Bêta Caséine</u>	182
<u>Test IMAC du digest de bêta caséine</u>	184
2.6. Résultats	184
2.7. Optimisation du protocole de digestion	185
<u>Test IMAC du digest de bêta caséine après optimisation</u>	186
2.8. Résultats	188
3. Conclusion	190
B. Colonnes monolithiques à base nanoparticules d'oxydes métalliques	192

I. DEVELOPPEMENT DE COLONNES MONOLITHIQUES A BASE DE NANOPARTICULES (NPOM)	193
1. Préparation des colonnes monolithiques à base de NPOM	193
2. Etude des colonnes monolithiques à base de NPOM	194
<u>Protocole</u>	195
2.1.Colonnes monolithiques à base de ZrO ₂	195
2.2.Colonnes monolithiques à base de NiCoO ₂	197
2.3.Colonnes monolithiques à base de Ni activé	199
3. Conclusion	201
<i>Partie II: Supports monolithiques pour la chromatographie d'affinité de Borates (BAC)</i>	202
I. INTRODUCTION	203
II. DEVELOPPEMENT DE COLONNES MONOLITHIQUES A BASE VPBA	203
1. Préparation de colonnes monolithiques à base de VPBA	203
2. Etudes des colonnes monolithiques à base de VPBA	204
<u>Protocole</u>	204
2.1.Test sur la rutine	204
2.2.Test sur le Lewis B	207
3. Conclusion	209
Références bibliographiques	210
Conclusion générale	213

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur Christian ROLANDO, Directeur de recherche au CNRS et Directeur de cette thèse, pour m'avoir initié à la recherche depuis mon stage de DEA que j'ai effectué au sein de son laboratoire. Je lui témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir guidé et prodigué des conseils sans lesquels je n'aurais pu compléter cette thèse.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur Paul-louis DESBENE, Professeur à l'Institut Universitaire de Technologie d'Evreux, Monsieur Michel SABLIER, Chargé de recherche à l'École Polytechnique de Palaiseau et Monsieur Claude VACCHER, Professeur à l'Université du Droit et de la Santé de Lille 2 qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Merci également à Monsieur Said EDDARIR, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech (FSTG) membres de jury qui a accepté de juger ce travail.

Je remercie également Mademoiselle Olivia GUERRE pour la préparation du plasma sanguin humain et pour les analyses qu'elle a effectuées sur le spectromètre de masse FT-ICR.

J'exprime ma reconnaissance à l'équipe du Centre Commun de Masse Guy RICART, Ingénieur de recherche à l'université des Sciences et Technologies de Lille pour ces conseils en spectrométrie de masse, Dr Adeline PAGE, Ingénieur d'études à l'université des Sciences et Technologies de Lille pour sa disponibilité ainsi que Monsieur Fabrice CANTAIS, pour le marquage fluorescent des échantillons protéomiques, et pour les analyses en spectrométrie de masse FT-ICR.

Je souhaite faire part de ma gratitude à Madame Cécile CREN, chargé de recherche CNRS pour ses nombreux conseils et pour son soutien moral qu'elle m'aura fournis durant la majeure partie de la réalisation de ces travaux.

J'associe à ces remerciements Salah MOUFHIM, Khadija EL IDRISSE, Sabrina BENKISSOU qui ont travaillé avec moi au cours de ma thèse.

Mes remerciements vont également aux membres du Laboratoires auprès de qui j'ai passé des moments inoubliables : Adil ESSAKHI, Anne Gaëlle FOURNIAL, Bouchra MAHER, Bouchra SILAHI, Caroline SOLAZO, Caroline TOKARSKI, Clément ROUX, Etienne ROUSSEAU-ROGUE, Florence GUERARD, Gaëlle NOT, Joël LYSKWA, Karima DEHAK, Khadija ELIDRISSE, Mohammed KAJJOUT, Pauline LE FOUDEUR, Rajae ZEMMOURI,

Remerciements

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

Hend BELGHECHAM, Lamine SEKIRIFA, Reda MHIDIA, Souhila OUDIR, Xiang WANG et Zohra DEMBAHRI.

Je n'oublierai pas les secrétaires de l'unité, Mme Florence FERRET, Jacqueline RICART, Annie KEKNBOSCH, Hélène PIERRON et Karine DELHAYE qui m'ont beaucoup aidé pour les démarches administratives et pour l'organisation de mes déplacements.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent à mes parents et mon épouse Meriem EL MARRASS pour leur soutien et leur amour.

Abréviations

Liste des Abréviations

3-TMSM	3-(triméthoxysilylpropyl) méthacrylate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire : séquence d'ADN correspondant à celle d'ADN après sa maturation.
AH	Albumine humaine
AIBN	Azobisisobutyronitrile
AMPS	Acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propane sulfonique
AN	Acrylonitrile
ARNm	Acide ribonucléique messager
BET	Méthode permettant de mesurer le volume et la surface spécifique des pores par adsorption/désorption d'un gaz.
BMA	Méthacrylate de Butyle
BSA	Bovine Serum Albumine
CEC	Electrochromatographie capillaire
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
CyOH	Cyclohexanol
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthacrylate sulfoxyde
DoOH	Dodécanol
DTT	Dithiothreitol
DVB	Divinylbenzène
EGDMA	Diméthacrylate d'éthylène glycol
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
ESI-MS	Spectrométrie de Masse avec Ionisation par Electronébulisation
FT-ICR MS	Spectrométrie de masse par Transformé de Fourier de la résonance cyclotronique d'ion
GMA	Méthacrylate de glycidyl
HEMA	Méthacrylate d'hydroxyéthyle
HEPT	Hauteur équivalente à un plateau théorique
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IDA	Acide Immuno-Diacétique

Abréviations

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

IEF	Iso-ElectroFocalisation
IMAC	Chromatographie d'Affinité pour un ion Métallique
2DGE	Gel Electrophorèse 2 Dimensions
LIF	Fluorescence induite par irradiation laser
LMA	Méthacrylate de Lauryl
MALDI	Ionisation-désorption assistée par irradiation laser et une matrice
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MMA	Méthacrylate de méthyle
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
Nano-LC	Chromatographie en phase liquide travaillant avec des débits de l'ordre de quelques centaines de nanolitres par minute.
NMRP	Polymérisation Radicalaire contrôlée par l'Intermédiaire des Nitroxydes
PAGE	Gel polyacrylamide
PTMs	Modifications Post-Traductionnelles
RAFT	Addition-Fragmentation Réversible
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RP-HPLC	Chromatographie liquide phase inverse à haute performance
SDS	Dodécylsulfate de sodium
Ser(P)	Serine phosphorylée
SMA	Méthacrylate de Stéaryle
TEMED	N,N,N,'N'-tétraméthylène diamine
TEMPO	2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidyloxy
Thr	Thréonine
TIC	Courant ionique total
TLC	Chromatographie sur couche mince
TOF	Temps de vol : type d'analyseur en spectrométrie de masse
Tyr	Tyrosine
UV	Ultra-violet
VBC	4-chlorométhyle styrène
VPBA	Acide vinylphényl boronique

Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (LCOM, UMR CNRS 8009) à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL).

L'objectif du travail est le développement de supports monolithiques à base de méthacrylate pour la nano-chromatographie liquide et l'analyse protéomique. Ce travail est constitué de deux parties.

La première partie s'est déroulée dans le cadre d'un projet de développement de microsystemes fluidiques intégrés. L'application visée pour ces microsystemes est la préparation intégrée d'échantillons protéomiques avant leur analyse en ligne par spectrométrie de masse avec une ionisation par électrospray (ESI-SM).

La directive de cette partie concerne la réalisation et la mise en œuvre de deux modules de préparation des échantillons protéomiques, qui sont un réacteur de digestion enzymatique et un dispositif chromatographique. Le premier, situé en amont du microsysteme, sert à transformer les échantillons de protéines en un mélange de peptides après digestion à la trypsine. Le deuxième assure la purification des échantillons avant leur injection en ESI-SM ; en premier lieu, leur dessalage et leur concentration, puisque l'ESI est une technique qui est sensible à la concentration des échantillons et à la présence de sels, et éventuellement, à la séparation des différents peptides même si cette opération reste plus ardue à mettre en place sur un système miniature. Ce travail m'a amené à participer au consortium *BioChipLab*, issu du programme GenHomme du ministère de l'Economie et des Finances rassemblant des équipes de Lille et de Grenoble. De Lille, le Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (LCOM, UMR CNRS 8009) et l'Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN, UMR CNRS 8520) et de Grenoble, le Laboratoire d'Electronique et de Technologie de l'Information (LETI) et la Direction des Sciences du Vivant (DSV), les deux appartenant au Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA). Le projet est mené par le groupe pharmaceutique Sanofi-Synthélabo.

La deuxième partie de ce travail, qui s'est déroulée après la clôture du consortium *BioChipLab*, a porté d'une part, sur l'optimisation des supports monolithiques à base de méthacrylates pour la nano-chromatographie liquide phase inverse et d'autre part, sur le développement de nouveaux supports monolithiques pour la chromatographie d'affinité, pour l'étude de certaines modifications post-traductionnelles ainsi que l'enrichissement de

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique molécules biologiques dans le cadre de l'analyse protéomique. La principale méthode d'analyse utilisée est la spectrométrie de masse notamment le MALDI-TOF.

Introduction générale

Le séquençage du génome de nombreux organismes, en particulier le génome humain, n'a pas bien élucidé les mécanismes qui relient les gènes aux fonctions biologiques et aux divers états pathologiques. Par conséquent, une nouvelle approche en science et en médecine – baptisé analyse protéomique – est émergée pour mieux comprendre la complexité cellulaire, pour la découverte de nouveaux marqueurs des pathologies humaines et pour le développement de nouveaux médicaments.

L'analyse protéomique s'intéresse à l'étude du protéome. Ce dernier, utilisé pour la première fois par Marc Wilkins en 1995, désigne les PROTEines exprimées par un génOME. Aujourd'hui, l'analyse protéomique est une discipline scientifique en pleine croissance. Elle comporte quatre étapes principales, à savoir :

- 1- La préparation de l'échantillon protéomique, qui comporte l'extraction, la digestion et la décontamination de l'échantillon,
- 2- La séparation des protéines et des peptides par des approches classiques comme le 2DGE ou par des approches modernes telle que la Chromatographie multidimensionnelle MudPIT,
- 3- L'analyse par spectrométrie de masse,
- 4- L'identification des protéines par interrogation de banques de données.

La nouvelle tendance à la miniaturisation de l'analyse biologique et des dispositifs associés, constatée depuis environ une décennie, a touché l'analyse protéomique. Cette tendance à la miniaturisation trouve ses justifications dans le gain à attendre en termes de vitesse et de débit d'analyse et en terme d'optimisation des analyses. Un haut débit d'analyse est à espérer du fait de la suppression de manipulations intenses pour et entre les différentes étapes et également d'une automatisation des analyses avec l'utilisation d'une interface robotisée, qui manipule les systèmes. Par ailleurs, cette miniaturisation s'accompagne d'un gain en sensibilité des analyses.

Dans ce contexte général, l'objectif de ce travail de thèse est de développer de nouveaux dispositifs et supports chromatographiques miniatures, pour la préparation et la séparation des échantillons protéomiques. De plus, nous nous sommes intéressé au développement de nouveaux supports pour l'enrichissement de peptides issus de modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation.

Introduction générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

Le caractère de ce travail de thèse est pluridisciplinaire. Il allie la chimie des polymères (synthèse de supports monolithiques via polymérisation radicalaire et polymérisation vivante contrôlée), la chimie analytique basée sur la microfluidique et l'analyse protéomique.

Ce mémoire de thèse est divisée en deux parties :

La première partie de ce manuscrit est une bibliographie générale. D'une part, elle définit l'analyse protéomique, ses objectifs et ses techniques. D'autre part, elle présente les matériaux monolithiques, leurs avantages et leurs applications.

Le choix de monolithes organiques, pour la réalisation des différents dispositifs et supports, est régi par le grand nombre d'avantages que présente ces matériaux.

La deuxième partie de ce mémoire de thèse présente les résultats obtenus lors de ce travail. Elle est constituée de trois chapitres :

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la réalisation d'un microréacteur de digestion enzymatique basé sur une phase monolithique. Ce microréacteur est développé dans des capillaires en silice fondue, transparents aux irradiations UV, d'un diamètre interne de 75 μm et d'une longueur de 15 cm.

L'enzyme est greffé de manière covalente sur le support monolithique. Ce dernier, est préparé à base d'un monomère fonctionnel comportant un groupement réactif qui réagit avec les groupements amine de l'enzyme dans des conditions très douces. La préparation du microréacteur est suivie d'une étude de certains paramètres qui influencent le rendement général à savoir, la dénaturation des protéines avant leur introduction dans le microréacteur, le dessalage des peptides issus de la digestion avant l'analyse par spectrométrie de masse et le débit d'injection des protéines à travers le microréacteur.

Les solutions récoltées en aval du microréacteur, sont analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour avoir les masses des fragments peptidiques ainsi formés. La liste des masses récupérée à partir du MALDI-TOF est introduite ensuite dans un moteur de recherche de bases de données protéomiques qui permet d'identifier avec précision les peptides issus de la digestion enzymatique.

Chapitre III : colonnes monolithiques pour la chromatographie phase inverse

L'objectif fixé dans ce chapitre est la mise en œuvre d'une phase stationnaire monolithique à base de monomères méthacrylates pour la nano-chromatographie liquide phase inverse pour le traitement des échantillons protéomiques, notamment le dessalage, la préconcentration et la séparation. Les monomères fonctionnels utilisés présentent une chaîne aliphatique composé de un, quatre, douze ou dix-huit carbones. Pour les tests préliminaires et ceux d'optimisation, les colonnes monolithiques préparées sont montées sur une nano-LC couplée avec deux détecteurs de fluorescence (LIF). Les colonnes monolithiques ainsi optimisées sont confrontées à un échantillon protéomique réel : le plasma sanguin humain. Dans ce cas, les colonnes monolithiques sont montées sur une nano-LC couplée à un spectromètre de masse FT-ICR.

Chapitre IV: Colonnes monolithiques pour la chromatographie d'affinité

Dans un premier temps, nous avons développé des supports dédiés à l'enrichissement des phosphopeptides. Deux approches sont adoptées. La première consiste à préparer des colonnes monolithiques IMAC à base d'un monomère réactif sur lequel sera greffé la molécule IDA, groupement chélateur d'ions métalliques. Tandis que la deuxième approche repose sur l'utilisation de nanoparticules d'oxydes métalliques qui seront capables de développer de fortes interactions avec les groupements phosphates des phosphopeptides, ou en général des molécules phosphorylées. Ces nanoparticules sont mélangées avec les constituants du mélange réactionnel avant polymérisation. Elles sont accrochées au monolithe à l'intérieur de la colonne par piégeage physique. Les monomères méthacrylates utilisés dans ce cas sont des monomères fonctionnels hydrophobes.

Les tests de ces dispositifs sont effectués sur un phospholipide modèle afin de valider leur bon fonctionnement durant les différentes étapes d'une chromatographie d'affinité: le chargement, le lavage et l'élution. Ensuite, ils sont testés vis-à-vis d'un digest de bêta caséine, une protéine comportant 5 phosphorylations portées majoritairement par l'acide aminé Sérine. Dans un deuxième temps, nous avons développé des supports monolithiques pour la chromatographie d'affinité de borate (BAC). La phase monolithique est préparée à partir d'un mélange réactionnel contenant principalement l'Acide vinylphényl boronique (VPBA).

Chapitre I:

Bibliographie générale

A. LA PROTEOMIQUE

I. INTRODUCTION

1. Historique et Définition

Le début des années 80 a connu l'émergence du concept de biologie à grande échelle [1]. Ce concept stipule que les systèmes biologiques fonctionnent comme des réseaux complexes. Ceci nécessite d'effectuer des études à grande échelle afin d'apporter un surcroît de connaissances. L'application de ce concept aux molécules biologiques a permis des progrès impressionnants. L'étude de la molécule d'ADN à grande échelle a conduit au séquençage complet du génome. Ce dernier désigne l'ensemble du matériel génétique d'un individu ou d'une espèce. Il est constitué de molécules de l'acide nucléique, les gènes n'en constituent qu'une partie. Le premier génome complet qui a été séquencé est celui d'*Haemophilus influenzae* en 1995 suivie par celui de la levure *Saccharomyces cerevisiae* en 1996 [2]. La séquence complète du dernier chromosome dans le génome humain, chromosome 1, le plus grand, contenant à lui seul 8% de ce génome, a été obtenue en mai 2006.

A un moment donné et sous des conditions définies, un génome d'un système biologique dans un type de cellules, produit une grande quantité d'ARNm définissant le transcriptome de ce type de cellules dans ces conditions. Le principal inconvénient de la transcriptomique est que l'ARNm produit dans une cellule n'est pas traduit totalement en protéines.

Un bon exemple est celui du génome humain. Parmi environ 30.000 gènes, seulement 10 % en moyenne de ces gènes sont exprimés en protéines dans un type différencié de cellules.

L'établissement de cartes génomiques permet de prévoir les protéines qui peuvent potentiellement être produites mais ne donnent ni le moment, ni l'endroit, ni à quelle concentration. Afin de répondre à ces questions il faut analyser le protéome. Ce terme a été inventé par l'australien Mark Wilkins de l'Université Macquarie de Sydney. Il se définit comme le complément protéique total exprimé par un génome dans une cellule ou un tissu.

La protéomique est la science qui étudie les protéomes. Ce terme dérivé du protéome a été utilisé pour la première fois en 1997 par James P dans une publication. Elle avait pour objectif l'étude à grande échelle des protéines produites dans un système biologique à un moment donné de son existence en fonction des conditions physiopathologiques. Mais au cours de ces dernières années cette définition s'est vue élargie. En plus de l'identification des protéines, la protéomique actuellement couvre aussi la caractérisation et la quantification [3].

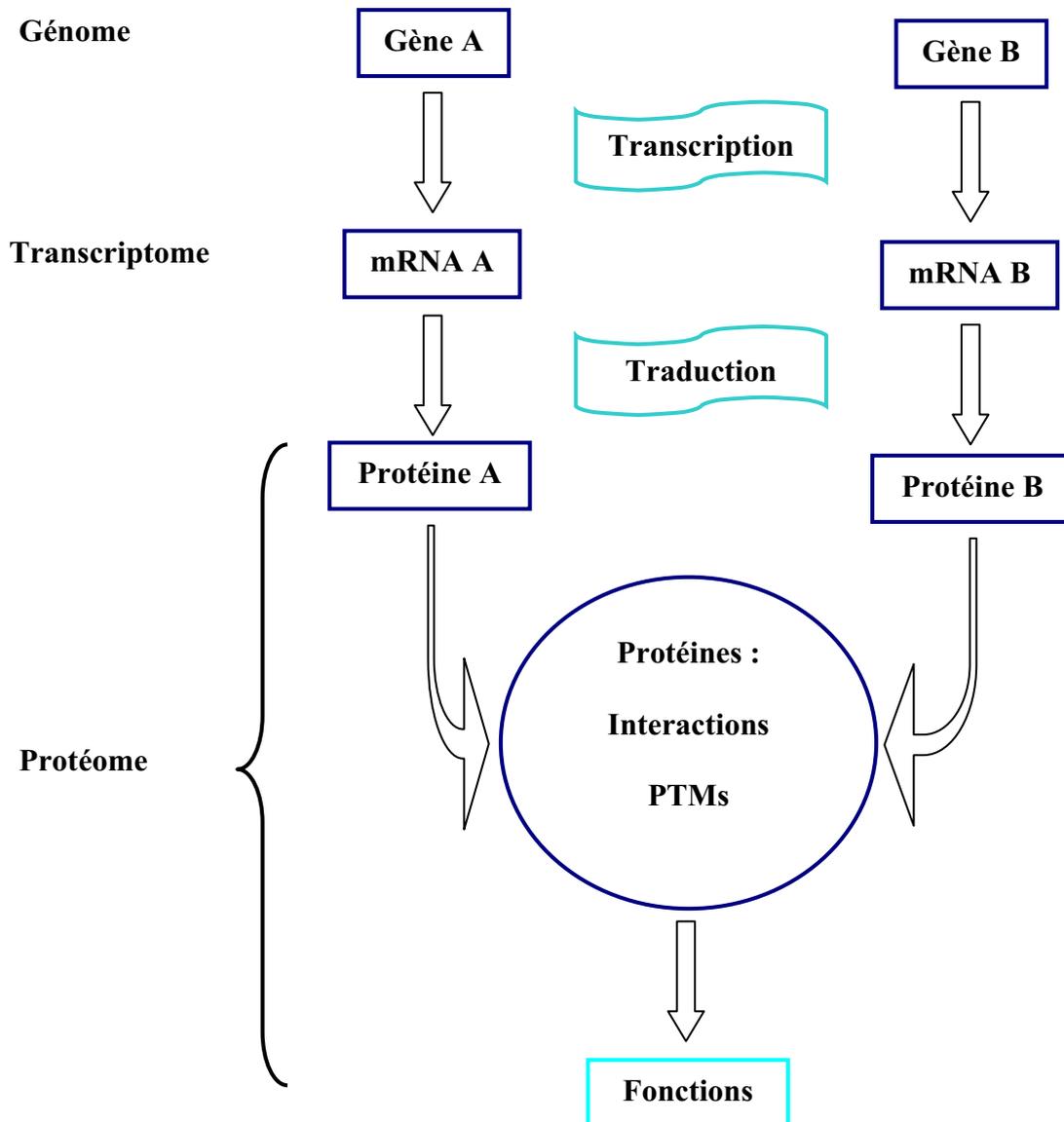


Figure 1.1 : Schéma expliquant le passage du Génome au Protéome

Il est important de noter qu'un génome est statique, il reste constant d'une cellule à l'autre et dans tous les moments de la vie de la cellule. Tandis que le protéome est dynamique, il varie de façon importante en fonction de différents facteurs, à savoir l'environnement cellulaire, l'état physiologique, le traitement avec des médicaments ou des produits toxiques et l'état pathologique du système étudié. Un exemple qui illustre le dynamisme du protéome en fonction du temps est celui proposé par Friedrich Lottspiech : une chenille qui se transforme en papillon. D'où l'affirmation : "*same genome, different proteomes*" titre de sa revue [4].



Figure 1.2 : Exemple du dynamisme du protéome, la transformation d'une chenille en papillon.

Finale­ment, la complexité du protéome est aug­mentée par un nombre impor­tant de modifications co- et post-traductionnelles et les diffé­rentes interactions des protéines entre elles. Ainsi, le gé­nome humain qui contient un nombre faible de gènes, environ 30.000, prédit 200.000 protéines, qui deviennent après modifications 2 millions de protéines!!!

2. Les Protéines

Les protéines sont des macromolécules biologiques pré­sent d'une manière très abondante dans les organismes vivants. Elles sont constituées d'une chaîne condensée d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. Les acides aminés sont des molécules organiques possédant un radical R, une fonction amine et une fonction acide carboxylique.

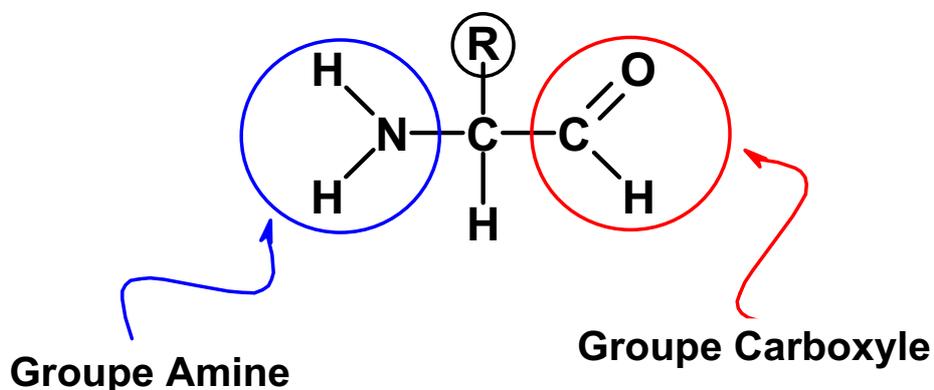


Figure 1.3 : Formule générale d'un acide aminé, la portion R de la molécule est variable d'un acide aminé à l'autre.

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

Le premier acide aminé de la chaîne est, par convention, celui dont le groupement aminé reste libre; il constitue l'extrémité N-terminale de la protéine. Tandis que le dernier résidu de la chaîne comporte un groupement carboxylique libre; il constitue l'extrémité C-terminale.

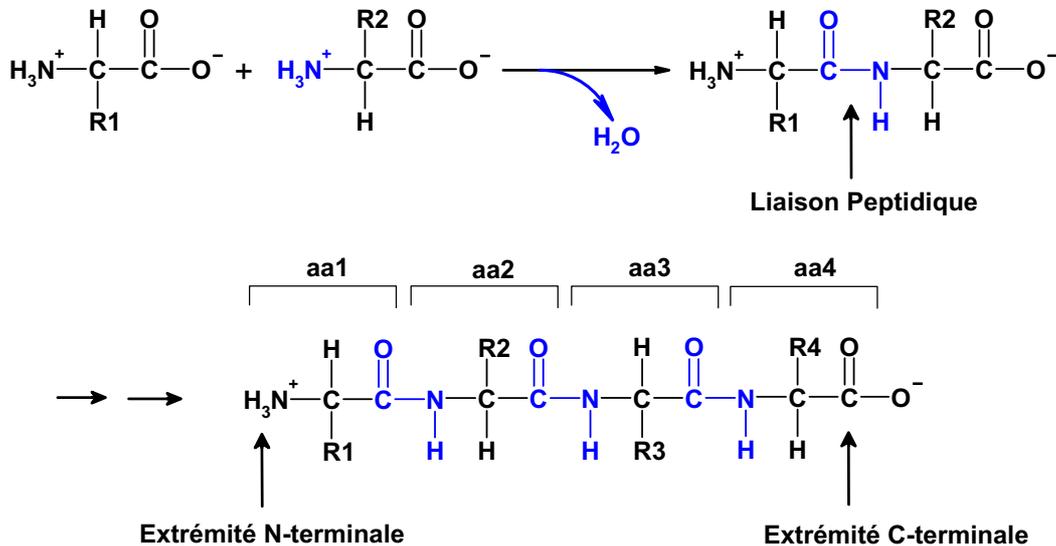


Figure 1.4 : Formation de la liaison peptidique entre les acides aminés par perte de molécules d'eau.

La synthèse des protéines est un processus qui se déroule à l'intérieur des cellules. Elle est caractérisée par l'assemblage des acides aminés isolés présent dans son cytoplasme en une chaîne protéique, à partir de l'information contenue dans l'ADN. Elle se déroule en deux étapes au moins : la transcription de l'ADN en ARN messager et la traduction de l'ARN messager en une protéine.

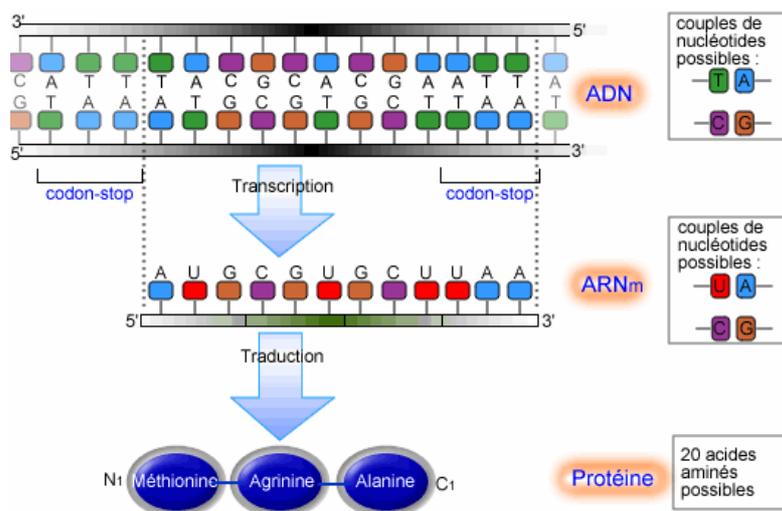


Figure 1.5 : Schéma général de la synthèse des protéines

2.1. Structures des protéines

La structure d'une protéine regroupe la séquence des acides aminés qui la constituent ainsi que sa conformation tridimensionnelle. Il existe quatre grands types d'interactions qui interviennent dans le repliement de la chaîne à savoir : les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques, les interactions hydrophobes et les ponts disulfures (voir Figure 1.6). La caractérisation des protéines est faite à travers quatre types de structures de complexité croissante.

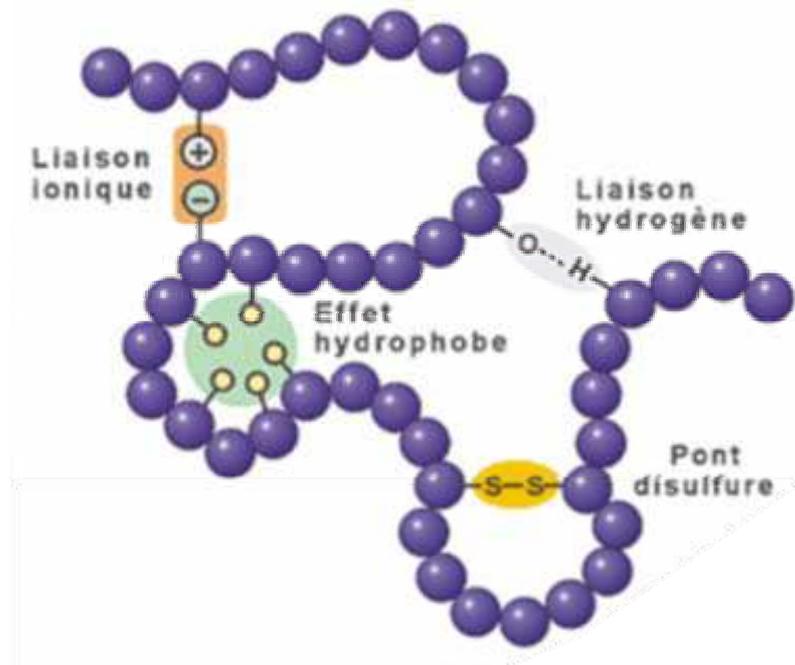


Figure 1.6 : Schéma représentatif des interactions responsables du repliement des protéines

Structure primaire

Cette structure donne seulement la séquence des acides aminés qui constituent la protéine. Elle est représentée par une chaîne linéaire d'acides aminés, unique à chaque protéine. Sa connaissance peut donner des indications sur la structure secondaire et tertiaire mais ne donne pas accès à la structure tertiaire tridimensionnelle.

Structure secondaire

La structure secondaire représente un repliement local de la chaîne d'acides aminés. On reconnaît deux grands types de structure secondaire, l'hélice alpha et le feuillet bêta.

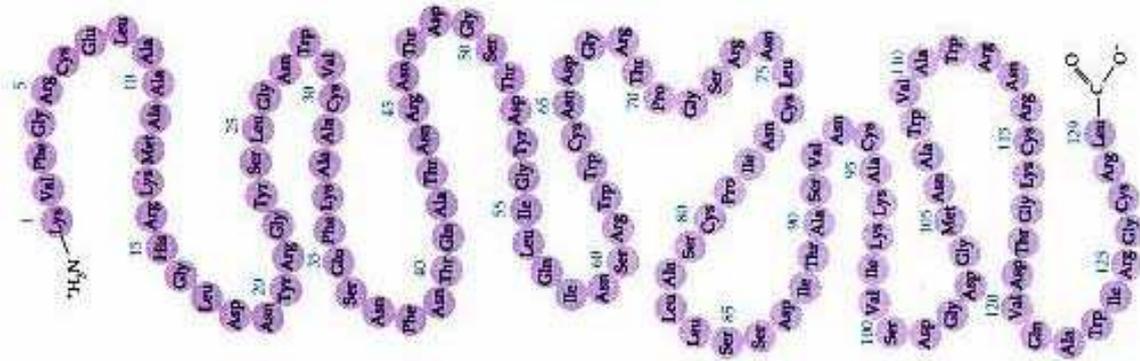


Figure 1.7 : Structure primaire d'une protéine.

Dans la structure dite en hélice alpha, la chaîne d'acides aminés prend la forme d'un tire-bouchon. Les différentes spires sont stabilisées par des liaisons hydrogène. Tandis que dans le feuillet bêta, il se forme des liaisons hydrogène entre certains segments de la chaîne, disposés parallèlement les uns par rapport aux autres. L'ensemble forme comme une membrane plissée. Cependant, il existe d'autres formes de structure secondaire comme l'hélice 3_{10} , l'hélice π , les hélices de type II, le brin β , les coudes et la pelote statistique. La Figure 1.8 représente certaines formes de la structure secondaire des protéines.

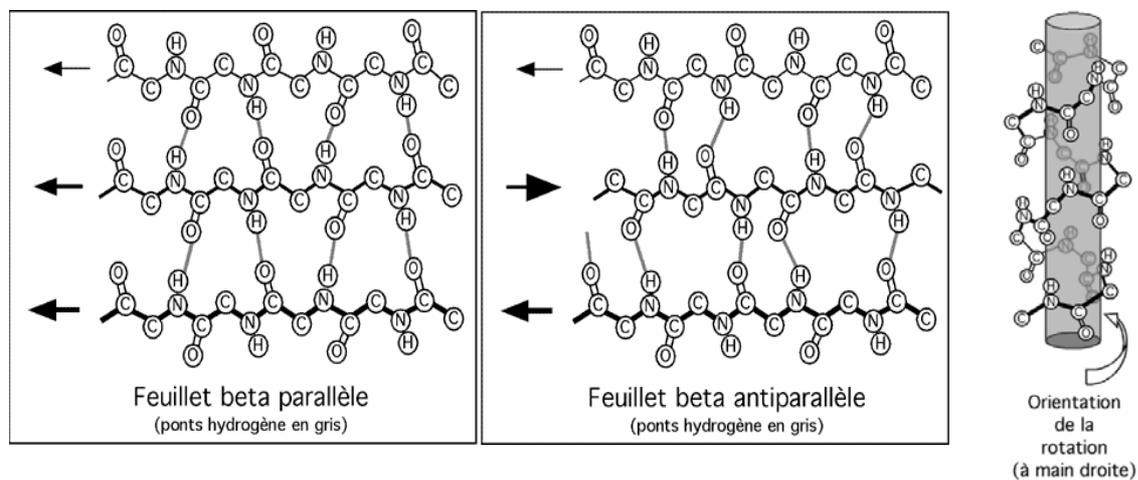


Figure 1.8 : Structure secondaire d'une protéine.

Structure tertiaire

La forme finale de la chaîne d'acides aminés, c'est à dire la structure tridimensionnelle finale qu'adopte la chaîne d'acides aminés, constitue la structure tertiaire de la protéine. Une protéine est donc faite d'hélices alpha et de feuillets bêta reliés par des segments qui n'ont pas de structure secondaire particulière.

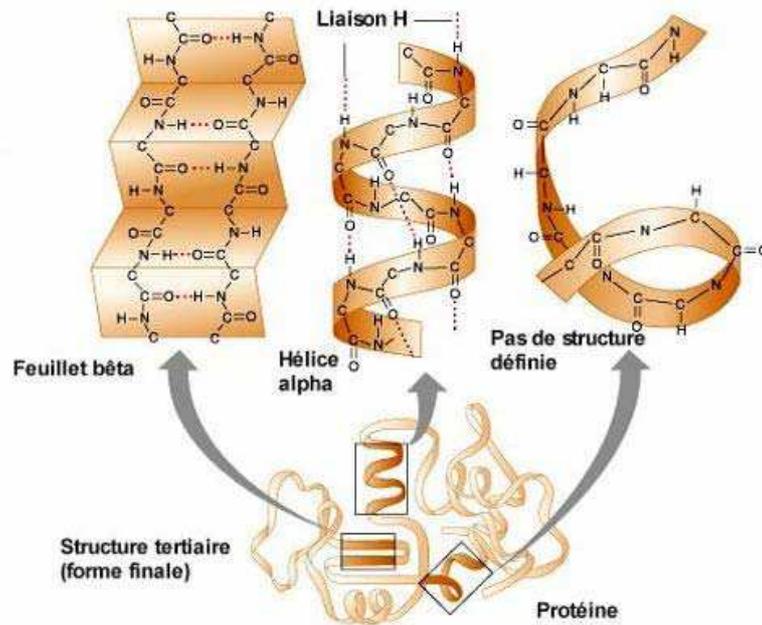


Figure 1.9 : Structure tertiaire d'une protéine

Structure quaternaire

Il existe des protéines complexes formées de plusieurs chaînes polypeptidiques identiques ou différentes. L'assemblage de ces sous-unités entre elles par des liaisons non covalentes (liaison H, liaison ionique, interactions hydrophobes), et parfois des ponts disulfures, constitue la structure quaternaire de la protéine. L'effet hydrophobe est un facteur prépondérant dans l'assemblage des éléments structuraux, y compris dans l'association des sous-unités. Évidemment, les protéines qui ne sont formées que d'une seule chaîne d'acides aminés n'ont pas de structure quaternaire.

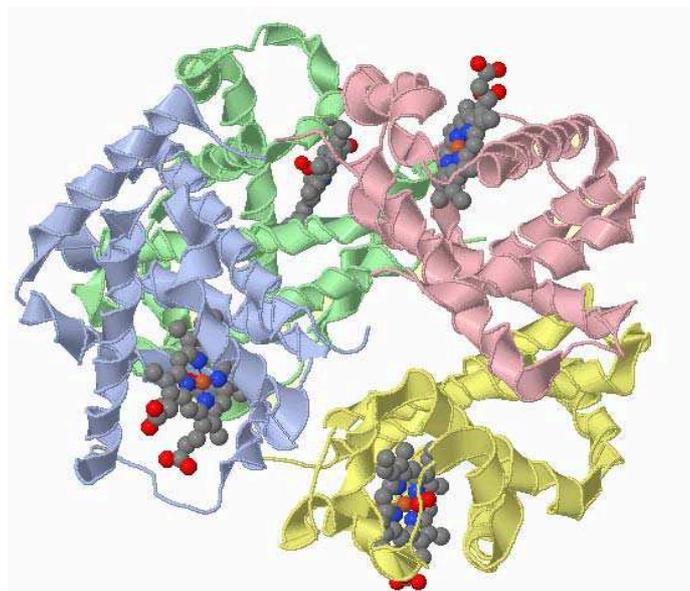


Figure 1.10 : Structure quaternaire d'une protéine

2.2. Fonctions des protéines

Les protéines remplissent de nombreux rôles dans les cellules. Parmi ces fonctions nous citons : (i) la formation de la structure cellulaire telles que les tendons et les ligaments, les fibres des caillots sanguins ou les membranes donnant de la résistance à la plupart des organes. Parmi les protéines de structure les plus abondantes, il y a la kératine, le cytosquelette et le collagène. Ce dernier est formé de grosses fibres résistantes à la traction. Il est responsable de la souplesse et la résistance de la peau et de la résistance des artères à la pression sanguine. (ii) l'identification des cellules : cette fonction est assurée par les glycoprotéines contenues dans les membranes de toutes les cellules qui permettent au système immunitaire de reconnaître ses propres cellules. Ces glycoprotéines, appelées protéines CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) sont nombreuses et très variables. Il n'existe pas deux personnes possédant les mêmes. Le système immunitaire peut distinguer ses propres cellules des cellules étrangères par les protéines CMH de la membrane. (iii) la mobilité cellulaire : C'est grâce aux interactions entre deux protéines fibrillaires qui remplissent les cellules musculaires, l'actine et la myosine que la contraction des cellules musculaire est effectuée. (iv) la communication cellulaire : l'émission des messages, leur réception, leur traduction et les réponses appropriées sont effectuées par les hormones qui sont dans la plupart des cas des protéines. (v) le transport : Il existe trois types de protéines transporteuses. Le premier type est celui qui transporte l'oxygène dans le sang et les muscles, représenté par l'hémoglobine et la myoglobine. Le deuxième type transporte les petites molécules, lipides et autres, dans le sang. Le troisième type responsable du transport membranaire. (vi) le système immunitaire : les anticorps, appelés aussi immunoglobulines, sont des grosses protéines fabriquées par les plasmocytes. Leur rôle est la détection et la neutralisation des agents pathogènes. (vi) la catalyse : les réactions chimiques qui se déroulent dans la cellule sont catalysées par des protéines spéciales appelées : enzymes. Ces dernières permettent aux réactions de se dérouler dans des conditions douces (1 atmosphère et 37°C).

3. Les objectifs et les promesses de la protéomique

Tout d'abord, la protéomique permet de réaliser l'inventaire des protéines cellulaires, ce qui permet de confirmer les prédictions effectuées à partir de la transcription théorique des gènes.

En biologie fondamentale, l'analyse protéomique permet d'étudier le fonctionnement basique des cellules et, l'organisation moléculaire. Les acides nucléiques, ADN et ARNm, sont des porteurs de l'information génétique. Ils donnent des informations indirectes sur les fonctions

des protéines. Mais, ils ne permettent pas de bien comprendre le fonctionnement des systèmes biologiques. Les protéines, quant à elles, sont les acteurs réels de la cellule. Elles sont responsables de la plupart des activités biologiques. D'où, une bonne compréhension de tels systèmes, ne peut être que le résultat d'une étude directe des protéines. Cette étude permet de déterminer les conditions de traduction des protéines ainsi que leur concentrations relatives.

Lors de la transcription des gènes, il y en a certains qui deviennent invalides, d'autres qui sont en surexpression. La protéomique différentielle permet d'étudier les effets de ces perturbations.

Dans les recherches cliniques, l'analyse protéomique concerne, d'une part, la mise au point de nouveaux médicaments par la mise en évidence de nouvelles cibles protéiques, d'autre part, par la découverte de nouveaux marqueurs de maladies, potentiellement utiles à leur diagnostic, pronostic, suivis d'évolution et thérapeutique.

Finalement, les plus grandes espérances viennent de la recherche pharmaceutique pour une nouvelle identification plus rapide afin de fabriquer des médicaments agissant sur des protéines cibles dans des cellules transformées ou des tissus malades.

4. Les branches de la protéomique

4.1. La protéomique d'expression

Cette branche de la protéomique est consacrée à l'analyse de l'abondance de protéines, elle comporte également la séparation des mélanges complexes de protéines, l'identification de protéines individuelles ainsi que leur analyse quantitative.

4.2. La protéomique structurale

Etant donné que la fonction d'une protéine et sa structure sont intimement liées. L'objectif de la protéomique structurale est d'étudier les structures tridimensionnelles des protéines. Ces études sont réalisées à l'aide de certaines techniques telles que la cristallographie, les rayons X et la résonance magnétique nucléaire RMN. Elles ont donné naissance à une nouvelle branche de la bioinformatique qui s'intéresse au stockage, à la présentation, à la comparaison et à la prédiction des structures de protéines.

4.3. La protéomique fonctionnelle

Cette branche s'intéresse à l'étude de protéines avec leurs modifications post-traductionnelles tout en gardant leurs conformations tridimensionnelles afin d'étudier leurs capacités

d'interaction entre elles et avec les autres composants de la cellule, des petits ligands comme des macromolécules, acides nucléiques et membrane cellulaires.

4.4. La protéomique d'interaction

Cette branche de la protéomique s'intéresse à la détermination des interactions physiques entre les protéines d'une même cellule et les éventuelles variations de la composition de ces complexes multiprotéiques dans différentes situations biologiques. Les protéines se regroupent pour former des complexes ayant des fonctionnalités spécifiques. La compréhension du fonctionnement du système cellulaire passe d'abord par la compréhension du fonctionnement de ces complexes protéiques après identification par différentes approches.

4.4.1. L'approche double-hybride

C'est l'une des méthodes les plus utilisées pour détecter des interactions physiques entre deux partenaires polypeptidiques. Le principe est de détecter, dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'activation d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un facteur de transcription dont l'activité dépend de la formation d'un complexe entre deux protéines d'intérêt. Ce principe est résumé dans la Figure 1.11.

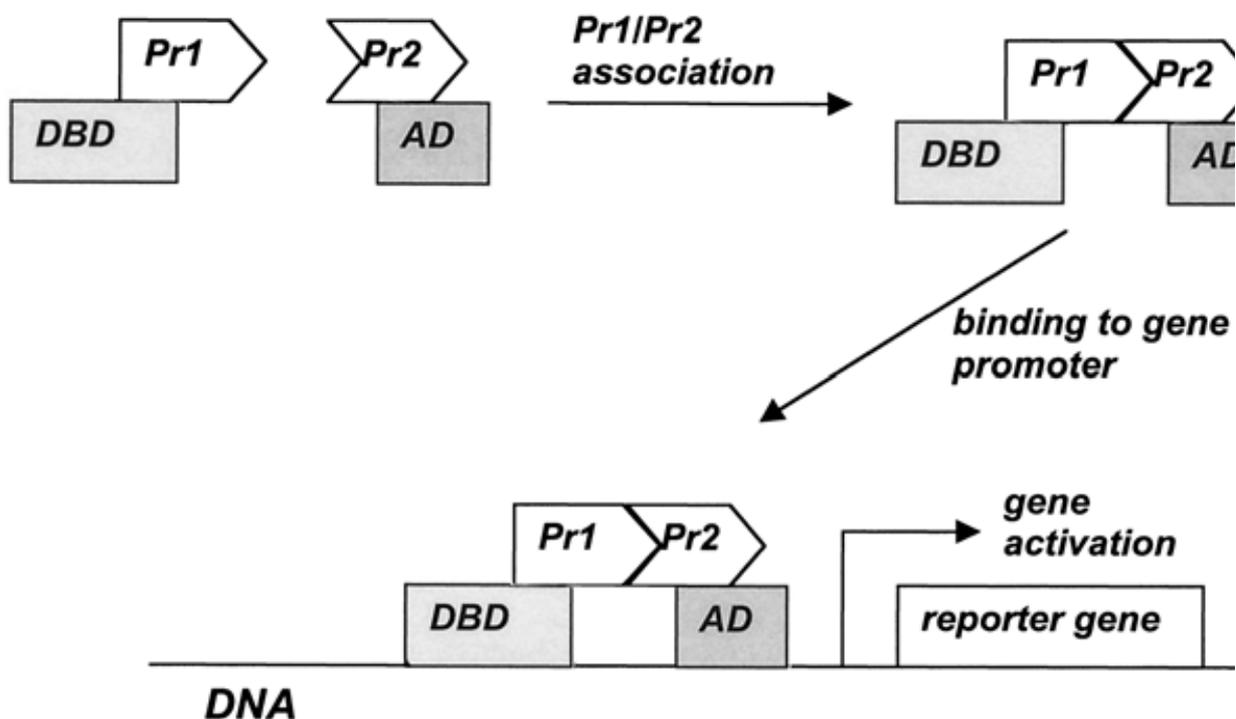


Figure 1.11 : Principe de l'approche double-hybride [5]

Cependant, différentes variantes du système double-hybride ont été développées et, de manière intéressante, certaines permettent la détection d'interactions protéine-protéine à haut débit, produisant ainsi des cartes d'interactions à grande échelle.

La protéine *Pr1* de levure, dans la Figure 1.11, est constituée d'un domaine de liaison de l'ADN (*DBD*). Dans l'approche double-hybride, une construction de sélection contenant un gène rapporteur sous le contrôle de la séquence de liaison de *Pr1* est introduite, ainsi qu'une fusion entre le domaine de liaison de *Pr1* et la protéine d'intérêt *Pr2*. Ces levures modifiées sont ensuite transfectées par une banque d'ADN préparée à partir du tissu d'intérêt, dans laquelle les ADN fusionnent avec la séquence codant pour le domaine de transactivation.

La principale limitation de cette méthode réside dans le fait que les protéines hybrides doivent avoir une localisation nucléaire pour pouvoir activer la transcription. Les protéines membranaires, par exemple, ne sont pas donc utilisables directement dans ce système.

4.4.2. La technique TAP-TAG

Le but de cette technique est d'extraire les complexes protéiques présents dans la cellule d'intérêt afin de les analyser. Ce qui permet de prendre en considération l'influence des modifications post-traductionnelles. Toutefois, cette technique a deux difficultés, la première est reliée à l'extraction des complexes. Les interactions protéine-protéine labiles qui sont détectables dans la cellule par la technique du double hybride, peuvent ne pas survivre au processus d'extraction utilisé dans cette technique. La deuxième est de diminuer les interactions non spécifiques.

4.4.3. L'immunoprécipitation

Cette approche vise l'immunoprécipitation de la protéine cible, ainsi que les protéines associés. Les protéines sont d'abord analysées par 1D-SDS-PAGE, ensuite elles sont transférées à une membrane par électrophorèse, et la membrane est sondée avec des anticorps suspectés comme partenaires de la protéine cible. Bien entendu, cette approche nécessite que l'un de ces anticorps soit spécifique pour la protéine cible et que cette dernière soit un bon récepteur [5]. Ces expériences avec les anticorps sont des outils très utiles pour confirmer des interactions protéine-protéine suspectées.

Toutefois, la limitation majeure de cette approche est qu'on ne peut détecter que ce qu'on recherche.

5. Les étapes principales de l'analyse protéomique

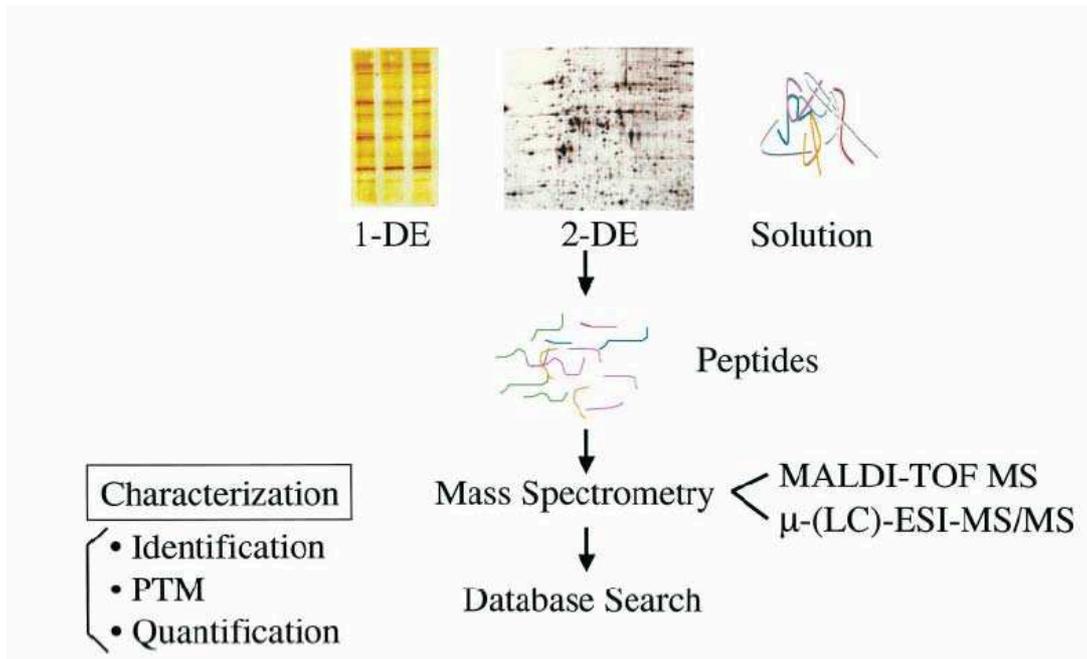


Figure 1.12 : Les différentes étapes de l'analyse protéomique. La préparation de protéines peut être effectuée sur un gel électrophorèse en une seule dimension (1-DE), sur gel électrophorèse bidimensionnel (2-DE) ou par des méthodes chromatographiques afin d'avoir des protéines ou peptides purifiés [6].

5.1. L'extraction des protéines

Les conditions d'extraction des protéines dépendent de l'organisme, de l'ordre, du type cellulaire et du compartiment d'où elles proviennent. Par exemple, les protéines cytoplasmiques dites solubles, sont extraites en utilisant un tampon après éclatement des cellules par broyage. Les protéines hydrophobes sont extraites à partir des membranes, qui sont généralement récupérées par sédimentation ou séparation sur gradient de densité. Ces protéines sont ensuite solubilisées à partir de la préparation membranaire par des agents chimiques comme les détergents. L'extraction des protéines structurelle nécessite une lyse chimique ou enzymatique de la matrice avant la mise en solution dans un tampon.

5.2. La séparation des protéines

Il existe différentes techniques de séparation des protéines et des peptides. D'un côté ces techniques ont bénéficié des développements instrumentaux récents et de l'autre côté, elles ont contribué à l'émergence de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse.

5.2.1. L'approche classique

La séparation par gel électrophorèse

La séparation d'un mélange complexe de protéines par gel 2D est effectuée en deux étapes. D'abord l'échantillon est séparé suivant une première dimension en fonction du point isoélectrique des protéines (pI), ensuite suivant une deuxième dimension en fonction de leurs masses moléculaires. La sensibilité de détection des gels dépend de celle des colorants utilisés. Trois types de coloration sont majoritairement utilisés en analyse protéomique. La coloration par le bleu de coomassie, la coloration à l'argent et la coloration fluorescente.

Cependant, les approches de séparation par 2DGE connaissent certaines limitations à savoir : la difficulté de la réalisation automatique des gels, l'insuffisance de la résolution des gels pour séparer l'ensemble de protéines cellulaires ce qui signifie qu'un spot correspond à plusieurs protéines, l'incapacité de visualiser les protéines membranaires ou en général les protéines hydrophobes, ceci est du fait que ces protéines sont faiblement solubles dans les milieux aqueux utilisés pour l'IEF (Iso-ElectroFocalisation) et que leurs pI sont alcalins.

Le SDS-PAGE 1D couplé nano-LC

Cette approche profite de la robustesse et de la sensibilité du couplage LC-spectrométrie de masse, elle est réalisée en deux étapes :

Etape 1: Séparation des protéines sur le gel SDS-PAGE (Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis), elle est effectuée selon les masses moléculaires des protéines. Cette technique vise à pré-fractionner des mélanges complexes de protéines avant leur digestion sur gel.

Etape 2 : Séparation des peptides par nano-LC par chromatographie phase inverse. En général, l'élution des peptides est effectuée par un gradient eau/acétonitrile. Les peptides séparés sont analysés ensuite par spectrométrie de masse. Par rapport à la technique de séparation des protéines par 2-DG, cette technique permet d'analyser les protéines hydrophobes ce qui fait d'elle une technique de choix pour l'analyse des protéines membranaires.

5.2.2. Les approches modernes

En général, le passage d'un gel 2-DG ou SDS-PAGE pour la séparation des protéines conduit à la perte de certains peptides lors de leurs extractions du gel, d'où la diminution du rendement de ces techniques. D'autres approches très récentes ne comportant pas l'utilisation des gels lors de leurs étapes, ont vu le jour notamment la chromatographie multidimensionnelle, approche utilisée pour la première fois par le laboratoire de Yates dans la fin des années 90.

Chromatographie multidimensionnelle MudPIT

Cette méthode procède par l'analyse directe de mélanges complexes de protéines pour générer rapidement un profil global des protéines présentes dans le mélange. Le mélange de protéines est directement digéré, les peptides résultants sont séparés par chromatographie multiple avant leur analyse par spectrométrie de masse.

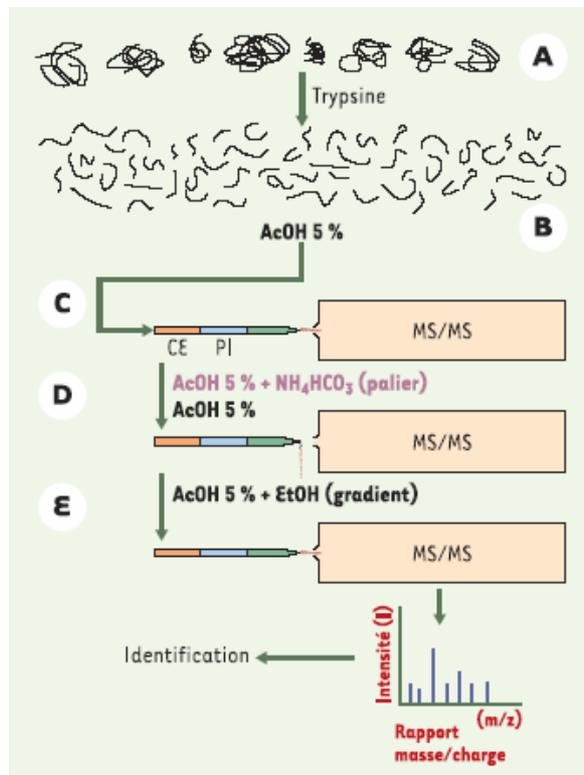


Figure 1.13 : Analyse d'un mélange de protéines par la méthode MUDPIT [7]

Dans la Figure 1.13, (A), le mélange de protéines est digéré par la trypsine. (B). Le mélange de peptides résultant est ensuite acidifié avec de l'acide acétique (AcOH) à 5 %. (C). Le

mélange est déposé sur un système composé de deux colonnes chromatographiques en tandem, relié à un spectromètre de masse (MS) en tandem : la première colonne basé sur un échangeur fort de cations (CE), la deuxième est de type phase inverse (PI). **(D)**. L'élution de la colonne échangeuse d'ions, par une concentration donnée de sels (NH_4HCO_3) transfère une partie des peptides vers la colonne de type phase inverse. **(E)**. Après élimination de sels par lavage, la colonne de type phase inverse subit un gradient d'éthanol (EtOH) pendant 1 heure et les peptides sortant de la colonne sont analysés par spectrométrie de masse en tandem, pour les identifier. Une fois l'élution terminée, une étape de salinité plus importante est appliquée pour transférer d'autres peptides vers la colonne de type phase inverse, une vingtaine de ces cycles est réalisée.

Cette méthode a permis de produire la plus grande analyse protéomique à ce jour avec 1484 protéines identifiées dans un lysat cellulaire total de Levure (*Saccharomyces cerevisiae*) par rapport à 300 protéines seulement identifiées après 2-DG du même échantillon.

5.3.L'identification des protéines

L'identification des protéines est effectuée par spectrométrie de masse, cette méthode repose sur une mesure précise de la masse de peptides ionisés. Différentes approches d'identification à partir des données obtenues par spectrométrie de masse ont été développées. L'approche la plus répandue reste celle de l'établissement d'une cartographie massique des peptides "Peptide Mass Fingerprinting PMF". La masse des peptides peut être obtenue, aussi bien par spectromètre de masse de type MALDI, que ESI.

5.4.La quantification des protéines

Afin que la détermination des protéines exprimées dans un tissu ou dans une cellule donnée soit significative, les données doivent être quantitatives. [8] Il existe deux grandes approches de quantification différentielle. La première est basée sur l'utilisation de gel 2D, elle comporte deux techniques :

La densitométrie, qui permet de comparer des différences d'expression relative des protéines marquées avec un colorant au sein de chaque gel. La coloration à l'argent est la plus sensible mais n'est que semi-quantitative car elle est peu reproductible et a une gamme de linéarité faible. La fluorométrie qui inclut une approche permettant de réaliser des analyses quantitatives de deux échantillons protéiques différents (marqués avec des colorants

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

fluorescents différents Cy3 et Cy5) au sein d'un même gel (2D-DIGE pour Differential Gel Electrophoresis).

La deuxième approche est basée principalement sur le marquage par des isotopes stables des protéines ou des peptides. Le principe de ces techniques réside dans le fait que deux formes d'une même espèce, qui ne diffèrent que par la substitution d'isotopes stables, se comportent de la même façon lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Elles seront différenciées par un écart de masse qui indiquera les quantités relatives des deux formes.

Différentes approches de quantification par marquage isotopique sont utilisées à l'heure actuelle à savoir :

- Marquage isotopique par réaction chimique : Stratégie ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) [9]
- Marquage isotopique par des acides aminés marqués : Stratégie SILAC (Stable isotope labelling with amino acids in cell culture) [10]
- Marquage isotopique par incorporation enzymatique d'O¹⁸. [11,12]

Cependant, il existe d'autres techniques de quantification de protéines telles que la quantification absolue qui nécessite un standard interne. [13]

B. LES MONOLITHES A BASE DE METHACRYLATES

I. DEFINITION ET HISTORIQUE

Les premiers supports chromatographiques de type polymère, dits conventionnels sont préparés par polymérisation radicalaire en suspension du Styrène en présence d'une faible quantité du Divinylbenzène. Les billes résultantes sont très influencées par les solvants, elles se gonflent dans les bons solvants et rétrécissent dans les mauvais solvants. La structure poreuse de ce matériau est due au gonflement des billes dans les bons solvants. Cependant, le problème majeur de ce type de support réside dans le fait que certaines de ces propriétés sont inversement liées. Par exemple, pour augmenter la porosité, il faut diminuer la quantité du DVB, ceci conduit à la diminution de la stabilité chimique du matériau. De plus, la plus grande limitation de ces supports est la disparition de la structure poreuse dans les mauvais solvants.

Vers la fin des années 1950, un nouveau processus de polymérisation, permettant la préparation des billes polymères macroporeux est découvert. Contrairement aux matériaux polymères précédents, dont la structure poreuse est liée à la présence d'un bon solvant qui gonfle le support, ce nouveau matériau garde sa structure poreuse même à l'état sec. Ceci est dû, d'une part, à l'utilisation d'une grande quantité de DVB qui conduit à la formation d'un réseau polymère rigide peu influencé par les solvants. Et d'autre part, au solvant introduit dans le mélange réactionnel qui doit être un bon solvant vis-à-vis des monomères et un mauvais solvant vis-à-vis des chaînes polymères en formation. Après polymérisation, le solvant est évacué, donnant naissance à un réseau de pores interconnectés.

Le mélange réactionnel est constitué principalement de monomères monovinyls, d'un agent réticulant, d'un solvant inerte et d'un amorceur radicalaire, le tout est dispersé dans un milieu aqueux par agitation. Le seul moyen, permettant le contrôle de la taille des billes, est la vitesse d'agitation du mélange réactionnel, le produit final a donc une distribution de taille large. Ces billes sont ensuite empaquetées dans des capillaires pour la préparation de colonnes chromatographiques. La dispersion de leur taille influence certaines propriétés de ces colonnes notamment le flux de la phase mobile et l'efficacité. De plus, les interstices entre les billes tassées, dus à leurs formes sphériques, constituent un chemin préférentiel pour la phase mobile et les solutés ce qui diminue les interactions de ces derniers avec le support chromatographique.

1. Développement des monolithes

En 1992, une nouvelle classe de matériaux macroporeux est rapportée par Svec [14,15]. Ce matériau, appelé monolithe macroporeux, est un matériau polymères monobloc obtenu par polymérisation radicalaire *in situ* initiée par voie thermique. Les parois internes du capillaire ont subi un prétraitement afin d'accrocher le monolithe d'une manière covalente. La structure poreuse est formée de deux types de pores interconnectés. Des macropores, permettant le flux direct de la phase mobile à travers le support monolithique à basse pression et des micropores qui sont le siège des interactions entre le soluté et la phase stationnaire.

Grâce à leur structure poreuse et aux propriétés hydrodynamiques qui en découlent, les monolithes macroporeux ont trouvé de nombreuses applications notamment dans le développement des supports de chromatographie liquide à haute performance (HPLC), dans la réalisation de support de chromatographie d'affinité par greffage de molécules ou de biomolécules développant des interactions spécifiques avec certains composés et dans la préparation de réacteurs chimiques et biochimiques par greffage des catalyseurs et des enzymes.

Les billes polymères obtenues par polymérisation en suspension et les monolithes macroporeux préparés à partir du même mélange réactionnel, présentent des structures poreuses différentes [16]. La seule différence entre les deux techniques réside dans l'absence de la force dynamique de l'agitation et le manque de la tension interfaciale entre la phase organique et la phase aqueuse. [17].

2. Composition du mélange réactionnel

Les supports monolithiques classiques sont préparés à partir d'un mélange réactionnel composé de monomères monovinyls et polyvinyls, d'un porogène qui est un solvant ou mélange de solvants inertes et d'un initiateur qui, par décomposition homolytique, amorce la réaction de polymérisation.

2.1. Diversité des monomères

Deux types de monomères sont utilisés pour la préparation des supports monolithiques. Des monomères mono-vinyls et poly-vinyls. Les premiers portent la fonctionnalité définitive de la phase ou un groupement réactif mis en jeu ultérieurement lors de la

fonctionnalisation du support monolithique. Les seconds assurent la réticulation du matériau pour former un support monobloc tridimensionnel.

Cependant, il existe différentes familles de monomères présentant des propriétés différentes. Le choix de l'agent réticulant est lié à la famille du monomère utilisé. Au cours des différentes études menées sur les monolithes, depuis leurs découvertes, trois familles de monomères ont été utilisées pour la préparation de ces matériaux. Les monomères vinyliques, acrylamides et méthacrylates.

2.1.1. Famille des monomères vinyliques

Le monomère fonctionnel le plus utilisé de cette famille est le styrène pour la préparation des colonnes hydrophobes de chromatographie liquide à haute performance HPLC dédiées à la séparation des protéines et des peptides.

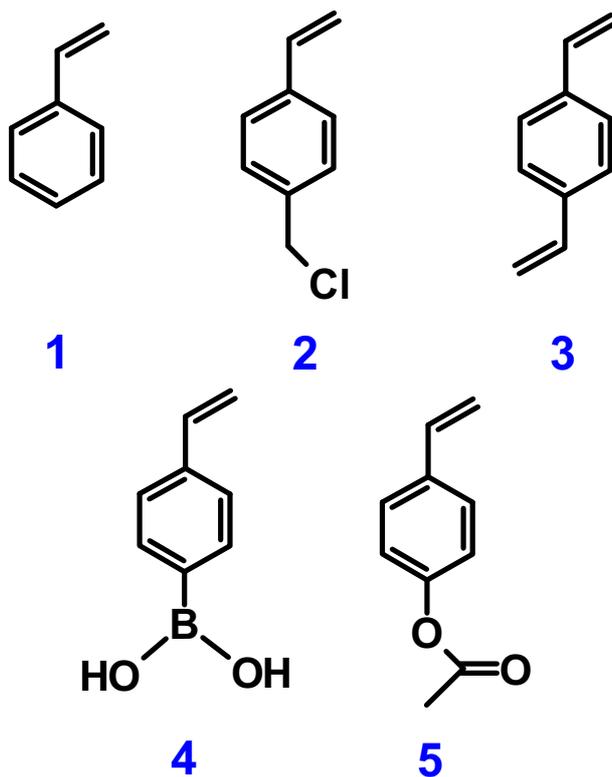


Figure 1.14 : Structures chimiques des monomères vinyliques utilisés dans la préparation des supports monolithiques : Styrène (1), 4-chlorométhyle styrène (2), divinylbenzène (DVB) (3), l'acide vinylphényl boronique (VPBA) (4) et 4-acétoxystyrène (5).

Cependant, il existe d'autres monomères de cette famille tel que : le 4-chlorométhyle styrène (VBC) utilisé pour la préparation de supports monolithiques réactifs et le l'acide vinylphényl

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

boronique (VPBA) pour la préparation de supports de chromatographie d'affinité destinés à l'enrichissement des molécules glycosylées. L'agent de réticulation correspondant à cette famille est le divinylbenzène (DVB).

La polymérisation radicalaire des monomères vinyliques, initiée par voie thermique est plus facile et rapide que celle initiée par voie photochimique. Pourtant, cette dernière permet d'utiliser un grand nombre de solvants de basse température d'ébullition comme porogène, qui ne peuvent pas être utilisés dans le cas d'une initiation par voie thermique à cause de leur évaporation.

Ce type de supports monolithiques a des performances de séparation très intéressantes. Il a donc trouvé de nombreuses applications, surtout dans la chromatographie liquide haute performance (HPLC) [18,19,20] et l'électrochromatographie capillaire (CEC) [21,22], où des colonnes monolithiques dans des capillaires couverts polyimide pour la nano chromatographie ont été commercialisées par LC-Paking. La Figure 1.15 représente un chromatogramme obtenu lors de la séparation de neuf protéines sur une colonne monolithique à base de (S/DVB).

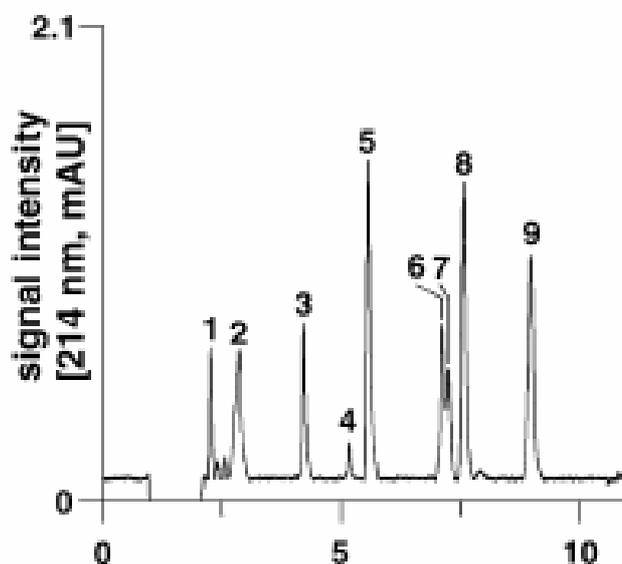


Figure 1.15 : Séparation de neuf protéines par RP-HPLC sur une colonne monolithique à base de (S/DVB) de dimension 60 mm × 0,20 mm. Phase mobile : (A) 0,050 % acide trifluoroacétique dans l'eau, (B) 80 % d'acétonitrile dans l'eau contenant 0,050 % d'acide trifluoroacétique. Gradient linéaire de 20 à 70 % de (B) en 10 min avec un débit de 1,7 à 2,3 $\mu\text{L}/\text{min}$. [20]

La Figure 1.16 représente la séparation de quatre polypeptides par électrochromatographie.

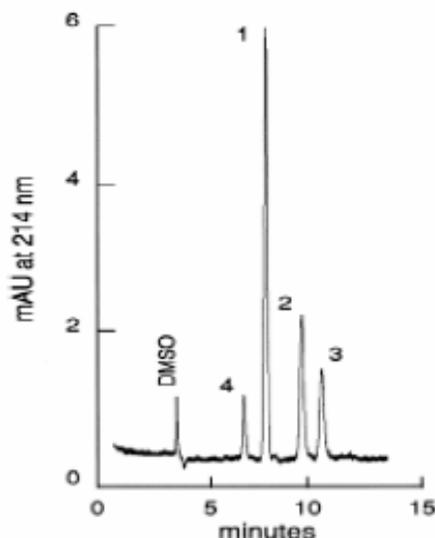


Figure 1.16 : Séparation de polypeptides acides et basiques par électrochromatographie. Phase mobile : gradient linéaire de 20 à 75% d'acétonitrile dans l'eau contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique. Tension : -15 kV. Echantillon : (1) angiotensin II, (2) angiotensin I, (3) [Sar1-Ala8]-angiotensin II et (4) insulín, chacun à 4mg/mL dans le tampon [21].

2.1.2. Famille des monomères acrylamides

La préparation des colonnes monolithiques, à partir des acrylamides, est effectuée par polymérisation d'un mélange réactionnel contenant des monomères fonctionnels tels que l'acrylamide, l'acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonique (AMPS), un agent de réticulation, le N,N'-méthylène(bis)acrylamide et un porogène. La polymérisation des monomères acrylamides exige la présence de l'eau dans le mélange réactionnel, d'où l'utilisation plus fréquemment d'un porogène ternaire.

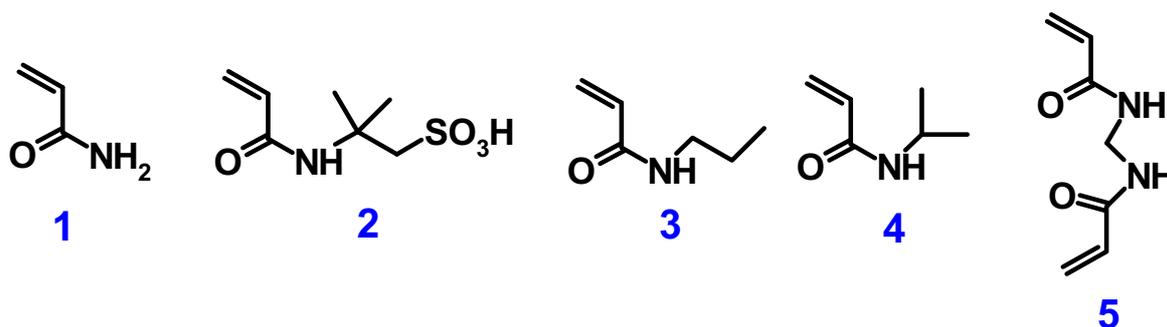


Figure 1.17 : Structures chimiques des monomères acrylamides utilisés dans la préparation des supports monolithiques : Acrylamide (1), Acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propane sulfonique (AMPS) (2), N-propylacrylamide (3), N-isopropylacrylamide (4) et N,N'-méthylène-(bis)acrylamide (5).

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

L'amorçage de la polymérisation est réalisé avec un système redox composé d'un amorceur radicalaire, le persulfate d'ammonium et d'un réducteur, le N,N,N',N'-tétraméthylène diamine (TEMED) qui va induire la décomposition de l'amorceur et la rendre possible à température ambiante.

Les applications développées avec ces monomères sont très variées en raison de leurs diversités chimiques [23,24,25]. Toutefois, les phases stationnaires pour la HPLC dédiées à la séparation des protéines et des peptides restent les applications principales. La Figure 1.18 présente la séparation de cinq protéines effectuée en μ -CPL sur une colonne monolithique à base d'acrylamide. La durée de la séparation est très courte, elle ne dépasse pas les 100 secondes.

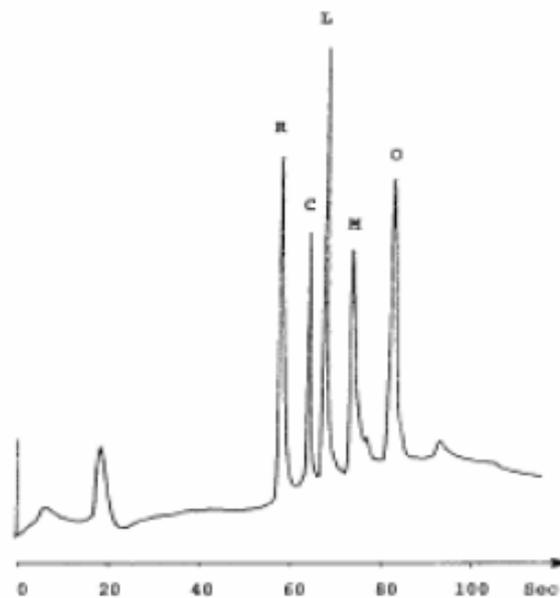


Figure 1.18 : Séparation de cinq protéines standard par μ -CPL sur une colonne monolithique à base de polyacrylamide (0,32 mm x 106 mm). Phase mobile : gradient de 10 à 70% d'acétonitrile dans l'eau contenant 0,1% de TFA. Débit de 100 μ L/min, pression en tête de colonne de 36 bars. Echantillon : (R) ribonucléase, (C) cytochrome c, (L) lysozyme, (M) myoglobine, (O) ovalbumine. [26]

2.1.3. Famille des monomères méthacryliques

Il existe une grande variété de monomères méthacryliques utilisée pour la préparation de supports monolithiques pour de nombreuses applications.

Ces dernières seront détaillées dans le dernier paragraphe consacré aux applications des monolithes à bases de méthacrylates.

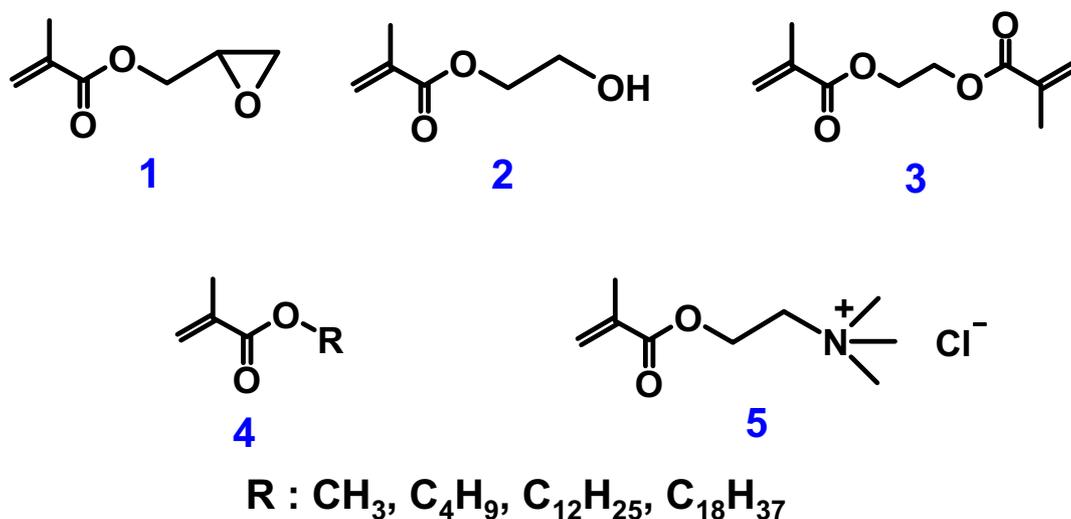


Figure 1.19 : Structures chimiques des monomères méthacrylates utilisés dans la préparation des supports monolithiques : Méthacrylate de glycidyl (1), Méthacrylate d'hydroxyéthyle (2), Méthacrylate d'éthylène glycol (3), Méthacrylate d'alkyl (4) et Chlorure de triméthyl ammonium [2-(méthacryloyloxy)éthyle] (5).

D'autres types de supports monolithiques sont préparés avec une combinaison de monomères de différentes familles, tels que les phases de l'électrochromatographie capillaire (CEC) préparées avec l'acide 2-acrylamido-2-méthyle-1-propane sulfonique (AMPS) introduit dans un mélange réactionnel de monomères méthacrylates [27,28,29,30].

2.2. Porogène

Le porogène est un solvant, ou mélange de solvants inertes par rapport à la réaction de polymérisation. Généralement, le porogène influence la structure poreuse du monolithe par sa teneur dans le mélange réactionnel et par sa composition. La teneur en porogène définit la porosité totale du monolithe. Tandis que sa composition change la distribution de la taille des pores vers les micro ou les macropores selon s'il est un bon ou un mauvais solvant vis-à-vis du polymère en formation.

2.3. Amorceurs

Divers amorceurs radicalaires sont utilisés pour la préparation des supports monolithiques. Pour la polymérisation radicalaire des monomères méthacrylates ou vinyliques, deux grandes

familles d'amorceurs sont utilisées. Les composés azonitriles et les peroxydes. La décomposition de ces derniers est soit thermique soit photochimique. Pour la famille des acrylamides, l'amorçage est effectué avec un système redox.

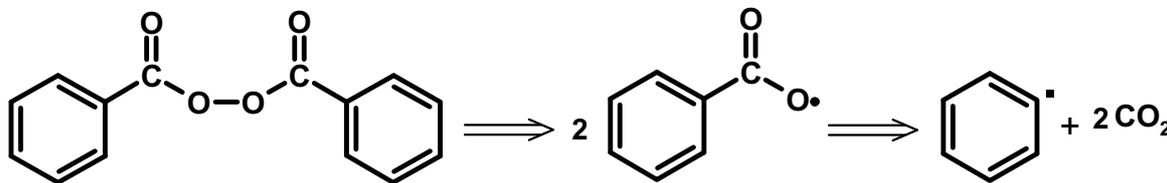


Figure 1.20 : Mécanisme de la décomposition spontanée du peroxyde de benzoyle en radicaux libres.

3. Techniques de Préparation des monolithes

Il existe plusieurs techniques de polymérisation des supports monolithiques, chacune a ses avantages et ses limitations. La technique la plus utilisée pour la préparation des monolithes est la polymérisation radicalaire, que ce soit par voie thermique ou par voie photochimique.

L'initiation par voie thermique est plus aisée à mettre en oeuvre. Cependant, elle est lente et très difficile à localiser surtout dans le cas des microsystèmes. De plus, la température cause parfois des fissures dans le support monolithique. Un autre inconvénient de cette technique réside dans le fait que les solvants de faible masse moléculaire, tels que les alcools de courtes chaînes aliphatiques, ne peuvent pas être utilisés comme porogène à cause de leurs faibles températures d'ébullition.

Par contre, dans le cas de la polymérisation par voie photochimique, ce mode d'initiation permet d'utiliser tous les solvants y compris ceux ayant une faible température d'ébullition vu que la polymérisation est réalisée à température ambiante. L'un des points forts de ce mode d'amorçage est le contrôle spatial, il offre la possibilité à polymériser une portion d'un capillaire ou d'un canal gravé sur un microsystème sans que la polymérisation s'étale sur tout le canal. Les autres parties peuvent être cachées à l'aide d'un masque qui empêche les irradiations UV d'y pénétrer. Cette méthode d'amorçage est limitée par l'utilisation de matériaux transparents aux irradiations UV, comme les capillaires de silice fondue, et ne marche en général, que dans le cas des faibles épaisseurs du dispositif de polymérisation, car au fur et à mesure que la polymérisation avance, l'épaisseur des chaînes polymères en

croissance augmente et le mélange réactionnel devient de plus en plus opaque ce qui empêche les irradiations UV de traverser le milieu.

Dans la dernière décennie, d'autres techniques de polymérisation ont été utilisées pour la préparation des monolithes, principalement les techniques de polymérisation radicalaire contrôlée connue aussi sous le nom de polymérisation radicalaire vivante. Ces techniques bénéficient à la fois des avantages de la polymérisation radicalaire et de ceux de la polymérisation vivante, à savoir un indice de polydispersité pratiquement égale à 1, une architecture bien contrôlée et une masse molaire modulable. De plus, en fin de polymérisation, les chaînes polymères restent actives pour une éventuelle fonctionnalisation. Parmi ces techniques nous citons :

- La polymérisation contrôlée avec un Transfert de chaîne par Addition-Fragmentation Réversible (RAFT). Dans cette technique, un agent de transfert de chaîne est ajouté au mélange réactionnel d'une polymérisation radicalaire classique. L'agent de transfert peut être un dithioester, un phosphoryl-(thiophosphoryl)dithioformate, un dithiocarbamate un di- ou un trithiocarbonate.

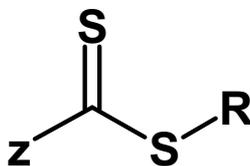


Figure 1.21 : Structure chimique générale d'un agent de transfert RAFT.

Le principe de cette technique est basé sur le transfert de chaîne dégénérative. Le mécanisme de la réaction de polymérisation vivante contrôlée est différent de celui d'une polymérisation radicalaire classique. La Figure 1.22 représente le schéma réactionnel du mécanisme de polymérisation vivante contrôlée avec Transfert de chaîne par Addition-Fragmentation Réversible (RAFT).

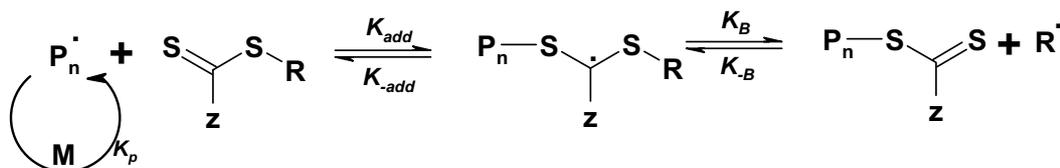
- La polymérisation radicalaire contrôlée par les nitroxydes (NMRP). Le principe de cette technique est basé sur le contrôle de la vitesse de l'incorporation des monomères dans les chaînes polymères en croissance. Cette tâche est réalisée avec les nitroxydes, espèces radicalaires stables utilisées comme inhibiteurs en polymérisation radicalaire classique. Leurs

réactions avec les radicaux carbonés conduit à la formation des alcoxyamine labiles. La décomposition de ces derniers donne naissance à des espèces radicalaires permettant de continuer la polymérisation.

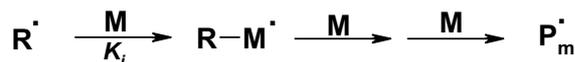
Initiation



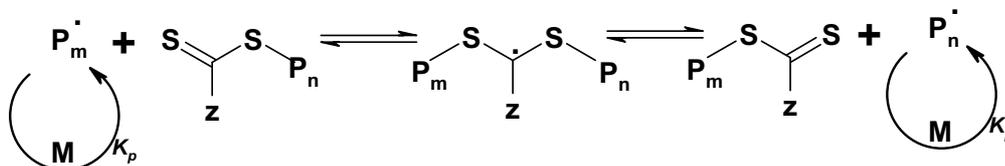
Transfert de chaîne



Réinitiation



Equilibration de chaîne



Terminaison

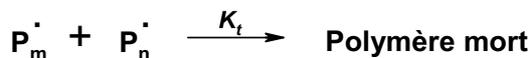


Figure 1.22 : Schéma réactionnel décrivant le mécanisme de la polymérisation vivante contrôlée avec Transfert de chaîne par Addition-Fragmentation Réversible (RAFT).

L'avantage majeur de la NMRP réside dans le fait qu'elle permet de contrôler les groupements fonctionnels terminaux des chaînes polymères en formation ainsi que la préparation de polymères avec des tailles et des formes moléculaires bien précis. Viklund et al. ont rapporté la préparation d'un support monolithique à base de styrène avec une distribution de taille des pores contrôlée [31,32,33]. Pour cette fin, ils ont utilisé le radical 2,2,6,6-tetraméthyl-1-piperidyloxy (TEMPO) et ses dérivés. La Figure 1.23 représente la structure chimique des radicaux stables utilisés pour le contrôle de la polymérisation du monolithe à base de S/DVB.

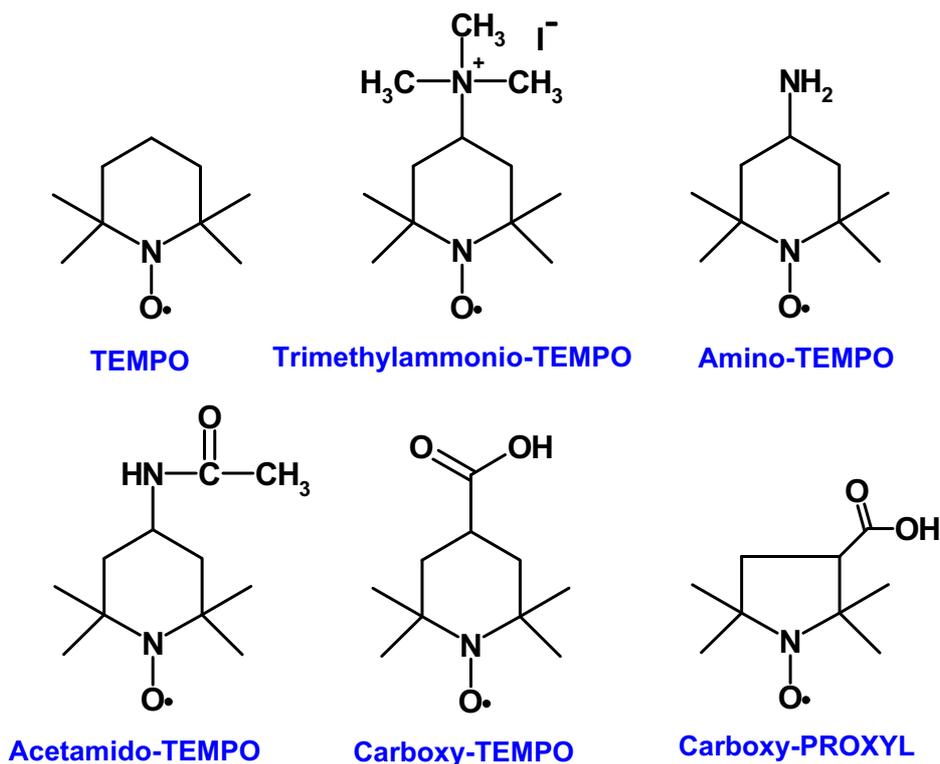


Figure 1.23 : Structures chimiques des radicaux stables utilisés pour le contrôle de la polymérisation des monolithes à base de S/DVB.

En fin de polymérisation un monomère fonctionnel, le méthacrylate 3-sulfopropyl, a été introduit dans le DMSO afin de fonctionnaliser le support monolithique à base de S/DVB. La Figure 1.24 représente une séparation par échange de cation d'un mélange de protéines.

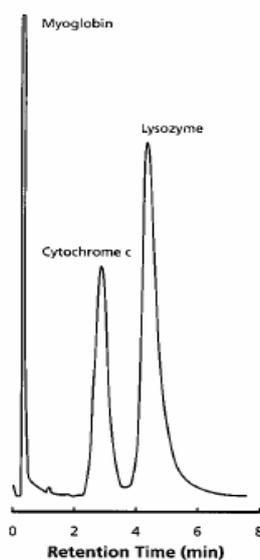


Figure 1.24 : Séparation d'un mélange de protéines par échange d'ions sur un monolithe à base de (S/DVB) fonctionnalisé avec le méthacrylate 3-sulfopropyl. Gradient linéaire de 20 à 100 % [34]

II. SUPPORTS MONOLITHIQUES A BASE DE METHACRYLATES

1. Préparation des monolithes

Dans la quasi-totalité des travaux présentés dans ce manuscrit, les monolithes ont été préparés par polymérisation radicalaire initiée par voie photochimique. Le mélange réactionnel est composé de monomères méthacrylates fonctionnels, d'un agent de réticulation le diméthacrylate d'éthylène (EGDMA), d'un porogène binaire et d'un photoinitiateur l'AIBN, pour amorcer la réaction de polymérisation. Les monomères fonctionnels et le porogène sont choisis selon l'application finale du support. Les pourcentages volumiques des différents constituant dans le mélange réactionnel dépendent de la structure poreuse du support et de ses propriétés finales souhaitées. En générale, l'agent réticulant est introduit à raison de 25 à 35 % volumique par rapport au volume total des monomères. Ces derniers représentent entre 20 et 40 % volumique par rapport au volume total du mélange réactionnel. Quant à l'amorceur, sa concentration ne dépasse pas les 3 % en masse par rapport à la masse totale des monomères.

1.1. Protocole standard de polymérisation

Les supports monolithiques sont préparés dans des capillaires en silice fondue, transparents aux irradiations UV. Ils sont destinés à travailler à haute pression. Donc, pour empêcher l'évacuation du monolithe du capillaire, un traitement de parois internes de ce dernier s'avère indispensable. Ce traitement, qui sera détaillé ultérieurement, consiste à greffer une molécule bi-fonctionnelle sur les parois interne du capillaire. La molécule comporte un groupement silane, lui permettant de s'accrocher sur les parois, et une double liaison qui va réagir avec le monolithe en formation d'une manière covalente.

Le mélange réactionnel est dégazé en introduisant un flux de N₂ afin d'éliminer les molécules d'oxygène qui jouent le rôle d'un inhibiteur de la réaction de polymérisation. Une fois le dégazage terminé, le mélange réactionnel est introduit dans un capillaire prétraité qui est ensuite placé sous irradiations UV. La durée de la réaction de polymérisation dépend du système binaire (Monomères - Porogène) étudié, de la distance séparant la source des irradiations UV, de la puissance de cette source, de l'épaisseur du capillaire et de la température ambiante de la salle. En fin de polymérisation, le support monolithique est lavé abondamment au méthanol afin d'évacuer le porogène et les monomères qui n'ont pas réagi, et séché à l'étuve pendant une nuit à 80 °C.

1.2. Mécanisme de polymérisation

Le mécanisme de la réaction de polymérisation des monolithes est identique à celui d'une polymérisation radicalaire. En général, la polymérisation radicalaire est une réaction en chaîne qui fait intervenir des espèces chimiques très réactives appelées radicaux. La concentration de ces centres actifs dans le milieu réactionnel est très faible, elle est de l'ordre de 10^{-8} mol.L⁻¹. Leur durée de vie moyenne, est très courte, elle varie entre 0,1 et 10 s. Après libération des radicaux par amorçage de l'initiateur, ces derniers sont capables, durant ce laps de temps très court, d'effectuer un très grand nombre de réactions chimiques, qui peut atteindre facilement 10^4 réactions chimiques élémentaires avant de disparaître.

Le nombre de réactions chimiques effectuées par un radical durant son temps de vie représente la longueur de la chaîne cinétique. Le mécanisme de la polymérisation radicalaire se décompose en trois étapes principales décrivant l'initiation, le croisement et l'arrêt de la chaîne cinétique. Ces étapes sont : l'amorçage, la propagation et la terminaison. Nous nous intéressons particulièrement à l'amorçage.

1.2.1. L'amorçage

L'amorçage est la première étape de la polymérisation radicalaire, elle est composée de deux sous-étapes. La première consiste à la décomposition de l'initiateur par rupture homolytique pour donner des radicaux libres. Cette décomposition peut être réalisée par chauffage, par irradiations UV ou via un réducteur. Dans la deuxième sous-étape est celle de l'activation des monomères, les radicaux formés s'additionnent sur les monomères en formant ainsi des radicaux monomères réactifs, comme le montre la Figure 1.25.

En général, les initiateurs sont des substances chimiques possédant au moins une liaison labile comme c'est le cas pour les peroxydes ou conduisant à la formation de molécules très stables comme dans le cas des composés azonitriles auxquels appartient l'AIBN que nous avons utilisé pour la préparation des supports monolithiques.

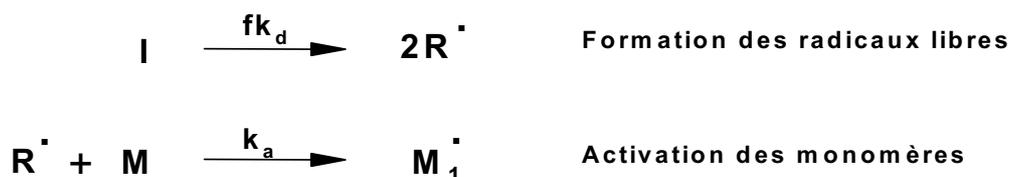


Figure 1.25 : Schéma réactionnel décrivant le mécanisme de l'amorçage d'une polymérisation radicalaire.

Dans le cas d'un photoinitiateur, tel que l'AIBN, la décomposition est effectuée par photolyse. Lors de son irradiation, l'AIBN adsorbe une quantité d'énergie $h\nu$ et passe à l'état excité (AIBN)* caractérisé par le passage d'un électron sur une orbitale d'énergie supérieure.

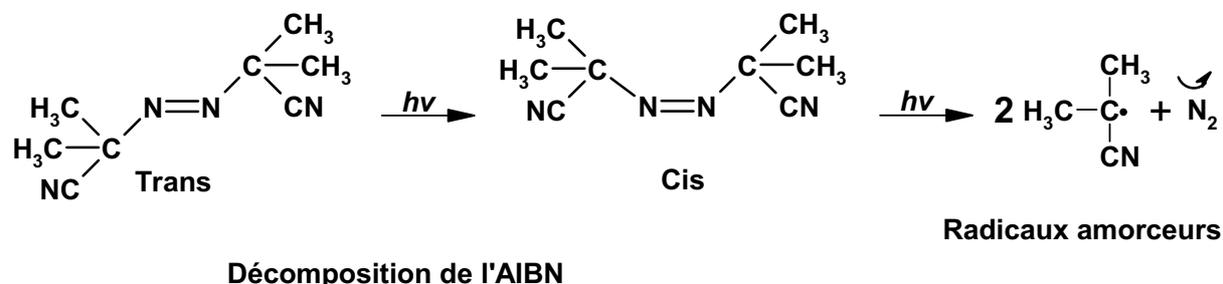


Figure 1.26 : Schéma réactionnel de la décomposition de l'AIBN par voie photochimique[35].

La durée de vie de ces états excités est très courte, en général elle ne dépasse pas 10^{-6} s. Les radicaux sont ainsi générés par rupture de chaîne intramoléculaire. La Figure 1.26 représente le schéma de la décomposition photochimique de l'AIBN.

Il est important de noter qu'une grande partie des radicaux générés par la décomposition de l'amorceur est impliquée dans des réactions secondaires donnant naissance à des espèces inactives qui n'interviennent pas dans l'amorçage de la polymérisation.

Dans le mélange réactionnel, l'amorceur est entouré de molécules de monomères et de porogène qui forment autour de lui une cage. Ce phénomène est appelé effet cage, il réduit l'efficacité de l'amorceur en empêchant une grande partie des radicaux formés de diffuser dans le mélange réactionnel.

La Figure 1.27, ci-dessous, représente ces réactions secondaires, dans le cas de la décomposition de l'AIBN, selon les travaux de G. MOAD et all. La réaction qui donne naissance à la cétèneimine, produit secondaire majoritaire, est instable. Elle génère les radicaux cyano-isopropyle amorçeurs de la polymérisation à une vitesse proche de celle de la décomposition de l'AIBN.

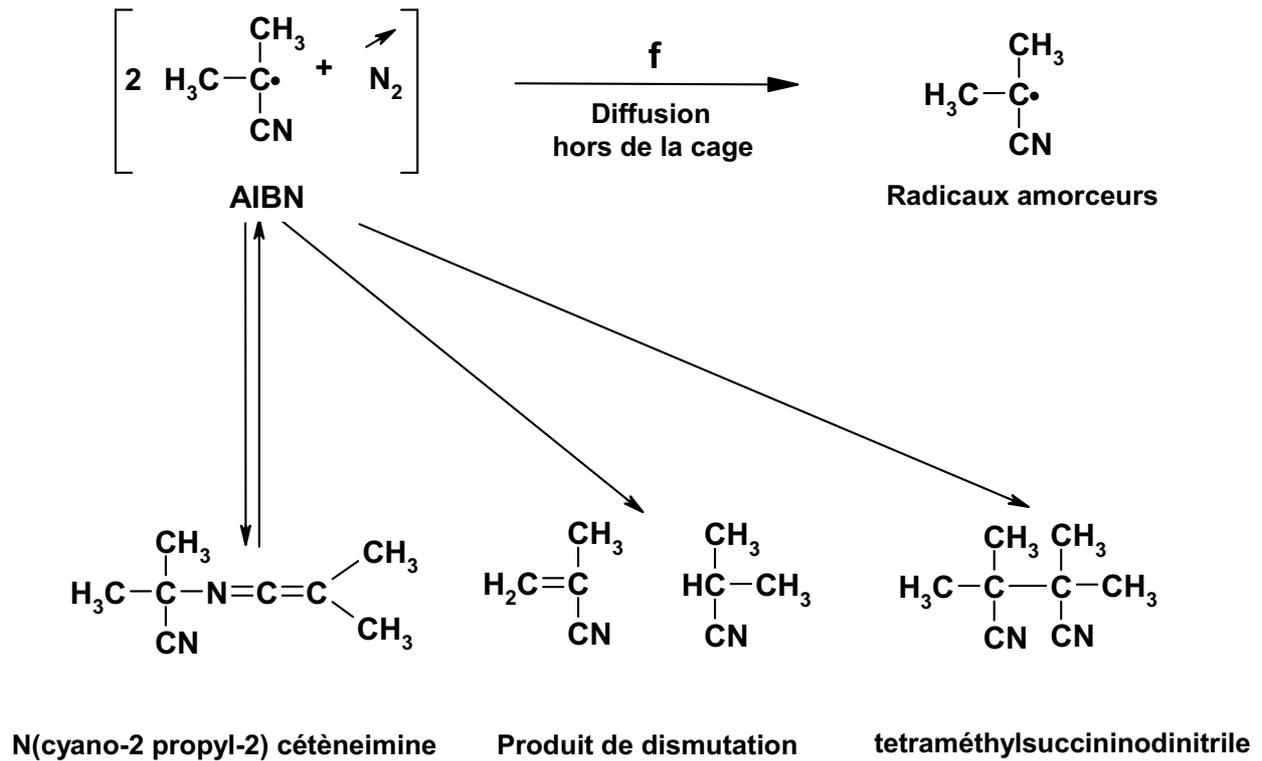


Figure 1.27 : Schéma réactionnel des réactions secondaires se déroulant à l'intérieur de la cage dans le cas de la décomposition de l'AIBN [36].

2. Formation et contrôle de la structure poreuse des monolithes

2.1. la structure poreuse des monolithes

Les monolithes sont des matériaux polymères macroporeux caractérisés par une structure poreuse stable, qui est peu ou non influencée par les solvants utilisés et qui persiste même à l'état sec.

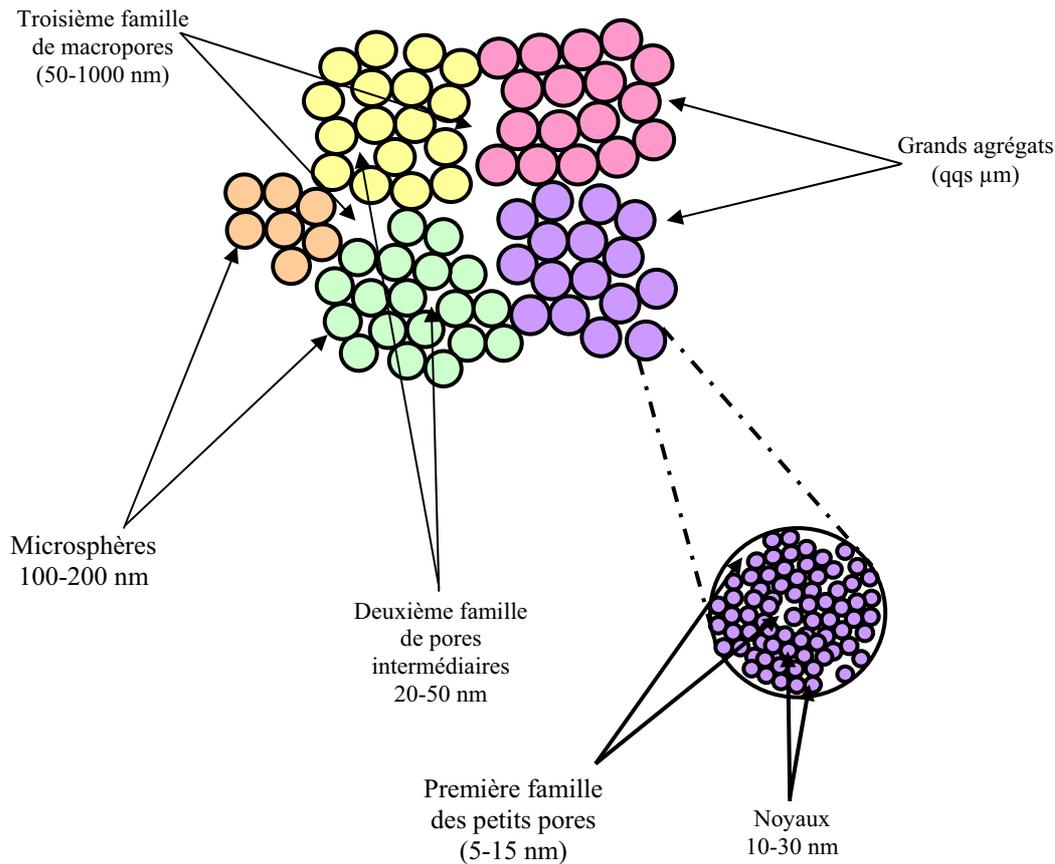


Figure 1.28 : Représentation schématique de la structure poreuse des matériaux monolithiques. Les globules de polymères ont été schématisés par des sphères pour des raisons de simplification [37]

La définition de micro ou macropores est donnée par la classification de l'IUPAC :

- Les micropores ont une largeur inférieure à 20 Å
- Les mésopores ont une largeur entre 20 et 500 Å
- Les macropores ont une largeur supérieure à 500 Å

Les micropores et les mésopores contribuent à la surface spécifique, plus le nombre de ce type de pores est grand, plus la surface spécifique est grande. Les macropores, quant à eux, sont responsables du flux de la phase mobile à travers le matériau. Plus la distribution de la taille des pores est décalée vers les macropores, plus il est aisé de réaliser des expériences à haut débit avec un temps d'analyse et une pression raisonnables. Leur contribution à la surface spécifique est faible. Cependant, il faut noter que les macropores des matériaux monolithiques sont plus larges que ceux des billes polymères préparées par polymérisation en suspension. La Figure 1.29 représente la courbe de distribution de tailles de pores pour un support monolithique et des billes polymères préparés à partir du même mélange réactionnel.

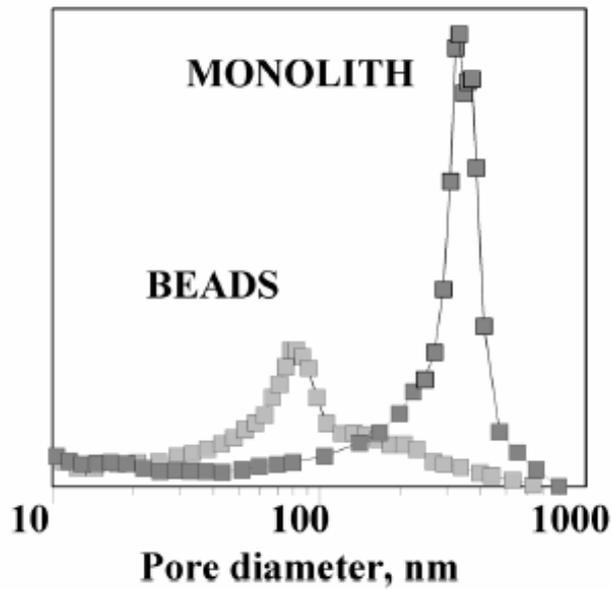


Figure 1.29 : Comparaison de la distribution de la taille des pores d'un monolithe avec des billes polymères préparées à partir du même mélange réactionnel [38]

2.2.Mécanisme de formation de la structure poreuse

Le mélange réactionnel est constitué de monomères mono et divinyls, de porogène et d'un amorceur. La décomposition induite de ce dernier donne naissance aux radicaux libres qui initient la réaction de polymérisation. Au cours de la polymérisation, la taille des chaînes macromoléculaires en formation augmente au fur et à mesure, conduisant à la diminution de la quantité des composants liquides du mélange réactionnel et augmente la densité du polymère. La précipitation du polymère en croissance dépend de deux paramètres, à savoir sa densité de réticulation et du pouvoir de solvation du porogène. Cette précipitation conduit à une séparation de phase, qui est un phénomène très important dans le processus de formation de la structure poreuse.

Lorsque la densité de réticulation du polymère atteint un niveau critique, appelé point gel, le matériau se transforme en un réseau macromoléculaire et devient insoluble dans le porogène. Il se précipite donc sous forme de nuclei gonflés de monomères. La taille des nuclei augmente d'une part à cause de la capture des chaînes polymères précipitant dans le milieu réactionnel, et d'autre part grâce à la polymérisation

Ces nuclei interagissent avec leurs voisins par des réactions de réticulation en formant des clusters de nuclei. Ces derniers restent dispersés dans le porogène et continuent à croître.

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

Dans le stade final de la polymérisation, la taille de ces clusters atteint un niveau assez grand pour qu'ils rentrent en contact avec les nuclei voisins afin de former une matrice tridimensionnelle interconnectée.

2.3. Contrôle des propriétés de la structure poreuse des monolithes

Les propriétés de la structure poreuse des supports monolithiques doivent répondre aux exigences de l'application visée, ceci demande un certain contrôle de ces propriétés permettant de répondre aux cahiers des charges. Ce contrôle consiste à changer le nombre de micro ou de macropores en décalant la distribution de taille des pores. Par exemple, les supports chromatographiques de séparation doivent avoir une distribution de taille des pores décalée vers les micropores pour avoir une très grande surface spécifique. Tandis que pour les bioréacteurs, la taille des pores doit être décalée vers les macropores afin de faciliter le passage des biomolécules de grosses tailles et de diminuer la résistance au transfert de masse.

Les principaux paramètres permettant le contrôle de la structure poreuse sont la nature et la teneur en porogène, la concentration de l'agent réticulant, la concentration de l'amorceur et la température, dans le cas d'une polymérisation initiée par voie thermique.

2.3.1. La nature du porogène

En général, le porogène est constitué d'un bon solvant (Sol) et d'un mauvais solvant (NonSol) vis-à-vis du polymère en formation. L'utilisation d'un porogène riche en bon solvant (Sol) vis-à-vis du polymère en formation conduit à la formation d'un matériau monolithique avec une très grande surface spécifique et d'une structure poreuse constituée de pores de faible diamètre. La distribution de la taille des pores dans le monolithe résultant est caractérisée par des micro et des mésopores.

L'utilisation d'un porogène riche en mauvais solvant vis-à-vis du polymère en formation (NonSol) donne naissance à une structure poreuse de faible surface spécifique et constituée de pores relativement larges. La distribution de la taille des pores, dans le monolithe résultant est caractérisée par un grand nombre de méso et de macropores.

Afin d'ajuster les propriétés poreuses des supports monolithiques selon l'application visée, il faut choisir les teneurs respectives en bon solvant (Sol) et mauvais solvant (NonSol). Il existe une méthode facile permettant de prédire le comportement des porogènes vis-à-vis du polymère. Cette méthode utilise les paramètres de solubilité du porogène (δ_1) et du polymère

(δ_2). Elle repose sur la théorie de Hildebrand qui stipule que la solubilité du polymère dans un solvant est favorisée lorsque $(\delta_1 - \delta_2)^2$ est faible.

Il est important de noter que dans le pouvoir de solvataion du milieu (Porogène + Monomères) change durant le processus de polymérisation. Ce changement est maximum dans le cas de l'utilisation d'un mauvais solvant vis-à-vis du polymère en formation comme porogène. En fait, les monomères constituent un bon solvant pour le polymère en formation, la consommation de ces monomères durant le processus de polymérisation rend le milieu riche en mauvais solvant ce qui influence par la suite la structure poreuse du polymère.

2.3.2. La teneur de l'agent réticulant

L'agent réticulant est responsable de la formation de la structure tridimensionnelle du monolithe. Cependant, le changement de sa teneur dans le mélange réactionnel conduit au changement de la composition chimique du matériau résultant, qui affecte conjointement la porosité totale du matériau et la distribution de la taille de pores. Ce changement n'est pas toujours le même, il dépend des systèmes de monomères utilisés.

Par exemple, dans le cas du système (S/DVB), l'augmentation de la teneur du DVB dans le mélange réactionnel conduit à l'augmentation de la porosité totale du monolithe. Cette dernière continue à augmenter avec le DVB jusqu'à une valeur où elle devient constante. D'autre part, l'augmentation de la teneur du DVB diminue la solubilité des chaînes polymères dans le milieu, ce qui rend la séparation de phase plus précoce. Les nuclei formés sont plus nombreux et plus petits. La distribution de la taille moyenne des pores est décalée vers les plus faibles valeurs.

Tandis que pour le système de monomères acrylonitrile (AN/DVB), la relation entre la porosité et l'agent réticulant est à l'opposé de celle observée dans le système précédent. L'augmentation de la teneur du DVB dans le mélange réactionnel conduit à la diminution de la porosité totale.

Un autre système de monomères présentant une relation différente de celles évoquées précédemment entre la teneur de l'agent réticulant et la porosité est le système (HEMA/EGDMA). La porosité totale du matériau augmente avec la teneur de l'agent réticulant jusqu'à 20 % molaire de ce dernier, après quoi elle diminue de manière continue.

2.3.3. Effet de la température

Dans le cas d'une polymérisation radicalaire initiée par voie thermique, le nombre de radicaux libres, déclenchant la réaction de polymérisation dépend de la température du milieu. Plus la température de la réaction est élevée, plus le nombre de radicaux libres formés est grand. Ceci conduit à la formation d'un plus grand nombre de nuclei et de globules. Etant donné que la quantité des monomères dans le mélange réactionnel est constante, la taille de ces nuclei et globules est plus petite et les pores renfermés dans cette structure sont eux aussi petits. Ce qui explique le décalage de la distribution de la taille moyenne des pores vers les plus faibles valeurs. D'une manière générale, plus la température de polymérisation est grande, plus la taille moyenne des pores est petite.

D'autre part, le changement de température affecte légèrement le pouvoir de solvation du porogène. La solubilisation des chaînes de polymère dans le porogène est favorisée par une augmentation de la température, ceci cause un retard de la séparation de phase, phénomène responsable de la formation de la structure macroporeuse.

2.3.4. La concentration de l'amorceur

De la même façon que précédemment, le remplacement de l'amorceur par un autre plus réactif ou l'augmentation de sa vitesse de décomposition conduit à l'augmentation de la quantité de radicaux libres qui vont déclencher la réaction de polymérisation. La distribution de la taille moyenne des pores est décalée vers les faibles valeurs. Le matériau développe une surface spécifique très grande.

3. Applications des monolithes à base de méthacrylates

Grâce à leur faible transfert de masse, à leur grande surface spécifique, à leur préparation facile *in situ*, à leur structure poreuse permanente et à leur chimie de surface très variée les matériaux monolithiques à base de méthacrylates ont trouvé de nombreuses applications.

3.1. Phases stationnaires de chromatographie

Les supports monolithiques à base de méthacrylates sont des matériaux polymères macroporeux, ils sont caractérisés par une structure poreuse contenant des micropores, qui sont le siège des interactions entre la phase stationnaire et les échantillons, et des macropores,

responsables de l'écoulement de la phase mobile. De ce fait, les supports monolithiques sont largement utilisés comme phases stationnaires de chromatographie.

3.1.1. Phases stationnaires pour la Chromatographie liquide à haute performance

Les supports monolithiques à base de méthacrylates ont été utilisés quasiment dans tous les types de séparations. Dans la séparation en phase inverse, des colonnes monolithiques à base de BMA ont été utilisées pour la séparation de petites molécules de polarité différente. La Figure 1.30 représente la séparation de cinq produits sur une colonne monolithique de 19 cm de longueur et de 320 μm de diamètre interne.

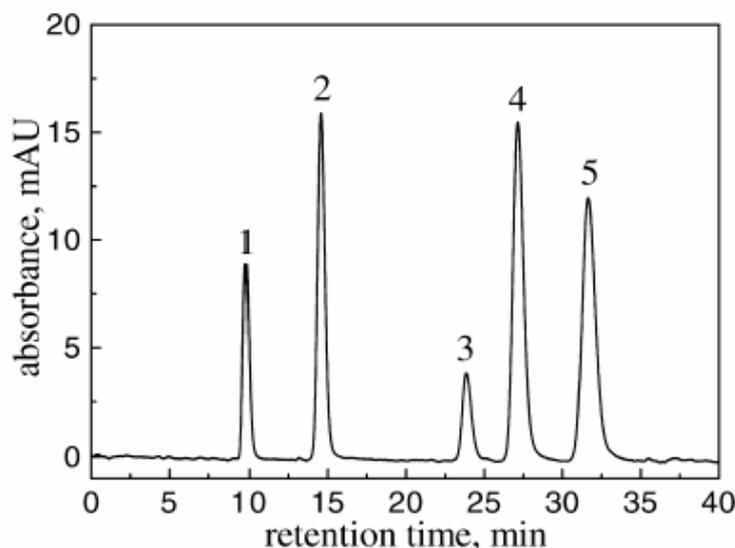


Figure 1.30 : Séparation de l'Uracile (1), Phénol (2), Benzène (3), Toluène (4) et l'éthylbenzène (5) sur une colonne monolithique à base de BMA/EGDMA. La phase mobile : acétonitrile/eau (65:35 v/v). injection de 60 nL à 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ et détection à 214 nm [39].

Ces colonnes exhibent les mêmes performances séparatives que leurs analogues de 100 et de 150 μm de diamètre interne. Les mêmes colonnes ont été préparées dans des capillaires de 100 cm de longueur les résultats de séparation étaient similaires [40]. Y. Ueki et al. rapportent la préparation de colonnes monolithiques à base de quatre monomères d'hydrophobies différentes C1, C2, C4, C4, C12 et C18 pour la séparation rapide des alkylbenzènes à haut débit et à haute température [41]. La séparation de cinq alkylbenzènes a été effectuée en 20 secondes sur une colonne de 20 cm. La durabilité des supports monolithiques, à haute pression et haute température est très élevée. Du fait des résultats obtenus avec les colonnes monolithiques à base de BMA, ces dernières ont été utilisées pour la séparation des protéines.

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

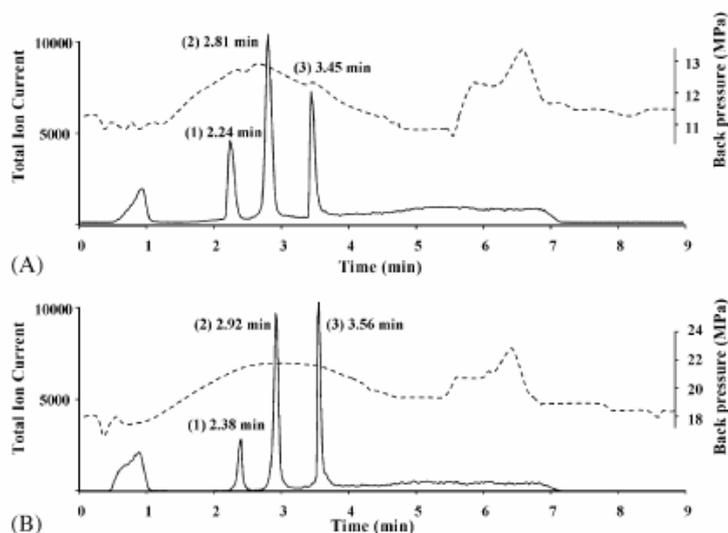


Figure 1.31 : Séparation chromatographique de trois protéines modèles sur une colonne monolithique à base de BMA/EGDMA de dimensions (L = 20 cm, d.i. = 100 μ m). (A) : Polymérisation thermique. (B) : Polymérisation photochimique. Phase mobile (A) : acide formique 2 % dans un mélange eau : acétonitrile 98:2. Phase mobile (B) : acide formique 2 % dans l'acétonitrile. Gradient : de 100 % de A à 50 % de B dans A en 4 min à 4 μ L/min. Pics : Rubonuclease A (1), Cytochrome C (2) et Myoglobine (3). [42]

La stabilité et la reproductibilité des colonnes monolithiques à base de BMA polymérisées par voie photochimique et par voie thermique ont été étudiées par L.Geiser et al. [42] comme le montre la Figure 1.32. Même après plus de 2000 injections, les colonnes monolithiques restent très stables, la répétabilité des temps de rétention est excellente.

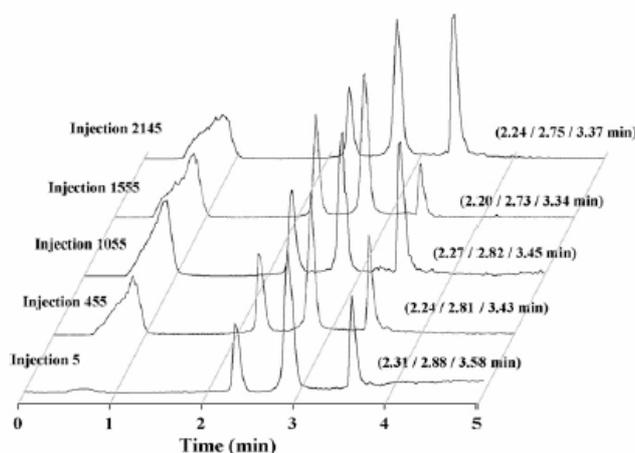


Figure 1.32 : Chromatogramme illustrant la stabilité d'une colonne monolithique à base de BMA/EGDMA durant une série successive d'injections d'un mélange de Rubonuclease A (pic 1), Cytochrome C (pic 2) et Myoglobine (pic 3) [42].

Les phases d'échange d'ions sont préparées à partir de monomères présentant un groupement chargé comme les groupements ammonium quaternaire ou par modification des supports

monolithiques à base de monomères réactifs. En conséquence, les monolithes ont été utilisés pour des séparations de macromolécules tels que les peptides [43], les protéines [44], les oligonucléotides [45,46,47] et des petites molécules organiques [48]. Les propriétés hydrodynamiques et la grande souplesse de ces matériaux en termes de fonctionnalité leur ont permis d'être utilisées dans d'autres types de séparation comme les séparations en phase normale [49,50] ou celles basées sur l'affinité [51,52,53], dédiée à la purification des anticorps [54], des protéines comportant des résidus histidine [55] ou des phosphopeptides [56].

3.1.2. Phases stationnaires pour l'électrochromatographie capillaire

L'électrochromatographie capillaire est une technique séparative électrocinétique. Un champ électrique est appliqué sur un capillaire comportant une phase stationnaire présentant des charges de surface. La phase stationnaire est responsable de la rétention des solutés en développant des interactions avec ces derniers. Tandis que le champ électrique et les charges de surface permet le déplacement de la phase mobile comme en électrophorèse. Le flux électroosmotique a un front d'écoulement plat. Le développement de phases monolithiques stationnaires pour la chromatographie capillaire est basé sur des monomères chargés, l'AMPS [30] ou l'acide vinylsulfonique [57] ou le sulfate de 2-(acryloyloxy)-éthyltriméthylammonium méthyl. [58]

3.2. Bioréacteur de digestion enzymatique

Du fait de la présence des macropores et du faible résistance au transfert de masse observée sur les supports monolithiques, ces derniers sont utilisés comme supports de bioréacteurs de digestion enzymatiques [59]. Ils sont préparés à base de monomères fonctionnels contenant des groupements réactifs qui réagissent de manière covalente avec les fonctions amines, largement présentes sur la périphérie de l'enzyme afin qu'elle soit immobilisée sur le support monolithique. Deux grandes alternatives basées sur des monomères méthacrylates sont utilisées. La première consiste à utiliser le GMA, un monomère possédant un cycle époxy qui, par ouverture du cycle, réagit directement avec un groupement amine en une seule étape dans des conditions douces [60]. La deuxième alternative est basée sur le HEMA comportant un groupement hydroxyle. La procédure de greffage est réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, l'hydroxyle est oxydé en carboxyle, qui après activation réagit avec un groupement amine de l'enzyme [61].

3.3. Applications en microfluidique

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

Cette dernière décennie est marquée par une tendance à la miniaturisation des outils de laboratoire incluant différentes étapes de l'analyse, notamment le traitement de l'échantillon et la séparation. Cette tendance à la miniaturisation est principalement motivée, d'une part, par le gain à attendre en terme de vitesse et de débit d'analyse et en terme d'optimisation des analyses. Un haut débit d'analyse est à espérer du fait de la suppression de manipulation intense pour et entre les différentes étapes et également d'une automatisation des analyses avec l'utilisation d'une interface robotisée qui manipule les systèmes. Par ailleurs, cette miniaturisation s'accompagne d'un gain en sensibilité des analyses. D'autre part, par les très faibles volumes d'échantillons biologiques disponibles (protéines, cellules, tissus...) et le coût de certains réactifs (anticorps, enzymes...).

De plus, les avantages présentés par les monolithes en microfluidique par rapport aux autres technologies classiques, qui se résument à la facilité de préparation, l'absence de frittés et la possibilité d'un contrôle spatial de la formation du monolithe dans un endroit prédéterminé lors d'une polymérisation radicalaire initiée par voie photochimique en utilisant des masques. Un autre point fort des supports monolithiques réside dans le fait que les propriétés finales de la structure poreuse ainsi que sa fonctionnalité sont ajustables en fonction de l'application désirée. Ces avantages et propriétés ont fait, des matériaux monolithiques un support de choix pour la préparation des phases dans le contexte microfluidique.

3.3.1. Mélangeur

L'une des applications originales des matériaux monolithiques consiste à la réalisation d'un mélangeur dans un microsystème [62].

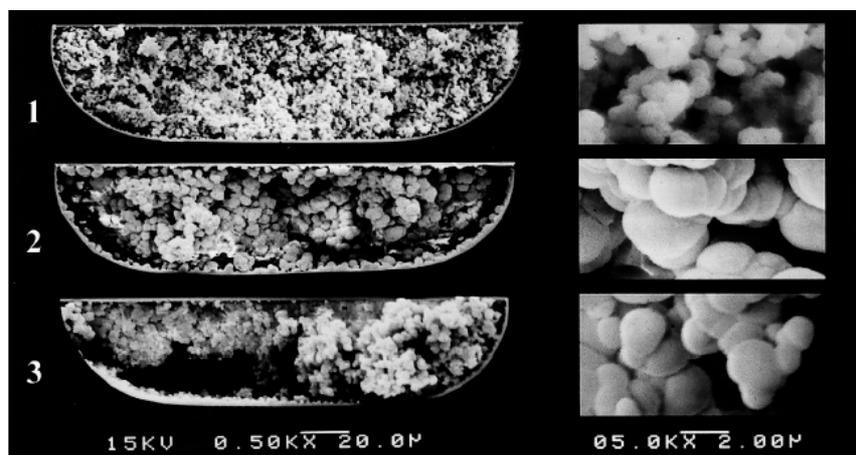


Figure 1.33 : Photographies de microscopie électronique à balayage (MEB), d'un mélangeur monolithique préparé à partir de trois différents mélanges réactionnels [62].

La structure poreuse du monolithe utilisé permet de créer un écoulement turbulent à l'intérieur des canaux du microsystème pour effectuer le mélange. Pour ce type d'applications, la porosité totale atteint 95 % en volume afin de diminuer au maximum la résistance à l'écoulement des fluides à travers le matériau.

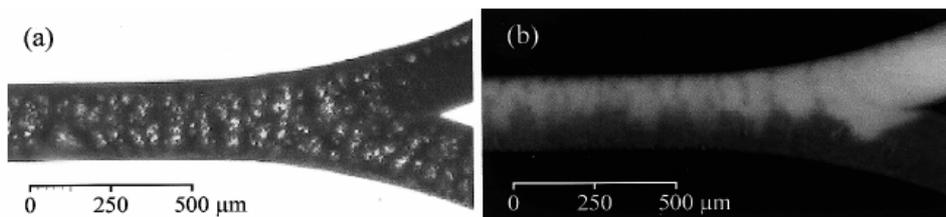


Figure 1.34 : Photographie optique : (a) d'un monolithe à l'intérieur d'un microcanal et (b) d'un flux irrégulier de deux solutions contenant un marqueur fluorescent à l'intérieur de ce mélangeur [62].

3.3.2. Phase de SPE et microréacteur enzymatique

L'utilisation majeure de l'extraction en phase solide est le dessalage et la purification de solution d'analytes. Le principe de cette technique repose sur la rétention sélective des analytes pour les libérer ultérieurement en solution plus concentrée. La préparation de tel module dans un microsystème est réalisée avec des matériaux monolithiques [56,59] grâce à leurs propriétés hydrodynamiques qui les rendent parfaitement adaptés aux applications d'extraction en phase solide.

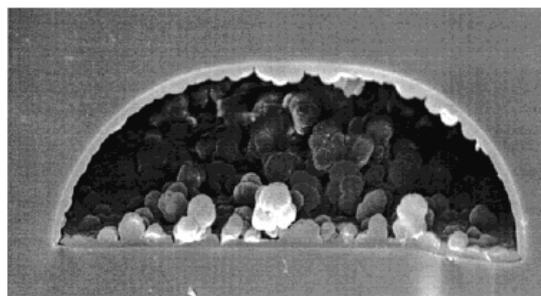


Figure 1.35 : Image microscopie électronique à balayage (MEB), d'un concentrateur par échange d'ions basé sur un support monolithique [63].

Cependant, les microréacteurs de digestion enzymatique intégrés sur le microsystème utilisent des monomères méthacrylates de façon indirecte. Les supports monolithiques sont préparés à partir d'un mélange réactionnel composé de HEMA/EGDMA contenant 8 % en masse de 2-vinyl-4,4-diméthylazlactone [64], comportant un groupement azalactone très réactif, qui

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

réagit rapidement avec les fonctions amines ou thiols des protéines pour un greffage covalent de ces dernières.

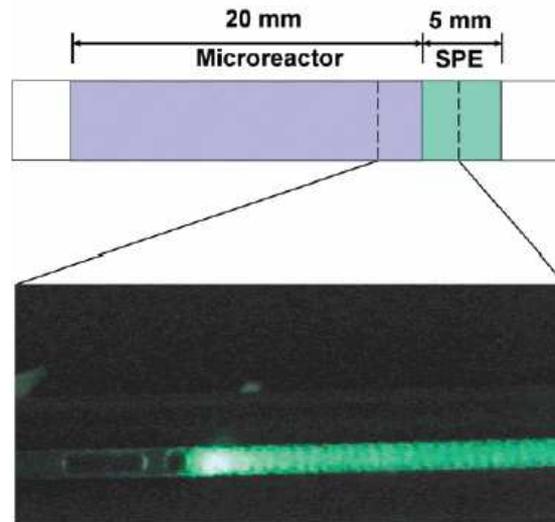


Figure 1.36 Schéma et image de microscopie par fluorescence d'un module mixte de digestion-SPE base sur un support monolithique pour la digestion de la caséine marquée et la capture de peptides fluorescents. Conditions: chargement de 5 μL d'une solution de caséine marquée à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans 50 mmol/L d'un tampon Tris (pH 8.0) à un débit de 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ suivi par un lavage du monolithe avec 10 μL avec la solution Tris [56].

C. LA CHROMATOGRAPHIE HPLC EN MODE GRADIENT

INTRODUCTION :

La chromatographie liquide haute performance est un outil de séparation et d'analyse très puissant. L'élution est réalisée à l'aide d'une phase mobile de composition fixe, c'est la forme la plus simple de la chromatographie liquide, dite séparation en mode isocratique. L'utilisation de ce mode permet de séparer tous les composés d'un échantillon tels que les mélanges de protéines ou de peptides issus d'une digestion enzymatique.

L'un des problèmes les plus rencontrés dans la chromatographie liquide en mode isocratique est que, l'utilisation d'une phase mobile de composition fixe ne permet pas d'obtenir une séparation efficace de certains échantillons complexes dont les facteurs de rétention sont très différents. De plus, lorsque les échantillons sont constitués de plus de 20 composés, l'utilisation d'une phase mobile de composition fixe ne donne plus une séparation efficace.

Ces problèmes de séparation sont en général résolus en utilisant un gradient d'élution. Dans ce mode chromatographique de séparation, les échantillons sont élués avec une phase mobile de composition variable en fonction du temps.

L'exemple suivant, issu d'une simulation par ordinateur, illustre bien les problèmes rencontrés lors de la séparation en mode isocratique d'un mélange de neuf herbicides de facteurs de rétention très différents. La séparation du mélange en mode isocratique n'a pas été efficace, voir Figures 1.37. L'utilisation d'une phase mobile à 50 % en acétonitrile a conduit à l'élargissement des derniers pics et à augmenter leurs temps de rétention. Par conséquent, le temps de l'analyse est devenu très long. L'utilisation d'une phase mobile à 70 % d'acétonitrile a permis de remédier à ces deux problèmes. Cependant, les pics 1-3 ne sont pas bien séparés. En conclusion, l'utilisation d'une phase mobile de composition fixe reste incapable de produire une bonne séparation.

L'une des solutions utilisées pour éviter ces problèmes de séparation était l'élution par étape introduite par Tswett.

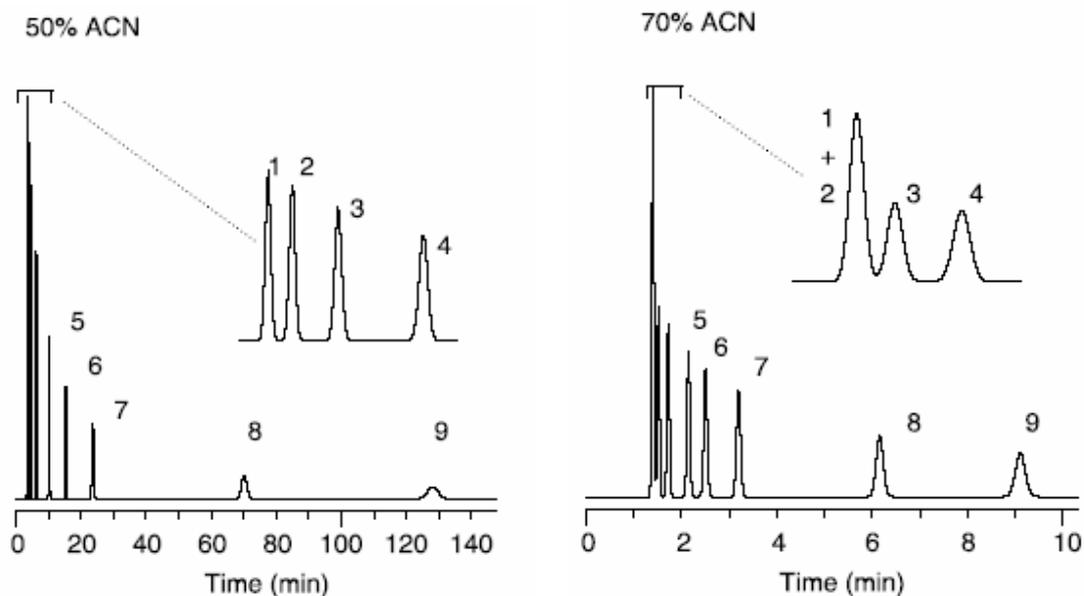


Figure 1.37 : Elution isocratique avec une phase mobile Eau-Acétonitrile ; colonne C18 (diamètre de particules 5 μ m) 150 \times 4,6 mm, 2 mL/min. A gauche 50 % d'acétonitrile et à droite 70 %.

Dans l'exemple précédent, la séparation peut commencer avec une phase mobile qui contient 50 % d'acétonitrile conduisant ainsi à une meilleure séparation des premiers pics 1-3. Ensuite, le pourcentage d'acétonitrile doit être augmenté à 70 % afin de réaliser une séparation rapide des composés qui restent, voir Figure Figure 1.38.

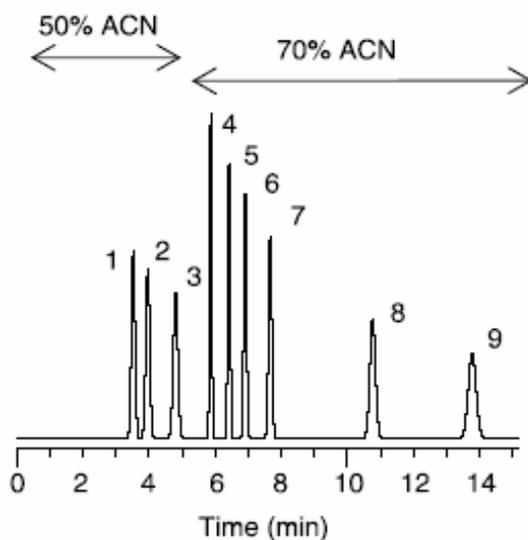


Figure 1.38 : Elution par étape avec, au début, une phase mobile Eau-Acétonitrile (50/50) et ensuite une phase mobile Eau-Acétonitrile (30/70) ; colonne C18 (diamètre de particules 5 μ m) 150 \times 4,6 mm, 2 mL/min.

Bien que l'éluion par étapes ait permis de résoudre le problème de séparation, cette solution reste partielle, étant donné que le chromatogramme révèle des différences considérables de

largeurs des pics. De plus, pour de nombreux échantillons, la séparation par élution en deux étapes présente une partie des problèmes mentionnés dans le mode isocratique.

Cependant, l'utilisation d'une phase mobile dont la composition varie de manière continue, dite élution par gradient, permet de pallier la totalité de ces problèmes. La Figure 1.39 représente le chromatogramme obtenu lors de la séparation du même mélange. Les pics sont bien séparés durant le temps de l'analyse, ce dernier n'a pas dépassé les 7 min.

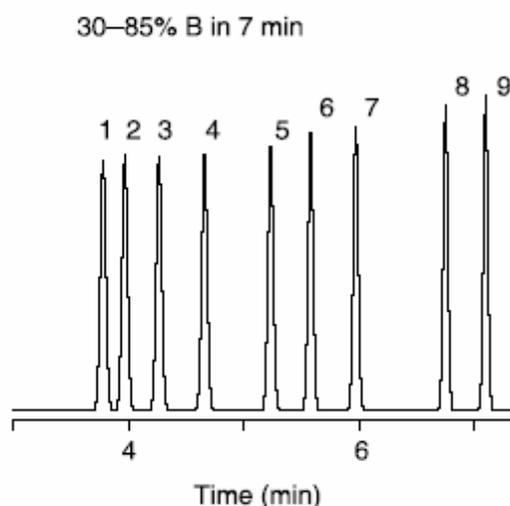


Figure 1.39 : Elution par gradient 30 :80 d'acétonitrile d'une phase mobile Eau-Acétonitrile ; colonne C18 (diamètre de particules 5 μ m) 150 \times 4,6 mm, 2 mL/min.

I. L'élution par gradient :

Il existe des procédés expérimentaux de plusieurs paramètres dont la modification permet de séparer les composés d'un échantillon, ce dernier est constitué de composés possédant des facteurs de rétention très éloignés, autres que le changement de la force d'élution de la phase mobile. Ces procédures expérimentales constituent une alternative au mode d'élution par gradient.

L'augmentation de la température [65] de la colonne durant la séparation en HPLC, dite aussi programmation de température, conduit à la réduction du temps de rétention et à la séparation des échantillons de facteurs de rétention très éloignés dans des intervalles de temps raisonnables. Cependant, cette méthode est rarement utilisée en HPLC. L'une des limitations majeures qui empêche son utilisation est la réponse relativement lente de la diffusion de la température à l'intérieur de la colonne pour atteindre la température fixée par l'utilisateur. Ceci ne permet pas d'avoir des données reproductibles fiables dans les analyses de courte

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

durée. Toutefois, notons que la programmation de température s'avère très efficace dans le cas de la chromatographie en phase gazeuse. Son effet est comparable à celui du changement de la force d'élution de la phase mobile en HPLC.

D'autres alternatives moins utilisées permettent de résoudre plus ou moins les problèmes d'élution, à savoir la programmation du débit [66], et le changement des colonnes. La première alternative consiste à augmenter le débit de la phase mobile pendant la séparation. Cette augmentation est accompagnée par une très forte élévation de la pression, ce qui rend cette alternative difficile à mettre en œuvre. La deuxième alternative, nécessite le transfert des fractions de l'échantillon d'une colonne à une autre lors des expériences de séparation. Cette méthode est très compliquée car elle cause des pertes de l'échantillon.

II. Les avantages de l'élution par gradient :

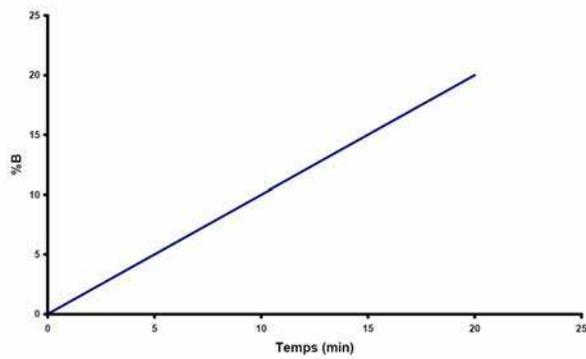
L'apport de la chromatographie HPLC en mode gradient ne se limite pas à la résolution des problèmes de l'élution. Il existe d'autres applications où cette technique s'avère meilleure. Par exemple, la séparation chromatographique HPLC en mode isocratique des composés tels que les polymères synthétiques et les macromolécules biologiques est très difficile. Ceci est dû au fait que la rétention de ces composés est très sensible aux faibles changements de la force d'élution de la phase mobile [67].

Pendant la séparation en mode isocratique, il y a certains composés qui sortent de la colonne sans séparation, et dans le cas d'une séparation lente d'autres composés ne sortent jamais. Dans cet exemple, le mode gradient garantit une séparation rapide et effective tout en évitant les problèmes de reproductibilité rencontrés en mode isocratique.

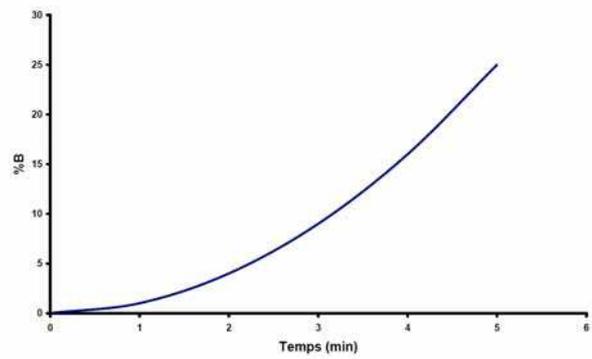
Aussi, pour développer une méthode efficace pour la séparation des composés de n'importe quel échantillon, l'idéal est de réaliser une ou plusieurs séparation en mode gradient afin d'obtenir facilement le meilleur pourcentage de la phase organique dans la phase mobile (% B) pour une séparation en mode isocratique.

Toutefois, il est important de signaler que dans le cas de séparation en mode gradient la queue du pic, observée lors des analyses en mode isocratique, est diminuée. En effet, l'augmentation de la force d'élution de la phase mobile en fonction du temps crée un gradient dans la bande d'élution. La queue du pic se déplace avec une vitesse plus grande que celle du front, causant ainsi une décompression du pic. Ce dernier présente une forme plus symétrique. Il existe différents types de gradient, selon la manière avec laquelle le pourcentage de l'éluant le plus

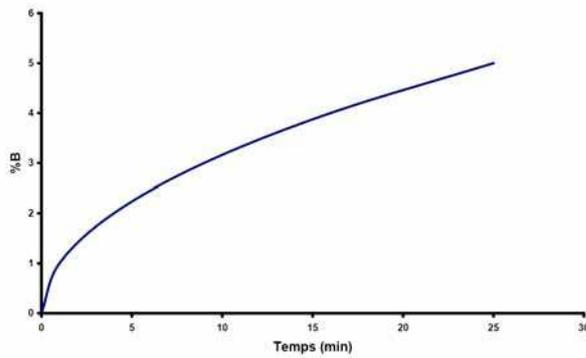
fort varie en fonction du temps. La figure 1.40 On définit en général six formes de gradients les plus utilisés.



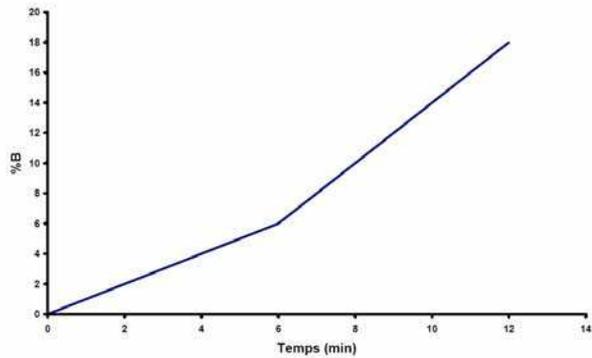
Linéaire



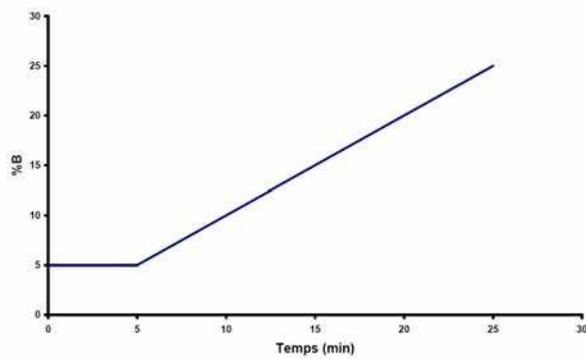
Concave



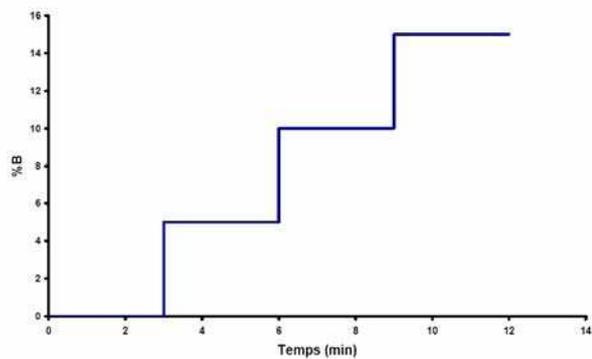
Convexe



Segmenté



Gradient retardé



Gradient par étapes

Figure 1.40 : Les différentes formes du gradient, obtenues en traçant % B en fonction du temps.

III. Le modèle LSS (force éluante du solvant) :

Durant tout le reste de cette partie, nous allons étudier le gradient linéaire. La gamme du gradient est : $\Delta\varphi = \varphi_f - \varphi_0$, % B_0 ou φ_0 : pourcentage initial ou fraction volumique initiale de l'éluant le plus fort. % B_f ou φ_f : pourcentage final ou fraction volumique finale de l'éluant le plus fort. Le programme du gradient décrit le changement de la composition de la phase mobile en fonction du temps durant le temps du gradient.

1. En mode isocratique

Il existe une relation empirique qui décrit la variation du facteur de rétention en fonction du pourcentage du solvant organique dans la phase mobile [68].

$$\log k = a - b(\%B) \quad (1.1)$$

Cette relation est le plus souvent représentée par :

$$\log k = \log k_w - S\varphi \quad (1.2)$$

S est une constante positive pour un composé donné dans des conditions expérimentales fixées. k_w est l'extrapolation de la valeur de k pour $\varphi = 0$, dans le solvant le plus faible, pur, qui est dans la plus part des cas, l'eau.

2. En mode gradient :

En mode gradient % B varie en fonction du temps % $B = f(t)$. Dans le cas d'un gradient linéaire, le pourcentage de B peut s'écrire sous la forme suivante : % $B = c + dt$. D'où :

$$\log k = \log k_a - b_s \frac{t}{t_m} \quad (1.3)$$

Cette équation décrit la variation de la rétention k en fonction du temps écoulé depuis le début du gradient. Avec k_a , la valeur de la rétention au début du gradient, t_m , le temps mort de la colonne et b_s , la raideur intrinsèque du gradient, elle permet de déterminer le taux de variation de $\log k$ en fonction du volume de la phase mobile qui traverse la colonne.

$$b_s = \frac{\text{changement de } \log k}{\text{nombre de volume de colonne}} \quad (1.4)$$

En remplaçant chaque expression avec sa valeur, la relation (1.4) devient :-

$$b_s = \frac{S\Delta\varphi}{V_G/V_m} \quad (1.5)$$

V_m est le volume mort de la colonne, V_G est le volume total de la phase mobile qui traverse la colonne pendant le temps du gradient t_G . D'où :

$$b_s = \frac{t_m S \Delta\varphi}{t_G} \quad (1.6)$$

Avec $t_m = \frac{V_m}{D}$, D est le débit de la phase mobile. Le remplacement de t_m avec son expression dans la relation (1.6) donne :

$$b_s = \frac{V_m S \Delta\varphi}{t_G D} \quad (1.7)$$

La valeur de S en chromatographie liquide phase inverse pour les composés de masse moléculaire entre 100 et 400 Da est de $S \approx 4$. Cependant, la valeur de S augmente avec la masse moléculaire [69,70]. La figure 1.41 présente la variation de S en fonction de la masse moléculaire M .

D'une manière générale, d'après la figure 1.41, la valeur de S peut être calculée approximativement à partir de la relation suivante :

$$S = \sqrt{\text{masse moléculaire}} \quad (1.8)$$

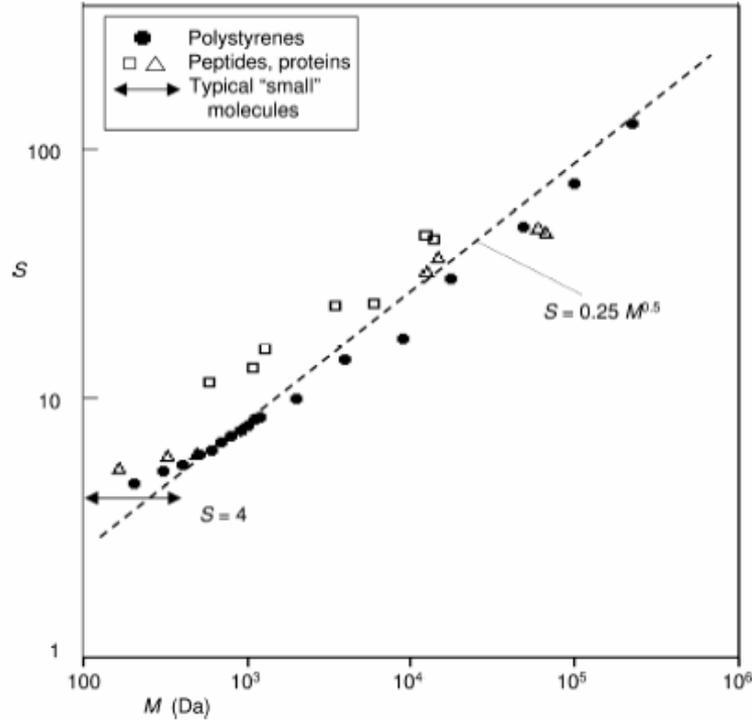


Figure 1.41 : valeur expérimentale de S pour des peptides (\square), des protéines (Δ) et du polystyrène (\bullet) en fonction du poids moléculaire de l'échantillon la courbe est en (log-log plot) [71]

3. La rétention dans une élution par gradient :

La largeur du pic est déterminée avec la valeur de k à l'élution, notée k_e .

Le facteur de rétention apparente du gradient k_G est déterminé de la manière suivante [70,72]:

$$k_G = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad (1.9)$$

Avec t_R , le temps de rétention du composé considéré et t_m le temps mort de la colonne. Ce facteur de rétention en mode gradient est relié aux conditions expérimentales avec l'équation suivante [69,73]:

$$k_G = \frac{1}{b_s} \log(1 + b_s k_w) \quad (1.10)$$

La rétention et la résolution dans un gradient dépendent de la valeur médiane de k notée k^* .

k^* est la valeur de k lorsque la bande a parcouru la moitié de la colonne.

$$k^* = \frac{1}{1,15 b_s} \quad (1.11)$$

En remplaçant la raideur intrinsèque du gradient par sa valeur dans la relation (1.11) on obtient :

$$k^* = \frac{87 t_G D}{V_m S \Delta(\%B)} \quad (1.12)$$

A partir de la relation précédente nous pouvons déterminer la valeur du facteur de rétention à l'élution k_e .

$$k_e = \frac{k^*}{2} \quad (1.13)$$

Le temps de rétention t_R pour un pic donné dans une séparation en mode gradient, peut être déduit du modèle LSS en mode gradient :

$$t_R = \frac{t_m}{b_s} \log(2,3 k_a b_s + 1) + t_m \quad (1.14)$$

La valeur de k^* permet de déterminer, au moment de l'élution, la résolution et la largeur du pic.

IV. Evaluation des performances de séparation en mode gradient :

Pour les expériences de chromatographie phase inverse en mode gradient, il existe un concept qui est plus simple et très pratique pour déterminer les performances de séparation : la capacité du pic P_c . Cette dernière est définie pour une colonne comme étant le nombre maximum de bandes qui peuvent être séparées à un degré de résolution souhaité [74]. Elle peut être calculée à partir de la relation suivante [75] :

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

$$P_C = \left(\frac{t_G}{w_b} \right) + 1 \quad (1.15)$$

Dans cette relation, t_G désigne le temps du gradient et w_b la largeur du pic à la base. En acceptant l'approximation qui stipule que les pics sont gaussiens, la relation (3.15) peut s'écrire sous la forme suivante :

$$P_C = \left(\frac{t_G}{1,699 \delta} \right) + 1 \quad (1.16)$$

Avec δ , la largeur à mi-hauteur du pic. Notons que dans les expériences de séparation en mode gradient, les pics ont presque les mêmes largeurs. Ceci peut être constaté dans les relations (3.15) et (3.16).

Cependant, il existe d'autres types de capacité du pic [76] que nous allons définir par la suite. On désigne par la capacité du pic maximale P_{Cmax} , la valeur de la capacité du pic obtenue pour une gamme totale de gradient (de 0 à 100 % du solvant le plus fort). Pour un gradient partiel $\Delta\phi$ la capacité du pic est obtenue par la relation suivante :

$$P_C = \Delta\phi \times P_{Cmax} \quad (1.17)$$

Nous définissons la capacité de pic d'un échantillon entier de la manière suivante :

$$P_C^{**} = (t_z - t_a) / W \quad (1.18)$$

Avec t_z le temps de rétention du dernier composé et t_a celui du premier composé de l'échantillon.

La largeur du pic est quasi constante pour les différents pics d'un échantillon analysé en mode gradient, elle est donnée par une relation similaire à celle en mode isocratique :

$$W \approx 4\sqrt{N^{-1}t_m(1+0,5k^*)} \quad (1.20)$$

Etant donné que $k^* = 2 \times k_e$, la relation (1.20) devient :

$$N = 16 \times \left(\frac{t_m(1+k_e)}{W} \right)^2 \quad (1.21)$$

Cette expression sert à déterminer la valeur du nombre de plateaux théoriques de la colonne dans une séparation en mode gradient. Dans l'approximation des pics gaussiens la relation (1.21) s'écrit sous la forme suivante :

$$N = 16 \times \left(\frac{t_m(1+k_e)}{1,699\delta} \right)^2 \quad (1.22)$$

Références Bibliographiques

- [1] Anderson, N. G.; Anderson, N. L. A policy and program for biotechnology. *American biotechnology laboratory* **1985**.
- [2] Goffeau, A.; Barrell, B. G.; Bussey, H.; Davis, R. W.; Dujon, B.; Feldmann, H.; Galibert, F.; Hoheisel, J. D.; Jacq, C.; et al. Life with 6000 genes. *Science (Washington, D. C.)* **1996**, *274*, 546, 563-567.
- [3] Hernandez, Patricia; Muller, Markus; Appel, Ron D. Automated protein identification by tandem mass spectrometry: issues and strategies. *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, *25*, 235-254.
- [4] Lottspeich, Friedrich. Proteome analysis: a pathway to the functional analysis of proteins. *Angewandte Chemie, International Edition* **1999**, *38*, 2476-2492.
- [5] Thomas, A. Sellers; John, R. Yates. Review of proteomics with applications to genetic epidemiology. *Genetic Epidemiology* **2003**, *24*, 83-98.
- [6] Link, Andrew J.; Eng, Jimmy; Schieltz, David M.; Carmack, Edwin; Mize, Gregory J.; Morris, David R.; Garvik, Barbara M.; Yates, John R., III. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnology* **1999**, *17*, 676-682.
- [7] Aebersold, Ruedi; Goodlett, David R. Mass spectrometry in proteomics. *Chemical Reviews (Washington, D. C.)* **2001**, *101*, 269-295.
- [8] Gygi, Steven P.; Rist, Beate; Gerber, Scott A.; Turecek, Frantisek; Gelb, Michael H.; Aebersold, Ruedi. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* **1999**, *17*, 994-999.
- [9] Ong, Shao-En; Blagoev, Blagoy; Kratchmarova, Irina; Kristensen, Dan Bach; Steen, Hanno; Pandey, Akhilesh; Mann, Matthias. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics* **2002**, *1*, 376-386.
- [10] Mirgorodskaya, Olga A.; Kozmin, Yuri P.; Titov, Mikhail I.; Korner, Roman; Sonksen, Carsten P.; Roepstorff, Peter. Quantitation of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ¹⁸O-labeled internal standards. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14*, 1226-1232.
- [11] Heller, Manfred; Mattou, Hassan; Menzel, Christoph; Yao, Xudong. Trypsin catalyzed ¹⁶O-to-¹⁸O exchange for comparative proteomics: tandem mass spectrometry comparison using MALDI-TOF, ESI-QTOF, and ESI-ion trap mass spectrometers. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *14*, 704-718.
- [12] Gerber, Scott A.; Rush, John; Stemman, Olaf; Kirschner, Marc W.; Gygi, Steven P. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 6940-6945.
- [13] Lescuyer, Pierre; Chevallet, Mireille; Rabilloud, Thierry. L'analyse protéomique: concepts, réalités et perspectives en thérapeutique. *Médecine Sciences* **2004**, *20*.
- [14] Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 820-822.

- [15] Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. New designs of macroporous polymers and supports: from separation to biocatalysis. *Science (Washington, D. C.)* **1996**, 273, 205-211.
- [16] Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of "Molded" Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations or Catalysis. *Chemistry of Materials* **1995**, 7, 707-715.
- [17] Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Temperature, a Simple and Efficient Tool for the Control of Pore Size Distribution in Macroporous Polymers. *Macromolecules* **1995**, 28, 7580 - 7582.
- [18] Premstaller, Andreas; Oberacher, Herbert; Huber, Christian G. High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Single- and Double-Stranded Nucleic Acids Using Monolithic Capillary Columns. *Analytical Chemistry* **2000**, 72, 4386-4393.
- [19] Oberacher, Herbert; Huber, Christian G. Capillary monoliths for the analysis of nucleic acids by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **2002**, 21, 166-174.
- [20] Walcher, Wolfgang; Toll, Hansjoerg; Ingendoh, Arnd; Huber, Christian G. Operational variables in high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of peptides and proteins using poly(styrene-divinylbenzene) monoliths. *Journal of Chromatography, A* **2004**, 1053, 107-117.
- [21] Gusev, I.; Huang, X.; Horvath, C. Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. *Journal of chromatography, A* **1999**, 855, 273-290.
- [22] Xiong, Bohui; Zhang, Lihua; Zhang, Yukui; Zou, Hanfa; Wang, Junde. Capillary electrochromatography with monolithic poly(styrene-co-divinylbenzene-co-methacrylic acid) as the stationary phase. *Journal of High Resolution Chromatography* **2000**, 23, 67-72.
- [23] Li, Y. M.; Liao, J. L.; Nakazato, K.; Mohammad, J.; Terenius, L.; Hjerten, Stellan. Continuous beds for microchromatography: cation-exchange chromatography. *Anal Biochem FIELD Full Journal Title:Analytical biochemistry* **1994**, 223, 153-158.
- [24] Ericson, Christer; Liao, Jia-Li; Nakazato, Ken'ichi; Hjerten, Stellan. Preparation of continuous beds for electrochromatography and reversed-phase liquid chromatography of low-molecular-mass compounds. *Journal of Chromatography, A* **1997**, 767, 33-41.
- [25] Maruska, Audrius; Ericson, Christer; Vegvari, Akos; Hjerten, Stellan. (Normal-phase) capillary chromatography using acrylic polymer-based continuous beds. *Journal of Chromatography, A* **1999**, 837, 25-33.
- [26] Liao, J. L.; Li, Y. M.; Hjerten, S. Continuous beds for microchromatography: reversed-phase chromatography. *Analytical biochemistry* **1996**, 234, 27-30.
- [27] Peters, Eric C.; Lewandowski, Kevin; Petro, Miroslav; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Chiral electrochromatography with a 'molded' rigid monolithic capillary column. *Analytical Communications* **1998**, 35, 83-86.
- [28] Peters, Eric. C.; Petro, M.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 1. Fine control of porous properties and surface chemistry. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 2288-2295.

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

- [29] Peters, Eric C.; Petro, Miroslav; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 2. Effect of chromatographic conditions on the separation. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 2296-2302.
- [30] Peters, Eric C.; Petro, Miroslav; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 3646-3649.
- [31] Meyer, Ulrika; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J.; Hawker, Craig J.; Irgum, Knut. Use of Stable Free Radicals for the Sequential Preparation and Surface Grafting of Functionalized Macroporous Monoliths. *Macromolecules* **2000**, *33*, 7769-7775.
- [32] Viklund, Camilla; Nordstroem, Anders; Irgum, Knut; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Preparation of Porous Poly(styrene-co-divinylbenzene) Monoliths with Controlled Pore Size Distributions Initiated by Stable Free Radicals and Their Pore Surface Functionalization by Grafting. *Macromolecules* **2001**, *34*, 4361-4369.
- [33] Peters, Eric C.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J.; Viklund, Camilla; Irgum, Knut. Control of Porous Properties and Surface Chemistry in "Molded" Porous Polymer Monoliths Prepared by Polymerization in the Presence of TEMPO. *Macromolecules* **1999**, *32*, 6377-6379.
- [34] Viklund, Camilla; Nordstroem, Anders; Irgum, Knut; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Preparation of Porous Poly(styrene-co-divinylbenzene) Monoliths with Controlled Pore Size Distributions Initiated by Stable Free Radicals and Their Pore Surface Functionalization by Grafting. *Macromolecules* **2001**, *34*, 4361-4369.
- [35] Schmittel, Michael; Ruechardt, Christoph. Aliphatic azo compounds. XVI. Stereoisomerization and homolytic decomposition of cis and trans bridgehead diazenes. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, 2750-2759.
- [36] Moad, Graeme; Solomon, David H.; Johns, Stanley R.; Willing, Richard I. Fate of the initiator in the azobisisobutyronitrile-initiated polymerization of styrene. *Macromolecules* **1984**, *17*, 1094-1099.
- [37] Sherrington, D. C.; Hodge, P. *Syntheses and separation using functional polymers. Vol. 1*, John Wiley and Sons Ltd., **1988**.
- [38] Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of "Molded" Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations or Catalysis. *Chemistry of Materials* **1995**, *7*, 707-715.
- [39] Pavel, Coufal; Martin, Cihak; Jana, Suchankova; Eva, Tesarova; Zuzana, Bosakova; Karel, Stulik. Methacrylate monolithic columns of 320 mm I.D. for capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A* **2002**, *946*, 99-106.
- [40] Xin, Shu; Lingxin, Chen; Bingcheng, Yang; Yafeng, Guan. Preparation and characterization of long methacrylate monolithic column for capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A* **2004**, *1052*, 205-209.
- [41] Yuji, Ueki; Tomonari, Umemura; Yoshikazu, Iwashita; Tamao, Otake; Hiroki, Haraguchi; Kin-ichi, Tsunoda. Preparation of low flow-resistant methacrylate-based monolithic stationary phases of different hydrophobicity and the application to rapid reversed-phase liquid chromatographic separation of alkylbenzenes at high flow rate and elevated temperature. *Journal of Chromatography, A* **2006**, *1106*, 106-111.

- [42] Laurent, Geiser; Eeltink, Sebastiaan; Svec, Frantisek; Jean, M.J., Frechet. Stability and repeatability of capillary columns based on porous monoliths of poly(butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate). *Journal of Chromatography, A* **2007**, *1140*, 140-146.
- [43] Wang, Q. C.; Svec, F.; Frechet, J. M. Reversed-phase chromatography of small molecules and peptides on a continuous rod of macroporous poly(styrene-co-divinylbenzene). *Journal of chromatography. A* **1994**, *669*, 230-235.
- [44] Wang, Q. C.; Svec, F.; Frechet, J. M. Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for reversed-phase chromatography. *Analytical chemistry* **1993**, *65*, 2243-2248.
- [45] Premstaller, Andreas; Oefner, Peter J.; Oberacher, Herbert; Huber, Christian G. Capillary Array High-Performance Liquid Chromatography of Nucleic Acids and Proteins. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 4688-4693.
- [46] Podgornik, Ales; Barut, Milos; Jancar, Janez; Strancar, Ales. Isocratic separations on thin glycidyl methacrylate-ethylenedimethacrylate monoliths. *Journal of Chromatography, A* **1999**, *848*, 51-60.
- [47] Sykora, David; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Separation of oligonucleotides on novel monolithic columns with ion-exchange functional surfaces. *Journal of Chromatography, A* **1999**, *852*, 297-304.
- [48] Bedair, Mohamed; El Rassi, Ziad. Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases: 1. Preparation of sulfonated stearyl acrylate monoliths and their electrochromatographic characterization with neutral and charged solutes. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2938-2948.
- [49] Xu, Mingcheng; Peterson, Dominic S.; Rohr, Thomas; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Polar polymeric stationary phases for normal-phase HPLC based on monodisperse macroporous poly(2,3-dihydroxypropyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) beads. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 1011-1021.
- [50] Xie, Shaofeng; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Preparation of porous hydrophilic monoliths: Effect of the polymerization conditions on the porous properties of poly(acrylamide-co-N,N'-methylenebisacrylamide) monolithic rods. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **1997**, *35*, 1013-1021.
- [51] Pan, Zaifa; Zou, Hanfa; Mo, Weimin; Huang, Xiaodong; Wu, Renan. Protein A immobilized monolithic capillary column for affinity chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *466*, 141-150.
- [52] Hahn, R.; Podgornik, A.; Merhar, M.; Schallaun, E.; Jungbauer, A. Affinity monoliths generated by in situ polymerization of the ligand. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5126-5132.
- [53] Luo, Quanzhou; Zou, Hanfa; Zhang, Qiang; Xiao, Xiangzhu; Ni, Jianyi. High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, *80*, 481-489.
- [54] Xie, S.; Svec, F.; Frechet, Jean M. J. Monolithic poly(2-vinyl-4,4-dimethylazlactone-co-acrylamide-co-ethylene dimethacrylate) support for design of high throughput bioreactors. *Book of Abstracts, 214th ACS National Meeting, Las Vegas, NV, September 7-11* **1997**, POLY-065.
- [55] Jain, Seema Rani; Borowska, Ewa; Davidsson, Richard; Tudorache, Madalina; Ponten, Einar; Emneus, Jenny. A chemiluminescence flow immunosensor based on a porous

Chapitre I : Bibliographie Générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

monolithic methacrylate and polyethylene composite disc modified with Protein G. *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, *19*, 795-803.

[56] Yu, Cong; Xu, Mingcheng; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Preparation of monolithic polymers with controlled porous properties for microfluidic chip applications using photoinitiated free-radical polymerization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **2002**, *40*, 755-769.

[57] Liao, Jia-Li; Chen, Nong; Ericson, Christer; Hjerten, Stellan. Preparation of Continuous Beds Derivatized with Alkyl and Sulfonate Groups for Capillary Electrochromatography. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 3468-3472.

[58] Ngola, Sarah M.; Fintschenko, Yolanda; Choi, Wen-Yee; Shepodd, Timothy J. Conduct-as-cast polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 849-856.

[59] Ponten, Einar; Viklund, Camilla; Irgum, Knut; Bogen, Stein Tore; Lindgren, Aasa Nson. Solid Phase Chemiluminescence Detection Reactors Based on in Situ Polymerized Methacrylate Materials. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 4389-4396.

[60] Petro, Miroslav; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Immobilization of trypsin onto "molded" macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* **1996**, *49*, 355-363.

[61] Bahar, Tahsin; Tuncel, Ali. Immobilization of α -chymotrypsin onto newly produced poly(hydroxypropyl methacrylate-co-methacrylic acid) hydrogel beads. *Reactive & Functional Polymers* **2000**, *44*, 71-78.

[62] Rohr, Thomas; Yu, Cong; Davey, Mark H.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Porous polymer monoliths: simple and efficient mixers prepared by direct polymerization in the channels of microfluidic chips. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3959-3967.

[63] Yu, Cong; Davey, Mark H.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Monolithic porous polymer for on-chip solid-phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5088-5096.

[64] Peterson, Dominic S.; Rohr, Thomas; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Dual-function microanalytical device by in situ photolithographic grafting of porous polymer monolith: Integrating solid-phase extraction and enzymatic digestion for peptide mass mapping. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 5328-5335.

[65] Greibrokk, Tyge; Andersen, Thomas. High-temperature liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A* **2003**, *1000*, 743-755.

[66] Aitzetmuller, Kurt. Flow gradients in the HPLC analysis of triacylglycerols in fats and oils. *Journal of High Resolution Chromatography* **1990**, *13*, 375-377.

[67] Quarry, M. A.; Grob, R. L.; Snyder, L. R. Prediction of precise isocratic retention data from two or more gradient elution runs. Analysis of some associated errors. *Analytical Chemistry* **1986**, *58*, 907-917.

[68] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. *Practical HPLC Method Development*, Wiley-Interscience: New York, 1997.

[69] Jandera, Pavel. Gradient elution in liquid column chromatography-prediction of retention and optimization of separation. *Advances in Chromatography (New York, NY, United States)* **2005**, *43*, 1-108.

- [70] Neue, Uwe D. Theory of peak capacity in gradient elution. *Journal of Chromatography, A* **2005**, 1079, 153-161.
- [71] Snyder, L. R.; Dolan, J. W. *High-Performance Gradient Elution. The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*, John Wiley & Sons: New Jersey, 2007.
- [72] Marchetti, Nicola; Guiochon, Georges. High peak capacity separations of peptides in reversed-phase gradient elution liquid chromatography on columns packed with porous shell particles. *Journal of Chromatography, A* **2007**, 1176, 206-216.
- [73] Churaceka, J.; Jandera, P. *Gradient elution in Column Liquid Chromatography – Theory and Practice*, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1985.
- [74] Giddings, J. Calvin. Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods. *Analytical Chemistry* **1967**, 39, 1027-1028.
- [75] Davis, Joe M.; Giddings, J. Calvin. Statistical theory of component overlap in multicomponent chromatograms. *Analytical Chemistry* **1983**, 55, 418-424.
- [76] Dolan, J. W.; Snyder, L. R.; Djordjevic, N. M.; Hill, D. W.; Waeghe, T. J. Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time. I. Peak capacity limitations. *Journal of Chromatography, A* **1999**, 857, 1-20.

Chapitre II :

*Développement d'un Microréacteur
de digestion enzymatique*

A. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE :

I. PLACE DE LA DIGESTION ENZYMATIQUE DANS L'ANALYSE PROTEOMIQUE

La première étape de l'analyse protéomique consiste à préparer l'échantillon protéomique. Cette préparation comporte l'extraction de l'échantillon, qui est une protéine ou ensemble de protéines de son environnement (cellule, membrane...etc.), la dégradation enzymatique des protéines ainsi que leur purification et préconcentration. De ce fait, la digestion de protéines, avec une enzyme protéase, est un élément clé dans la préparation des échantillons biologiques avant leur analyse par spectrométrie de masse pour les identifier.

L'objectif de cette partie de travail consiste à mettre en œuvre un microréacteur de digestion enzymatique basé sur un support monolithique préparé *in situ*, comportant une fonctionnalité permettant d'accrocher l'enzyme en une seule étape dans des conditions douces. La mise en œuvre doit être facile et fiable dans un capillaire transparent aux irradiations UV de taille de l'ordre du micromètre.

1. Digestion sur gel 2D

La digestion de protéines est réalisée après leur séparation par électrophorèse sur un gel 2D. Les spots contenant des protéines sont découpés et placés dans des solutions d'enzyme le plus souvent la trypsine. La digestion est effectuée dans ce cas à l'intérieur du gel acrylamide.

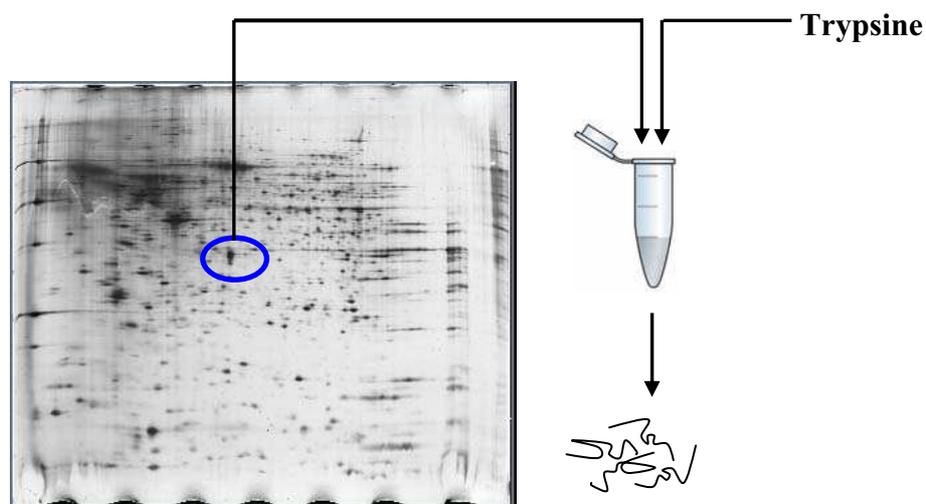


Figure 2.1 : Digestion enzymatique d'une protéine sur gel 2D.

2. Digestion en solution

Une autre alternative est la digestion des protéines en solution. Cependant cette approche présente certains inconvénients. Premièrement, le digest est contaminé avec les fragments de l'enzyme issus de l'autolyse de cette dernière [1].

Vu que les problèmes d'autolyse augmentent avec la concentration de l'enzyme, sa concentration doit être très faible, ce qui diminuera l'activité enzymatique et par conséquence nécessitera de longs temps d'incubation. En effet l'expression de l'équation de Michaelis-Menten montre que la vitesse de digestion est directement liée à la concentration de l'enzyme. De plus, le digest contient l'enzyme qui doit être éliminé avant l'analyse. Enfin, en raison du phénomène d'autodigestion, une enzyme en solution perd souvent rapidement son activité catalytique et ne peut pas être employée plusieurs fois.

3. Immobilisation de l'enzyme

Une des alternatives, qui permet d'éviter ces problèmes, est l'immobilisation de l'enzyme sur un support solide. Comparé à une enzyme en solution, l'enzyme immobilisée sur un support solide ne présente pas de phénomène d'autolyse, ainsi sa concentration peut être augmentée afin d'augmenter l'activité enzymatique. Une forte stabilité et une augmentation de la robustesse de l'enzyme, traduit par la diminution de la sensibilité aux conditions organiques, sont observées. A ceci s'ajoute la possibilité de l'automatisation de l'opération en utilisant une interface robotisée.

4. Utilisation de bras-espaceur :

Dans certains cas, lorsque l'enzyme est de grande taille, l'utilisation d'un bras éloignant l'enzyme du support solide s'avère nécessaire [2], l'immobilisation de l'enzyme directement sur le support solide causant une diminution de son activité enzymatique, cette diminution étant dû aux difficultés que rencontrent les substrats pour entrer en contact avec le site actif de l'enzyme. L'utilisation d'un bras chimique, qui est généralement un glutaraldéhyde, rend l'enzyme plus accessible aux protéines.

II. LES TECHNIQUES D'IMMOBILISATION D'ENZYME

1. Les avantages de l'immobilisation d'enzyme

Les avantages de l'immobilisation d'enzymes sur un support solide sont nombreux à savoir :

- La reproductibilité : l'immobilisation de l'enzyme rend cette dernière stable, son activité est quasi-constante;
- Un usage multiple de l'enzyme : l'absence du phénomène d'autolyse permet d'utiliser l'enzyme plusieurs fois;
- La pureté des produits : les protéines digérées ne contiennent pas de fragments issus de l'autolyse de l'enzyme;
- La réduction du temps de la réaction : le temps de la digestion de protéines dans un microréacteur est très court par rapport à celle réalisée en solution.

L'immobilisation des enzymes peut être effectuée selon plusieurs techniques [3]. Chacune de ces techniques présente des avantages et des inconvénients. Les paragraphes suivants présentent un résumé des techniques d'immobilisation les plus utilisées.

1.1. Immobilisation par adsorption

L'immobilisation des enzymes par adsorption est une technique réversible, elle est basée sur les interactions développées entre l'enzyme et le support. Les interactions mises en jeu sont de types ioniques, hydrophobes ou liaisons hydrogène. Les supports utilisés sont chimiquement inertes, ils peuvent être des résines échangeuses d'ions [4], des nanoparticules d'Or [5,6], de l'oxyde d'aluminium [7], du verre poreux ou des nanoparticules de silices [8].

Les avantages de cette technique sont nombreux, à savoir : (i) le protocole d'immobilisation est très facile à mettre en œuvre, (ii) la désorption de l'enzyme est facile et complète une fois qu'elle devient inactive, de plus, le support est réutilisable (iii) les supports actifs utilisés sont stables durant le transport ou le stockage. Ces avantages ont favorisé l'utilisation de cette technique dans l'industrie, là où les supports sont très grands et parfois très chers et le traitement des déchets est coûteux.

1.2. Immobilisation par piégeage

Une autre technique d'immobilisation utilise un gel pour le piégeage de l'enzyme. Les mailles des matrices assurent d'une façon mécanique le piégeage de l'enzyme à l'intérieur du support tout en permettant la diffusion du substrat au site actif de l'enzyme. Les gels utilisés peuvent être d'origine organique ou inorganique. Kurokawa a utilisé un gel composite à base de fibre d'acétate de cellulose et d'un oxyde métallique, le gel est formé grâce aux liaisons de coordination entre les groupements OH et carbonyles du cycle pyranose et le métal. Cependant ce protocole n'est pas applicable aux enzymes susceptibles de se désactiver par

contact avec les solvants organiques [9]. Cette technique présente un grand inconvénient, l'enzyme peut facilement quitter la matrice dans laquelle elle est piégée avec le temps.

1.3. Immobilisation covalente

Le greffage covalent de l'enzyme sur un support solide exige que ce dernier soit réactif. Les supports utilisés pour cette fin comportent des groupements fonctionnels susceptibles de réagir d'une façon directe ou indirecte avec les groupements amines largement présent à la périphérie de l'enzyme. L'avantage de cette technique réside dans le fait que le microréacteur réalisé est très stable, l'enzyme est immobilisée d'une manière irréversible.

Parmi ces différentes techniques d'immobilisation nous avons choisi le greffage covalent, malgré le fait que le support ne peut pas être régénéré. Ceci a peu d'importance car d'une part, le support monolithique ne coûte pas cher et d'autre part, les quantités jetées du support après l'inactivation de l'enzyme sont à l'ordre de quelques microgrammes.

2.L'approche monolithique

Grâce à leur préparation aisée et à leurs propriétés physiques et chimiques, les monolithes sont devenus des supports de choix pour la préparation de microréacteurs enzymatiques. [10-15]. De plus, pour les applications enzymatiques, la conversion est souvent limitée par la diffusion du substrat au site actif de l'enzyme [16]. Dans le cas des monolithes, la présence de macropores permet d'éviter cette limitation. Pour la préparation d'un microréacteur de digestion enzymatique, les matériaux monolithiques s'avèrent les mieux appropriés vu qu'ils se prêtent bien à la miniaturisation en comparaison avec les phases particulières. Plus la taille des particules est petite plus leur manipulation est difficile et plus la pression est grande. Avec les matériaux monolithiques, ce problème n'existe pas, car le support monolithique est préparé *in situ*, et d'autre part, la modulation de la distribution de la taille des pores vers les macropores permet de travailler dans des pressions basses.

Diverses méthodes ont été rapportées par la littérature pour l'immobilisation covalente d'une enzyme sur un support monolithique. Ces méthodes sont basées sur une réaction de couplage entre un groupement amine, situé à la périphérie de l'enzyme, et un groupe fonctionnel sur le monolithe. Les premiers supports préparés étaient à base de méthacrylate d'hydroxyéthyle (HEMA), qui inclut un groupe alcool. L'immobilisation d'enzymes est réalisée d'une manière indirecte, après la formation d'une base de Schiff ou par une réaction d'amidation, une fois que les groupements hydroxyles ont été oxydés. D'autres types de monolithes ont été préparés

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

à base de méthacrylate de glycidyle (GMA), ce monomère comporte un cycle époxy permettant un greffage direct de l'enzymes, [17-19] soit avec l'introduction d'un espace entre l'enzyme et le support, avec du glutaraldéhyde [20], soit après leur conversion en hydroxyle et leur activation en utilisant le carbonyldiimidazole [21]. Fréchet et al. [22,23] ont introduit l'utilisation des groupements azlactones pour le greffage de l'enzyme. Ces groupements réagissent facilement avec les fonctions amines de l'enzyme dans des conditions douces. Enfin, Novotny et al. proposent un procédé en une étape pour la polymérisation de monolithe et l'immobilisation de trypsine [24]; le mélange réactionnel de polymérisation contient un monomère comprenant un groupement succinimide qui réagit avec la trypsine.

B. DEVELOPPEMENT DU MICROREACTEUR DE DIGESTION ENZYMATIQUE

1. Préparation du support monolithique

Les supports monolithiques des microréacteurs ont été préparés dans des capillaires transparents aux irradiations UV d'une longueur de 15 cm. Les parois des capillaires ont subi le même traitement que précédemment. Pour les différentes étapes de préparation et de test, les capillaires sont connectés en amont à une seringue. Cette dernière est montée sur un pousse-seringue afin d'assurer l'écoulement des solutions à travers les microréacteurs.

1.1.Composition du mélange réactionnel

Le mélange réactionnel est composé d'un monomère fonctionnel réactif assurant l'ancrage covalent de l'enzyme, le méthacrylate de glycidyle (GMA), d'un agent réticulant le diméthacrylate d'éthylène (EGDMA), d'un porogène binaire et d'un amorceur radicalaire. Pour avoir une phase riche en GMA, la teneur en monomère réticulant est fixé 25 % par rapport au volume total des monomère.

Tableau 2.1 : Mélange réactionnel utilisé pour préparer les supports monolithiques de microréacteurs

Composition des Monomères (% vol)	Composition du Porogène (% vol)	Teneur vol en porogène	Amorceur
GMA/EGDMA 75/25	Dodécanol/cyclohexanol 92/8	75 %	AIBN 1 % massique

Le choix du porogène dépend de la nature des monomères utilisés et de l'application finale du support. Après greffage de la trypsine, qui est une bio-macromolécule, le support doit avoir

une quantité suffisante de larges pores afin d'assurer le passage des protéines à digérer à travers la phase. Ce qui implique l'introduction d'un macroporogène. Le porogène utilisé contient 92 % dodécanol de qui joue le rôle d'un macroporogène et de 8 % de Cyclohexanol. L'AIBN est introduit à raison de 1 % par rapport à la masse totale des monomères.

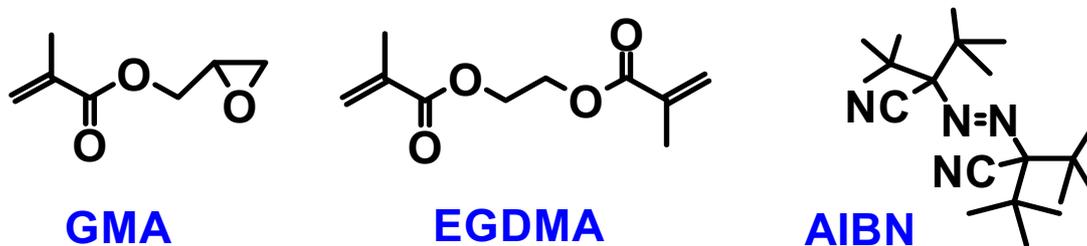


Figure 2.2 : Structures chimiques des monomères et de l'amorceur utilisés pour la préparation des supports monolithiques pour les microréacteurs de digestion enzymatique.

Après dégazage du mélange réactionnel, ce dernier est introduit dans le capillaire qui est ensuite placé sous irradiations UV pendant 1 heures. En fin de polymérisation, le support monolithique est lavé abondamment et séché à l'étuve.

2. Greffage de la trypsine

La fonctionnalisation du support monolithique avec la trypsine a été effectuée selon le protocole suivant (Fréchet et Svec 2002) : une solution aqueuse de trypsine (bovine pancréas), contenant 0,5 mol/L de sulfate de sodium, et 0,1 mol/L de carbonate de sodium, a été injectée à travers la colonne monolithique, pendant plus de 5 heures à température ambiante. La concentration de la trypsine était comprise entre 2 et 10 mg/mL. Afin de limiter l'autolyse de l'enzyme, une faible quantité de benzamide a été ajoutée à la solution de fonctionnalisation.

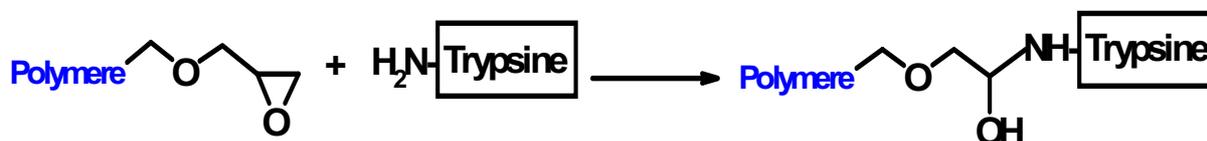


Figure 2.3 : Schéma réactionnel de la fonctionnalisation du support monolithique avec la trypsine

Après greffage de la trypsine, le microréacteur ainsi formé est équilibré avec une solution Tris 20 mol/L (pH = 8) dans laquelle le réacteur est conservé jusque son utilisation. Après chaque utilisation, le microréacteur est lavé avec cette solution afin de l'équilibrer.

C. ETUDE DU MICROREACTEUR DE DIGESTION ENZYMATIQUE

I. TESTS PRELIMINAIRES DU MICROREACTEUR

Les premiers tests ont été effectués sur deux protéines standard, le Cytochrome C du cheval (11702 Da) et l'albumine de sérum bovine BSA (69294 Da). Leur but est de valider le greffage de l'enzyme, dans notre cas la trypsine, et de s'assurer que cette dernière n'a pas perdu son activité. Le microréacteur de digestion enzymatique est connecté à une seringue de 1 mL à l'aide d'une connectique adaptée (UpChurch Scientific). Le tout est monté sur un pousse-seringue assurant le passage des protéines à travers le microréacteur à un débit ajustable.

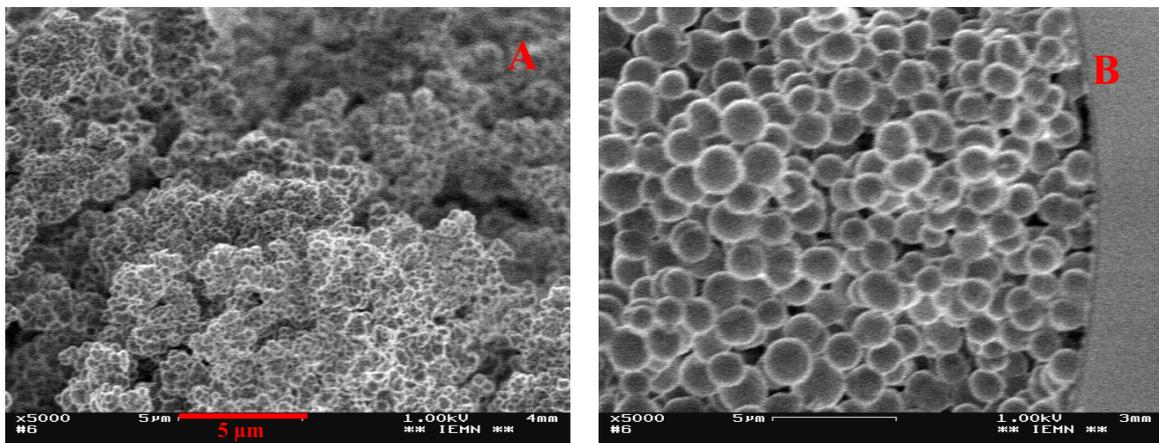


Figure 2.4 : Image MEB d'un support monolithique avant (A) et après (B) greffage de la trypsine

1. Protocole du test :

Le microréacteur de digestion enzymatique est testé vis-à-vis des protéines standard. Les protéines sont mises en solution dans un tampon Tris 50 mM (pH=8) à raison de 20 pmol/µL. Ces solutions ont été traitées ensuite avec des ondes ultrasoniques pour assurer leur dissolution totale avant leur injection à travers le microréacteur. Le débit d'injection utilisé était de 0,5 à 4,5 µL/min. La solution ainsi récoltée en aval du microréacteur est analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

2. Analyse MALDI-TOF :

La matrice utilisée pour ces analyses est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque ou DHB. La solution de matrice est préparée dans un mélange équimolaire H₂O/MeOH à une concentration de 10 mg/mL de DHB solide. Cette solution de matrice est conservée au réfrigérateur entre les utilisations.



Figure 2.5 : Image du spectromètre de masse MALDI-TOF (Voyager DE) de chez *Perceptive Biosystems*

Les dépôts pour les analyses sont réalisés avec 1 μL de solution de matrice et 1 μL de solution à analyser ; le dépôt est ensuite séché et cristallisé puis la cible MALDI est introduite dans le spectromètre de masse. Les analyses sont réalisées en mode positif et réflectron sur une large gamme de m/z dépendant de la protéine utilisée. Après calibration et extraction des rapports m/z correspondant à chaque pic, les spectres de masse obtenus sont interprétés par interrogation de bases de données protéiques disponibles sur le serveur de protéomique (www.expasy.org).

3.Résultats :

3.1.Cytochrome C (Cheval)

Le spectre de masse enregistré à partir de l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF du digest du Cytochrome C sur le microréacteur enzymatique (Figure 2.6) contient un ensemble de pics fins dans la gamme de m/z 700-2500 Da et pics large à m/z 12,5 kDa. Ce dernier est celui de la protéine native, d'où la digestion du Cytochrome C n'a pas été totale.

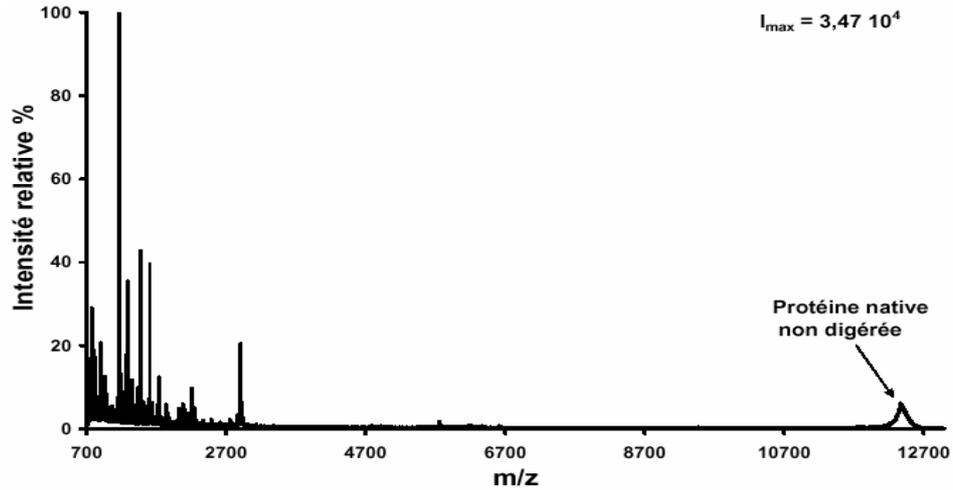


Figure 2.6 : Spectre de masse MALDI-TOF du digest de Cytochrome C sur un microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique.

L'agrandissement de la gamme de m/z de 700 à 2500 (Figure 2.7) montre l'existence d'un grand nombre de pics correspondants aux peptides issus de la digestion du Cytochrome C par la trypsine greffée sur le support monolithique.

La digestion enzymatique au sein du microréacteur est menée dans un tampon Tris, ce qui se traduit par la présence de nombreux adduits salins sur les peptides, d'où la présence des pics de types $(M+Na)^+$ et $(M+K)^+$ correspondant aux adduits salins sur les peptides. Pour éviter ce phénomène, l'introduction d'une étape de dessalage s'avère nécessaire.

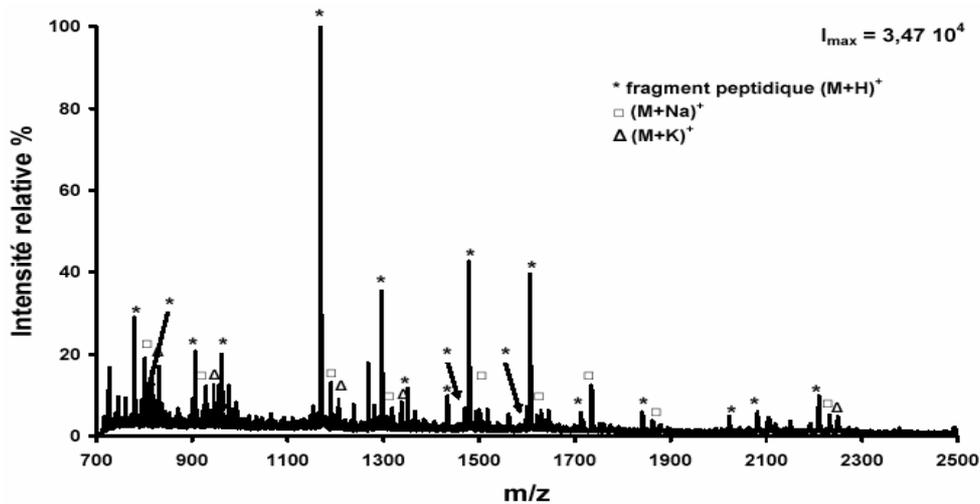


Figure 2.7 : Agrandissement de la gamme m/z 700-2500 du spectre de masse MALDI-TOF du digest de Cytochrome C.

L'interrogation des bases de données de protéomique a permis d'identifier 11 des 80 peptides espérés lors de la digestion théorique du Cytochrome C (cheval) avec 5 sites de clivage

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

manqués. Ces peptides comportent 78 des 104 résidus de Cytochrome C, soit une couverture de séquence de 75%. Le Tableau 2.2 regroupe les résultats de cette interrogation.

Tableau 2.2 : Séquence des fragments peptidiques issus de la digestion Trypsique du Cytochrome C dans le microréacteur, identifiés par interrogation de bases de données.

<i>m/z</i> mesuré	<i>m/z</i> théorique	Delta ppm	Fragment	Séquence
779,4819	779,4490	42	80-86	MIFAGIK
795,4574	795,4439	17	80-86	MIFAGIK
806,4792	806,4776	2	73-79	KYIPGTK
907,5547	907,5439	12	80-87	MIFAGIKK
1168,6407	1168,6227	15	28-38	TGPNLHGLFGR
1296,7217	1296,7177	3,1	28-39	TGPNLHGLFGRK
1350,7224	1350,7269	-3,3	89-99	TEREDLIAYLK
1433,7632	1433,7766	-9,3	26-39	HKTGPNLHGLFGRK
1470,6404	1470,6865	-31	40-53	TGQAPGFTYTDANK
1598,7565	1598,7815	-16	39-53	KTGQAPGFTYTDANK
1712,7705	1712,8244	-31	40-55	TGQAPGFTYTDANKNK
2080,9314	2081,0265	-46	56-72	GITWKEETLMEYLENPK

1 11 21 31 41
| | | | |
GDVEKGGKIF VQKCAQCHTV EKGGKHKTGP NLHGLFGRKT GQAPGFTYTD
51 61 71 81 91 101
| | | | |
ANKNKGITWK EETLMEYLEN PKKYIPGTKM IFAGIKKTE REDLIAYLKK ATNE

Figure 2.8 : Séquence du cytochrome C, en rouge les résidus identifiés par interrogation de bases de données.

3.2. Albumine de sérum bovin (BSA)

Contrairement au spectre de masse MALDI-TOF issu de la digestion Cytochrome C dans le microréacteur, celui issu de la digestion de BSA, ne contient aucune trace de la protéine

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

native, il y a une forte chance que cette dernière est restée adsorber à l'intérieur du microréacteur (Figure 2.9). De même que précédemment, la présence des pics dans le spectre, confirme que la trypsine a été greffée d'une manière covalente et que ce greffage n'a entraîné aucune altération de la réactivité de la trypsine.

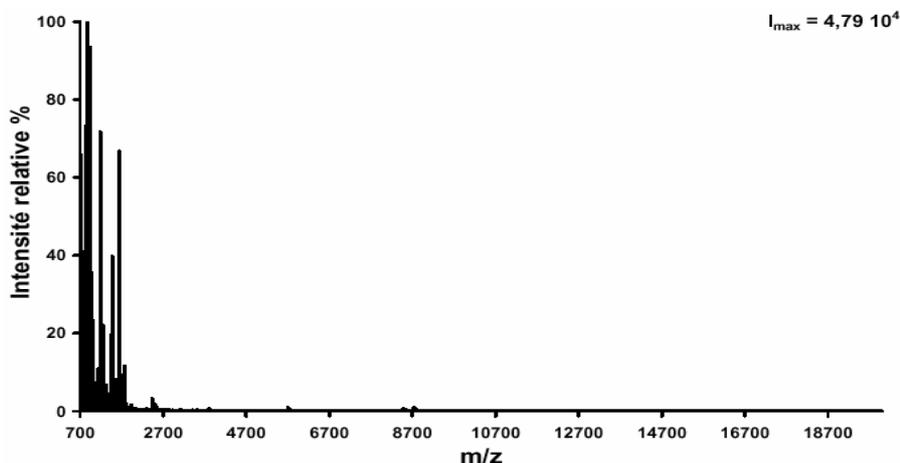


Figure 2.9 : Spectre de masse MALDI-TOF total du digest de BSA dans un microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique.

L'agrandissement du spectre de masse sur la gamme de m/z 700-2000 (Figure 2.10), révèle la totalité des pics correspondant aux fragments peptidiques issus de la digestion de BSA. La même remarque concernant les adduits salins sur les fragments peptidiques dans le cas du Cytochrome C, est valable ici.

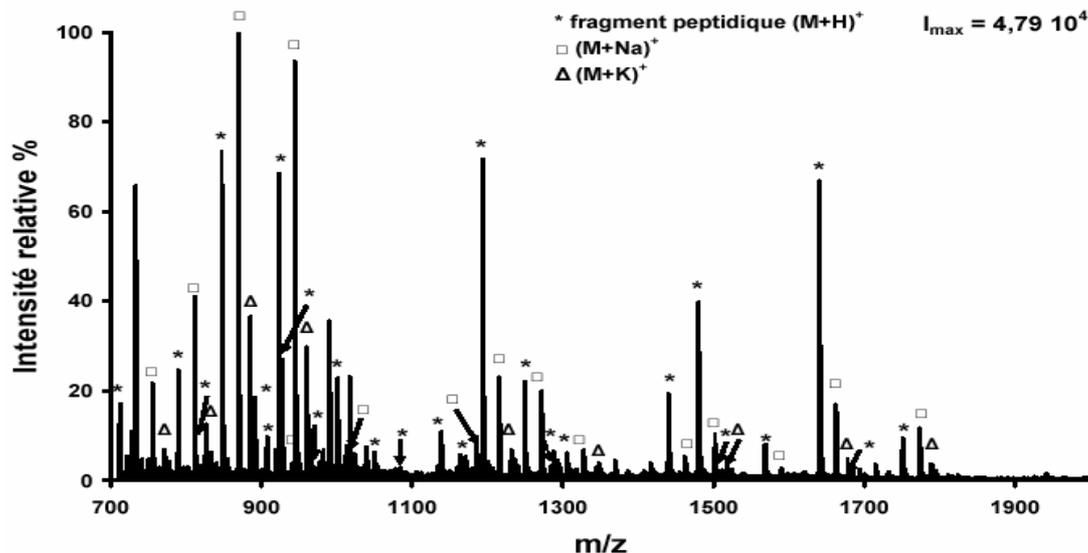


Figure 2.10 : Agrandissement de la gamme m/z 700-2000 du spectre de masse MALDI-TOF du digest de BSA dans un microréacteur.

L'interrogation de bases de données, après calibration du spectre et l'extraction des valeurs des rapports m/z correspondant à chaque pic, a conduit à l'identification des séquences des

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

fragments peptidiques de BSA issus de la digestion de cette dernière dans le microréacteur enzymatique. Le tableau suivant (Tableau 2.3) regroupe les résultats obtenus.

Tableau 2.3 : Séquence des fragments peptidiques issus de la digestion Trypsique de BSA sur le microréacteur, identifiés par interrogation de bases de données.

<i>m/z</i> mesuré	<i>m/z</i> théorique	Delta ppm	Fragment	Séquence
712,3843	712,3742	14	29-34	SEIAHR
789,4714	789,4722	-1	257-263	LVTDLTK
847,4919	847,5042	-14	242-248	LSQKFPK
918,5337	918,5195	15	221-228	LRCASIQK
922,4759	922,4668	9,9	205-211	IETMREK
922,4759	922,4886	-14	249-256	AEFVEVTK
927,4911	927,4940	-3,1	161-167	YLYEIAR
1001,5751	1001,5892	-15	233-241	ALKAWSVAR
1138,5588	1138,5679	-8	223-232	CASIQKFGER
1163,5995	1163,6312	-27	66-75	LVNELTEFAK
1193,5947	1193,6027	-6,7	25-34	DTHKSEIAHR
1249,5904	1249,6217	-25	35-44	FKDLGEEHFK
1283,6802	1283,7112	-24	361-371	HPEYAVSVLLR
1305,6709	1305,7167	-35	402-412	HLVDEPQNLIK
1439,7647	1439,8123	-33	360-371	RHPEYAVSVLLR
1479,7664	1479,7960	-20	421-433	LGEYGFQNALIVR
1511,7788	1511,8433	-43	438-451	VPQVSTPTLVEVSR
1567,6996	1567,7433	-28	347-359	DAFLGSFLYEYSR
1639,9010	1639,9383	-23	437-451	KVPQVSTPTLVEVSR
1692,8686	1692,9424	-44	249-263	AEFVEVTKLVTDLTK

Cependant, il faut signaler que dans le cas de BSA, il existe des pics non identifiés lors de l'interrogation des bases de données et qui sont probablement issus de la digestion non spécifique de BSA. L'interrogation des bases de données permet d'identifier 19 des 84

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

peptides de la digestion théorique de BSA avec 5 sites de clivage manquant, ces peptides correspondent à 151 des 607 résidus de BSA, soit une couverture de séquence de 24%.

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

1	11	21	31	41	51	61	71
MKWVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRR DT HKSE	IA HRFKDLGE	EH FKGLVLIA	FSQYLQQCPF	DEHV KL VNEL	TE FAKTCVAD
81	91	101	111	121	131	141	151
ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK	VASLRETYGD	MADCCEKQEP	ERNECFLSHK	DDSPDLPKPK	PDPNTLCDEF	KADEKKFWGK
161	171	181	191	201	211	221	231
YL YEIARRHP	YFYAPELLYY	ANKYNGVFQE	CCQAEDKGAC	LLPK IE TMRE	KV LASSARQR	LR CASIQKFG	ER ALKAWSVA
241	251	261	271	281	291	301	311
RL SQKFPKAE	FV EVT KL VD	LT KVHKECCH	GDLLECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE	CCDKPLLEKS	HCIAEVEKDA
321	331	341	351	361	371	381	391
IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAK DA FL	GS FLYEYSRR	HP EYAVSVLL	RL AKEYEATL	EECCA KD DPH	ACYSTVFDKL
401	411	421	431	441	451	461	471
KH LVDEPQNL	IK QNC DQ FEK	LG EYGFQNAL	IV RYTRKVPQ	VST P TL VEVS	RS LGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL
481	491	501	511	521	531	541	551
NRLCVLHEKT	PVSEKVT K CC	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP	DTEKQIKKQT	ALVELLKHKP
561	571	581	591	601			
KATEEQLKTV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV	STQTALA			

Figure 2.11 : Séquence de BSA, en rouge les résidus identifiés par interrogation de bases de données.

II. OPTIMISATION DES RESULTATS DE DIGESTIONS A TRAVERS LE MICROREACTEUR

L'optimisation de la digestion a été effectuée comme suivant :

- D'une part, en remplaçant le benzamide par la benzamidine, qui s'avère plus efficace pour limiter le phénomène d'autolyse de la trypsine dans la solution de greffage, et en fixant le débit d'injection des protéines à 1,5 µL/min.

- Et d'autre part, en introduisant deux nouvelles étapes, une étape de dessalage des digests récoltés en aval du microréacteur avant leurs analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF et, une étape de dénaturation des protéines avant leur digestion.

1. Introduction d'une étape de dessalage

Les premiers tests du microréacteur ont montrés la nécessité du dessalage des solutions, récoltées en sortie du microréacteur, afin d'éviter les adduits salins sur les fragments peptidiques détectés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette étape a été réalisée à l'aide de petits cônes commerciaux ZipTip® contenant des billes de silices fonctionnalisées avec des chaînes aliphatiques hydrophobes de 18 Carbones dites C18.

1.1. Digestion du Cytochrome C et de BSA

Cytochrome C

Le spectre de masse total, correspondant à la digestion du cytochrome C suivant ce nouveau protocole, ne comporte pas de protéine native non digérée. Le débit de 1,5 µL/min a permis une digestion totale du cytochrome C dans le microréacteur et l'intensité du spectre est meilleure que précédemment ($1,49 \cdot 10^5$ dans le cas du nouveau protocole contre $3,47 \cdot 10^4$ dans le cas de l'ancien protocole). De plus, l'étape de dessalage sur les supports ZipTip® a été efficace, vu l'absence des pics de type $(M+Na)^+$ et $(M+K)^+$ correspondent aux adduits salins.

La Figure 2.12 représente le spectre de masse obtenu lors de la digestion du Cytochrome C dans le microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique.

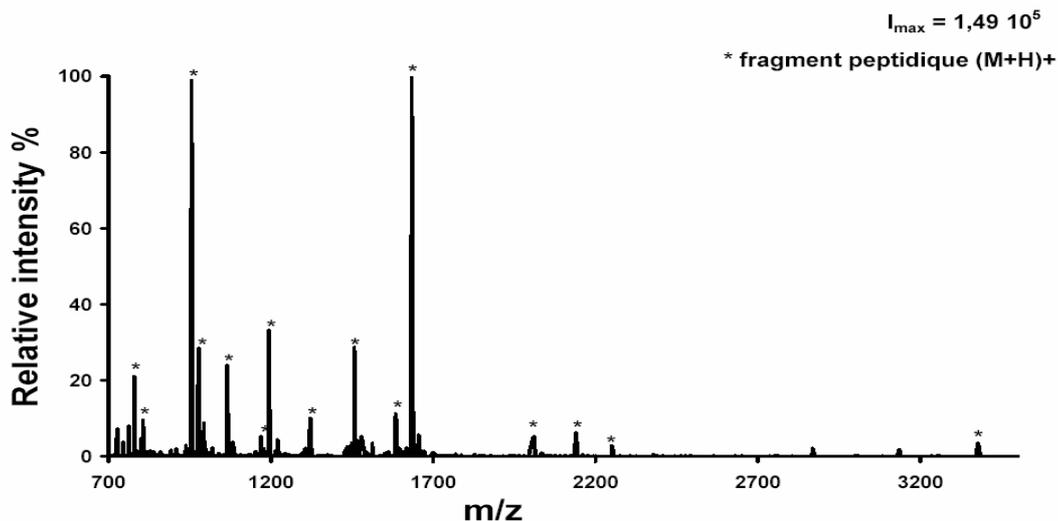


Figure 2.12 : Spectre de masse MALDI-TOF du digest dessalé du Cytochrome C dans un microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique.

Le résultat de l'interrogation des bases de données montre que la couverture de séquence est de 81 %. Cette augmentation de 6 % est due essentiellement à la réduction efficace des réactions d'autodigestion de la trypsine avant son greffage, ce qui lui permet de garder son activité.

Albumine de sérum bovin (BSA)

Le spectre de masse total correspondant à la digestion de BSA suivant ce nouveau protocole ne comporte pas de protéine native non digérée, l'intensité du spectre est meilleure que précédemment, $9,65 \cdot 10^4$ dans le cas du nouveau protocole contre $4,79 \cdot 10^4$ dans le cas de l'ancien protocole, mais elle reste inférieure à celle observée dans le cas du Cytochrome C. De même, l'étape de dessalage ZipTip® a permis d'éliminer les pics de type $(M+Na)^+$ et $(M+K)^+$ correspondant aux adduits salins.

La Figure 2.13 représente le spectre de masse obtenu lors de la digestion de BSA dans le microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique suivant le nouveau protocole.

Le résultat obtenu après interrogation des bases de données donne une couverture de séquence de 35 %. La digestion de BSA dans le microréacteur s'est bien améliorée, la couverture de séquence étant augmentée de 11 %. Cependant, ce résultat reste nettement inférieur à celui du Cytochrome C.

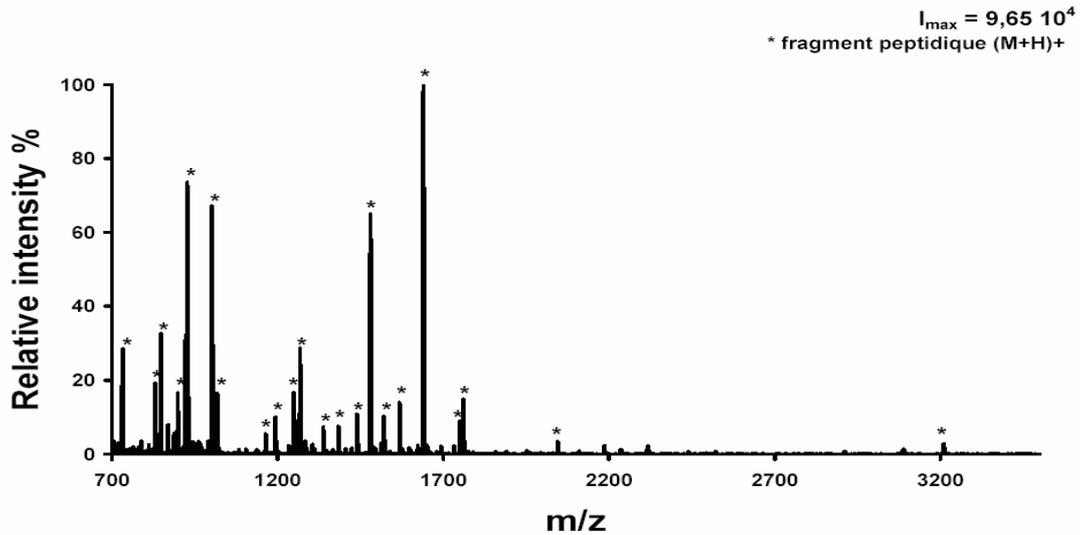


Figure 2.13 : Spectre de masse MALDI-TOF du digest dessalé de BSA dans un microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique.

1.2. Digestion d'autres protéines

Ce protocole a été appliqué sur d'autres protéines de masse moléculaire compris entre celui du Cytochrome C et celui de BSA et appartenant à d'autres espèces, afin de confirmer l'amélioration apportée par le nouveau protocole.

Albumine humaine AH

L'Albumine humaine est une protéine en quantité très abondante dans le plasma sanguin, son masse moléculaire est de 66,4 kDa. Elle a été injectée à travers le microréacteur à un débit de 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

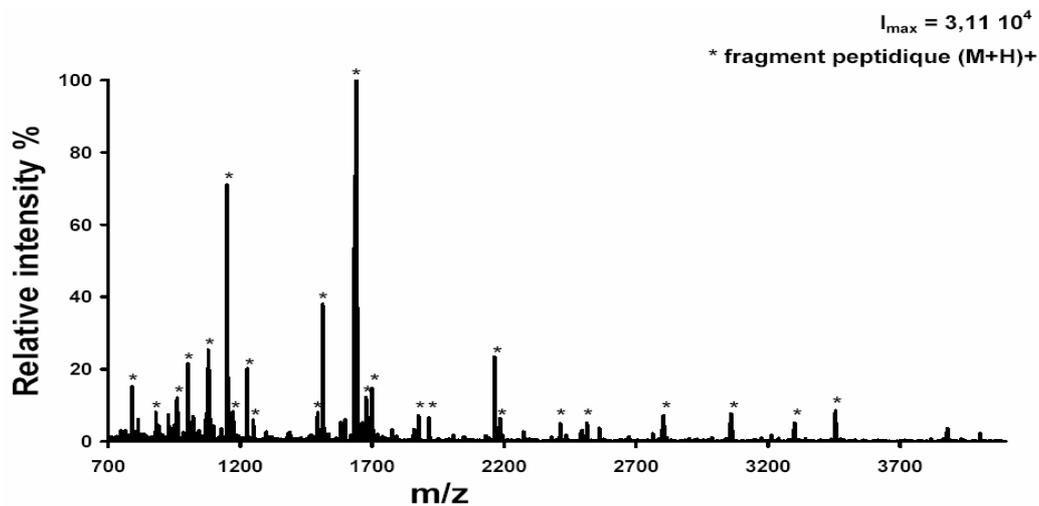


Figure 2.14 : Spectre de masse MALDI-TOF de la digestion de L'Albumine humaine dans un microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique.

La Figure 2.14 représente le spectre de masse obtenu lors de la digestion de l'Albumine humaine sur le microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique.

L'Ovalbumine (*Gallus Gallus*)

L'Ovalbumine est une protéine de masse moléculaire moyenne, elle est de 42,7 kDa. Le spectre de masse MALDI-TOF contient peu de pics dans la gamme de m/z 700-1500 par rapport aux spectres de masse des autres protéines. De plus, la plupart des pics ont une intensité très faible. La Figure 2.15 représente le spectre de masse obtenu lors de la digestion de l'Albumine humaine avec le microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique.

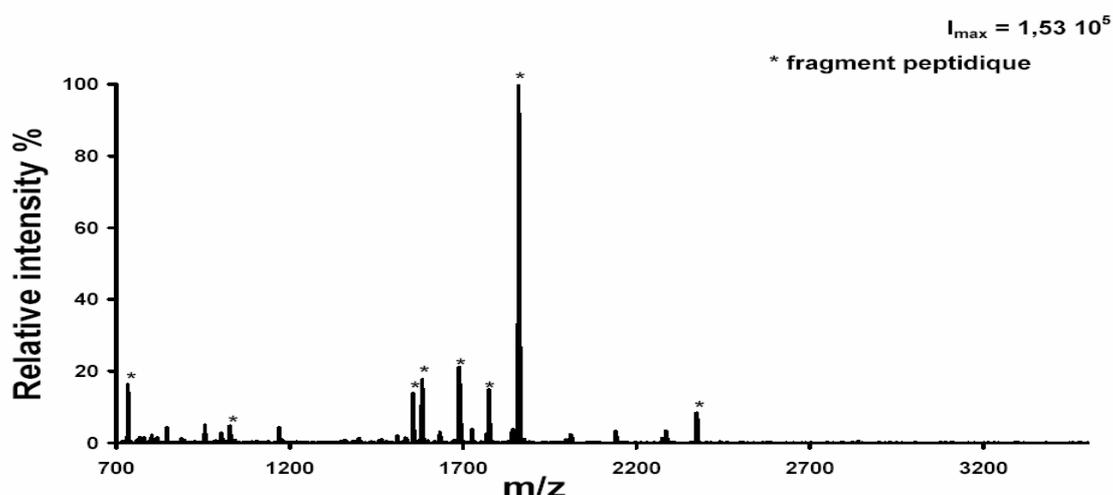


Figure 2.15 : Spectre de masse MALDI-TOF de la digestion de l'Ovalbumine (*Gallus Gallus*) sur un microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique.

L'interrogation de bases de données protéomiques montre que la couverture de séquence dans le cas de l'Ovalbumine est de 30 % avec un débit de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

1.3. Conclusion

Nous avons préparé un microréacteur de digestion enzymatique basé sur un support monolithique. Le greffage covalent de l'enzyme a été effectué par réaction chimique, à température ambiante, dans des conditions douces, entre les groupements amines de l'enzyme et les groupements époxy du support monolithique. Les premiers tests ont été réalisés en injectant une solution de protéine, sans préparation préalable, à travers le microréacteur. Les solutions récoltées sont analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Une amélioration du protocole a permis de conserver l'activité de l'enzyme lors du greffage et d'éliminer les adduits salins sur les fragments peptidiques. Les résultats obtenus sont supérieurs dans

certains cas à ceux présentés dans la littérature. Le Tableau 2.4 regroupe les résultats des tests préliminaires des microréacteurs.

Tableau 2.4 : Couverture de séquence des différentes protéines digérées sur le microréacteur enzymatique à base de trypsine.

Protéine	Mw (kDa)	Couverture de séquence (%)	Acides aminés identifiés	Clivage Manqué
Cytochrome C	11,6	81	84 sur 104	5
Ovalbumine	42,7	30	116 sur 386	5
Albumine humaine (AH)	69,4	40	244 sur 609	5
Albumine Sérum Bovine (BSA)	66,3	35	222 sur 607	5

Toutefois, si les optimisations effectuées ont conduit à une bonne amélioration, ces derniers restent toujours faibles pour certaines protéines. Bien que la masse de l'ovalbumine soit inférieure à celle de l'Albumine humaine et de la BSA, la couverture de séquence de ces dernières est plus grande que celle de l'Ovalbumine. Ceci implique qu'il y a d'autres paramètres influençant la digestion des protéines dans le microréacteur. La suite des études d'optimisation dans cette deuxième partie est effectuée sur le Cytochrome C.

2. Dénaturation des protéines avant leur digestion

2.1. Intérêt de la dénaturation

Les protéines en solution adoptent, le plus souvent, une conformation sous forme de pelote qui se caractérise par une structure tertiaire ou quaternaire selon la présence ou non de plusieurs protomères. Cette conformation est maintenue grâce aux interactions intramoléculaires covalentes, comme les ponts disulfures, ainsi qu'aux liaisons électrostatiques et aux liaisons hydrogènes. La digestion de protéines sous cette forme réduit l'accès de l'enzyme aux sites de clivage. La dénaturation vise le déploiement de la protéine en détruisant les différents types d'interactions responsables de sa structure globulaire.

2.2. Protocole standard de dénaturation

Le protocole standard de dénaturation des protéines comporte deux étapes principales, la première consiste en un chauffage de la protéine dans un tampon de dénaturation à 70 °C pendant 1 heure. Le tampon de dénaturation est composé d'une solution de guanidine 6 μM et d'une solution de Dithiothreitol (DTT) 4 mM dans un Tris HCl à une concentration de 50 mM. Le but de cette étape est de réduire les ponts disulfures et détruire les liaisons électrostatiques et les liaisons hydrogènes. La deuxième étape consiste en l'alkylation des fonctions thiols avec une solution d'Iodoacétamide à 50mM ajoutée à la solution résultante de la protéine à raison de 10 % en volume. Le but de cette étape est d'empêcher la formation réversible des ponts disulfures. Finalement, et pour diminuer la concentration de la guanidine dans la solution résultante, cette dernière est diluée au dixième avec un tampon Tris HCl à une concentration de 20mM et un pH = 7,6.

2.3. Résultats

Le spectre de masse de MALDI-TOF enregistré à partir d'un digest du Cytochrome C dénaturé, montre l'existence de beaucoup plus de pics dans la gamme de m/z comprise entre 700 et 2500, que dans les autres spectres du Cytochrome C non dénaturé. De plus, la gamme de m/z allant de 2500 à 3000 environ, présente quelques pics qui n'apparaissent pas avant. Le spectre de masse contient moins de pics issus de la digestion non spécifique de la protéine.

La Figure 2.16 présente le spectre de masse obtenu lors de la digestion du Cytochrome C dénaturé dans le microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique.

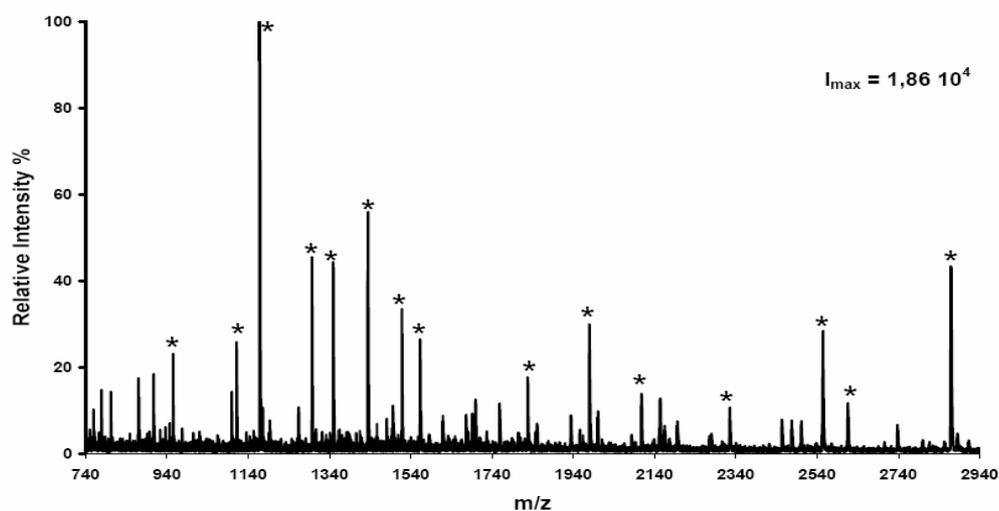


Figure 2.16 : Spectre de masse MALDI-TOF de la digestion du Cytochrome C dénaturé dans un microréacteur enzymatique basé sur un support monolithique.

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

Ces observations ont été confirmées par l'interrogation de bases de données de protéomiques. 31 fragments ont été identifiés comme peptides issus de la digestion trypsique du Cytochrome C, parmi lesquels trois ont subi une modification par le groupement méthoxy. Ces 31 fragments couvrent 95 % de la séquence de la protéine soit 99 des 104 acides aminés de Cytochrome C.

Tableau 2.5 : Fragments peptidiques reconnus par interrogation de bases de données à partir du digest Trypsique dessalé du Cytochrome C dénaturé.

<i>m/z</i> mesuré	<i>m/z</i> théorique	Delta ppm	Fragment	Séquence
779,4270	779,4490	-28	80-86	MIFAGIK
906,4711	906,5123	-45	75-82	IPGTKMIF
907,5275	907,5439	-18	80-87	MIFAGIKK
923,5193	923,5388	-21	80-87	MIFAGIKK
955,4833	955,5001	-18	28-36	TGPNLHGLF
1168,6230	1168,6227	0,24	28-38	TGPNLHGLFGR
1193,5902	1193,6166	-22	88-97	KGEREDLIAY
1220,6372	1220,6540	-14	26-36	HKTGPNLHGLF
1296,7184	1296,7177	0,56	28-39	TGPNLHGLFGRK
1306,6855	1306,7007	-12	89-99	GEREDLIAYLK
1321,6672	1321,7116	-34	87-97	KKGEREDLIAY
1433,7379	1433,7766	-27	26-38	HKTGPNLHGLFGR
1434,7634	1434,7957	-22	89-100	GEREDLIAYLKK
1434,7634	1434,7957	-22	88-99	KGEREDLIAYLK
1497,7298	1497,7338	-2,7	47-59	SYTDANKNKGITW

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

1507,7575	1507,8008	-29	92-104	EDLIAYLKKATNE
1561,8616	1561,8716	-6,4	26-39	HKTGPNLHGLFGRK
1562,8856	1562,8906	-3,2	87-99	KKGEREDLIAYLK
1562,8856	1562,8906	-3,2	88-100	KGEREDLIAYLKK
1584,8100	1584,7658	28	39-53	KTGQAPGFSYTDANK
1675,9228	1675,9145	5,0	23-38	GGKHKTGPNLHGLFGR
1680,8734	1680,8155	34	60-73	GEETLMEYLENPKK
1690,9465	1690,9492	-1,6	83-97	AGIKKKGEREDLIAY
1690,9465	1690,9856	-23	87-100	KKGEREDLIAYLKK
1698,8371	1698,8087	17	40-55	TGQAPGFSYTDANKNK
1710,9394	1710,9981	-34	73-87	KYIPGTKMIFAGIKK
1710,9394	1710,9981	-34	74-88	YIPGTKMIFAGIKKK
1803,9865	1804,0094	-13	23-39	GGKHKTGPNLHGLFGRK
1826,9027	1826,9037	-0,55	39-55	KTGQAPGFSYTDANKNK
1849,9445	1849,9660	-12	89-104	GEREDLIAYLKKATNE
1932,0833	1932,1282	-23	83-99	AGIKKKGEREDLIAYLK
1955,0148	1955,0252	-5,3	28-46	TGPNLHGLFGRKKTGQAPGF
1978,0516	1978,0609	-4,7	88-104	KGEREDLIAYLKKATNE
2082,1440	2082,1422	0,89	80-97	MIFAGIKKKGEREDLIAY
2305,2070	2305,1797	12	6-25	GKKIFVQKCAQCHTVEKGGK

2.4. Conclusion

La dénaturation du Cytochrome C a permis d'améliorer sa digestion. La protéine dénaturée a beaucoup plus d'accès au site actif de l'enzyme, ceci est traduit par la détection d'un grand nombre de fragments peptidiques qui couvrent 95 % de la séquence de protéine.

III. ETUDE DE LA CINÉTIQUE DE DIGESTION

Dans cette partie nous avons étudié l'influence du temps de séjour de la protéine dans le microréacteur. L'étude de ce paramètre revient à étudier la vitesse d'injection de la protéine à travers le microréacteur. Plus la vitesse d'injection est grande, plus le temps de séjour de la protéine à l'intérieur du microréacteur est petit et la protéine a moins de contact avec les sites actifs de l'enzyme greffée.

1. Influence du débit d'injection des protéines

1.1. Description du test

Le test consiste à injecter le Cytochrome C sans dénaturation, à travers le microréacteur avec différentes vitesses d'injection allant de 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ jusqu'à 4,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec un pas de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Les solutions récoltées en sortie du microréacteur sont ensuite dessalées et analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La Figure 2.17 représente les spectres de masse MALDI-TOF obtenus pour la digestion du Cytochrome C dans le microréacteur à différentes vitesses d'injection.

1.2. Résultats

Les spectres de masse MALDI-TOF obtenus sont différents, certains peptides, très intenses à faible vitesse d'injection (peptides marqués en verts), deviennent moins intenses à grande vitesse d'injection. D'autres peptides (marqués en rouge), ayant une faible intensité à basse vitesse d'injection, deviennent très intenses à grande vitesse d'injection.

Pour comprendre la relation qui lie la vitesse d'injection à l'intensité des peptides, nous avons dressé un tableau contenant les deux groupes de peptides en indiquant pour chaque peptide la séquence et le nombre de clivages manquant correspondant (voir Tableau 2.6).

Les peptides intenses à faible vitesse d'injection ont un nombre de clivages manqués inférieur ou égal à deux. Tandis que ceux ayant une grande intensité à haute vitesse d'injection ont un nombre de clivages manqués supérieur atteignant dans certains cas 5. De plus, la plupart des peptides intenses à faible vitesse d'injection sont issus des peptides intenses à haute vitesse d'injection.

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

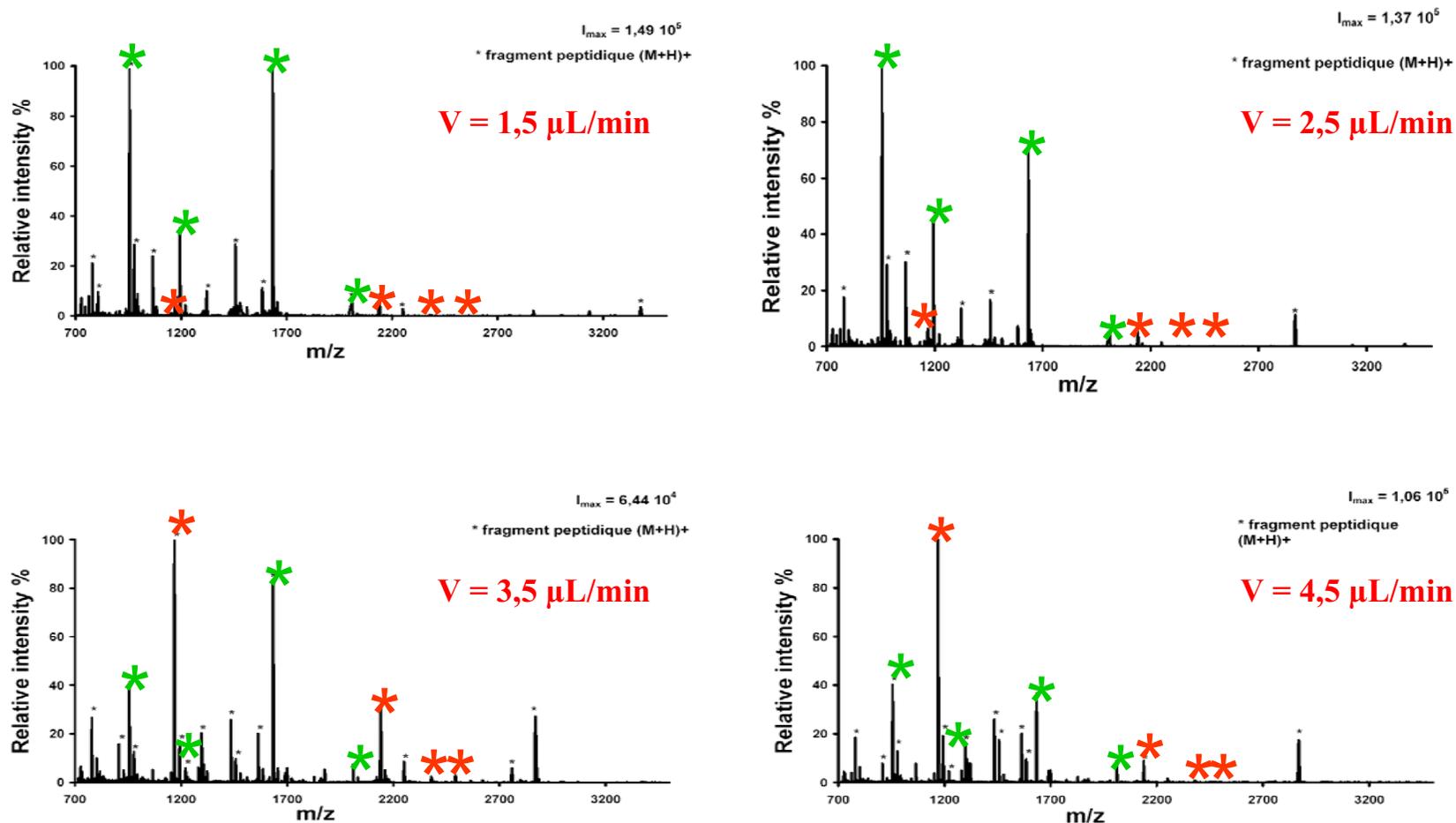
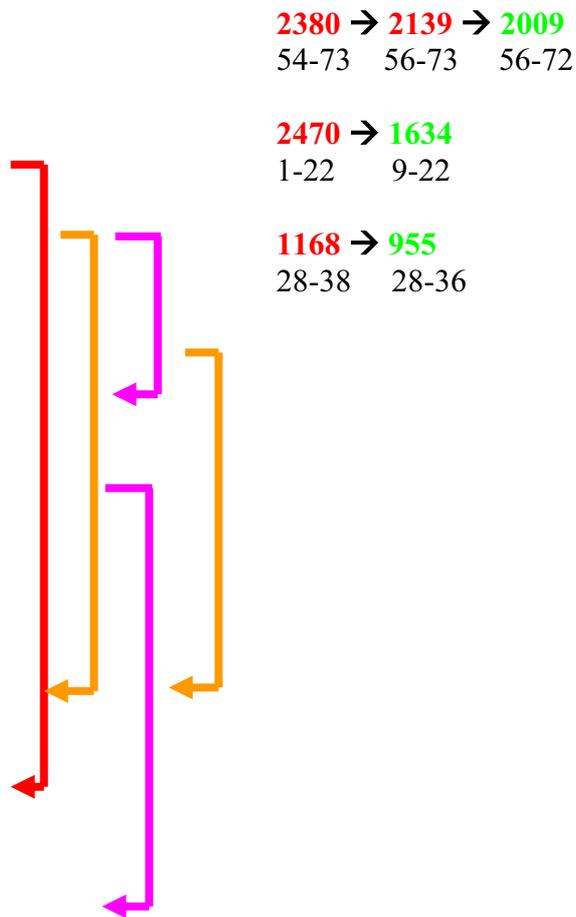


Figure 2.17 : Spectres de masse MALDI-TOF issus de la digestion du Cytochrome de C dans un microréacteur à différentes vitesses d'injection. En rouge, les peptides intenses à haute vitesse d'injection et en vert les peptides intenses à faible vitesse d'injection.

Tableau 2.6 : Résultats de la digestion du Cytochrome C dans le microréacteur enzymatique à différentes vitesses d'injection.

Masse (M+H ⁺)	Séquence	Clivages manqués
2470	1-22	5
2380	54-73	4
2139	56-73	3
1168	28-38	1
2009	56-72	2
1634	9-22	1
955	28-36	0



La cinétique d'augmentation/diminution de l'intensité des peptides est liée au nombre de clivages manquant. À haute vitesse d'injection, le temps de séjour de la protéine et des peptides produits à l'intérieur du microréacteur est faible, cela signifie que le temps de contact avec l'enzyme immobilisée est court. D'où la présence de pics intenses correspondants aux peptides ayant un nombre de clivages manquant élevé (peptides marqués en rouge). A faible vitesse d'injection, le temps de séjour est long, le contact de la protéine et des peptides produits avec l'enzyme immobilisée l'est également, la digestion est donc efficace, d'où la présence de nombreux peptides dans la gamme de m/z 700-2000 avec un petit nombre de clivages manquant (peptides marqués en vert).

Afin de connaître l'influence de la vitesse d'injection sur la couverture de séquence, nous avons calculé cette dernière pour chacune des vitesses utilisées. Le Tableau 2.7 regroupe les valeurs de la couverture de séquence du Cytochrome C ainsi que les fragments peptidiques identifiés au moyen des bases de données protéomiques.

Tableau 2.7 : Couverture de séquence du Cytochrome C digéré dans le microréacteur enzymatique à différentes vitesses d'injection.

Vitesse d'élution ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Couverture de séquence (%)	Acides aminés identifiés	fragments identifiés
1,5	81	84 sur 104	11
2,5	75	71 sur 104	11
3,5	66	63 sur 104	17
4,5	81	84 sur 104	20

La plus grande valeur de la couverture de séquence est obtenue avec les vitesses d'injection 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 4,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Dans le premier cas, la faible vitesse d'injection donne naissance à des fragments peptidiques courts mais nombreux avec un taux de recouvrement de séquence excellent (81 %). Dans le deuxième cas, la grande vitesse d'injection produit moins de fragments peptidiques dans la gamme de m/z de 2000 à 3500 mais de taille plus grande conduisant à la même couverture de séquence.

Le nombre de fragments identifiés par interrogation des bases de données est lié à son tour à la vitesse d'injection, plus cette dernière est faible, plus temps de séjour est grand, ceci conduit à un grand nombre de fragments issus d'une digestion non spécifique d'où le faible nombre de fragments peptidiques reconnu par interrogation de base de données. A grande vitesse d'injection, le nombre de fragment issus d'une digestion non spécifique est faible, d'où la reconnaissance de la plupart des fragments peptidiques produits par les bases de données de protéomique.

IV. MICROREACTEUR INTEGRANT UNE PHASE MONOLITHIQUE DE DESSALAGE

L'étape de dessalage, décrite précédemment, a été effectuée manuellement sur un support commercial en forme de cône. Ce procédé présente deux inconvénients majeurs, le premier, est d'ordre technique, et réside dans l'intervention manuelle pour la réalisation du dessalage, ce qui augmente le risque de contamination, de perte ou de dégradation des échantillons. Le

deuxième, est d'ordre économique, et consiste en l'achat de supports commerciaux à usage unique. L'objectif de ce travail est double :

- d'une part effectuer le dessalage directement après la digestion sans intervention de manipulateur humain, pour minimiser les risques de contamination des échantillons et en même temps il constitue un pas vers l'automatisation du processus ;
- Et d'autre part, de minimiser le coût de l'opération tout en évaluant l'efficacité des supports monolithiques hydrophobes préparés au laboratoire et destinés pour le dessalage et à la préconcentration des échantillons biologiques. La Figure 2.18 représente le schéma descriptif du microréacteur de digestion enzymatique intégrant une phase monolithique de dessalage.

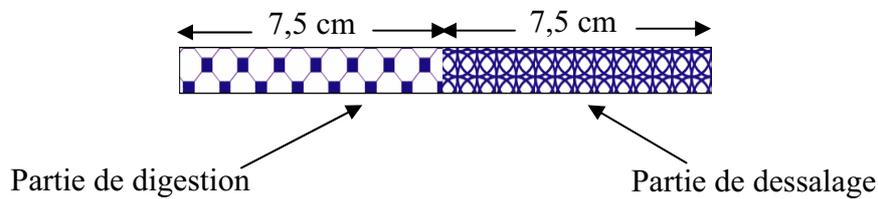


Figure 2.18 : schéma représentatif du microréacteur de digestion enzymatique intégrant un support monolithique de dessalage.

1. Préparation de la colonne monolithique

La colonne monolithique a été préparée en deux étapes. La première étape consiste en la polymérisation du support monolithique de dessalage dans la moitié du capillaire. La deuxième étape, quant à elle, consiste en la polymérisation du support monolithique réactif pour le greffage de la trypsine dans l'autre moitié du capillaire. Une fois que la colonne avec les deux phases monolithiques prête, l'enzyme est greffée selon le protocole décrit précédemment.

1.1. Polymérisation de la phase de dessalage

La phase de dessalage est préparée à partir des mêmes monomères utilisés pour le développement des colonnes de séparation (Voir Chapitre III). Cependant, la teneur volumique en porogène doit être plus grande vu que la phase finale doit être assez poreuse pour favoriser le passage de l'enzyme à greffer.

Tableau 2.8 : Mélange réactionnel utilisé pour préparer les supports monolithiques de dessalage intégré dans le microréacteur

Composition des Monomères (% vol)	Composition du Porogène (% vol)	Teneur vol en porogène	Amorceur
LMA/EGDMA 65/35	Cyclohexanol /Ethylène glycol 80/20	70 %	AIBN 1 % massique

Après dégazage, le mélange réactionnel est injecté dans un capillaire dont les parois sont préalablement traitées. La moitié du capillaire a été couverte à l'aide d'un masque en papier aluminium, pour empêcher la polymérisation du mélange réactionnel dans l'autre moitié du capillaire. En fin de polymérisation sous irradiations UV, la colonne à moitié polymérisée est lavée abondamment au méthanol est séchée à l'étuve pendant une nuit à 80 °C.

1.2. Polymérisation du support réactif et greffage de l'enzyme

Le support monolithique réactif a été préparé à partir du mélange réactionnel décrit au début de ce chapitre. La moitié polymérisée de la colonne a été masquée avec du papier aluminium avant d'injecter le mélange réactionnel dégazé, la colonne est placée ensuite sous irradiation UV puis lavée en fin de polymérisation. Le greffage de la trypsine a été effectué selon la même procédure décrite auparavant. Le microréacteur est équilibré avec une solution Tris 20 mM à pH = 8 dans laquelle il est conservé jusqu'à son utilisation.

2. Test du nouveau microréacteur

Le microréacteur est testé avec le Cytochrome C. 1 µL d'une solution de la protéine dénaturée a été injecté à travers la colonne à un débit de 1,5 µL/min. la solution récoltée en sortie du microréacteur a été analysée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La liste des pics est extraite après calibration du spectre obtenu.

2.1. Résultats

Le spectre de masse MALDI-TOF enregistré à partir de l'analyse des peptides récoltés en aval du nouveau microréacteur est représenté dans la Figure 2.19. Le spectre de masse MALDI-TOF montre l'absence des adduits salins sur les fragments peptidiques issus de la digestion du Cytochrome C dans le microréacteur doté d'un module de dessalage basé sur phase monolithique hydrophobe. Le dessalage en ligne a donc été efficace.

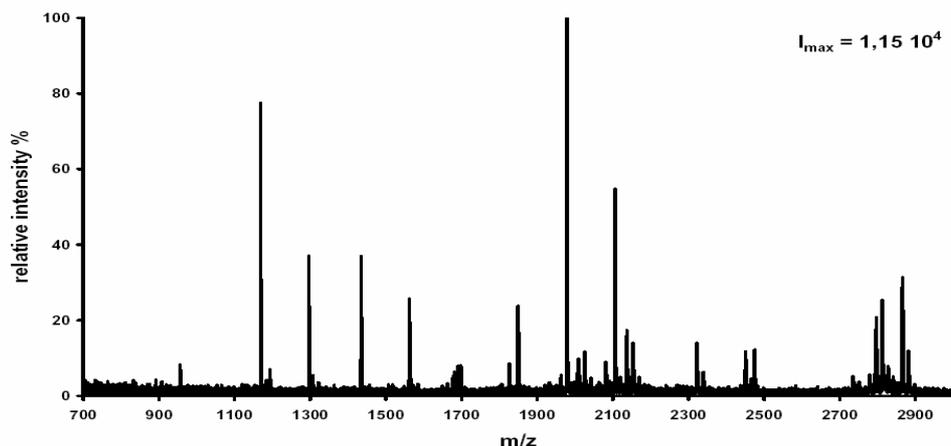


Figure 2.19 : Spectre de masse MALDI-TOF obtenu lors de la digestion du Cytochrome C sur un microréacteur enzymatique intégrant une phase monolithique de dessalage

Le fait de ne pas introduire une manipulation externe entre l'injection de la protéine dans le microréacteur et l'identification des peptides par spectrométrie de masse a permis d'éviter la perte de certains peptides. La couverture de séquence est de 100 %. Tous les résidus sont identifiés par interrogation de bases de données. La Figure 2.20 représente la séquence du Cytochrome C couverte totalement après interrogation de bases de données.

1	11	21	31	41	
GDVEKGKKIF	VQKCAQCHTV	EKGGKHKTGP	NLHGLFGRKT	GQAPGFTYTD	
51	61	71	81	91	101
ANKNKGITWK	EETLMEYLEN	PKKYIPGTKM	IFAGIKKKTE	REDLIAYLKK	ATNE

Figure 2.20 : Séquence du cytochrome C, en rouge les résidus identifiés par interrogation de bases de données.

L'intégration d'une étape de dessalage en ligne est très avantageuse. D'une part, elle nous a permis de prouver l'efficacité de nos phases monolithiques de dessalage préparées au laboratoire. Et d'autre part, nous avons franchi un pas vers l'automatisation du processus de digestion en éliminant la manipulation de l'échantillon lors de l'étape de dessalage.

3. Conclusion

Le but qui a été fixé au début de cette partie consistait à développer un microréacteur de digestion enzymatique basé sur un support solide, efficace et facile à mettre en œuvre. La préparation d'un microréacteur de digestion enzymatique basé sur un support monolithique est effectuée avec succès. Le support monolithique est préparé à base du méthacrylate de

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

glycidyle (GMA) comportant un cycle époxy réactif et du diméthacrylate d'éthylène glycol (EGDMA) qui a joué le rôle du réticulant. La technique de polymérisation utilisée, la polymérisation sous irradiation UV permet un contrôle spatial de la zone à polymériser ce qui permet de réaliser le même travail dans des microsystèmes. L'enzyme utilisée, la trypsine a été immobilisée d'une manière covalente en une seule étape dans des conditions douces.

L'efficacité du microréacteur de digestion enzymatique est testée avec quatre protéines de masses allant de 11,7 kD à 69 kD. L'analyse des solutions récoltées en aval du microréacteur par spectrométrie de masse MALDI-TOF a montré que la digestion des protéines sur le microréacteur est effective et totale. Certains peptides, issus de la digestion non spécifique ont été détectés. Ce phénomène est causé par la présence de traces de la chymotrypsine dans la trypsine commerciale. Cependant, une étape de dénaturation s'avère nécessaire afin de rendre les protéines plus accessibles au site actif de l'enzyme.

L'étude de l'influence de la vitesse d'élution a révélé que cette dernière conditionne le taux de recouvrement obtenu et permet d'établir une cinétique de digestion des peptides reliée au nombre de clivages manquant des peptides.

Les adduits salins observés sur les fragments peptidiques lors des analyses MALDI-TOF ont été éliminés en utilisant un dessalage ZipTip® avant l'analyse par spectrométrie de masse. L'introduction d'une étape de dessalage en ligne sur un support monolithique hydrophobe est prometteuse car d'une part elle a permis d'améliorer les conditions d'analyse sans manipulation de l'échantillon ce qui est considéré comme un pas vers l'automatisation du procédé et d'autre part, l'utilisation de support de dessalage moins cher, préparé au laboratoire, permet de diminuer les charges et de valoriser de plus les supports monolithiques hydrophobes.

Références Bibliographiques

- [1] Vestling, Martha M.; Murphy, Constance M.; Fenselau, Catherine. Recognition of trypsin autolysis products by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **1990**, *62*, 2391-2394.
- [2] Migneault, Isabelle; Dartiguenave, Catherine; Vinh, Joelle; Bertrand, Michel J.; Waldron, Karen C. Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1367-1378.
- [3] Phadke, Ratna S. Immobilization of enzymes/coenzymes for molecular electronics applications. *BioSystems* **1995**, *35*, 179-182.
- [4] Mateo, Cesar; Abian, Olga; Fernandez-Lafuente, Roberto; Guisan, Jose M. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, *68*, 98-105.
- [5] Mukhopadhyay, Kausik; Phadtare, Sumant; Vinod, V. P.; Kumar, Ashavani; Rao, Mala; Chaudhari, Raghunath V.; Sastry, Murali. Gold Nanoparticles Assembled on Amine-Functionalized Na-Y Zeolite: A Biocompatible Surface for Enzyme Immobilization. *Langmuir* **2003**, *19*, 3858-3863.
- [6] Phadtare, Sumant; Vinod, V. P.; Mukhopadhyay, Kausik; Kumar, Ashavani; Rao, Mala; Chaudhari, Raghunath V.; Sastry, Murali. Immobilization and biocatalytic activity of fungal protease on gold nanoparticle-loaded zeolite microspheres. *Biotechnology and Bioengineering* **2004**, *85*, 629-637.
- [7] Takhistov, Paul. Electrochemical synthesis and impedance characterization of nano-patterned biosensor substrate. *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, *19*, 1445-1456.
- [8] Luo, Xi-Liang; Xu, Jing-Juan; Zhao, Wei; Chen, Hong-Yuan. Glucose biosensor based on ENFET doped with SiO₂ nanoparticles. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2004**, *B97*, 249-255.
- [9] Kurokawa, Youichi. Entrap-immobilization of enzyme on composite gel fiber using a gel formation of cellulose acetate and metal (Ti, Zr) alkoxide. *Polymer Gels and Networks* **1996**, *4*, 153-163.
- [10] Josic, Djuro; Buchacher, Andrea. Application of monoliths as supports for affinity chromatography and fast enzymatic conversion. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2001**, *49*, 153-174.
- [11] Josic, D.; Buchacher, A.; Jungbauer, A. Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications* **2001**, *752*, 191-205.
- [12] Bencina, Mojca; Babic, Janja; Podgornik, Ales. Preparation and characterization of ribonuclease monolithic bioreactor. *Journal of Chromatography, A* **2007**, *1144*, 135-142.
- [13] Ma, Junfeng; Zhang, Lihua; Liang, Zhen; Zhang, Weibing; Zhang, Yukui. Monolith-based immobilized enzyme reactors: recent developments and applications for proteome analysis. *Journal of Separation Science* **2007**, *30*, 3050-3059.
- [14] Svec, Frantisek. Less common applications of monoliths: I. Microscale protein mapping with proteolytic enzymes immobilized on monolithic supports. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 947-961.

Chapitre II : Développement d'un microréacteur de digestion enzymatique

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

- [15] Zhang, Kai; Wu, Si; Tang, Xiaoting; Kaiser, Nathan K.; Bruce, James E. A bifunctional monolithic column for combined protein preconcentration and digestion for high throughput proteomics research. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, *849*, 223-230.
- [16] Unarska, M.; Davies, P. A.; Esnouf, M. P.; Bellhouse, B. J. Comparative study of reaction kinetics in membrane and agarose bead affinity systems. *Journal of Chromatography* **1990**, *519*, 53-67.
- [17] Petro, Miroslav; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Immobilization of trypsin onto "molded" macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* **1996**, *49*, 355-363.
- [18] Bencina, Mojca; Bencina, Katja; Strancar, Ales; Podgornik, Ales. Immobilization of deoxyribonuclease via epoxy groups of methacrylate monoliths. *Journal of Chromatography, A* **2005**, *1065*, 83-91.
- [19] Duan, Jicheng; Liang, Zhen; Yang, Chun; Zhang, Jie; Zhang, Lihua; Zhang, Weibing; Zhang, Yukui. Rapid protein identification using monolithic enzymatic microreactor and LC-ESI-MS/MS. *Proteomics* **2006**, *6*, 412-419.
- [20] Ye, Mingliang; Hu, Shen; Schoenherr, Regine M.; Dovichi, Norman J. On-line protein digestion and peptide mapping by capillary electrophoresis with post-column labeling for laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1319-1326.
- [21] Bencina, Katja; Podgornik, Ales; Strancar, Ales; Bencina, Mojca. Enzyme immobilization on epoxy- and 1,1'-carbonyldiimidazole-activated methacrylate-based monoliths. *Journal of Separation Science* **2004**, *27*, 811-818.
- [22] Xie, Shaofeng; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Design of reactive porous polymer supports for high throughput bioreactors: poly(2-vinyl-4,4- dimethylazlactone-co-acrylamide-co-ethylene dimethacrylate) monoliths. *Biotechnology and Bioengineering* **1999**, *62*, 30-35.
- [23] Logan, Timothy C.; Clark, Douglas S.; Stachowiak, Timothy B.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Photopatterning Enzymes on Polymer Monoliths in Microfluidic Devices for Steady-State Kinetic Analysis and Spatially Separated Multi-Enzyme Reactions. *Analytical Chemistry (Washington, DC, United States)* **2007**, *79*, 6592-6598.
- [24] Palm, Anders K.; Novotny, Milos V. Analytical characterization of a facile porous polymer monolithic trypsin microreactor enabling peptide mass mapping using mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 1374-1382.

Chapitre III :

Colonnes monolithiques pour la nano-chromatographie liquide phase inverse

A. Introduction

Dans les dix dernières années, les matériaux monolithiques ont été largement utilisés comme phases stationnaires pour la chromatographie liquide phase inverse à haute performance **RP-HPLC**. Ceci est dû aux nombreux avantages qu'ils offrent par rapport aux matériaux constituant les phases stationnaires traditionnelles.

Les colonnes monolithiques sont actuellement utilisées dans plusieurs domaines allant de la chimie organique aux analyses biologiques et biomédicales, en passant par les sciences de l'environnement. Outre les propriétés hydrodynamiques et physico-chimiques que présente ce type de matériaux, les monolithes ont deux avantages techniques qui sont, le faible coût de fabrication de phases pour la chromatographie et la facilité de préparation au laboratoire. Ces deux caractéristiques permettent de fabriquer des colonnes monolithiques à usage unique. L'intérêt de ce type de colonnes réside dans la possibilité d'injecter directement les échantillons protéomiques à l'état brut sans introduire des étapes supplémentaires telles que la préparation et la préconcentration de l'échantillon. Par contre, les colonnes actuelles nécessitent l'introduction d'une étape de filtration des échantillons. Cette étape conduit à la perte des peptides hydrophobes qui sont adsorbés de façon irréversible sur la surface. De la même manière, dans l'étape de préconcentration, les peptides les plus hydrophiles sont perdus car ils ne sont pas retenus à l'intérieur de la pré-colonne placée en amont de la colonne de séparation.

B. DEVELOPPEMENT DES COLONNES MONOLITHIQUES POUR LA NANO-LC

I. PREPARATION DES COLONNES MONOLITHIQUES

Les colonnes monolithiques dédiées à la séparation et au dessalage ont été préparées à base de monomères méthacryliques hydrophobes. Ces monomères sont constitués d'une chaîne aliphatique de longueur variable, greffée sur la partie méthacrylate. Le nom des phases préparées découle du nombre de carbones dans cette chaîne. Ainsi, une phase dite C12 est préparée à partir du méthacrylate de lauryl qui a 12 carbones dans sa chaîne aliphatique.

1. Composition du mélange réactionnel

Les monomères fonctionnels qui ont été étudiés en séparation sont : le méthacrylate de méthyle C1, le méthacrylate de butyle C4, le méthacrylate de lauryl C12 et le méthacrylate de stéaryle

C18. Pour toutes les colonnes préparées dans cette étude, l'agent réticulant utilisé était le diméthacrylate d'éthylène (EGDMA). La teneur en monomère réticulant est fixée à 35 % du volume total des monomère.

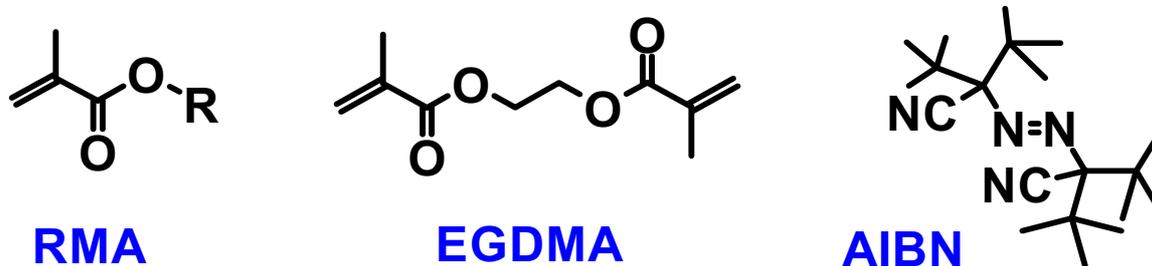


Figure 3.1 : Structures chimiques des monomères fonctionnels utilisés, de l'agent réticulant et de l'amorceur.

Une bonne phase de séparation doit développer non seulement une structure microporeuse donnant naissance à une grande surface spécifique pour avoir des interactions avec l'échantillon introduit dans la phase mobile, mais aussi une structure macroporeuse suffisante afin de minimiser la résistance au transfert de masse. Le porogène que nous devons choisir, doit d'une part répondre à ce compromis, et d'autre part il doit solubiliser les monomères. Après une longue étude effectuée au sein de mon stage de DEA, notre choix s'est fixé sur un porogène binaire constitué de cyclohexanol et de l'éthylène glycol avec un pourcentage volumique de 80 % et de 20 % respectivement.

L'initiateur utilisé pour le photo-amorçage des réactions de polymérisation est l'AIBN, sa teneur massique était de 1 % de la masse totale du mélange réactionnel. En effet, la préparation de ces colonnes, qui ont été destinées pour les études en la nano-LC, a été précédée par une étude préliminaire, durant laquelle des colonnes ont été fabriquées à partir des mêmes mélanges réactionnels, mais cette fois-ci avec une faible concentration en amorceur, 1 % en masse par rapport à la masse des monomères. Ces colonnes, dites basse pression, ont servi pour la validation des mélanges réactionnels ainsi que pour la détermination des conditions de polymérisation afin d'assurer la reproductibilité de ces supports.

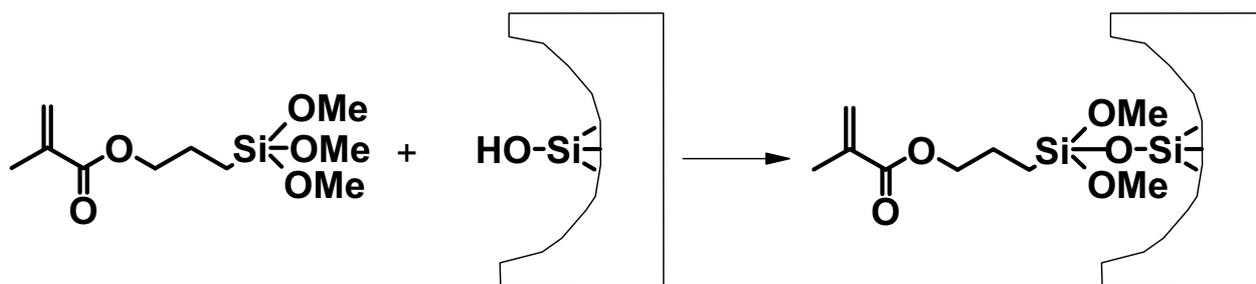
Le tableau suivant regroupe la composition des différentes colonnes étudiées dans la première partie de ce chapitre.

Tableau 3.1 : Composition du mélange réactionnel des colonnes étudiées

Colonne	Monomères	Porogène	Pourcentage volumique de Porogène
C1	MMA/EGDMA 65/35	CyOH/Et(OH) ₂ 80/20	65 %
C4	BMA/EGDMA 65/35	CyOH/Et(OH) ₂ 80/20	65 %
C12	LMA/EGDMA 65/35	CyOH/Et(OH) ₂ 80/20	60 %
C18	SMA/EGDMA 65/35	CyOH/Et(OH) ₂ 80/20	65 %

2. Protocole standard de préparation des colonnes monolithiques

Les supports monolithiques sont préparés dans des capillaires en silice fondue, transparents aux irradiations UV. Par conséquent, ces capillaires ne sont pas recouverts de polyimide mais de Téflon[®] qui est moins résistant, c'est pour cela qu'il faut les manipuler avec précaution. Il s'avère qu'à ces échelles, un traitement des parois internes est nécessaire, afin d'ancrer de façon covalente la phase monolithique à l'intérieur du capillaire. Ce traitement de parois est réalisé en deux étapes. La première étape consiste à l'activation des parois internes pour hydrolyser les fonctions silanols. Pour cette fin, nous avons utilisé un lavage basique avec une solution NaOH 0,2 M suivi d'un lavage acide avec une solution HCl 0,2 M. La deuxième étape consiste à greffer l'agent de traitement de parois, qui est introduit dans une solution à 30 % volumique dans l'acétone pur. Dans ce cas, nous avons utilisé le 3-(triméthoxysilylpropyl) méthacrylate (3-TMSM). Les groupements méthacrylates de cette molécule réagissent avec les groupements méthacrylates des monomères d'une manière covalente.



3-TMSM

Paroi interne du capillaire

Figure 3.2 : Schéma représentant la fonctionnalisation de la paroi interne du capillaire.

II. CARACTERISATION DES COLONNES MONOLITHIQUES

1. Caractérisation morphologique

La morphologie des supports monolithiques a été caractérisée par microscopie électronique à balayage (MEB). Les images MEB permettent de valider la polymérisation du monolithe à l'intérieur du capillaire, comme le montre la Figure 3.3.

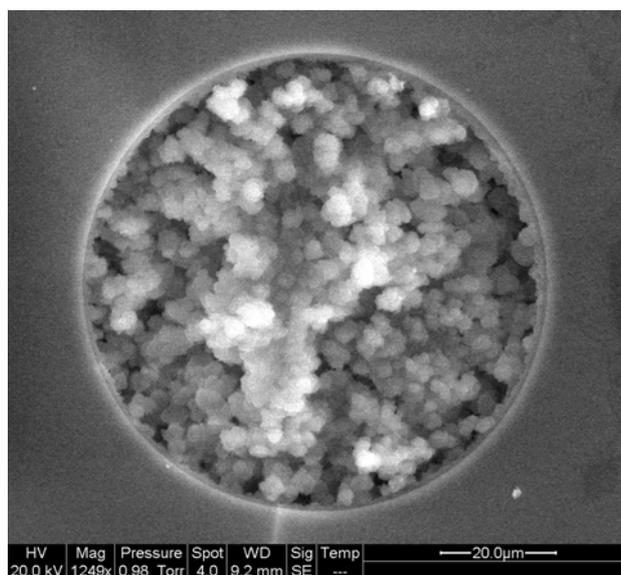
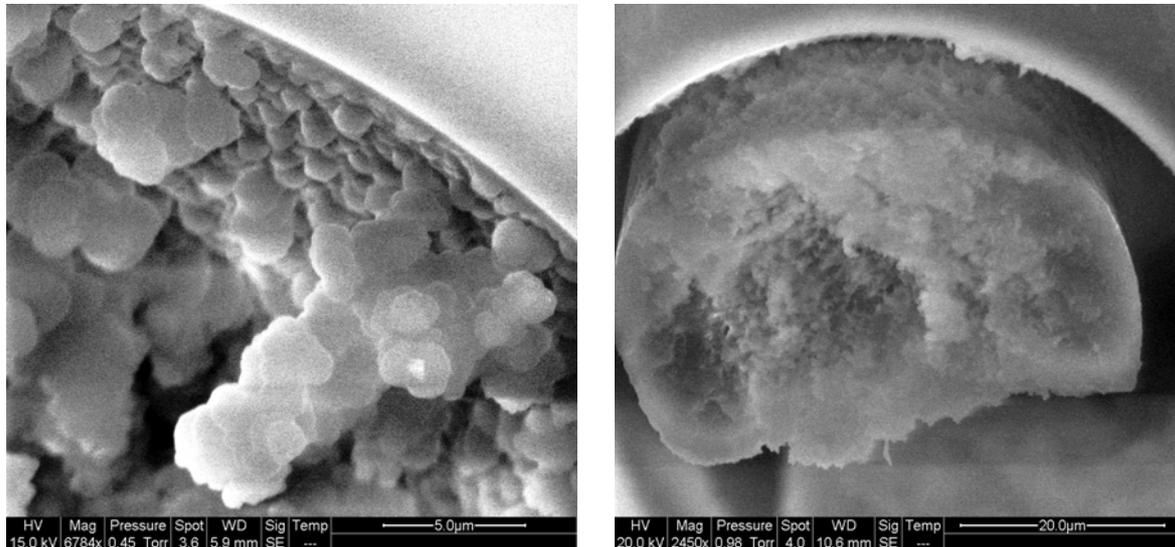


Figure 3.3 : Image MEB d'une coupe transversale d'une colonne monolithique à base de monomère méthacrylique hydrophobe.

Effet du traitement de parois

Les images MEB permettent aussi d'étudier l'effet du prétraitement des parois internes du capillaire.

La Figure 3.4 représente deux images MEB, celle de gauche montrant une phase monolithique dans un capillaire qui a subi un prétraitement, la phase est bien accrochée sur les parois internes du capillaire. Tandis que la phase monolithique, présente dans le capillaire non traité, image de droite, s'est décollée des parois.



Monolithe accroché d'une manière covalente sur les parois internes d'un capillaire traité

Présence d'une faille entre le monolithe et les parois internes d'un capillaire non traité

Figure 3.4 : Images MEB de colonnes monolithiques en présence et en absence de traitement de parois internes du capillaire

Mise en évidence de l'hétérogénéité des matériaux monolithiques

Les polymères réticulés sont des matériaux hétérogènes. Ceci est dû au fait que les monomères divinylés, agents de réticulation, sont plus réactifs que les monomères monovinylés dits fonctionnels. Ceci conduit à la formation des zones hautement réticulées, qui précipitent dès leurs formations, conduisant à la formation d'un grand nombre de globules de petite taille et des zones moins réticulées. Ces dernières sont gonflées par des monomères et conduisent à la formation d'un nombre de globules petits avec de grandes tailles. [1,2]

Nous avons tenté de montrer l'existence de ces deux types de zones différentes à l'aide des images de microscopie électronique à balayage (MEB). La Figure 3.5 représente une vue agrandie de différentes zones d'une colonne monolithique, mettant en évidence la présence de deux structures de taille de nodules différentes.

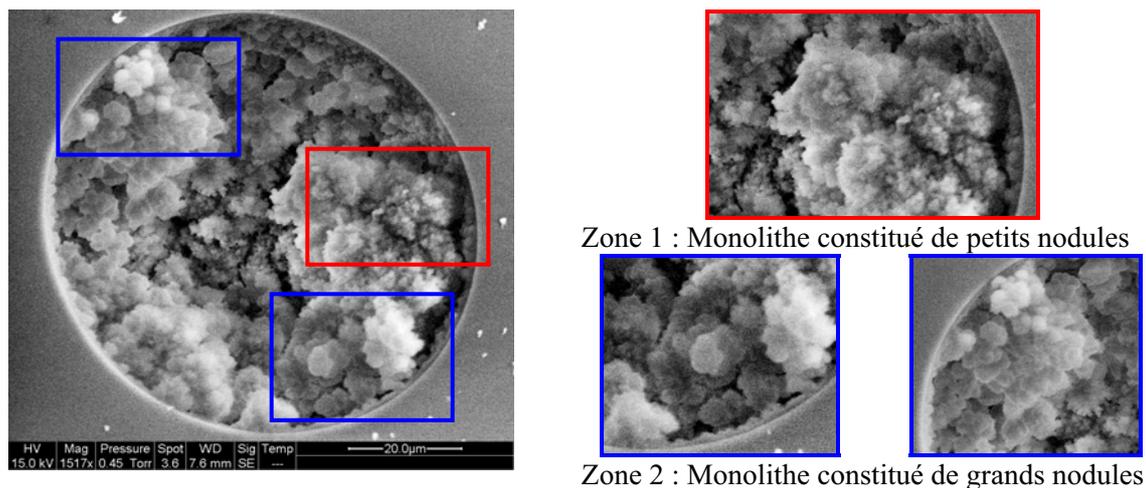


Figure 3.5 : Image MEB mettant en évidence l'hétérogénéité des matériaux monolithiques

2.Caractérisation hydrodynamique

2.1. Mesure de la perte de charge d'une colonne monolithique

La courbe de la perte de charge d'une colonne représente l'évolution de la pression de la colonne au cours d'une expérience de séparation chromatographique. Pour une colonne commerciale PepMap® d'une longueur de 15 cm remplie de billes de silice, la pression est étroitement liée à la viscosité de la phase mobile, constituée dans notre cas d'un mélange (Eau + Acétonitrile). L'allure de cette courbe est caractérisée par une petite augmentation de la pression avec l'introduction de l'acétonitrile dans le mélange, ceci est dû à l'augmentation de la viscosité du mélange (Eau + Acétonitrile) avec des petites concentrations d'acétonitrile. Ensuite, la pression connaît une chute intense lorsque la teneur en acétonitrile dans la phase mobile est maximale.

La valeur maximale de la perte de charge, ΔP_{\max} pour cette colonne commerciale est de 125 bars. Pour les colonnes monolithiques préparées à base de méthacrylates au laboratoire, la courbe de la perte de charge est caractérisée par une forte augmentation de la pression au début de l'introduction de l'acétonitrile dans la phase mobile, suivie d'une chute de pression moins intense que celle observée avec la colonne commerciale. De plus, les valeurs de perte de charge maximales dans le cas des colonnes monolithiques varient entre **8** bars pour les colonnes monolithiques à base de méthacrylate de méthyle et **90** bars pour les colonnes monolithiques à base de méthacrylate de stéaryle pour une longueur de 45 cm qui est trois fois plus grande que celle de la colonne commerciale PepMap®.

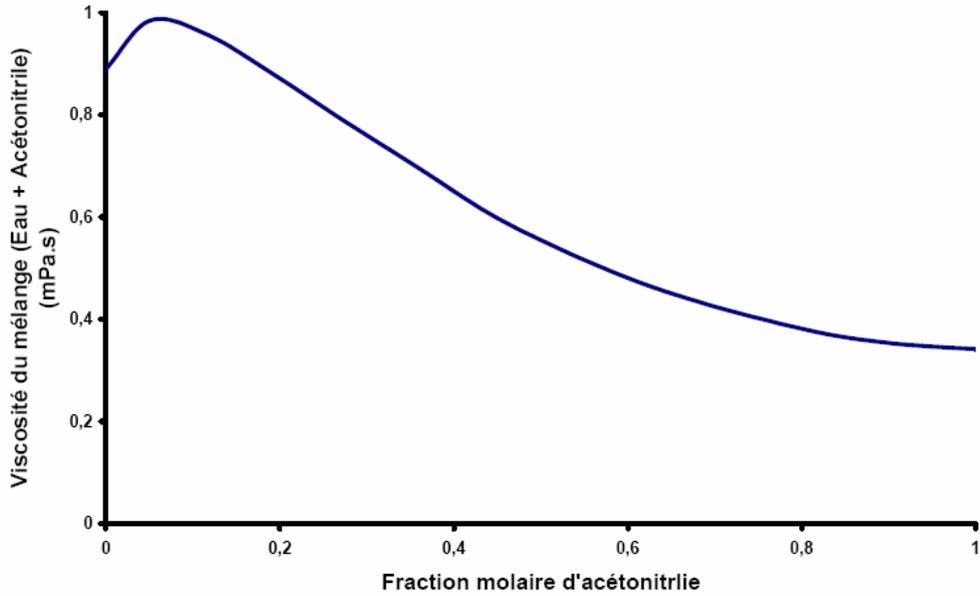


Figure 3.6 : Variation de la viscosité du mélange (Eau + Acétonitrile) en fonction de la fraction molaire de l'acétonitrile

Ces valeurs, nettement inférieures aux 125 bars observées dans le cas d'une colonne commerciale, peuvent être expliquées par la présence d'un réseau interconnecté de macropores qui facilitent l'écoulement de fluides à l'intérieur des colonnes monolithiques.

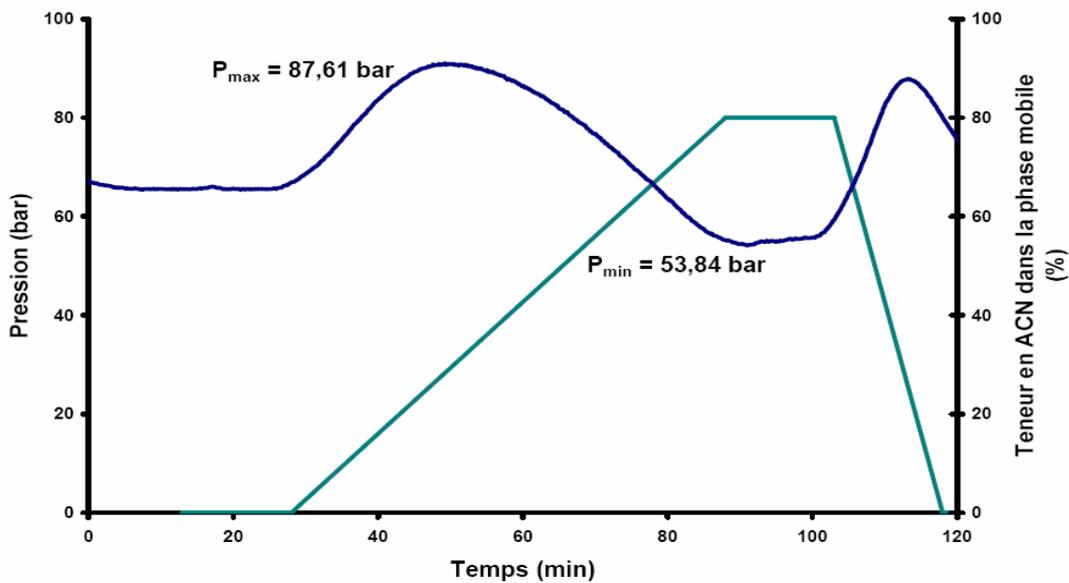


Figure 3.7 : Evolution de la pression lors d'une expérience de séparation sur une colonne monolithique à base de méthacrylate par rapport à la teneur en acétonitrile dans la phase mobile

2.2. La mise en évidence du gonflement du monolithe

Au cours d'une expérience de séparation, nous avons mesuré la pression d'une colonne monolithique, représentée en bleu dans le graphe de la Figure 3.8. La viscosité de la phase mobile a été calculée tout au long de cette expérience en utilisant la relation suivante :

$$\eta = \sum_{j=0,n} C_j X_2^j \quad (3.1)$$

Dans l'équation (3.1) X_2 représente la fraction molaire de l'acétonitrile. Les coefficients C_j sont calculés à partir d'une mesure expérimentale de la viscosité à 25°C. Le tableau suivant regroupe les valeurs de ces coefficients [3].

Tableau 3.2 : Valeurs des coefficients C_j calculés à partir d'une mesure expérimentale de la viscosité à 25°C.

Coefficient	C_0	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6
Valeur	0,89606	2,4347	-22,175	63,922	-93,094	67,935	-19,58

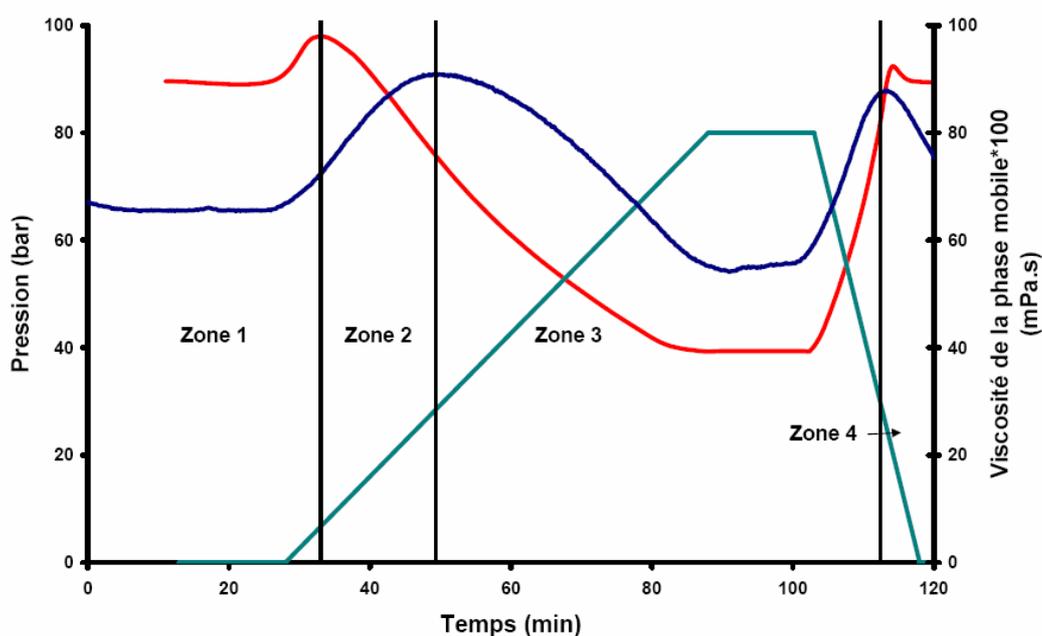


Figure 3.8 : Comparaison de l'évolution de la pression, courbe en bleu, et de la viscosité de la phase mobile, courbe en rouge, par rapport à la teneur en acétonitrile dans la phase mobile

Le comportement des réseaux polymères réticulés (gonflement ou rétrécissement) est décrit dans la littérature [4,5], il dépend fortement de leur degré de réticulation.

Dans la zone 1 et la zone 3, la variation de la pression est normale, elle suit la variation de la viscosité de la phase mobile. Dans la zone 2, l'augmentation de la teneur en acétonitrile conduit à une diminution de la viscosité et malgré cela, la pression de la colonne augmente. Cette augmentation est expliquée par le gonflement du monolithe par l'acétonitrile d'où la diminution de la taille des pores. Dans la zone 4, le phénomène inverse s'est produit. La diminution de l'acétonitrile dans la phase mobile, se traduit par une augmentation de la viscosité, conduit au dégonflement du monolithe. La taille des pores redevient normale et par la suite la pression diminue.

2.3. Perméabilité des monolithes

La perméabilité B_0 est une caractéristique des milieux poreux. Elle va nous permettre de comparer les différentes colonnes préparées. Parce qu'elle tient compte des paramètres géométriques de la colonne tels que la section, la longueur, le débit et la viscosité dynamique de la phase mobile. De plus, elle est en fonction de la variation de pression, entre les extrémités de la colonne, dite perte de charge. Cette dernière est liée directement à la structure poreuse du support chromatographique. La valeur de la perméabilité est calculée à partir de la loi de Darcy donnée par la relation (3.2).

$$B_0 = \frac{\eta L Q}{A \Delta P} \quad (3.2)$$

Dans cette relation, η représente la viscosité dynamique de la phase mobile, L la longueur de la colonne, Q le débit de l'éluant, ΔP la perte de charge et A la section de la colonne. Dans notre cas, pour les colonnes monolithiques comme pour la colonne commerciale PepMap® la valeur de A est de $4,41 \times 10^3 \text{ } (\mu\text{m}^2)$.

Les valeurs de la viscosité η et de la perte de charge ΔP utilisées, correspondent au plateau observé dans la zone 1 au début de la courbe de l'évolution de la pression, la composition de la phase mobile correspondante à ce plateau est de 100 % d'eau. La viscosité est égale donc à la viscosité de l'eau pure qui est de 0,896 mPa.s.

Un autre paramètre important, qui peut-être calculé à partir de la perméabilité, est le diamètre moyen des pores d_p , la valeur de ce paramètre est donnée par la relation empirique (3.3), dite relation de Kozeny-Carman.

$$d_p = 2 \times \sqrt{\frac{5 \times B_o}{\epsilon_T}} \quad (3.3)$$

Où B_o est la perméabilité de la colonne et ϵ_T représente la fraction volumique poreuse. Dans les cas des colonnes monolithiques, la valeur de la fraction volumique est inférieure à la fraction volumique du porogène introduit dans le mélange réactionnel [6].

Cependant, en première approximation, nous avons considéré qu'elles sont approximativement égales. Le Tableau 3.3 regroupe les dimensions des colonnes, les paramètres mesurés après la connexion de ces colonnes à la nano-LC ainsi que les grandeurs physiques calculées à partir des relations (3.2) et (3.3). Ceci va nous permettre de comparer d'une part, les colonnes monolithiques entre elles et d'autre part les colonnes monolithiques avec la colonne conventionnelle PepMap®.

Tableau 3.3 : Dimensions des colonnes monolithiques étudiées et d'une colonne commerciale PepMap® ainsi que les grandeurs physiques calculées à partir des relations (3.2) et (3.3).

Phases	L (cm)	Q (nL/min)	ϵ_T	ΔP (Bar)	B_o ($10^{-2} \mu m^2$)	d_p^1 (μm)
C1	45	200	0,65	8,6	35,2	3,29
C4	45	200	0,65	23,5	12,9	1,99
C12	45	200	0,6	70,6	4,29	1,19
C18	45	200	0,65	93,9	3,22	0,99
PepMap®	15	100	0,3	125	0,4	0,5

¹ les valeurs de la perméabilité B_o et du diamètre moyen des pores d_p sont calculées à partir de ΔP qui est mesurée à l'état gonflé du monolithe.

La comparaison des valeurs de la chute de pression, de la perméabilité et du diamètre moyen des pores des colonnes monolithiques entre elles, montre que, plus la chaîne aliphatique du monomère est longue, plus le diamètre moyen des pores est faible. En effet, plus la chaîne aliphatique du monomère est longue, plus la masse des globules qui apparaissent dans le milieu est grande, ce qui conduit à une séparation de phase plus précoce. Les globules sont plus nombreux et plus petits, la distribution de la taille moyenne des pores est décalée vers les valeurs les plus faibles.

Ceci conduit à une augmentation de la valeur de la chute de pression. Vu que cette dernière est inversement proportionnelle à la perméabilité, les valeurs de celle-ci ont connu une diminution. La Figure 3.9 représente la courbe de variation de la chute de pression mesurée dans les colonnes monolithiques en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique du monomère fonctionnel de chaque colonne.

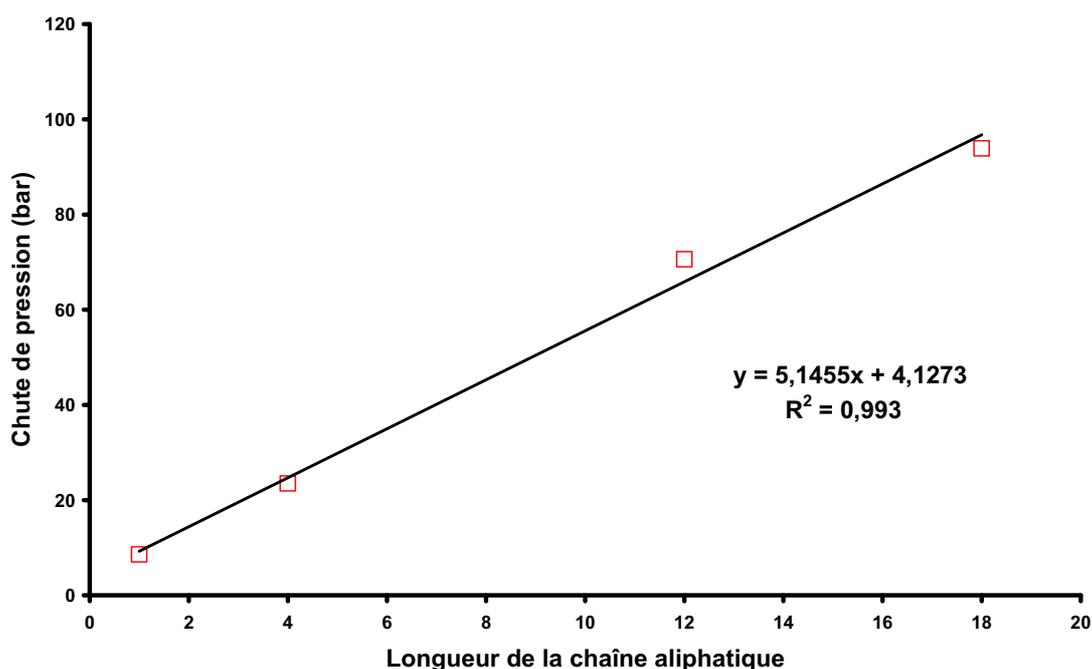


Figure 3.9 : Chute de pression de la colonne en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique des monomères.

La chute de pression des colonnes monolithiques varie d'une manière linéaire en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique du monomère fonctionnel avec un facteur de corrélation

de 0,993. Le petit écart remarqué pour la phase C12 est due à la valeur de la teneur volumique en porogène qui est de 60 %, une valeur qui est inférieure aux 65 % des autres phases.

Par ailleurs, la comparaison des colonnes monolithiques avec la colonne commerciale PepMap® montre que les valeurs de la perméabilité B_0 des colonnes monolithiques sont 8 à 88 fois plus élevées que celle de la colonne PepMap®, et que cette dernière a des pores de diamètre moyen jusqu'à 6 fois plus petit que celui des supports monolithiques. Ce qui justifie la valeur de la chute de pression de 125 bars observée à un débit de 100 nL/min qui représente la moitié du débit dans les colonnes monolithiques et à une longueur qui représente le 1/3 de la longueur des colonnes monolithiques.

Cependant, les paramètres étudiés ; la perméabilité B_0 et le diamètre moyen des pores d_p ne permettent pas, seuls, de faire une comparaison qualitative entre les différentes colonnes étudiées. Il est donc nécessaire d'étudier le pouvoir de séparation et calculer les grandeurs de rétention de chaque colonne.

3. Etude des performances séparatives des colonnes monolithiques hydrophobes

3.1. Présentation de l'appareillage utilisé

La détermination du comportement et des performances séparatives des colonnes monolithiques à base de monomères hydrophobes, synthétisées auparavant, a été effectuée à l'aide d'un test de séparation comportant deux molécules de structures chimiques très proches. En effet, ces molécules sont des marqueurs chimiques fluorophores, utilisées dans la technique 2D Differential Gel Electrophoresis (**2D-DIGE**) pour la quantification des protéines.

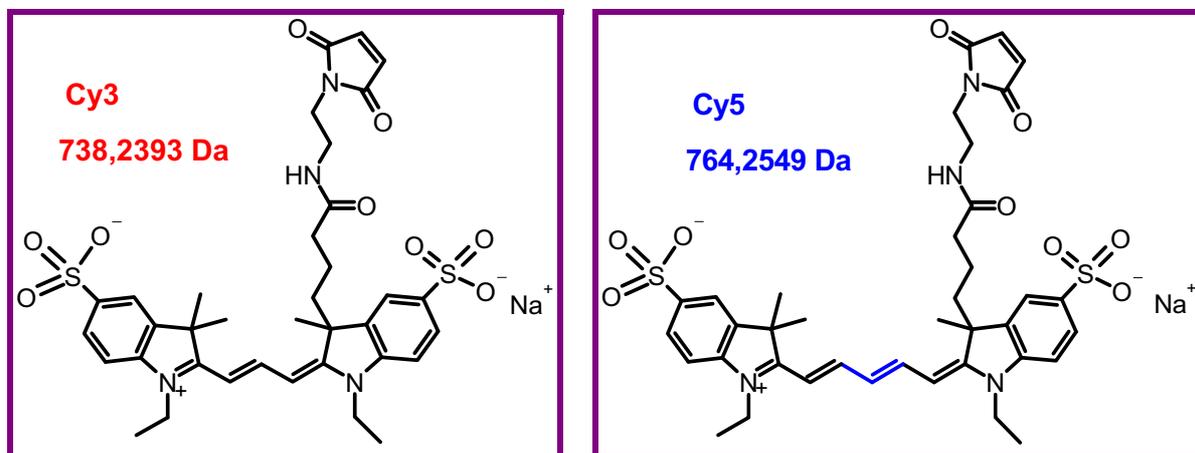


Figure 3.10 : Structures chimiques des deux fluorophores commerciaux Cy3 et Cy5.

Les colonnes monolithiques sont montées sur une chaîne de nano-chromatographie en phase liquide couplée avec deux détecteurs de fluorescence (**LIF**).

La chaîne de nano-chromatographie en phase liquide utilisée est l'Ultimate® 3000 (U 3000) représentée dans la Figure 3.11, c'est une nouvelle nano-LC de LC-packing (Dionex). C'est un prototype que le laboratoire a reçu afin de réaliser les β tests. Son avantage essentiel est la présence d'un pont fluidique qui permet de corriger le débit dans la colonne en fonction de sa perte de charge.



Figure 3.11 : Image de la chaîne de nano-chromatographie en phase liquide l'Ultimate 3000 de LC-packing (Dionex)

Si la perte de charge de la colonne est importante, un débit apparaîtra dans le pont. Une vanne appelée stepper se fermera pour créer une perte de charge supplémentaire sur la voie déchet. Ceci aura pour effet d'augmenter le débit dans la colonne. La Figure 3.12 représente le système de correction de débit de l'Ultimate® 3000 constitué d'un pont fluidique et d'une vanne appelée : stepper.

La détection a été effectuée par spectrofluorométrie. Le principe de cette technique est basé sur la capacité que développent certains composés organiques. Ces composés sont fluorescents, c'est à dire qu'ils réémettent sous forme de lumière une partie de l'énergie qu'ils reçoivent d'une source lumineuse excitatrice. On observe la lumière réémise dans une direction perpendiculaire à celle de la source excitatrice, l'intensité lumineuse est

proportionnelle à la concentration de la substance si cette concentration est suffisamment faible.

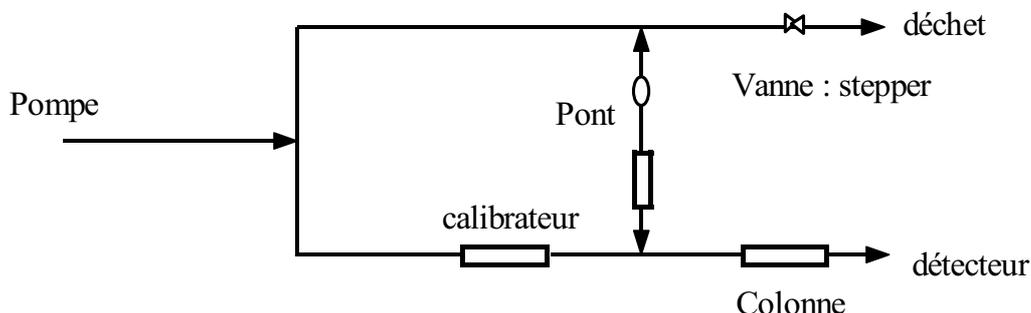


Figure 3.12 : Système de correction de débit de l'Ultimate® 3000 de LC-packing (Dionex)

Ce type de détecteur est très sensible (100 à 1000 fois plus que le détecteur U.V) et très sélectif. On peut étendre son champ d'application en transformant, par une réaction appropriée, une substance non fluorescente en une autre qui le sera. Environ 15% des composés chimiques sont naturellement fluorescents, ce qui restreint quelque peu son utilisation. Ce type de détecteur est utilisable en mode gradient.

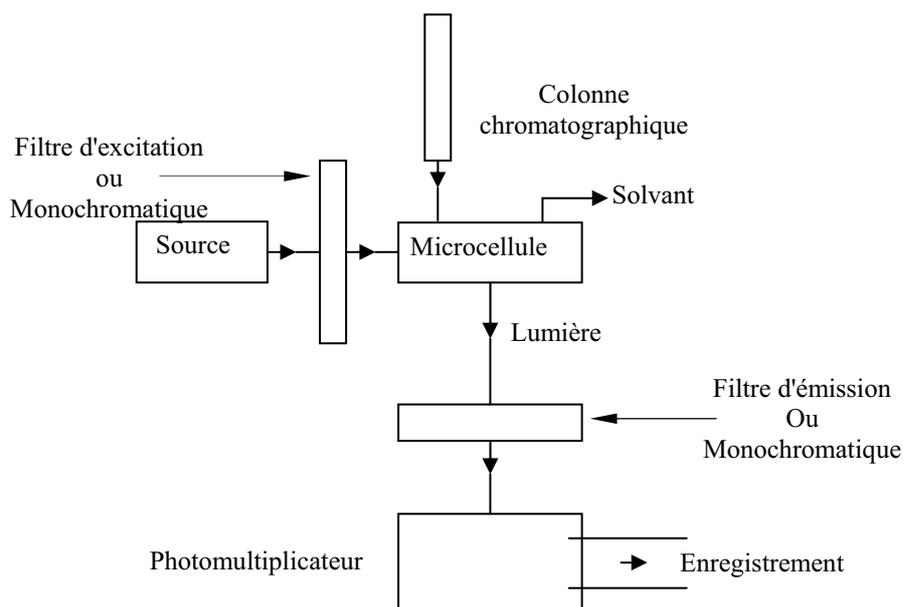


Figure 3.13 : Principe d'un spectrofluoromètre

Les détecteurs de fluorescence utilisés dans cette étude sont deux prototypes appelés : détecteur double canaux Zetalif (Picometrics, Toulouse).



Figure 3.14 : Image des détecteurs Zetlif (Picometrics, Toulouse)

Les deux détecteurs sont indépendants, l'un est dédié au Cy3 est doté d'un laser à diode, émettant, à une longueur d'onde de 532nm, une couleur verte, et l'autre est dédié au Cy5 est doté d'un laser Hélium Néon, émettant, à une longueur d'onde de 633nm, une couleur rouge. La longueur entre les deux canaux est de 10cm, la jonction entre la colonne monolithique et les détecteurs est réalisée par l'intermédiaire d'un capillaire transparent de 40 μ m de diamètre interne.

Cet appareil présente une très haute sensibilité. Cette dernière peut-être mesurée à l'aide de la loi fondamentale de la fluorométrie et celle de Beer-Lambert :

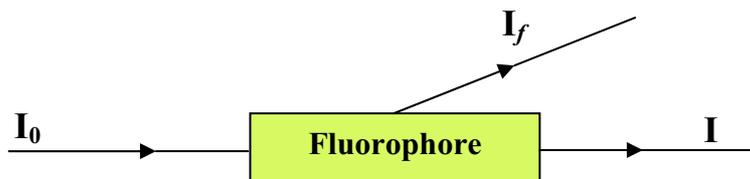


Figure 3.15 : Schéma de l'absorption et de l'émission d'un fluorophore.

La loi fondamentale de la fluorimétrie indique que l'intensité I_f du rayonnement émis par fluorescence est proportionnelle, pour un volume de fluorophore donné, à l'intensité absorbée I_{abs} . On peut la calculer par la relation suivante :

$$I_f = KI_{abs} = K(I_0 - I) \quad (3.4)$$

I_0 et I sont respectivement les intensités du rayonnement incident et transmis.

Par ailleurs, la loi de Beer-Lambert pour l'absorption de l'intensité incidente, peut s'écrire sous la forme :

$$I = I_0 10^{-\varepsilon l^* C} \quad (3.5)$$

$\varepsilon(\lambda)$ étant l'absorptivité molaire du fluorophore à la longueur d'onde λ utilisée. Pour les deux fluorophores utilisés dans ce test de séparation, Cy3 et Cy5, l'absorptivité molaire est de 15×10^4 et $25 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ respectivement. l^* représente la longueur du chemin optique et C la concentration du fluorophore.

Le remplacement de l'intensité transmise I par son expression dans la loi de Beer-Lambert dans l'équation (3.4) donne :

$$I_f = KI_0(1 - 10^{-\varepsilon l^* C}) \quad (3.6)$$

Vu que la concentration et l'épaisseur traversée sont très faibles, l'approximation suivante est valable :

$$10^{-\varepsilon l^* C} \approx 1 - 2,3 \times \varepsilon l^* C \quad (3.7)$$

L'équation (3.7) devient :

$$I_f \approx 2,3 \times KI_0 \varepsilon l^* C = K' C \quad (3.8)$$

La réponse du détecteur, dans notre cas, est donc linéaire en fonction de la concentration. Cette réponse a été mesurée en utilisant de très faibles concentrations de fluorophores. Ceci revient à la capacité de mesurer la sensibilité des détecteurs LIF.

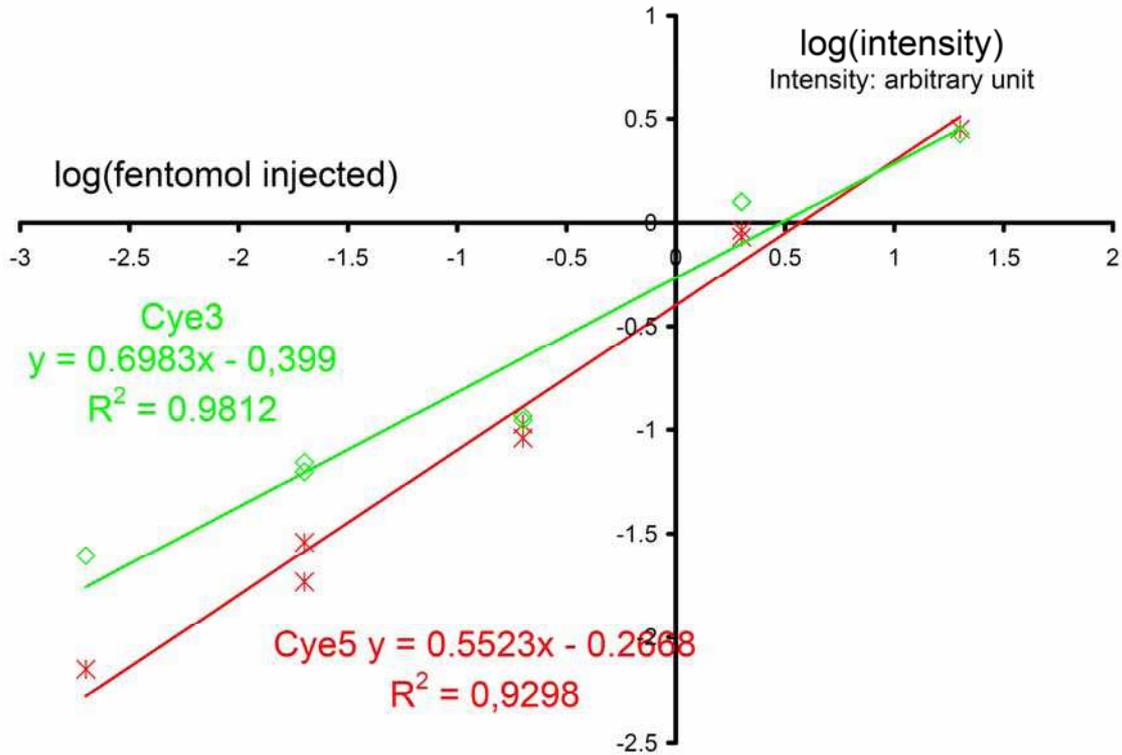


Figure 3.16 : Intensité de fluorescence en fonction des concentrations injectées des deux réactifs (exprimées en femtomole) les courbes sont en (log-log plot).

D'après les courbes de la Figure 3.16, l'intensité de fluorescence I_f est linéaire sous quatre ordres de grandeur en fonction de la concentration, pour les deux fluorophores. Ceci corrèle avec l'approximation proposée dans l'équation (3.7). De plus, le comportement des deux détecteurs est similaire.

L'utilisation d'un rayonnement laser pour l'excitation, à la place d'une source lumineuse classique, permet de diminuer le bruit de fond afin d'obtenir un bon rapport signal/bruit. Par suite, elle conduit aussi à l'abaissement de la concentration détectable. Ainsi l'injection de 2 attomoles seulement de réactif dans une colonne commerciale PepMap® avec couplage nanoLC /détecteurs LIF. La Figure 3.17 représente le pic détecté à partir de l'injection de 2 attomoles du marqueur Cy5.

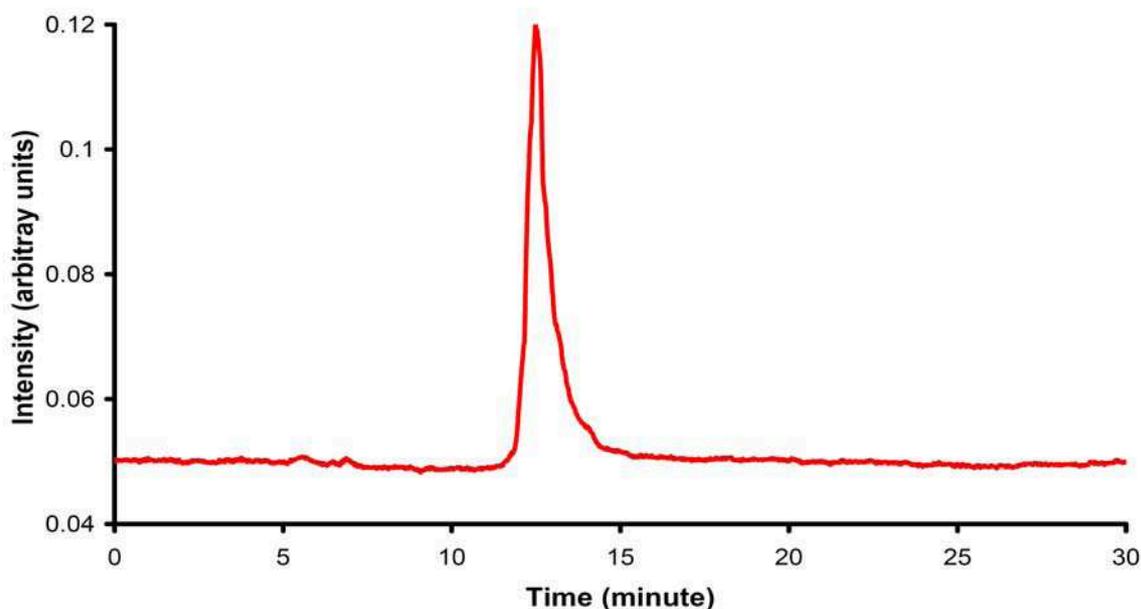


Figure 3.17 : Pic détecté pour une injection de 2 attomoles de marqueur Cy5.

Cette sensibilité est supérieure à celle observée avec le spectromètre de masse d'au moins deux ordres de grandeur.

3.2. Protocole de test des colonnes monolithiques :

Après quelques analyses, permettant de vérifier la constance des performances analytiques des colonnes monolithiques, nous avons effectué notre test sur les quatre phases. Cependant, une étude de répétabilité des résultats est donc nécessaire pour un usage multiple en toute sûreté.

Préparation de la solution

Deux solutions ont été préparées à base de Cy5 3 et de Cy5 5 dans le solvant DMF à une concentration de 2 pmol/ μ L. Ces solutions ont été diluées dans l'eau à une concentration de 20 attomoles/ μ L. Un mélange de 10 μ L de chaque solution a été mis dans un petit flacon, qui a été ensuite placé dans le passeur d'échantillon pour une injection automatique.

Gradient d'élution utilisé

Le gradient d'élution utilisé est un gradient classique en chromatographie liquide phase inverse. Il commence par l'eau acidifiée et se termine par l'acétonitrile, afin d'éluer les échantillons retenus par des interactions hydrophobes à l'intérieur de la colonne.

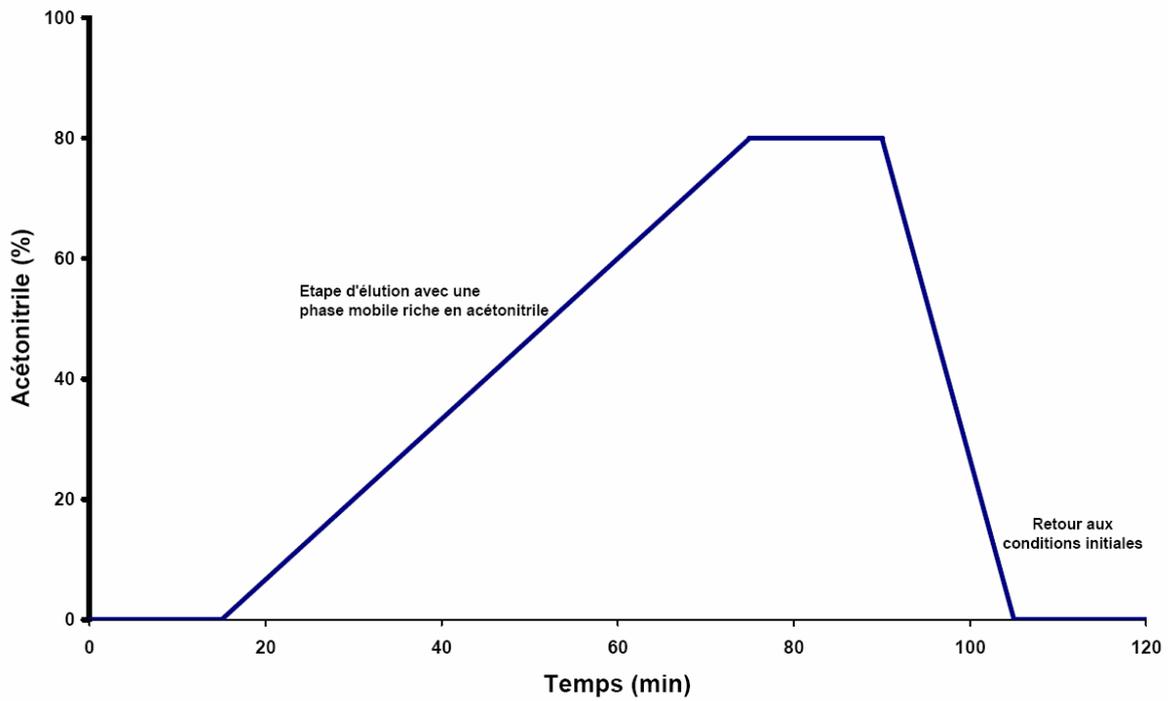


Figure 3.18 : Représentation graphique du gradient d'acétonitrile utilisé en phase inverse.

Nous avons utilisé deux phases mobiles, la phase mobile A constituée de 100 % d'eau acidifiée avec 0,1 % d'acide formique, et la phase mobile B constituée de 80 % d'acétonitrile et de 20 % d'eau.

Tableau 3.4 : Tableau du gradient utilisé lors du test des colonnes monolithiques

Temps	% B	% ACN
0	0	0
15	0	0
75	100	80
90	100	80
105	0	0
120	0	0

3.3.Résultats

Pour pouvoir comparer l'efficacité et le pouvoir séparatif des différentes colonnes, nous avons calculé la valeur de la capacité de pic pour les deux molécules de chaque colonne.

Phase C1

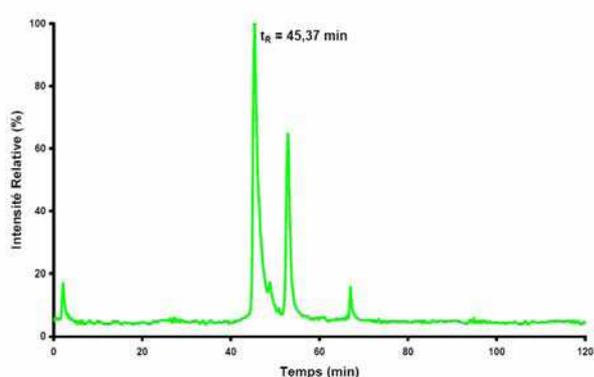


Figure 3.19 : Pic détecté pour une injection de 2 attomoles de marqueur Cy3 sur la colonne C1.

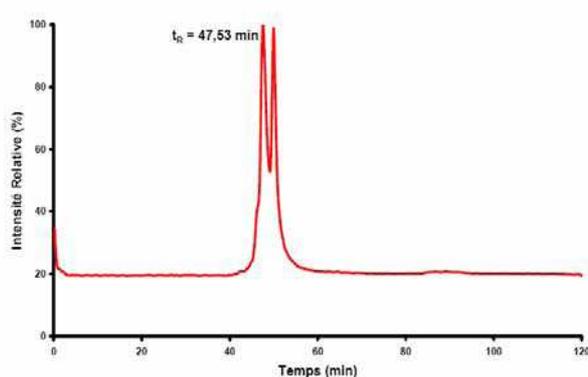


Figure 3.20 : Pic détecté pour une injection de 2 attomoles de marqueur Cy5 sur la colonne C1.

Phase C4

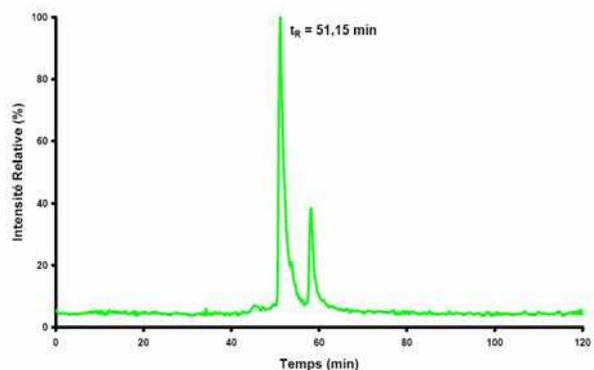


Figure 3.21 : Pic détecté pour une injection de 2 attomoles de marqueur Cy3 sur la colonne C4.

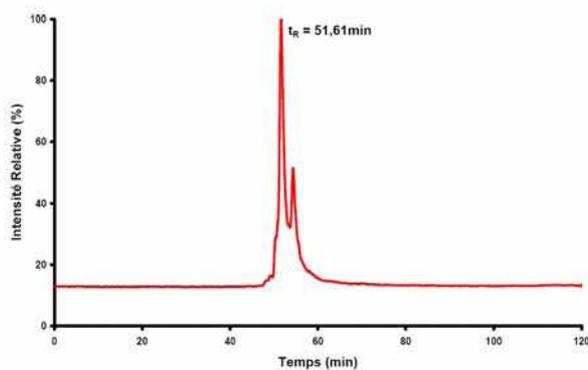


Figure 3.22 : Pic détecté pour une injection de 2 attomoles de marqueur Cy5 sur la colonne C4.

Phase C12

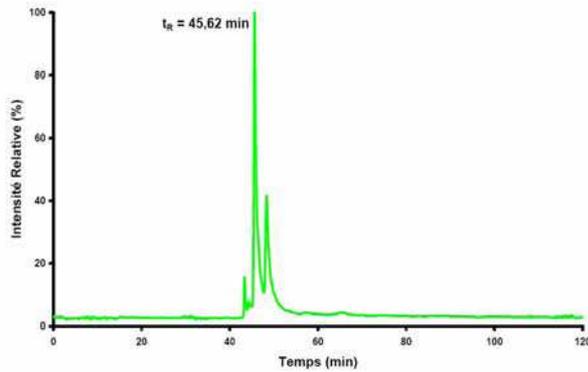


Figure 3.23 : Pic détecté pour une injection de 2 attomoles de marqueur Cy3 sur la colonne C12.

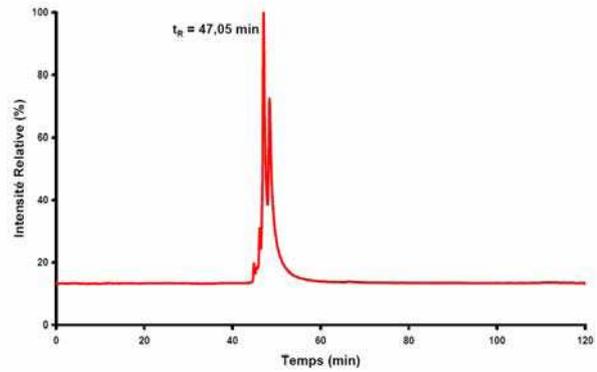


Figure 3.24 : Pic détecté pour une injection de 2 attomoles de marqueur Cy5 sur la colonne C12.

Phase C18

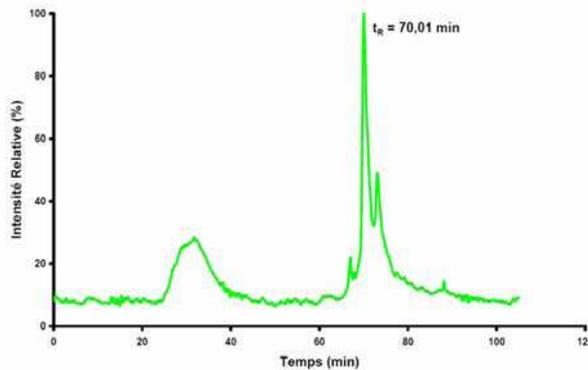


Figure 3.25 : Pic détecté pour une injection de 2 attomoles de marqueur Cy3 sur la colonne C18.

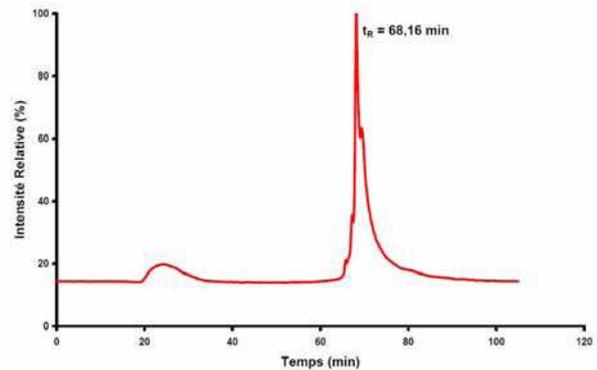


Figure 3.26 : Pic détecté pour une injection de 2 attomoles de marqueur Cy5 sur la colonne C18.

Tout d'abord nous allons commencer par calculer les caractéristiques du gradient utilisé durant ces expériences.

Caractéristiques du gradient

Le temps du gradient t_G . Dans le cas des expériences chromatographiques menées dans cette première partie de l'étude des colonnes monolithiques, le temps de gradient était de :

$$t_G = 75 - 15 = 60 \text{ min.}$$

La gamme du gradient est $\Delta\varphi = \varphi_f - \varphi_0$, où φ_f et φ_0 désignent les fractions volumiques finale et initiale du solvant organique dans la phase mobile. Pour les présentes expériences chromatographiques la gamme du gradient était de $\Delta\varphi = 0,80$

La raideur intrinsèque du gradient b_s , permet de déterminer la taux de variation de $\log k$ en fonction du volume de la phase mobile qui travers la colonne.

$$b_s = \frac{t_m S \Delta\varphi}{t_G} \quad (3.9)$$

Afin de calculer la valeur de ce paramètre, nous allons calculer la valeur de la constante S en utilisant l'approximation suivante :

$$S = \sqrt{\text{masse moléculaire}} \quad (3.10)$$

Dans le cas des deux fluorophores utilisés Cy3 et Cy5 nous avons :

$$S_{Cy3} = 6,78 \quad S_{Cy5} = 6,90$$

D'où :

$$b_{s_{Cy3}} = 0,53 \quad b_{s_{Cy5}} = 0,54$$

Par ailleurs, la détermination des performances de séparation dans le cas d'une expérience de séparation en chromatographie phase inverse mode gradient, repose sur un concept qui est simple et très pratique, qui est la capacité du pic P_c . Cette dernière peut être calculée à partir de la relation suivante :

$$P_C = \left(\frac{t_G}{1,699 \delta} \right) + 1 \quad (3.11)$$

Dans cette relation, t_G désigne le temps du gradient et δ la largeur du pic à mi-hauteur.

Pour chaque colonne, nous avons mesuré les largeurs à mi-hauteur δ_i des pics des deux molécules et le temps de rétention réduit t'_R qui ne tient pas compte du temps mort t_m passé par tout composé non retenu par la phase stationnaire. Ces valeurs sont indispensables pour calculer les capacités de pics ainsi que certaines grandeurs de rétention.

Les valeurs des temps de rétention réduits t'_{Ri} et les largeurs à mi-hauteur des pics δ_i des deux marqueurs lors de leur séparation sur les colonnes monolithiques, sont regroupées dans le Tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Les temps de rétentions réels et les largeurs des pics à mi-hauteur de Cy3 et Cy5 pour chaque colonne monolithique.

Phases	$t'_{R\text{ Cy3}}$ (min)	$t'_{R\text{ Cy5}}$ (min)	δ_{Cy3} (min)	δ_{Cy5} (min)
C1	39,37	41,54	1,11	1,65
C4	45,15	45,61	1,12	1,04
C12	39,62	41,05	0,5	0,57
C18	64,01	62,16	1,09	0,93

D'après les résultats du Tableau 3.6, le capacité de pic de la phase C12 préparée à base de méthacrylate de lauryl est, de loin, les plus grande. Ce résultat préliminaire, que nous pouvons déjà déduire à partir des valeurs du Tableau 3.5, étant donné que les largeurs à mi-hauteur des pics et les temps de rétention réduits des deux marqueurs observés sur la phase C12 sont pratiquement les plus faibles, montre que le pouvoir séparatif de la colonne préparée à partir de la phase C12 est le plus grand, suivi de celui de la colonne préparée à partir de la phase C18 et enfin vient la colonne préparée à partir de la phase C1 avec le nombre de plateaux théoriques effectifs le plus faible.

Tableau 3.6 : Les capacités de pics des colonnes monolithiques vis-à-vis des marqueurs Cy3 et Cy5

Phase	$P_{c\ cy3}$	$P_{c\ cy5}$
C1	33	22
C4	32-33	35
C12	72	63
C18	33	39

Pour mieux caractériser les colonnes monolithiques, un calcul de certaines grandeurs de rétention demeure indispensable.

Calcul des grandeurs de rétention

Les grandeurs de rétention calculées sont :

Le facteur de rétention k_G apparent. Ce facteur peut être calculé à partir d'un chromatogramme par la relation suivante :

$$k_G = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad (3.12)$$

Le dernier paramètre calculé est la résolution. Ce facteur peut être calculé à partir d'un chromatogramme avec la relation suivante :

$$R = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\delta_2 + \delta_1} \quad (3.13)$$

Tableau 3.7 : Les facteurs de rétention, de séparation, de résolution et les efficacité de séparation des colonnes monolithiques vis-à-vis des marqueurs Cy3 et Cy5.

Phase	$k_{G_{cy3}}$	$k_{G_{cy5}}$	R	$P_{c_{Cy3}}$	$P_{c_{Cy5}}$
C1	6,56	6,92	0,93	33	22
C4	7,52	7,60	0,24	32-33	35
C12	6,60	6,84	1,58	72	63
C18	10,66	10,36	1,92	33	39

Le facteur de rétention apparent varie légèrement pour les colonnes monolithiques préparées à partir des phases C1, C4 et C12. Pour la phase C18, la valeur de ce facteur est très élevée. Ce facteur correspond au rapport entre la masse du soluté dans la phase mobile sur la masse du soluté dans la phase stationnaire. Il rend compte de la "capacité" de la colonne à retenir un soluté. Ce facteur est indépendant du débit de la phase mobile, plus k' est grand, plus le soluté sera retenu longtemps dans la colonne, ceci conduit à l'élargissement du pic, ce que nous pouvons constater sur les chromatogramme correspondants à la séparation des deux marqueurs sur la colonne monolithique préparée à partir de la phase C18. Le contrôle de ce paramètre peut-être obtenu en jouant sur la composition et la polarité de la phase mobile.

La résolution des colonnes monolithiques testées varie entre 0.93 et 1.92. Ce paramètre important correspond à une grandeur numérique caractérisant l'aptitude du système chromatographique à séparer 2 composés d'un mélange. La séparation est jugée bonne s'il y a un retour à la ligne de base entre deux pics, ceci est réalisé si $R > 1,5$. D'après les résultats du

Tableau 3.7, seules les colonnes monolithiques préparées à partir des phases C12 et C18 ont la capacité de bien séparer les deux marqueurs.

Cependant, la colonne monolithique obtenue à partir de la phase C12 reste la plus performante, étant donné que le temps de séparation est plus court par rapport à celui observé avec la phase C18 et que la capacité de pics de la colonne est beaucoup plus grande.

Dans le cas d'une expérience chromatographique en mode isocratique, l'efficacité de séparation est évaluée en calculant le nombre de plateaux théoriques absolus donné par la relation suivante :

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2 \quad (3.14)$$

N représente le nombre de plateaux théoriques absolus, encore appelé efficacité théorique. Il permet de comparer les efficacités de séparation des composés dans une colonne donnée. Cependant, ce paramètre reste relatif, puisqu'il dépend du composé choisi et des conditions du test. Afin de pouvoir comparer les performances de colonnes différentes vis-à-vis d'un même composé, il faut remplacer le temps de rétention total t_R par le temps de rétention réduit t'_R qui ne tient pas compte du temps mort t_m passé par tout composé non retenu par la phase stationnaire.

L'expression (3.14) s'écrit de la manière suivante :

$$N_{eff} = 5,54 \times \left(\frac{(t_R - t_m)}{\delta} \right)^2 \quad (3.15)$$

Dans cette expression, N_{eff} représente le nombre de plateaux théoriques effectifs sur la partie active de la colonne. Pour obtenir le nombre de plateaux effectifs par mètre il suffit de diviser cette valeur par la longueur L de la colonne.

Tandis que, dans le cas d'une expérience de séparation en chromatographie phase inverse mode gradient, la relation qui permet de calculer le nombre de plateaux théorique afin d'évaluer l'efficacité de séparation est la suivante :

$$N = 16 \times \left(\frac{t_m(1+k_e)}{W} \right)^2 \quad (3.16)$$

Dans cette relation k_e est le facteur de rétention à l'élution et W représente la largeur du pic à la base. En acceptant que les pics sont gaussiens la relation (3.16) devient :

$$N = 16 \times \left(\frac{t_m(1+k_e)}{1,699\delta} \right)^2 \quad (3.17)$$

Le facteur de rétention à l'élution k_e est calculé à partir de la valeur médiane du facteur de rétention par la relation suivante :

$$k_e = \frac{k^*}{2} \quad (3.18)$$

k^* représente la valeur médiane du facteur de rétention, c'est la valeur du facteur de rétention d'un composé lorsque la bande correspondante à ce dernier est au milieu de la colonne. La valeur de k^* est calculé à partir de la relation suivante :

$$k^* = \frac{1}{1,15 b_s} \quad (3.19)$$

D'où :

$$k_e = \frac{1}{2,3 b_s} \quad (3.20)$$

Et :

$$k_{e_{cy3}} = 1,64 \quad k_{e_{cy5}} = 1.6$$

La relation (3.17) pour les deux marqueurs devient :

$$N_{cy3} = \frac{1390,28}{\delta_{cy3}^2} \quad N_{cy5} = \frac{1348,92}{\delta_{cy5}^2}$$

Tableau 3.8 : Les facteurs de rétention, de séparation, de résolution et les efficacité de séparation des colonnes monolithiques vis-à-vis des marqueurs Cy3 et Cy5.

Phase	δ_{Cy3} (min)	δ_{Cy5} (min)	N_{Cy3} (plateaux/m)	N_{Cy5} (plateaux/m)
C1	1,11	1,65	2508	1100
C4	1,12	1,04	2460	2768
C12	0,5	0,57	12360	9224
C18	1,09	0,93	2600	3464

D'après les résultats du Tableau 3.8, l'efficacité de la phase C12 préparée à base de méthacrylate de lauryl est, de loin, la plus grande. Ce résultat préliminaire, que nous pouvons déjà déduire à partir des valeurs de largeurs à mi-hauteur des pics des deux marqueurs observés sur la phase C12 sont pratiquement les plus faibles, montre que le pouvoir séparatif de la colonne préparée à partir de la phase C12 est le plus grand, suivi de celui de la colonne préparée à partir de la phase C18.

III.OPTIMISATION DE LA PHASE MONOLITHIQUE C12

Les tests précédents ont montré que, la phase C12 préparée avec le monomère fonctionnel méthacrylate de lauryl est celle qui a le meilleur pouvoir de séparation en comparaison avec les autres colonnes monolithiques. Sa chute de pression est raisonnable et le temps de l'analyse est quasiment le plus faible.

Le reste du chapitre est consacré à l'optimisation de la séparation sur cette phase monolithique en étudiant l'influence de certains paramètres sur la qualité de séparation. Les paramètres étudiés sont le mode de polymérisation et le débit de la phase mobile.

1. Etude de paramètres influençant la qualité de séparation

1.1. Influence de la technique de polymérisation

La colonne monolithique C12 est obtenue par copolymérisation radicalaire initiée par voie photochimique. L'incorporation des monomères dans cette technique de polymérisation n'est pas contrôlée, c'est pourquoi elle conduit à la formation de polymères polymoléculaires caractérisés par des valeurs de l'indice de polydispersité qui dépassent très fréquemment 10. De plus, cette technique de polymérisation ne permet pas de contrôler la distribution de la taille des pores contrairement à la polymérisation vivante contrôlée [7,8,9].

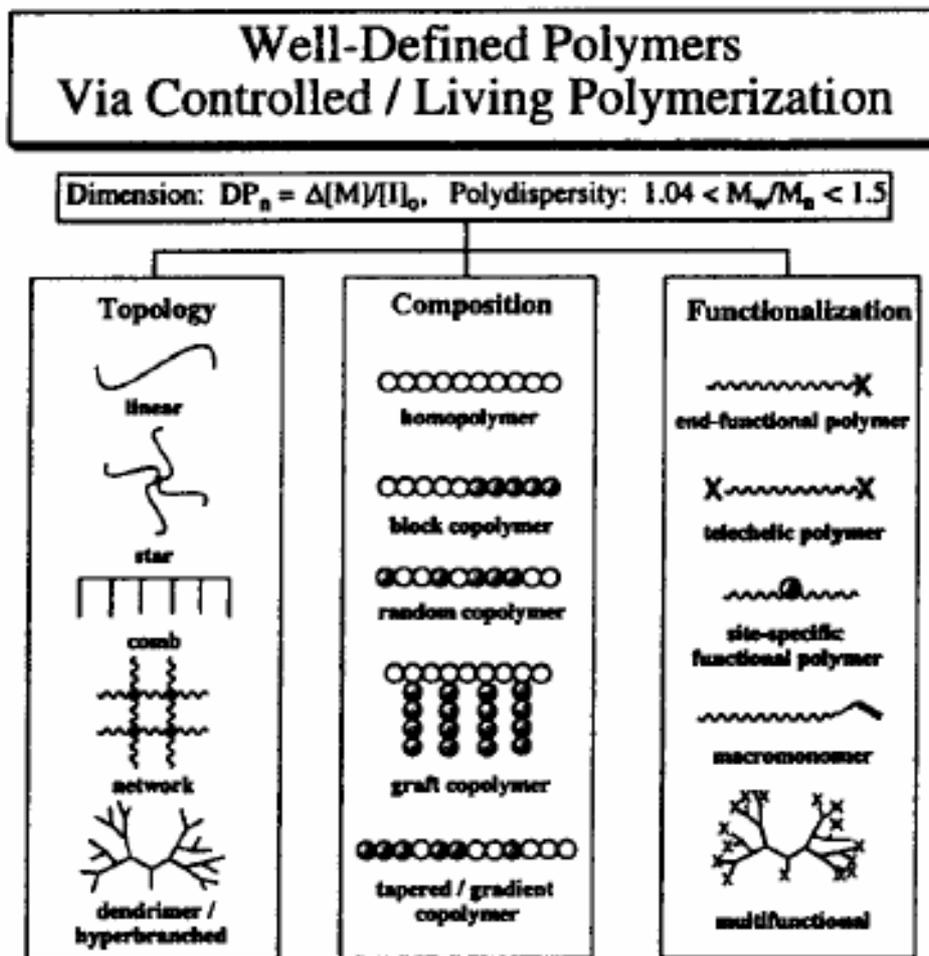


Figure 3.27 : Différents types de contrôle de structure avec la polymérisation vivante contrôlée. [10]

Préparation des colonnes monolithiques C12_v par polymérisation vivante

Les supports monolithiques C12_v sont préparés par polymérisation radicalaire contrôlée, par un agent de transfert de chaîne, du mélange réactionnel des supports C12. Cette technique de

polymérisation est appelée polymérisation vivante avec Transfert de chaîne par Addition-Fragmentation Réversible (RAFT). L'agent de transfert de chaîne utilisé, dit agent RAFT est l'acide S-(thiobenzoyl) thioglycolique.

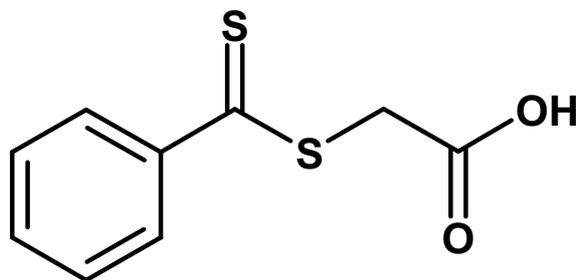


Figure 3.28 : Structure chimique de l'agent RAFT utilisé pour la polymérisation des supports monolithiques C12_v.

Un équivalent de l'agent RAFT par rapport à l'amorceur est ajouté au mélange réactionnel. Le Tableau 3.9 donne la composition du mélange réactionnel utilisé pour la préparation des colonnes monolithiques C12_v.

Après dégazage, le mélange réactionnel est injecté dans des capillaires transparents aux irradiations UV, de 45 cm de longueur et de 75 μm de diamètre interne et qui ont subi un traitement préalable. Une fois la polymérisation terminée, les colonnes monolithiques sont lavées au méthanol et séchées à l'étuve une nuit à 80 °C.

Tableau 3.9 : Composition du mélange réactionnel utilisé pour la préparation des colonnes étudiées.

Monomères	Porogène	Amorceur	Agent de transfert de chaîne
LMA/EGDMA 65/35 v/v	CyOH /Et(OH) ₂ 80/20 v/v	AIBN	l'acide S-(thiobenzoyl) thioglycolique
35	65	1% w/w /mélange	1éq /amorceur

1.2. Protocole du test

Les colonnes monolithiques sont testées suivant le même protocole utilisé précédemment. Elles ont été montées sur la chaîne nano-LC Ultimate® 3000 couplée aux détecteurs de fluorescence (LIF). Ensuite, un mélange des deux marqueurs a été injecté à travers les

colonnes avec le même gradient d'acétonitrile représenté dans la Figure 3.18. Durant ces tests, la perte de charge des colonnes monolithiques C12_v a été mesurée, elle servira par la suite à calculer la perméabilité et le diamètre moyen des pores.

1.3.Résultats

Phase C12_v

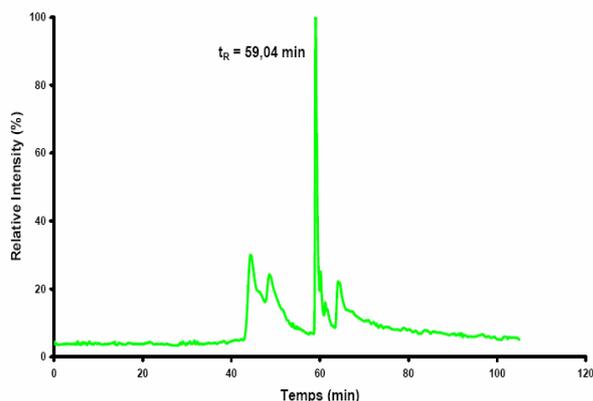


Figure 3.29 : Pic détecté pour une injection de 2 attomoles de marqueur Cy3 sur la colonne C12_v.

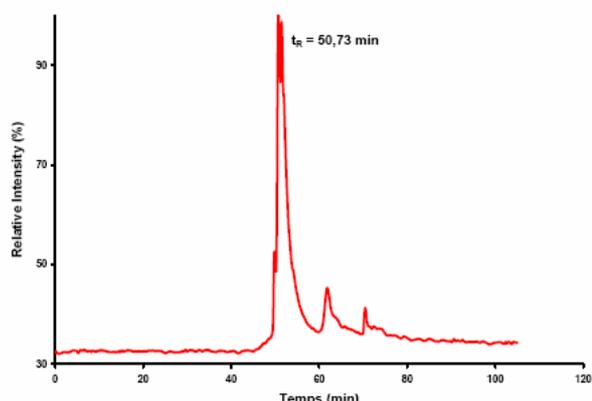


Figure 3.30 : Pic détecté pour une injection de 2 attomoles de marqueur Cy5 sur la colonne C12_v.

Tableau 3.10 : Comparaison des grandeurs physiques des colonnes monolithiques C12V et C12

Phases	ΔP (Bar)	B_o (10^{-2} μm^2)	d_P (μm)	$t'_{R\text{ Cy3}}$ (min)	$t'_{R\text{ Cy5}}$ (min)	δ_{Cy3} (min)	δ_{Cy5} (min)
C12	70,6	4,29	1,19	39,62	41,05	0,5	0,57
C12 _v	56	5,39	1,29	53,04	44,73	0,68	1

La perméabilité de la colonne monolithique préparée par polymérisation vivante est la plus grande ($5,39 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$), la valeur de la chute de pression ΔP mesurée lors d'une expérience de séparation (56 bars) conforte ce résultat. Le diamètre moyen des pores est estimé, avec

l'équation de Kozeny-Carmen, à 1,29 μm . le Tableau suivant regroupe les grandeurs de rétention des deux colonnes monolithiques.

Tableau 3.11 : Les grandeurs de rétention et les efficacités de séparation correspondant aux deux marqueurs Cy3 et Cy5 des deux colonnes monolithiques C12 et C12_v.

Phase	$k_{G_{cy3}}$	$k_{G_{cy5}}$	R	$P_{c_{Cy3}}$	$P_{c_{Cy5}}$
C12	6,60	6,84	1,58	72	63
C12 _v	8,84	7,45	9,80	53	36

Les valeurs du facteur de rétention apparent des deux marqueurs sur la colonne monolithique C12_v sont plus grandes que celles observées sur la colonne C12. Par conséquent, d'un côté la colonne C12_v préparée par polymérisation vivante, a une tendance à retenir plus les marqueurs que la colonne monolithique C12 préparée par polymérisation radicalaire. D'un autre côté, les valeurs élevées de ce facteur signifient que les pics issus du test sur la colonne monolithique C12_v sont plus larges que ceux issus de la colonne monolithique C12. Ce phénomène est bien clair avec le marqueur Cy5 représenté dans la Figure 3.30. Concernant les capacités de pic des deux molécules séparées, celles calculées sur la colonne monolithique C12 sont nettement plus grandes que celles obtenues sur la colonne monolithique C12_v. Au niveau de la résolution, la colonne monolithique préparée par polymérisation vivante est de loin la meilleure avec une résolution de 9.80, à comparer avec la valeur 1.58 pour la colonne monolithique C12. D'autre part, les efficacités de séparation de la colonne monolithique C12_v pour les deux fluorophores est respectivement de 1670, 866 plateaux par mètre, restent inférieures à celles calculées pour ces deux molécules sur la monolithique colonne C12.

En conclusion, la colonne monolithique C12_v préparée par polymérisation radicalaire exhibe des propriétés de séparations très intéressantes, qui dépassent parfois celles de la colonne C12 préparée par polymérisation radicalaire. Cependant, cette dernière reste la plus performante.

1.4. Test de répétabilité des colonnes monolithiques

La répétabilité des caractéristiques séparatives des colonnes monolithiques a été mise en évidence avec un ensemble de tests identiques sur une même colonne à base de méthacrylate

de lauryl d'une longueur de 60 cm et dans les mêmes conditions. Ces tests consistent à séparer les deux marqueurs Cy3 et Cy5 en suivant un protocole identique à celui qui a été utilisé auparavant.

Les résultats de ces tests sont représentés dans le Tableau 3.12.

Tableau 3.12 : Les temps de rétentions réels et les largeurs des pics à mi-hauteur de Cy3 et Cy5 pour une colonne monolithique C12 de 60 cm.

Test	$t'_{R\text{ Cy3}}$ (min)	$t'_{R\text{ Cy5}}$ (min)	δ_{Cy3} (min)	δ_{Cy5} (min)
1	39,75	40,98	0,47	0,3
2	39,72	41,02	0,48	0,3
3	39,77	41,03	0,46	0,27
4	39,79	41	0,44	0,31
5	39,76	41,01	0,45	0,28
6	39,79	41,05	0,47	0,3

La variance des valeurs des temps de rétention réduits pour le Cy3 et le Cy5 est de $4,47 \times 10^{-4}$ et $4,91 \times 10^{-4}$ respectivement. La séparation des deux marqueurs sur la colonne monolithique C12 est répétable au niveau du temps d'analyse ainsi que pour la qualité de séparation. La largeur à mi-hauteur des pics est pratiquement la même pour chaque marqueur durant tous les tests.

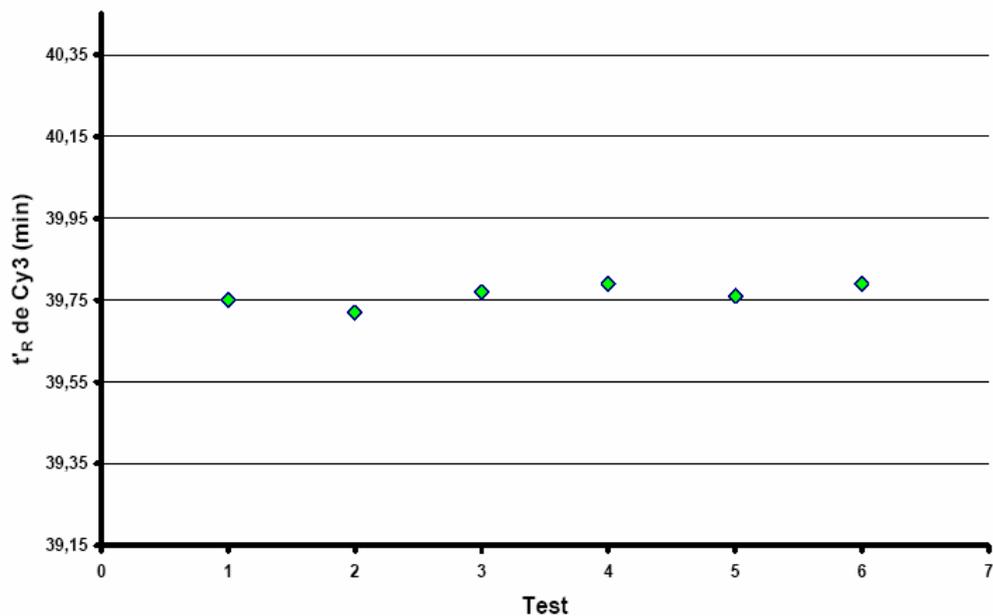


Figure 3.31 : Répétabilité des temps de rétention de Cy3 sur une colonne monolithique C12, L = 60 cm.

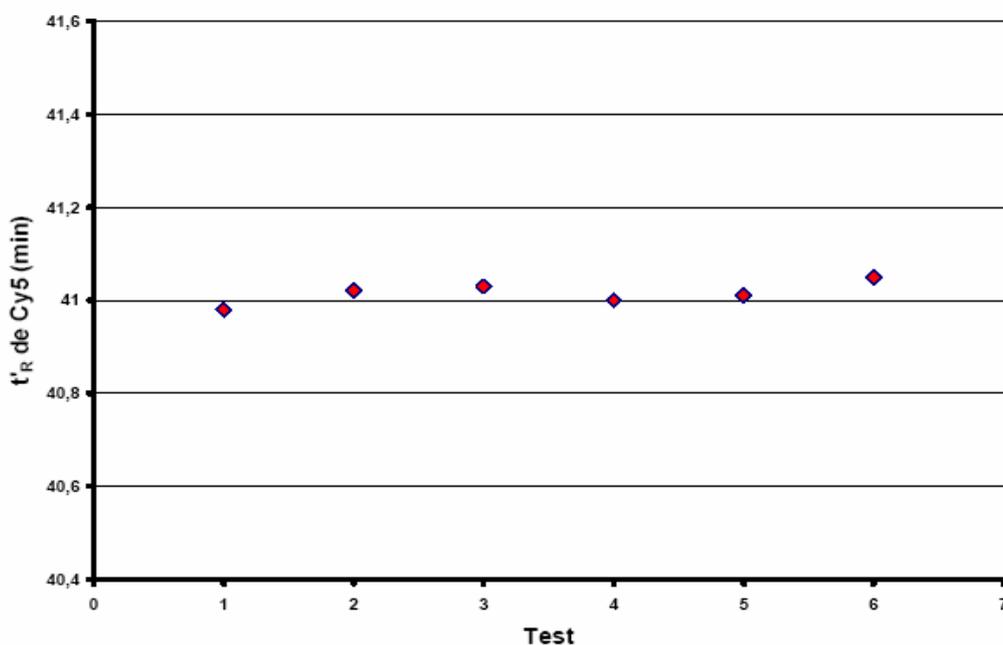


Figure 3.32 : Répétabilité des temps de rétention de Cy5 sur une colonne monolithique C12, L = 60 cm.

1.5. Influence du débit

Le débit de la phase mobile est l'un des paramètres les plus importants, qui influencent l'efficacité de la colonne. Celle-ci peut être exprimée en nombre de plateaux théorique N ou par la hauteur équivalente à l'un de ces plateaux. La relation qui lie ces deux paramètres est la suivante :

$$H = H.E.P.T = \frac{L}{N} \quad (3.21)$$

Plus H sera petit et plus la colonne sera efficace. Pour étudier l'influence du débit de la phase mobile, il existe une équation en chromatographie liquide dite de Knox, qui relie la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile relation (3.22). Cette équation est équivalente à l'équation de Van Deemter en CPG.

$$H(u) = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (3.22)$$

En réalité, l'équation de Knox pour la chromatographie liquide est un peu plus complexe que celle de Van Deemter en phase gazeuse, mais il y a finalement peu de différences et nous utiliserons donc celle de Van Deemter qui est plus simple dans l'utilisation.

Mode opératoire

Afin d'étudier l'influence de la vitesse d'écoulement de la phase mobile dans la colonne sur les propriétés séparatives des colonnes monolithiques. Nous avons effectué une étude sur une colonne monolithique, préparée à partir de la phase C12 par polymérisation radicalaire, de 120 cm de longueur. Le gradient utilisé dans cette étude est différent de celui utilisé précédemment. Nous avons utilisé deux phases mobiles, la phase mobile A, constituée de 100 % d'eau acidifiée avec 0,1 % d'acide formique, et la phase mobile B constituée de 80 % d'acétonitrile et de 20 % d'eau. La Figure 3.33 représente le gradient utilisé pour cette étude.

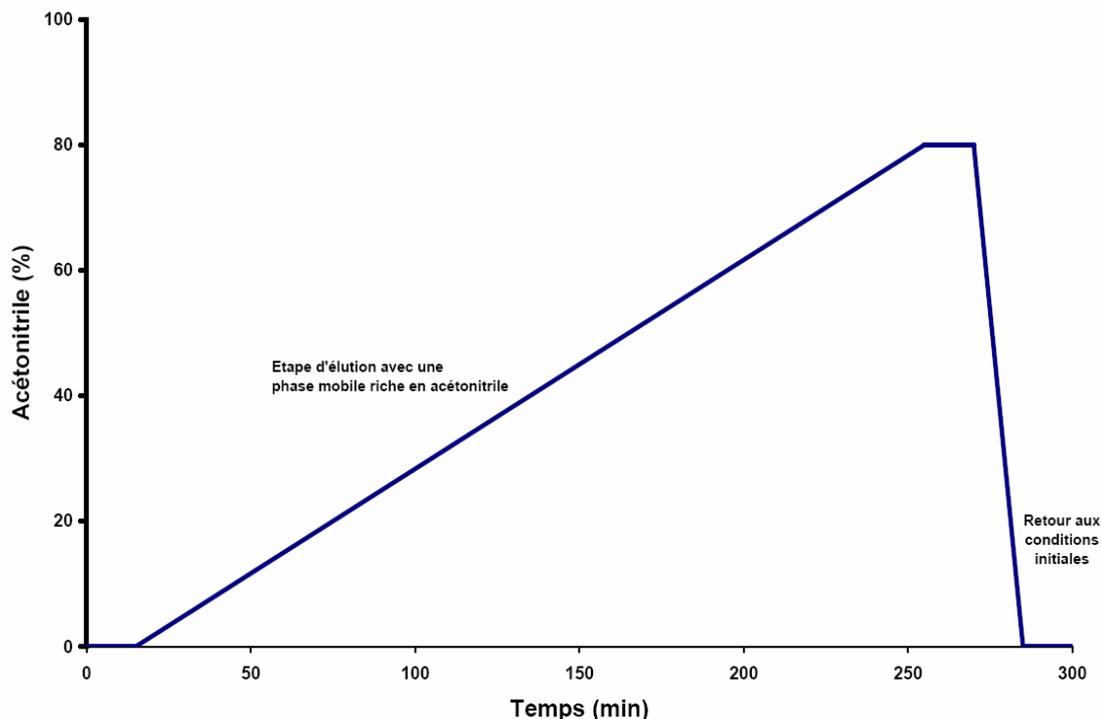


Figure 3.33 : Représentation graphique du gradient d'acétonitrile utilisé en phase inverse pour l'étude de l'influence du débit sur le pouvoir séparatif de la colonne monolithique C12 de 120 cm.

Le Tableau suivant résume le gradient utilisé.

Tableau 3.13 : Tableau du gradient utilisé lors du test de la colonne monolithique C12 de 120 cm

Temps	% B	% ACN
0	0	0
15	0	0
255	100	80
270	100	80
285	0	0
300	0	0

Caractéristiques du gradient

Dans le cas des expériences chromatographiques menées dans cette première partie de l'étude des colonnes monolithiques, le temps de gradient était de : $t_G = 255 - 15 = 240 \text{ min}$.

La gamme du gradient est de $\Delta\varphi = 0,80$

Dans le cas du fluorophore utilisé, Cy3, nous avons :

$$S = 6,78$$

La raideur intrinsèque du gradient b_s , dépend du temps mort de la colonne, ce dernier est lié au débit. Etant donné que le débit dans ces expériences varie, la raideur intrinsèque du gradient varie. Le tableau suivant regroupe les débits utilisés lors de l'étude de la courbe de Van Deemter au moyen de la rétention du marqueur Cy3 sur la colonne monolithique C12, ainsi que les vitesses linéaires correspondantes et la raideur intrinsèque du gradient pour le composé Cy3 (voir Tableau 3.14).

Tableau 3.14 : Débits, vitesses linéaires moyennes et raideur intrinsèque du gradient calculés lors de cette étude

	Débit (nL/min)	u (mm/s)	b_s Cy3
1	50	0,19	0,84
2	100	0,38	0,42
3	200	0,75	0,21
4	300	1,13	0,14
5	400	1,5	0,11

Dans le cas des colonnes monolithiques, la vitesse linéaire moyenne de la phase mobile u est exprimée en mm/s et la hauteur équivalente à un plateau théorique en μm . Le passage du débit à la vitesse linéaire moyenne est effectué avec la relation (3.23)

$$u = \frac{D}{S} \quad (3.23)$$

Avec u , vitesse linéaire moyenne de la phase mobile, D débit de la phase mobile et S section de la colonne chromatographique.

Les résultats des tests obtenus pour le marqueur Cy3 sont présentés dans le Tableau 3.15. Les temps de rétention et les largeurs à mi-hauteur sont accessibles directement à partir des chromatogrammes, les efficacités et les hauteurs équivalentes à un plateau théorique sont calculées à partir des relations (3.17) et (3.21).

Tableau 3.15 : Efficacités et hauteurs équivalentes aux plateaux théoriques calculées pour Cy3 lors de l'étude de l'influence du débit sur l'efficacité de la colonne monolithique C12 de 120 cm.

u (mm/s)	t'_R (min)	δ_{Cy3} (min)	N_{Cy3}	H (μm)
0,19	121,69	2,3	3326	301
0,38	81,78	0,72	15268	65,5
0,75	59,15	0,44	23277	42,9
1,13	50,94	0,38	24807	40,3
1,5	46,48	0,37	23080	43,3

Ces données ont servi pour tracer la courbe de Van Deemter représentée dans la Figure 3.34.

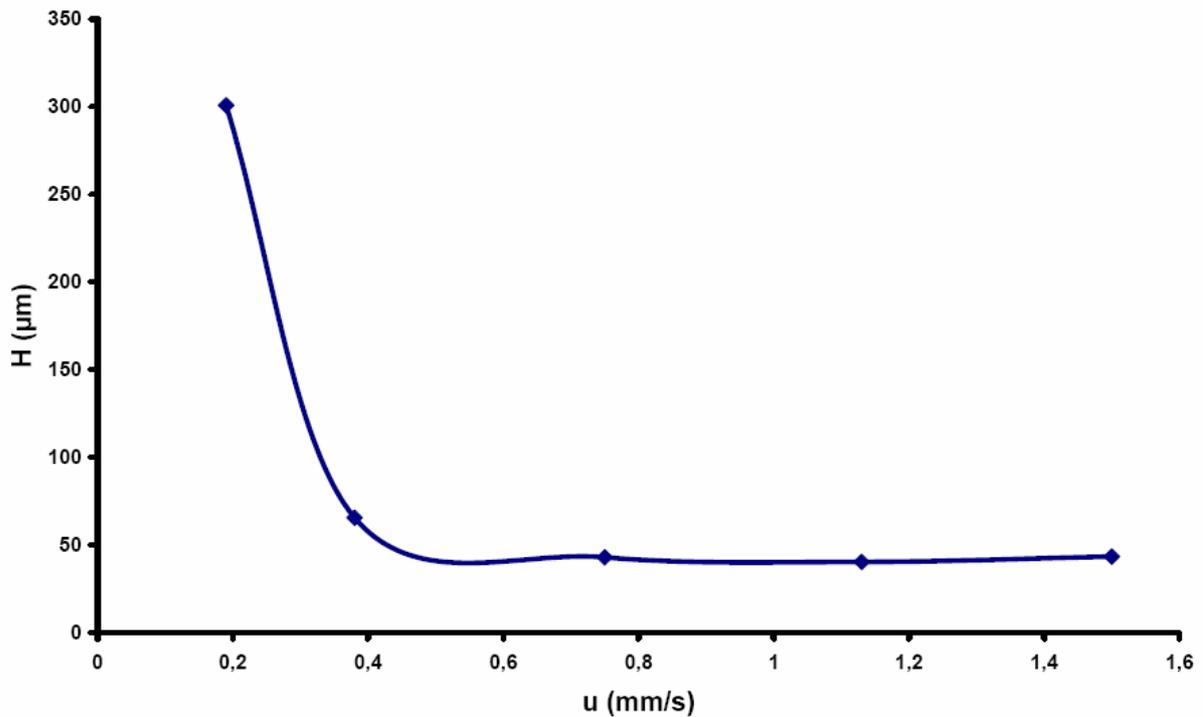


Figure 3.34 : Courbe de Van Deemter obtenue pour la colonne monolithique C12 de 120 cm.

L'allure de la courbe de Van Deemter représentée dans la Figure 3.34 est quasiment plate à haut débit de la phase mobile, ce qui permet d'effectuer des séparations à grande vitesse avec un minimum de perte de l'efficacité de la colonne. Cette constatation rejoindra d'autres constatations similaires dans la littérature à propos du comportement des colonnes monolithiques de chromatographie liquide phase inverse à haut débit de la phase mobile. [11]

Les coefficients A , B et C de la courbe de Van Deemter, sont déterminés à partir du graphique. Sachant que la courbe tend vers la droite, $H = A + Cu$ lorsque u devient grande.

$$A = 0,042 \text{ mm} \quad B = 0,41 \text{ mm}^2 / \text{s} \quad C = 0,45 \text{ s}$$

Cette courbe passe par un minimum, dont les coordonnées correspondent à la vitesse linéaire moyenne optimale de la phase mobile u_{opt} et à la hauteur minimale équivalente à un plateau théorique H_{min} . Ces coordonnées sont déterminées par annulation de la dérivée de l'équation de Van Deemter.

$$u_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}} \quad (3.24)$$

$$H_{min} = A + \sqrt{B * C} + B / \sqrt{\frac{B}{C}} \quad (3.25)$$

Après remplacement de *A*, *B* et *C* avec leur valeurs :

$$\mu_{opt} = 0,96 \mu m / s \quad H_{min} = 39 \mu m$$

La valeur optimale de la vitesse linéaire moyenne est équivalente à un débit optimal de : $D = 252,6 \text{ nL} / \text{min}$. Cela signifie que pour effectuer une rétention très efficace du marqueur Cy3 sur la colonne monolithique C12 de 120 cm avec le nombre maximum de plateaux théoriques, il faut travailler avec ce débit optimal.

IV. SEPARATION D'UN DIGEST DU PLASMA HUMAIN

Après l'étude et l'optimisation des colonnes monolithiques à base de méthacrylate pour la chromatographie liquide à haute performance phase inverse, notre choix s'est fixé sur les colonnes monolithiques à base de méthacrylate de lauryl pour la séparation du digest de Plasma humain lors d'une étude protéique du plasma effectuée dans notre laboratoire.

1. Le plasma humain

À la suite d'une centrifugation de sang, différents éléments se déposeront au fond de l'éprouvette et le liquide et surnagera au-dessus. On observera le plasma flottant à la surface et une couche rougeâtre accumulée au fond avec une mince couche blanchâtre sur le dessus Figure 3.35 ci-dessous.

Le plasma humain est un liquide jaune citrin composé de 91% d'eau. On y trouve 7 g de protéines pour 100 ml de plasma, représentant 7% du poids. Le reste est représenté par des ions et d'autres substances organiques que les protéines. Les concentrations de ces différentes substances, sont maintenues constantes par différents mécanismes. Ainsi le pH est constant chez l'homme sain. Il est de 7,35 à 7,45.

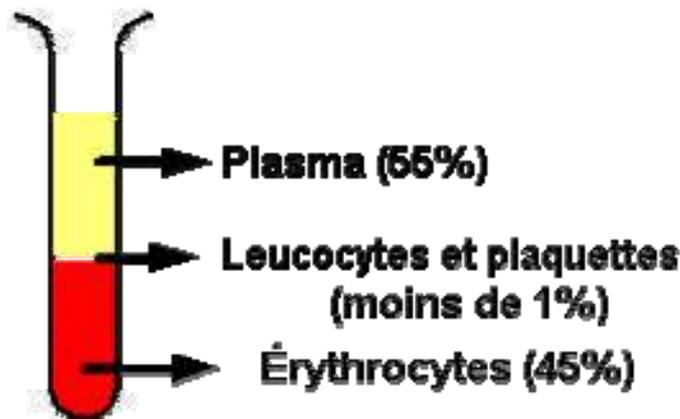


Figure 3.35 : Composition du sang humain : 55% de plasma, 45 % d'érythrocytes et moins de 1 % de leucocytes et plaquettes.

Parmi les nombreuses substances contenues dans le plasma, nous citons :

- Les protéines de transport telles que ; l'albumine, qui transporte les acides gras, l'acide urique, le calcium et les médicaments, l'alpha et la bêta-lipoprotéines, qui transportent

les phospholipides, le cholestérol et les triglycérides, la transcortine, la transferrine ou sidérophiline, l'haptoglobuline et la hémopexine.

- Les protéines de défense telles que les immunoglobulines (anticorps) et la protéine C-réactive, qui favorise la phagocytose des bactéries par les macrophages.
- D'autres constituant tels que les facteurs de coagulation, les facteurs d'inflammation, les enzymes, les constituants nutritifs (glucose, acides aminés, lipides, corps cétoniques et vitamines), les déchets du métabolisme, les hormones et les constituants minéraux.

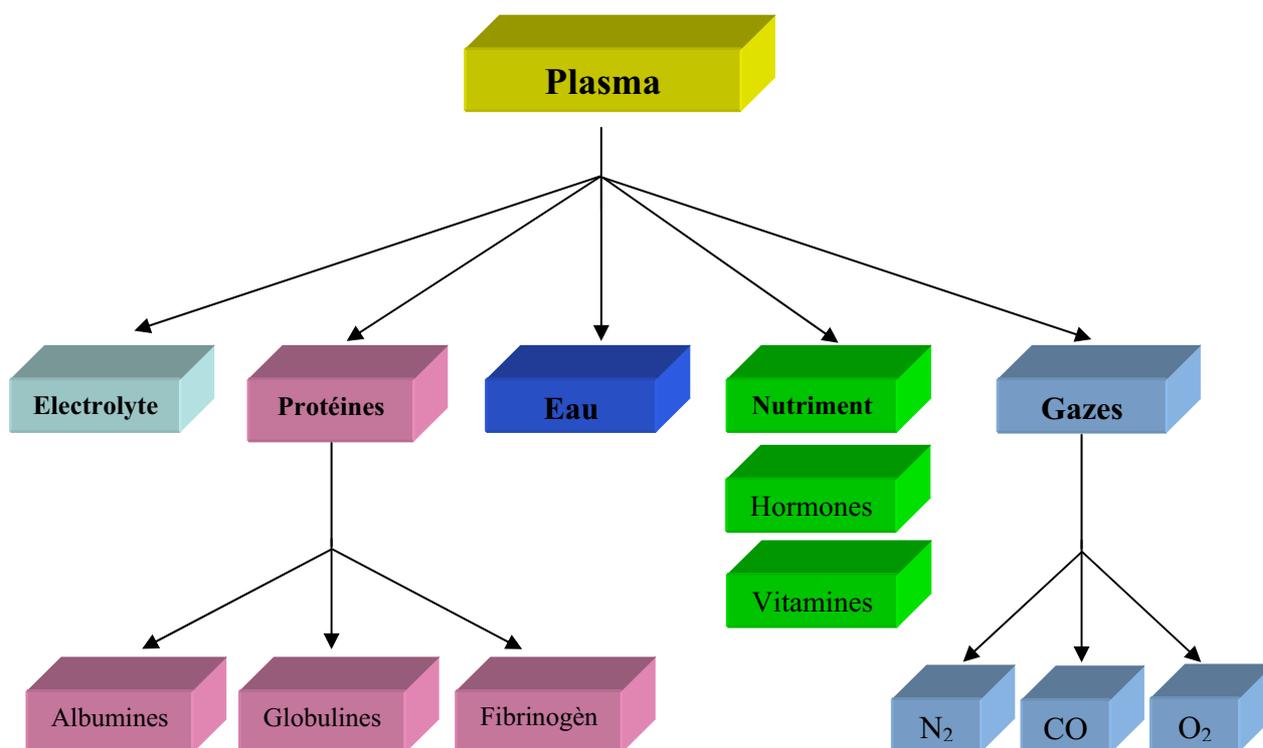


Figure 3.36 : Composition du Plasma sanguin humain.

2.L'étude protéique du plasma

L'analyse du protéome du plasma humain représente une promesse d'une révolution dans le diagnostic des maladies et le suivi thérapeutique, lorsque certains défis de la protéomique et des disciplines reliées seront surmontés. L'étude protéique du plasma est très complexe, son analyse avec les techniques de protéomique classique est très difficile étant donné que ces dernières ont une limite de détection à une gamme d'expression de 3 ordres de grandeur, alors que le plasma humain présente une gamme d'expression de 12 ordres de grandeurs.

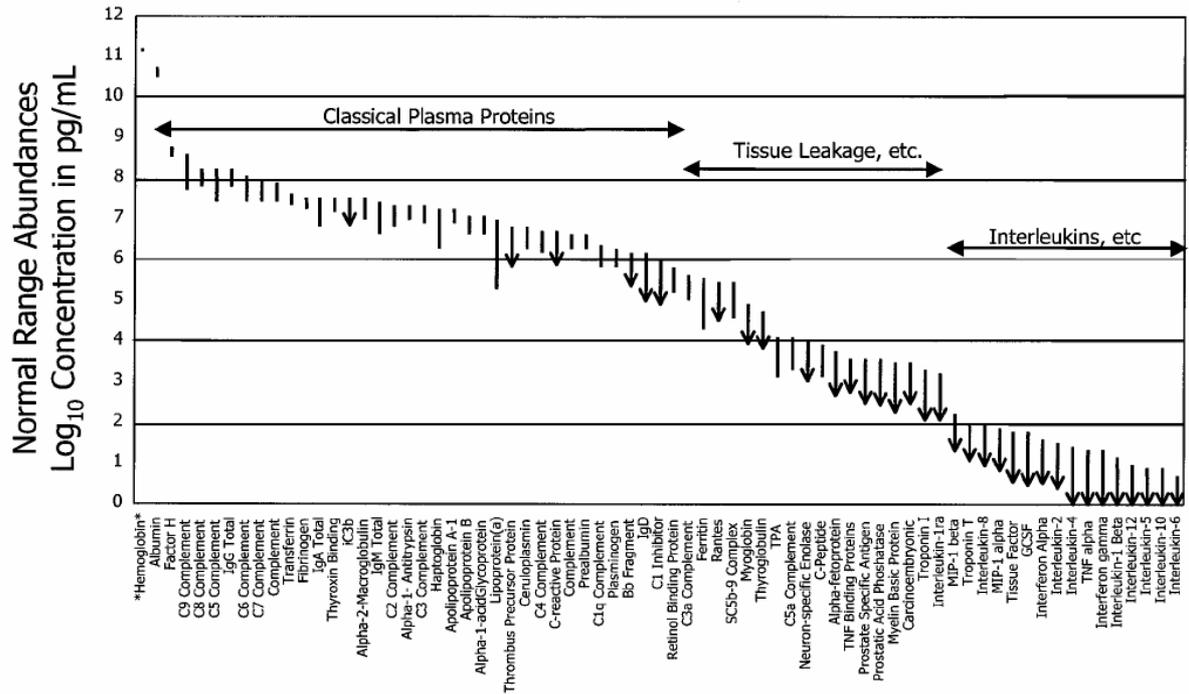


Figure 3.37 : Intervalles références pour 70 protéines de plasma humain. [11]

Dans la Figure 3.37, l'abondance est tracée sur une échelle couvrant 12 ordres de grandeur. Lorsque seule une limite supérieure est citée, la partie inférieure de la ligne d'intervalle est représentée avec une flèche. L'Hémoglobine est introduite pour la comparaison.

3.Mode opératoire :

La préparation du plasma comporte deux étapes principales, la déplétion et la digestion.

3.1.Déplétion du plasma

La déplétion est une étape qui vise à l'élimination des protéines majoritaires, qui empêchent la détection des protéines minoritaires lors des analyses. La déplétion du plasma humain peut être effectuée en une seule protéine telle que l'albumine par exemple (Figure 3.38) qui est la plus majoritaire.

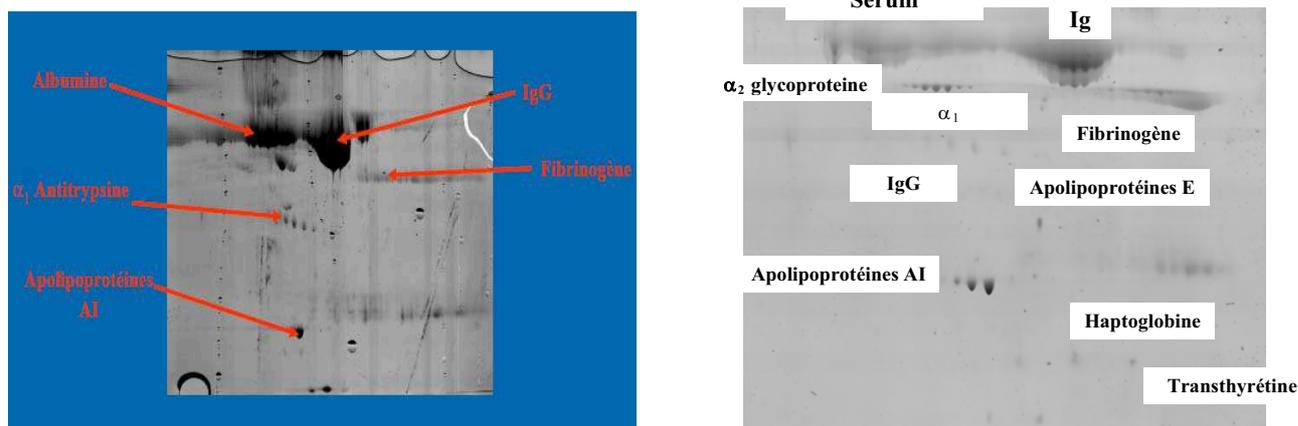


Figure 3.38: Déplétion en albumine à l'aide d'une « spin column » anticorps. 2DGE Avant déplétion (à gauche) et après déplétion (à droite).

Certaines colonnes commerciales permettent d'effectuer la déplétion du plasma en plusieurs protéines (Figure 3.39). La colonne d'immunodéplétion (MARS, Agilent) permet, lors de la déplétion du plasma humain, d'enlever 6 protéines majoritaires : l'albumine, IgA et IgG, haptoglobine, α 1-antitrypsine et transferrine. Ce qui nous a permis de détecter de nombreuses protéines parfois abondantes mais masquées par les plus abondantes dans la fraction minoritaire. Une alternative à la colonne d'immunodéplétion de Agilent est la colonne Hi Trap de chez Amersham, cette dernière propose de passer le plasma sur une colonne de dessalage nommé Hi trap desalting (colonne qui sert à dessaler les échantillons) avant de le passer sur la colonne Hi trap blue.

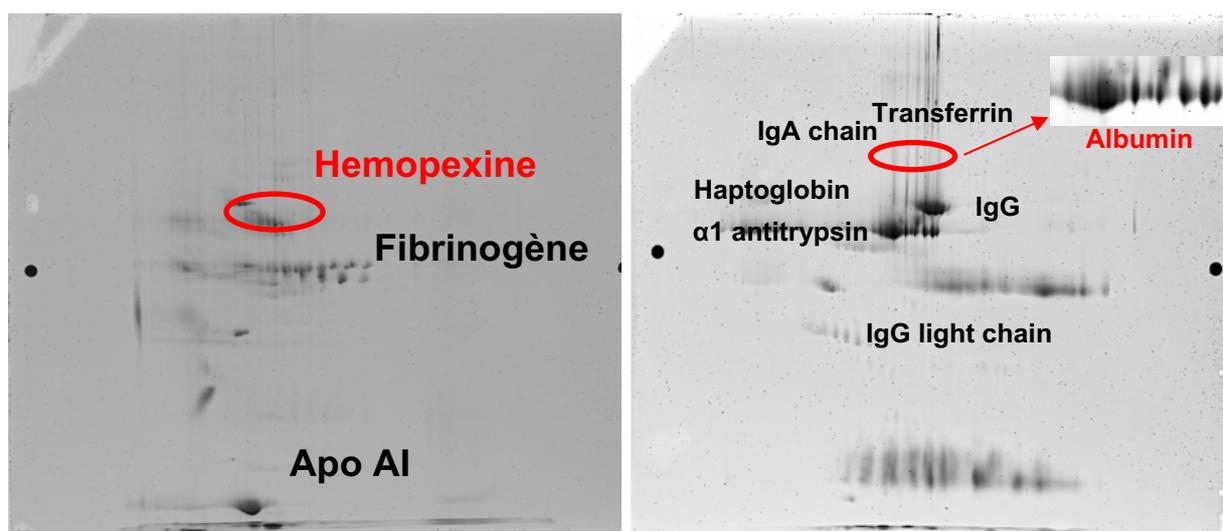


Figure 3.39 : Plasma déplété avec une colonne d'immunodéplétion (MARS, Agilent), 2DGE de la fraction minoritaire (à gauche) et de la fraction majoritaire (à droite).

Dans notre cas, nous avons déplété 1 μL de Plasma humain sur une colonne d'immunodéplétion (MARS, Agilent), les deux fractions, minoritaire et majoritaire, récupérées sont ensuite dénaturées et digérées par la trypsine. La dénaturation est réalisée avec chauffage à 70 °C pendant 1 heure dans un tampon composé de 50 mM Tris-HCl, 6M guanidine, 4 mM DTT. Puis nous avons ajouté une solution d'iodoacétamide à 50mM à la solution précédente, le tout est placé dans la glace pendant 2 heures. La concentration de la guanidine est diminuée à 0,6 M avec du tampon Tris-HCl à 20mM à pH 7.6. Ensuite, la trypsine est ajoutée à la solution résultante au ratio E/S 1:25 massique, la digestion est réalisée à 37 °C pendant une nuit. Enfin, le digest est concentré par évaporation à sec et redilué dans 10 μL d'eau acidifiée. La concentration finale du digest est de 50 pmol/ μL .

Une colonne monolithique à base de méthacrylate de lauryl, préparée dans un capillaire de 75 μm de diamètre interne et de 120 cm de longueur est montée sur une nano-LC en couplage avec un spectromètre de masse nanoESI-hQh-FT-ICR. La Figure 3.40 représente le spectromètre de masse FT-ICR (APexQE 9,4T, Bruker Daltonics) utilisé dans ces tests.



Figure 3.40 : Spectromètre de masse FT-ICR (APexQE 9,4T, Bruker Daltonics)

Le spectre de masse FT-ICR développe une résolution supérieure à 1 million, une précision de mesure inférieure au ppm et, une sensibilité accrue grâce au haut champ magnétique utilisé.

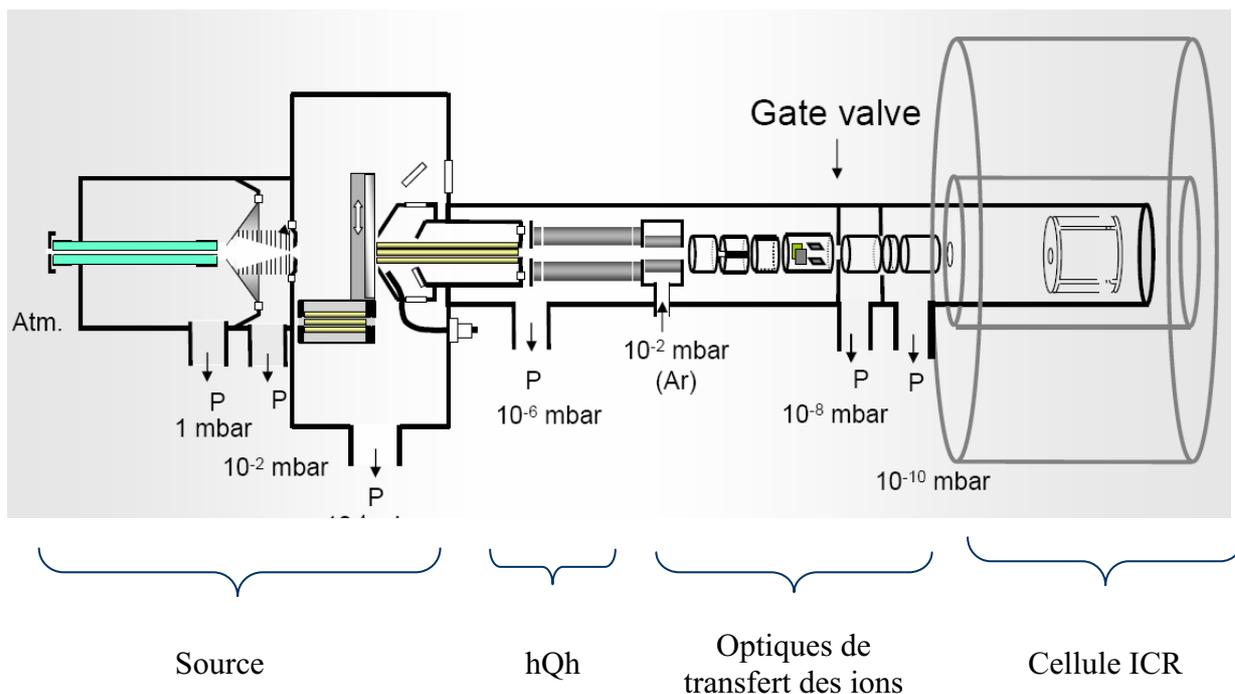


Figure 3.41 : Géométrie du spectromètre de masse nanoESI-hQh-FT-ICR.

Le temps de cycle pour le couplage est de 2 à 3 secondes pour la MS ou pour la MS/MS, la Figure suivante (Figure 3.42) représente les étapes qui composent le cycle.

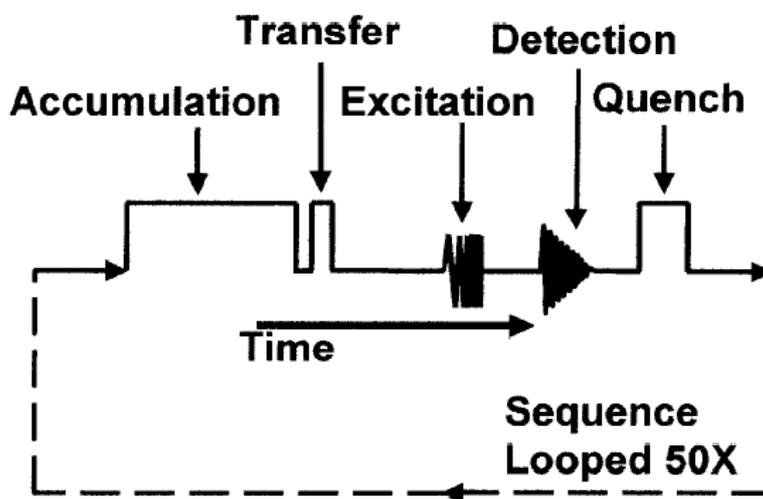


Figure 3.42 : Temps de cycle pour le couplage MS et MS/MS

Gradient d'élution utilisé

Nous avons utilisé deux phases mobiles, la phase mobile A constituée de 5 % d'acétonitrile et 95 % d'eau acidifiée avec 0,1 % d'acide formique et la phase mobile B constituée de 80 % d'acétonitrile et de 20 % d'eau. La Figure 3.43 représente le gradient utilisé pour l'élution des peptides issus de la digestion du plasma humain déplété

Tableau 3.16 : Tableau du gradient utilisé lors du test de séparation des peptides issus de la digestion du plasma humain par la trypsine sur une colonne monolithique C12.

Temps	A	Acétonitrile (%)
0	100	5
10	100	5
20	80	8,2
140	60	14,6
150	0	80
155	0	80
160	100	5
180	100	5

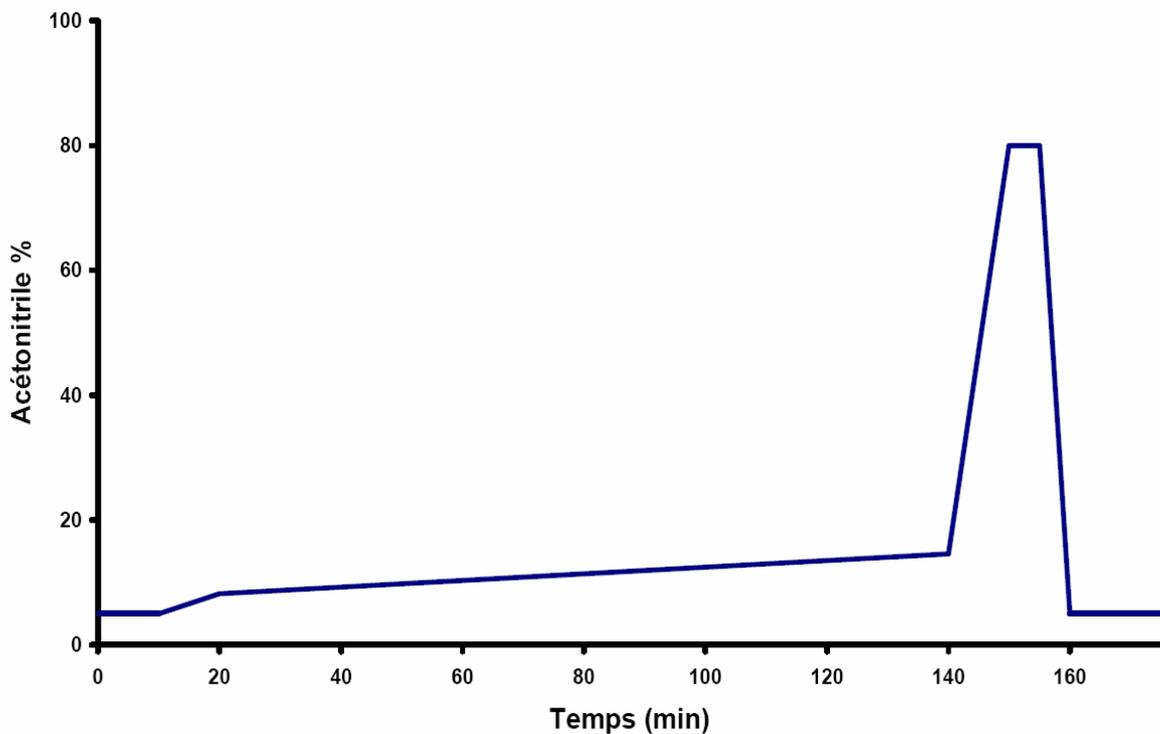


Figure 3.43 : Représentation graphique du gradient d'acétonitrile utilisé en phase inverse pour la séparation d'un digest trypsique du plasma humain sur la colonne monolithique C12 de 120 cm.

Nous avons injecté 1 μL du digest à 50 pmol/ μL dans la colonne monolithique C12 à un débit de 200 nL/min.

3.2.Résultats

Dans un premier temps, nous avons comparé les traces des séparations (TIC) du digest des protéines minoritaires de plasma humain obtenues en nanoESI-hQh-FT-ICR MS et MS/MS sur la colonne monolithique avec celles obtenues sur une colonne commerciale PepMap[®]. Le résultat de cette comparaison est représenté dans les Figure 3.44 à 3.47.

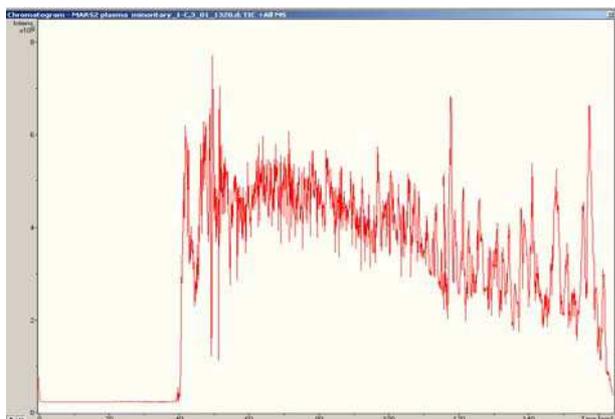


Figure 3.44 : TIC MS de la séparation du digest des protéines minoritaires du plasma humain dépleted sur la colonne PepMap[®].

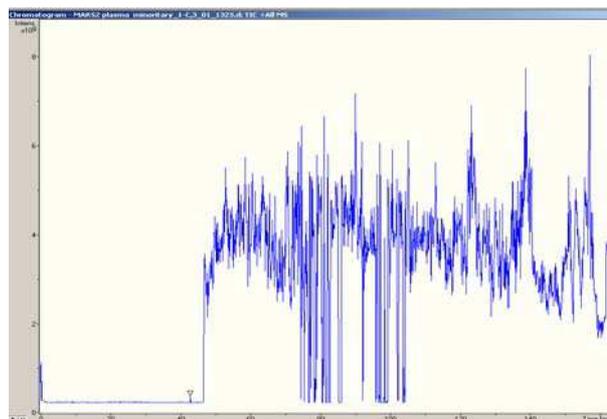


Figure 3.45 : TIC MS de la séparation du digest des protéines minoritaires du plasma humain dépleted sur la colonne monolithique C12.

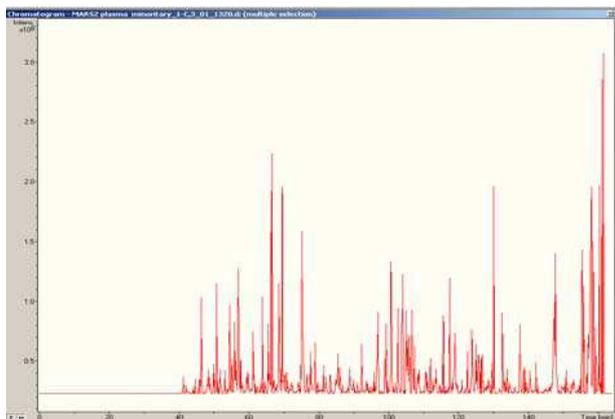


Figure 3.46 : TIC MS/MS de la séparation du digest des protéines minoritaires du plasma humain dépleted sur une colonne PepMap[®].

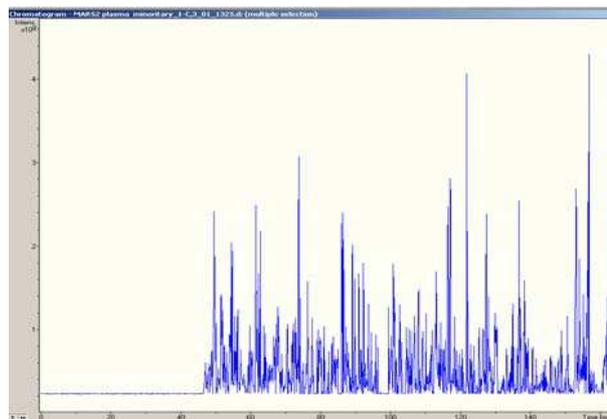


Figure 3.47 : TIC MS/MS de la séparation du digest des protéines minoritaires du plasma humain dépleted sur la colonne monolithique C12.

La comparaison des deux traces des séparations MS obtenues en nanoESI-hQh-FT-ICR sur la colonne monolithique C12 (à droite) avec celles obtenues avec la colonne PepMap® (à gauche) montre que le pouvoir séparatif de la colonne monolithique C12 est supérieur à celui de la colonne commerciale. Ce résultat est très clair dans la trace de la séparation MS/MS obtenue avec la colonne monolithique C12 contenant beaucoup plus de pics ainsi que des intensités plus grandes.

La séparation du digest de plasma humain déplété par la colonne MARS, sur la colonne monolithique C12 et son analyse nanoLC-FT-ICR MS/MS sont très concluantes. En une seule analyse, environs 1000 peptides sont séquencés.

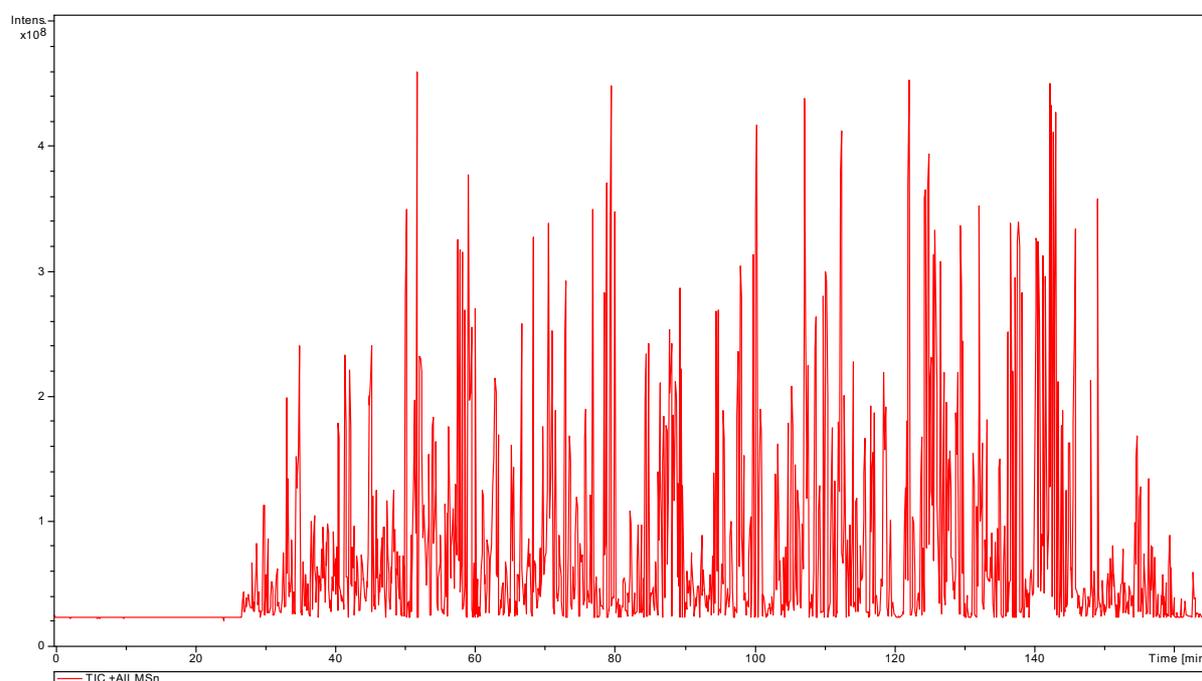


Figure 3.48 : TIC MS/MS du digest trypsique de plasma humain séparé sur la colonne monolithique C12 de 120 cm.

Après interrogation de la base de données MASCOT, nous avons pu identifier une quarantaine de protéines. Le Tableau 3.17 regroupe certaines de ces protéines, leurs concentrations et leurs classes.

Tableau 3.17 : Les noms de certaines protéines du plasma sanguin humain identifiées après séparation de leurs digests sur une colonne monolithique C12 ainsi que leurs classes.

	Nom	Concentration (pg/mL)	Classe
1	Apolipoprotein AI	10⁹-10⁸	Protéines Classiques

2	Complement C3		
3	α2 macroglobulin		
4	Hemopexin		
5	Complement C4-A	10^9-10^8	Protéines Classiques
6	Antithrombin III		
7	Ceruloplasmin		
8	α1 B Glycoprotein		
9	Fibrinogen γ chain		
10	Apolipoprotein A IV		
11	Fibrinogen β chain		
24	Serum amyloid A4	10^6	Protéine de la fuite tissulaire
25	Transthyretin	10^9-10^8	Protéine Classique
26	Plasma protease C1 inhibitor	10^7	Fin des protéines Classiques
27	Plasma Retinol Binding protein		
28	Kininogen 1		
29	C4B binding protein α chain		
30	Zinc alpha2 glycoprotein		
39	Fetuin A		
40	Afamin precursor, alpha albumin		
41	Serum paraoxonase		
42	Alpha 2 antiplasmin		
43	Serum amyloid P		

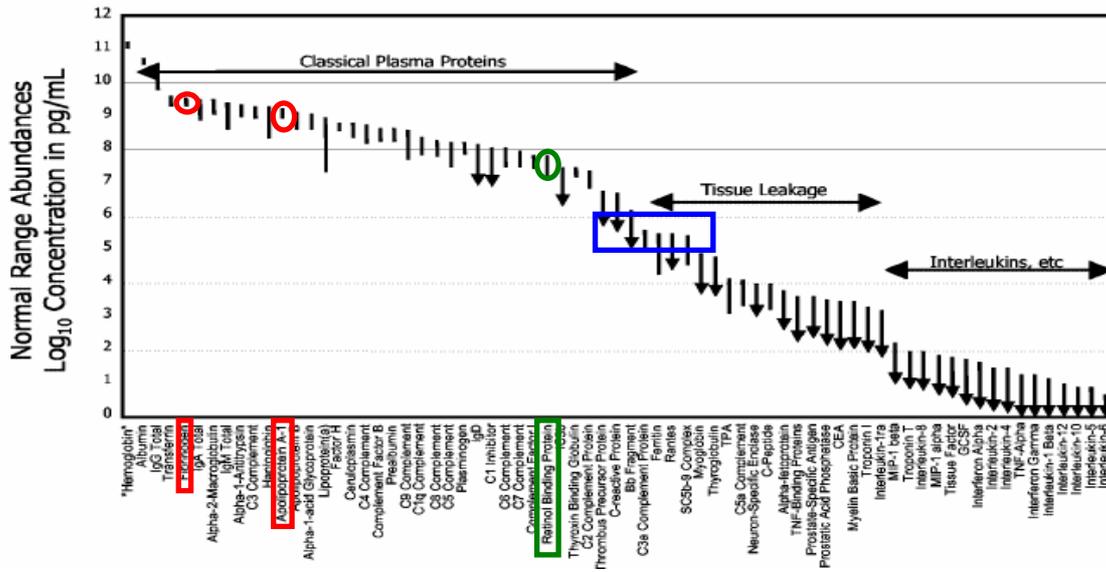


Figure 3.49 : Identification de la totalité des protéines classiques du plasma (en rouge et vert) et identification de la première protéine de la fuite tissulaire (en bleu).

La séparation du digest de plasma sur la colonne monolithique C12 et l'analyse par nanoLC-nanoESI-hQH-FT-ICR MS ont permis de réaliser la cartographie de toutes les protéines classiques du plasma humain. Ces protéines, en rouge et vert, ont une concentration de 10^9 à 10^7 pg/mL. De plus, nous avons identifié la première protéine issue de la fuite tissulaire.

En terme de répétabilité des résultats, la colonne monolithique C12 utilisée pour la séparation du digest de plasma humain déplété a donné le même résultat après 10 expériences consécutives.

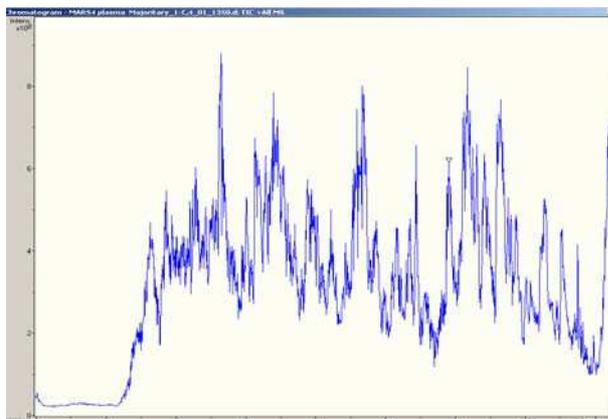


Figure 3.50 : TIC MS de la 1^{ère} expérience de séparation du digest des protéines majoritaires du plasma humain déplété sur la colonne monolithique C12.

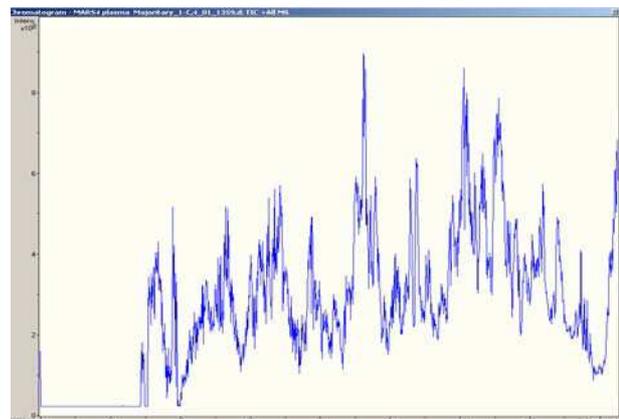


Figure 3.51 : TIC MS de la 10^{ème} expérience de séparation du digest des protéines majoritaires du plasma humain déplété sur la colonne monolithique C12.

Les traces de la séparation MS présentées dans les Figures 3.50 et 3.51 sont superposables ainsi que celles de la séparation MS/MS dans les Figures 3.52 et 3.53.

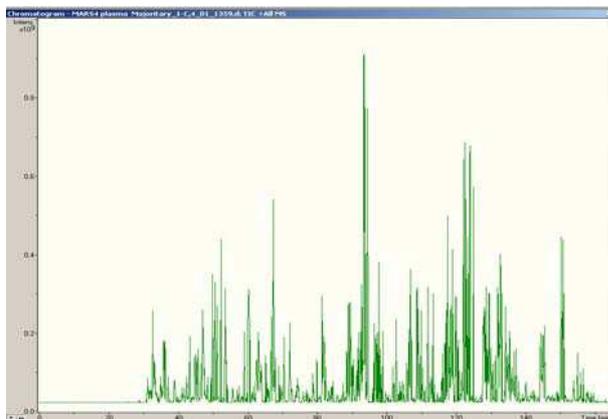


Figure 3.52 : TIC MS/MS de la 1^{ère} expérience de séparation du digest des protéines majoritaires du plasma humain déplété sur la colonne monolithique C12.

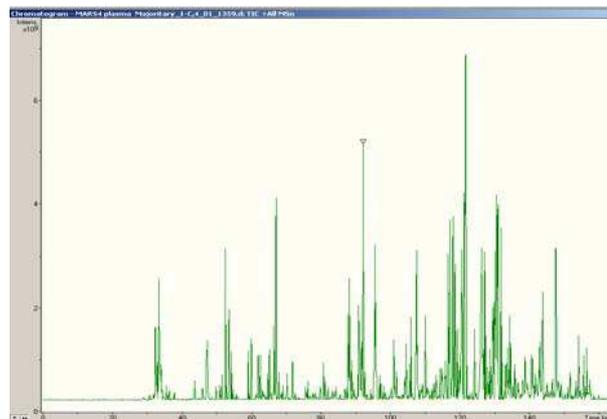


Figure 3.53 : TIC MS/MS de la 10^{ème} expérience de séparation du digest des protéines majoritaires du plasma humain déplété sur la colonne monolithique C12.

4. Conclusion

Lors d'une première étude visant la détermination du pouvoir séparatif des supports monolithiques, des colonnes monolithiques à base de monomères méthacrylates hydrophobes dédiées à la nano-chromatographie liquide de type phase inverse ont été réalisées par polymérisation radicalaire dans des capillaires transparents aux irradiations UV. Les monomères fonctionnels qui ont été étudiés en séparation sont : le méthacrylate de méthyle C1, le méthacrylate de butyle C4, le méthacrylate de lauryl C12 et le méthacrylate de stéaryle C18. Les résultats de cette étude ont montré que les supports monolithiques à base de C12 exhibent des propriétés de séparation supérieures aux autres supports.

Dans une deuxième étude, nous nous sommes intéressés à l'optimisation des supports monolithiques à base de méthacrylate de lauryl C12. Nous avons étudié l'influence de la technique de polymérisation ainsi que l'influence du débit de la phase mobile sur le pouvoir séparatif de ces supports. La résolution de la colonne obtenue par polymérisation radicalaire contrôlée, dite vivante, est plus grande que celle des colonnes obtenues par polymérisation radicalaire classique. Cependant, ces dernières restent les plus efficaces.

L'allure de la courbe de Van Deemter a montré que l'efficacité des colonnes monolithiques est peu influencée par l'augmentation de la vitesse de la phase mobile. Ceci permet d'effectuer des séparations à haut débit sans altération de l'efficacité.

Enfin, la phase monolithique C12 a été confrontée à un échantillon protéomique complexe, le plasma humain. Lors du test de séparation du digest trypsique du plasma, l'efficacité de la colonne monolithique été nettement supérieure à celle de la colonne commerciale PepMap®.

Références Bibliographiques

- [1] Okay, Oguz; Akkan, Ufuk. Heterogeneities in polyacrylamide gels immersed in acetone-water mixtures. *Polymer Bulletin (Berlin)* **1998**, *41*, 363-370.
- [2] Matsumoto, Akira; Nishizawa, Kazuyoshi; Yamashita, Yukihiro; Morita, Takehiko; Aota, Hiroyuki. Electron spin resonance spectroscopic studies on microheterogeneity of crosslinked polymers. IV. Correlation between void evaluation of crosslinked resin and microgelation in monomethacrylate/dimethacrylate copolymerizations. *Journal of Applied Polymer Science* **2001**, *81*, 1187-1192.
- [3] Grande, Maria del Carmen; Julia, Jorge Alvarez; Barrero, Carmen R.; Marschoff, Carlos M.; Bianchi, Hugo L. The (water + acetonitrile) mixture revisited. A new approach for calculating partial molar volumes. *Journal of Chemical Thermodynamics* **2006**, *38*, 760-768.
- [4] Huglin, Malcolm B.; Yip, Daniel C. F. Microsyneresis region in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Macromolecules* **1992**, *25*, 1333-1337.
- [5] Kesenci, K.; Tuncel, A.; Piskin, E. Swellable ethylene glycol dimethacrylate--hydroxyethyl methacrylate copolymer beads. *Reactive & Functional Polymers* **1996**, *31*, 137-147.
- [6] Yu, Cong; Xu, Mingcheng; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Preparation of monolithic polymers with controlled porous properties for microfluidic chip applications using photoinitiated free-radical polymerization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **2002**, *40*, 755-769.
- [7] Viklund, Camilla; Nordstroem, Anders; Irgum, Knut; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J. Preparation of Porous Poly(styrene-co-divinylbenzene) Monoliths with Controlled Pore Size Distributions Initiated by Stable Free Radicals and Their Pore Surface Functionalization by Grafting. *Macromolecules* **2001**, *34*, 4361-4369.
- [8] Peters, Eric C.; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J.; Viklund, Camilla; Irgum, Knut. Control of Porous Properties and Surface Chemistry in "Molded" Porous Polymer Monoliths Prepared by Polymerization in the Presence of TEMPO. *Macromolecules* **1999**, *32*, 6377-6379.
- [9] Meyer, Ulrika; Svec, Frantisek; Frechet, Jean M. J.; Hawker, Craig J.; Irgum, Knut. Use of Stable Free Radicals for the Sequential Preparation and Surface Grafting of Functionalized Macroporous Monoliths. *Macromolecules* **2000**, *33*, 7769-7775.
- [10] Matyjaszewski, Krzysztof; Davis, Kelly; Patten, Timothy E.; Wei, Mingli. Observation and analysis of a slow termination process in the atom transfer radical polymerization of styrene. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15321-15329.
- [11] Anderson, N. Leigh; Anderson, Norman G. The human plasma proteome. History, character, and diagnostic prospects. *Molecular and Cellular Proteomics* **2002**, *1*, 845-867.

Chapitre IV :

*Colonnes monolithiques pour
la chromatographie d'affinité*

Partie I :

*Rétention spécifique des peptides
phosphorylés*

I. INTRODUCTION

Durant et en fin du processus de production des protéines, ces dernières subissent des modifications diverses, allant de la simple modification chimique de certains groupements portés par les acides aminés au clivage du squelette principal de la protéine. Ce phénomène est connu sous le nom suivant : **Modifications Post-Traductionnelles (PTMs)**.

Ces modifications représentent un mécanisme puissant de régulation de l'activité des protéines. Certaines modifications influencent la structure des protéines, d'autres permettent aux protéines de réagir avec des ligands, ou les unes avec les autres, et certaines parmi elles, ont un impact direct sur l'activité biochimique. Cependant, il existe des modifications qui ne sont pas appropriées, elles sont souvent associées aux maladies. Dans ce cas, ces modifications constituent des biomarqueurs de maladies.

Les modifications Post-traductionnelles les plus répandues sont la phosphorylation, la glycosylation, l'ubiquitination et la méthylation.

1. La phosphorylation

La phosphorylation est l'une des modifications post-traductionnelles abondantes. C'est une modification réversible qui consiste en l'estérification de la chaîne latérale de certains acides aminés, par addition d'un groupement phosphate qui est chargé négativement. L'introduction de cette charge négative peut causer le changement de la conformation de la protéine et par conséquent, conduit à l'altération de sa stabilité, de sa réactivité et de ses interactions avec les autres molécules du milieu. La phosphorylation est au cœur de plusieurs processus biologiques à savoir, la régulation de l'expression des gènes, la régulation de la division des cellules et la transduction du signal : transmission des informations de la membrane plasmique au noyau.

Il existe en général quatre types de phosphorylation [1] qui peuvent atteindre plusieurs acides aminés. Chez les bactéries, les sites de phosphorylation des protéines sont souvent l'acide aspartique, l'acide glutamique et l'histidine. En revanche chez les eucaryotes, les acides aminés les plus concernés par la phosphorylation sont, la sérine, la thréonine et la tyrosine. Cependant, d'autres acides aminés, chez les procaryotes et les eucaryotes sont phosphorylés. De nos jours, les résidus phosphorylés dans les organismes vivants sont au nombre de neuf. L'Histidine donne accès à deux formes phosphorylées, la 1-phosphohistidine et la 3-phosphohistidine. La Figure 4.1 représente ces différents acides aminés.

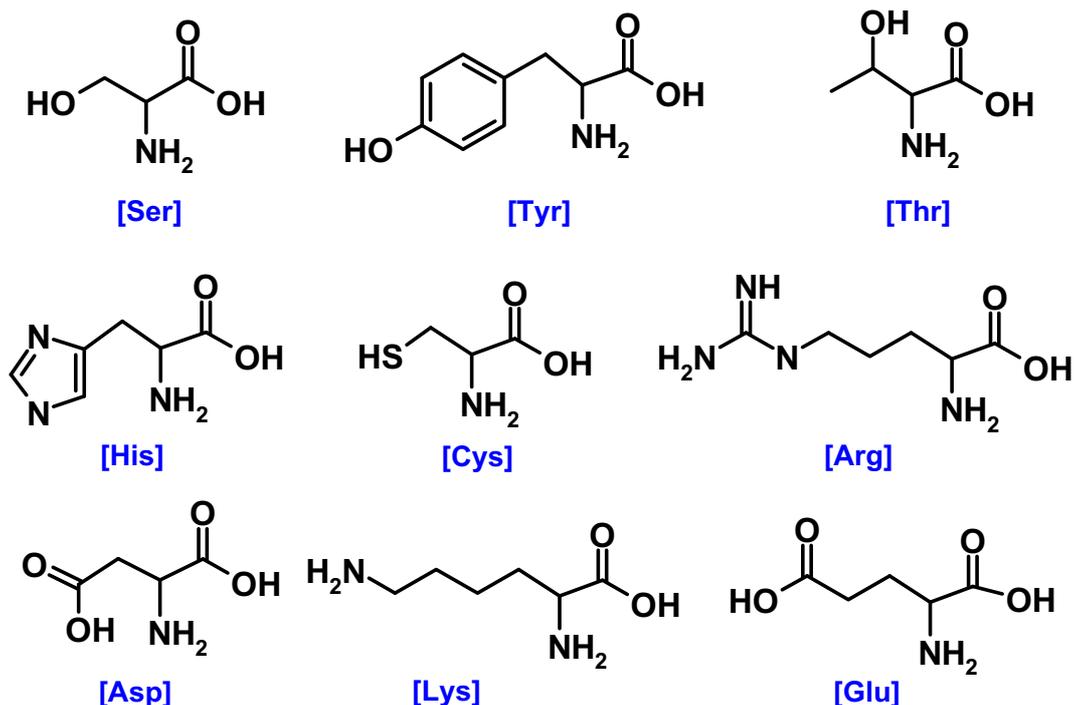


Figure 4.1 : Les différents acides aminés cibles de la phosphorylation dans les milieux biologiques naturels.

Les enzymes responsables de la phosphorylation des protéines appartiennent à une classe d'enzymes appelée Kinases, alors que la déphosphorylation est contrôlée par une autre classe d'enzymes appelée phosphatases. Le génome humain comporte environ 500 protéines kinases chacune pouvant phosphoryler de nombreuses cibles et 100 phosphatases.

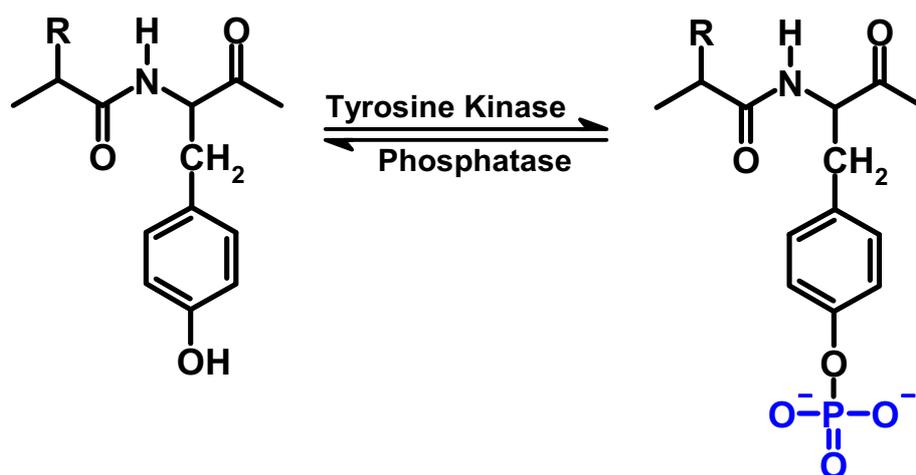


Figure 4.2 : Schéma réactionnel de la phosphorylation/ déphosphorylation de la Tyrosine.

Etant donné que la phosphorylation joue un rôle très important dans la régulation des activités cellulaires, la compréhension du fonctionnement de la cellule restera incomplète, sans la réalisation d'un inventaire global du phosphoprotéome. Cet inventaire comporte la

préparation d'un catalogue de toutes les phosphoprotéines des cellules, la représentation de la distribution des sites de phosphorylation ainsi que l'abondance des formes phosphorylés alternatives dans les différentes conditions. L'aspect quantitatif de cet inventaire est également important car, en plus de la complexité du phosphoprotéome, ce dernier est extrêmement dynamique.

Ce type d'analyse n'est devenu possible que récemment avec le développement des techniques d'enrichissement des protéines/peptides phosphorylés et l'amélioration des techniques d'analyses par spectrométrie de masse.

II. L'ANALYSE DE LA PHOSPHORYLATION

Le but global de l'analyse phosphoprotéomique est l'identification des phosphoprotéines, en partant d'un mélange plus ou moins complexe composé de protéines phosphorylés et d'autres non phosphorylés, la détermination des sites de phosphorylation et, si possible, de réaliser la quantification des phosphoprotéines sous différentes conditions.

1. La préparation des échantillons

La première étape, qui occupe une place très importante dans l'analyse des phosphoprotéines consiste en la préparation de l'échantillon de manière à conserver toutes les phosphorylations. Durant l'étape de préparation des échantillons, les protéines peuvent être déphosphorylés. Afin d'éviter ce phénomène, des inhibiteurs de phosphatases sont ajoutés dans toutes les solutions tampon [2].

2. La détection des phosphoprotéines

La deuxième étape est celle de la détection des phosphoprotéines. Dans un premier temps il faut déterminer si la protéine est phosphorylée ou non. Ensuite, il faut identifier le ou les résidus qui portent le groupement phosphate. Vu la complexité des mélanges à analyser, la détection des phosphoprotéines doit être précédée d'une étape de séparation.

Nombreuses sont les techniques utilisées pour la détermination des phosphoprotéines. On peut citer le marquage radioactive avec le ^{32}P , l'utilisation des anticorps spécifiques à certains acides aminés phosphorylés comme la Ser(P), la Thr(P) ou la Tyr(P), le séquençage d'Edman, l'analyse chromatographique (HPLC, TLC), ou la spectrométrie de masse. Souvent, la combinaison de plusieurs méthodes est nécessaire pour avoir de bons résultats.

3.Quantification des phosphorylations

L'intensité des peptides en spectrométrie de masse ne peut être utilisée pour corrélérer leur abondance relative liée à une différence de composition entraînant une détection différente. Pour obtenir des informations quantitatives, la seule possibilité est de comparer l'intensité de deux peptides chimiquement proches. De nos jours, le marquage avec des isotopes stables est une méthode de choix [1]. Un peptide peut être marqué avec un élément lourd comme l'attachement d'un tag contenant un élément radioactif, *in vitro* par dérivation chimique ou *in vivo* par l'incorporation d'un atome radioactif dans la source métabolique.

III. TECHNIQUES D'ENRICHISSEMENT DES PHOSHOPEPTIDES

Dans un digest d'un mélange de protéines phosphorylées et non phosphorylées, l'abondance des phosphopeptides est très faible. Une étape d'enrichissement s'avère nécessaire. L'enrichissement consiste en une séparation spécifique des molécules (protéines et/ou peptides) phosphorylés du mélange complexe de départ.

1.L'immunoprécipitation

L'utilisation des anticorps pour l'isolation des molécules phosphorylées reste la technique la plus simple. Ces anticorps sont spécifiques, ils réagissent avec un seul type de résidus phosphorylés. Les anticorps les plus utilisés sont les anti-phosphotyrosines bien que les phosphotyrosines soient moins nombreuses [3], ceci est dû à leur haute spécificité. Les anticorps qui réagissent avec d'autres résidus phosphorylés comme la sérine et la thréonine sont aussi utilisés, mais ils sont moins satisfaisants pour l'immunoprécipitation. Toutefois, cette technique a deux limites, la première est d'ordre technique, les liaisons entre les anticorps et les résidus phosphorylés ne sont pas très fortes. La deuxième est d'ordre économique, le coût élevé des anticorps limite l'utilisation de cette technique qui reste cependant très performante.

2.Les modifications chimiques

D'autres techniques d'enrichissement utilisent les modifications chimiques des groupement phosphates. L'une des techniques utilisant les modifications chimiques est basée sur la bêta élimination du groupement phosphate du phosphopeptide. La Figure 4.3 représente modification chimique basée sur la bêta élimination.

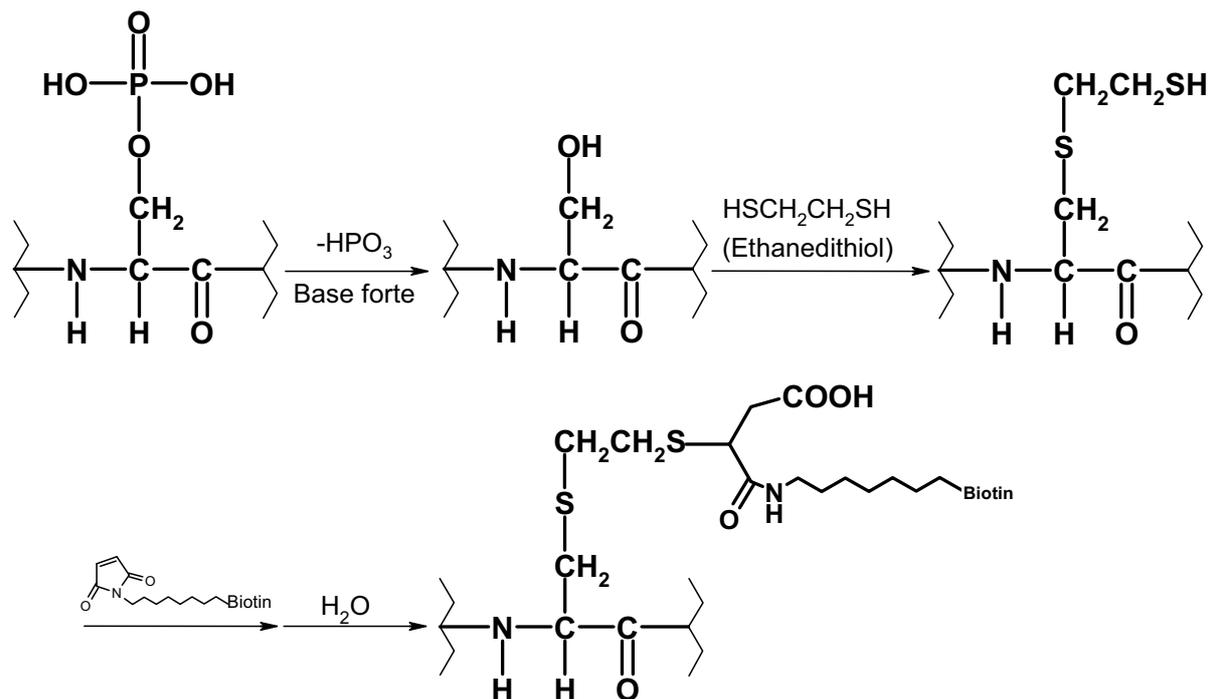


Figure 4.3 : Schéma réactionnel du marquage d'une phosphoserine avec la biotine après une β - élimination [4].

L'échantillon est traité d'abord avec une base forte conduisant à la réaction de β élimination et la formation d'une espèce contenant une liaison α,β insaturée dans le cas des résidus phosphoserine et phosphothréonine. Cette espèce résultante joue le rôle d'un accepteur de nucléophile (dans ce cas c'était l'éthanedithiol). Un réactif contenant la biotine réagit alors avec le groupement thiol ce qui conduit au marquage du phosphopeptide avec la biotine pour son enrichissement sur une colonne d'avidine. L'autre technique est très longue, elle repose sur deux réactions de condensation successives après protection de l'extrémité N-terminale, la première condensation vise le carbone de l'extrémité C-terminale. Elle est effectuée à l'aide de l'éthanolamine. Tandis que la deuxième condensation a pour but le marquage du groupement phosphate avec la fonction sulfydryl, en utilisant la Cystamine.

3.La chromatographie d'affinité type IMAC

La technique d'enrichissement la plus utilisée est la chromatographie d'affinité par immobilisation de métal (IMAC). Le principe de cette technique, introduite pour la première fois en 1975 par Porath et al. [5], est basé sur l'affinité des charges négatives des groupements phosphates des résidus phosphorylés pour les charges positives des ions métalliques, [6-12].

Chapitre IV : Partie I: Réétention spécifique des peptides phosphorylés

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

L'utilisation de divers ions métalliques a été rapportée dans la littérature [13-18], notamment les ions Fe^{3+} [18,19].

La limite majeure de cette technique est celle des liaisons non spécifiques développées avec les résidus non phosphorylés qui contiennent des groupements acides comme l'acide glutamique ou aspartique. Pour palier ce problème, Ficcaro et al. [20], proposent une dérivation de tous les peptides par une estérification qui réduit toutes les sources de liaisons non spécifiques dues aux acides carboxyliques [21].

IV. APPROCHES MONOLITHIQUES

Le but de cette première partie est de développer des supports d'enrichissements de phosphopeptides basés sur les monolithes. La première approche que nous avons adoptée est celle des colonnes monolithiques IMAC. Le support monolithique est à base du méthacrylate de Glycidyle, le cycle époxy réagit avec un diacide qui joue le rôle de chélateur des ions métalliques. La deuxième approche, qui est tout à fait nouvelle, repose sur l'utilisation des nanoparticules d'oxydes métalliques incorporées dans un support monolithique à base de méthacrylate de lauryl.

A. Colonnes monolithiques IMAC

I. DEVELOPPEMENT DE COLONNES MONOLITHIQUES IMAC

1. Préparation des colonnes IMAC

Les supports monolithiques IMAC dédiés à la rétention spécifique des peptides phosphorylés sont préparés dans des capillaires transparents aux irradiations UV, dont les parois internes sont prétraitées pour assurer un ancrage covalent du polymère. Ces capillaires ont une longueur de 15 cm et un diamètre interne de 75 µm.

1.1. Polymérisation du support monolithique

Le monolithe résultant doit réagir d'une manière covalente avec le ligand chélateur des ions métalliques. C'est pour cela que la phase doit être préparée en utilisant un monomère réactif. Pour cette fin nous avons utilisé un monomère appartenant à la famille des méthacrylates, présentant un groupement réactif ; le méthacrylate de glycidyle (GMA). Le mélange réactionnel contient, en plus de ce monomère, un agent de réticulation le EGDMA, un porogène binaire Cyclohexanol/ Dodécanol et le photoamorceur radicalaire AIBN.

Tableau 4.1 : Mélange réactionnel utilisé pour préparer les supports monolithiques IMAC

Composition des Monomères (% vol)	Composition du Porogène (% vol)	Teneur vol en porogène	Amorceur
GMA/EGDMA 75/25	Dodécanol/cyclohexanol 92/8	75 %	AIBN 1 % massique

Après dégazage du mélange réactionnel, il est injecté dans le capillaire qui est ensuite placé sous irradiations UV pendant une durée allant de 1 à 2 heures. Une fois la polymérisation achevée, la phase monolithique ainsi formée est lavée abondamment au méthanol, pour retirer le porogène et les monomères qui n'ont pas réagi, et séchée à l'étuve pendant une nuit à 80 °C.

1.2. Greffage du ligand chélateur

Nous avons utilisé l'acide imminodiacétique qui va se greffer sur le support monolithique grâce à son groupement amine qui va réagir de manière covalente avec le cycle époxy du monolithe. La chélation de l'ion métallique est assurée par les groupements acides. L'immobilisation de l'IDA sur le monolithe est représentée dans le schéma de la Figure : 4.4.

Le protocole de la réaction de greffage est le suivant : tout d'abord, la colonne monolithique est connectée à une seringue, le tout est monté sur un pousse-seringue à débit ajustable.

L'acide immunodiacétique IDA est solubilisé dans une solution aqueuse de Na_2CO_3 à une concentration de 2 mmol/L, auquel est ajouté 1 g de NaCl. Cette solution est injectée à travers la colonne monolithique pendant 1 heure à 0,3 mL/min. Enfin, la colonne a reçu une série de lavages avec de l'eau, une solution aqueuse de l'EDTA 50 mM et de l'eau. Maintenant la colonne est prête à l'étape suivante qui est la chélation de l'ion métallique.

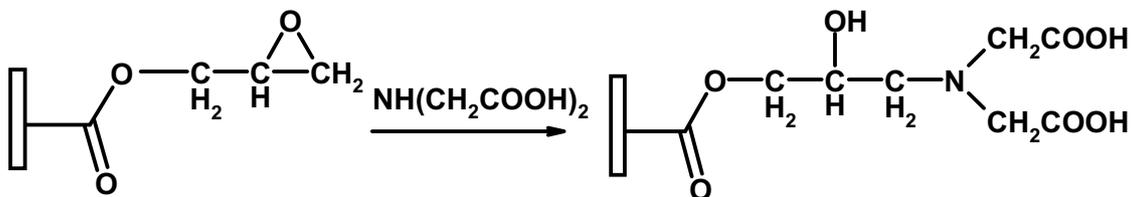


Figure 4.4 : Schéma réactionnel de la fonctionnalisation du support monolithique avec l'acide immunodiacétique.

1.3. Chélation de l'ion métallique

Les premières colonnes monolithiques sont préparées à base des ions Fe^{3+} . A cette fin, une solution aqueuse de chlorure de fer(III) hexahydraté (FeCl_3) 30 mM dans l'acide acétique 0,1 M a été d'abord injectée dans la colonne monolithique modifiée pendant 1 heure. Par la suite, la phase résultante a été traitée avec une solution aqueuse d'acétate d'ammonium 1% à pH= 9,5 dans le but de décrocher toute impureté retenue sur les ions métalliques. Enfin, la colonne a été conditionnée avec une solution d'acide acétique 0,1 M dans laquelle cette dernière est stockée jusqu'à son utilisation.

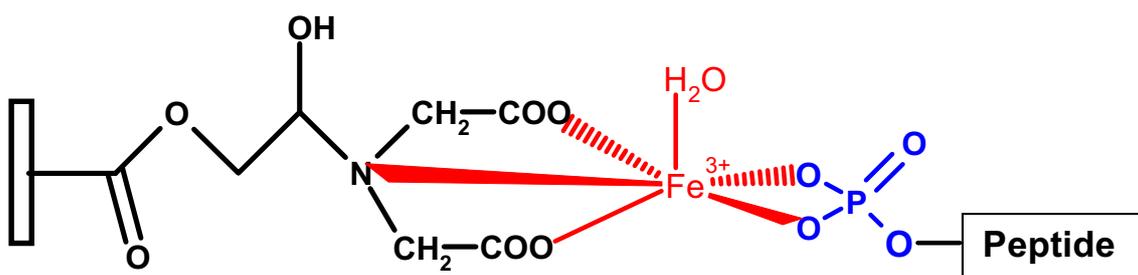


Figure 4.5 : Schéma représentatif de la structure finale du support monolithique IMAC.

2. Etude des colonnes monolithiques IMAC

2.1. Protocole du test

La colonne monolithique IMAC est connectée à une seringue qui est ensuite montée sur un pousse-seringue assurant l'écoulement des fluides à des débits ajustables.

Le test est composé de trois étapes. La première étape est celle du chargement, durant laquelle un échantillon contenant une ou plusieurs espèces phosphorylées, est injecté dans la colonne monolithique IMAC. Le débit d'injection doit être faible, il ne doit pas dépasser quelques dixièmes de microlitre par minute, afin de favoriser les interactions entre les groupements phosphates de l'échantillon et les cations métalliques présents sur la surface du support monolithique. La deuxième étape consiste en un lavage de la colonne IMAC avec une solution d'acide acétique à 0,1 M pour évacuer les espèces non phosphorylées qui ne sont pas accrochées sur le support ainsi que les impuretés. La troisième étape est celle de l'éluion des molécules retenues, qui est effectuée à l'aide d'une solution aqueuse d'acétate d'ammonium 1% à pH= 9,5.

Les différentes solutions récoltées en sortie de la colonne sont analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode positif et réflectron. Les échantillons sont déposés sur la plaque MALDI à l'aide de la matrice (DHB). Cette dernière est préparée à partir de 10 mg de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque dissous dans un mélange eau-méthanol (50:50 v/v). Les dépôts sont effectués avec 1 µL de la matrice et 1 µL de l'échantillon. La plaque MALDI est ensuite séchée avant son introduction dans le spectromètre de masse. Les spectres de masse sont obtenus après 100 coups de laser. Ils sont comparés avec le spectre initial de l'échantillon avant son passage dans la colonne monolithique IMAC.

Les premiers tests ont été effectués sur une molécule phosphorylée de taille moyenne. Le but de ces tests était l'étude du bon fonctionnement de ces supports dans la rétention spécifique des espèces phosphorylées. Ensuite, nous avons testé les colonnes monolithiques IMAC sur un échantillon modèle cité dans plusieurs références bibliographiques, le digest de bêta caséine.

2.2.Rétention spécifique d'un phospholipide

La molécule choisie est un phospholipide modèle sous la forme de sel de sodium, le 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphate disodium (DGPD). Sa masse exacte calculée est de 637,38 g/mol.

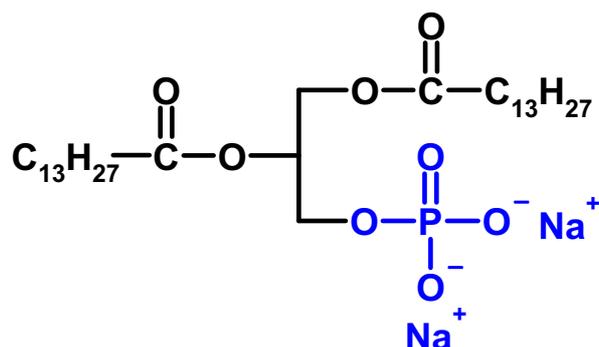


Figure 4.6 : Structure chimique du 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphate (DGPD).

2,5 nmol de l'échantillon dans le méthanol pur est injectée dans la colonne monolithique IMAC à une faible vitesse, de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Après le lavage acide de la colonne IMAC, le phospholipide est élué avec une solution d'acétate d'ammonium 1% à $\text{pH} = 9,5$. Les solutions récoltées sont analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF sans dessalage. Les spectres de masse sont enregistrés dans une gamme de m/z couvrant tous les pics qui peuvent être obtenus par les différentes combinaisons d'adduits salins sur le 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphate avec ou sans élimination du groupement HPO_3 .

Résultats du test avec la matrice DHB

Le 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphate (DGPD) est commercialisé sous la forme d'un sel de sodium. Son analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF, donne naissance à des pics correspondant aux espèces obtenues suite aux différentes combinaisons d'adduits salins sur la molécule avec ou sans perte du groupement HPO_3 . Le tableau suivant regroupe les différentes espèces observées sur les spectres de masse MALDI-TOF.

Tableau 4.2 : Les différentes espèces qui peuvent être obtenues lors de l'analyse du (DGPD) par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode positif et réflectron.

Molécule	Modification	Masse Exacte ¹
$\text{C}_{31}\text{H}_{61}\text{O}_8\text{P}$	$\text{HH} + \text{H}^+$	592,41
	$\text{HH} + \text{Na}^+$	615,40
	$\text{HH} + \text{K}^+$	631,37

	(-H+Na) + Na⁺	637,38
	(-H+Na) +K⁺	653,36
	(-H+K) +K⁺	669,33
C₃₁H₆₀O₅ (perte du phosphate)	- [HPO₃], H⁺	512,44
	(+H+Na) ⁺	536,44
	(+Na+K) ⁺	574,40
	+ 2K⁺	590,37
	(-H+Na) +2K⁺	612,35

1: Les valeurs des Masses Exactes sont calculées à l'aide du logiciel formula.exe

Les principaux paramètres influençant l'apparition de ces espèces et la perte du phosphate sont, la matrice utilisée pour le dépôt de l'échantillon sur la cible MALDI et le réglage de ce dernier, principalement l'ajustement de l'intensité du Laser.

Les spectres de masse MALDI-TOF obtenus à partir des différentes étapes de l'expérience sont présentés dans la Figure 4.7. L'utilisation de la matrice DHB conduit à la perte du groupement HPO₃ du phospholipide, comme le montre le spectre de masse de la solution initiale ainsi que celui de l'élution. Elle donne naissance aux espèces suivantes : (M-HPO₃+H+Na⁺) et (M-HPO₃+Na⁺+K⁺) respectivement de masses exactes 536,44 et 574,40 g/mol. L'absence des pics qui correspond au phospholipide (DGPD) dans le spectre de masse de chargement montre que la molécule a été chargée sur la colonne monolithique IMAC, et que la quantité de 2,5 nmol n'a pas surchargée le support. La même remarque pour le spectre de masse obtenu à partir du lavage acide, le phospholipide n'a pas été détecté ce qui confirme qu'il est bien retenu dans la colonne. Le (DGPD) a été élué d'une manière quantitative avec l'acétate d'ammonium à pH = 9,5.

Chapitre IV : Partie I-A: Colonnes monolithiques IMAC

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

Les résultats de cette expérience sont très prometteurs, néanmoins nous avons tenté de les améliorer en effectuant certains changements du mode opératoire. Ces changements touchent plus les conditions d'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF que le protocole du test.

2.3.Changement du mode opératoire

Le protocole du test n'a pas connu de grandes modifications. La vitesse d'injection du phospholipide dans la colonne monolithique IMAC a été descendue à 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$, pour favoriser la rétention de l'échantillon sur le support IMAC. Le reste du protocole est égal par ailleurs.

Concernant les analyses spectrométriques, d'une part nous avons changé la matrice 2,5-dihydroxybenzoïque DHB, cette dernière a été remplacée par la matrice 2',4',6'-trihydroxyacetophenone (THAP). L'utilisation de cette matrice augmente l'ionisation des phosphopeptides dix fois plus que les autres matrices [22]. D'autre part, l'intensité du Laser a été diminuée aux $\frac{3}{4}$ pour éviter l'élimination du groupement HPO_3 et les spectres de masse MALDI-TOF sont enregistrés en mode négatif et réflectron.

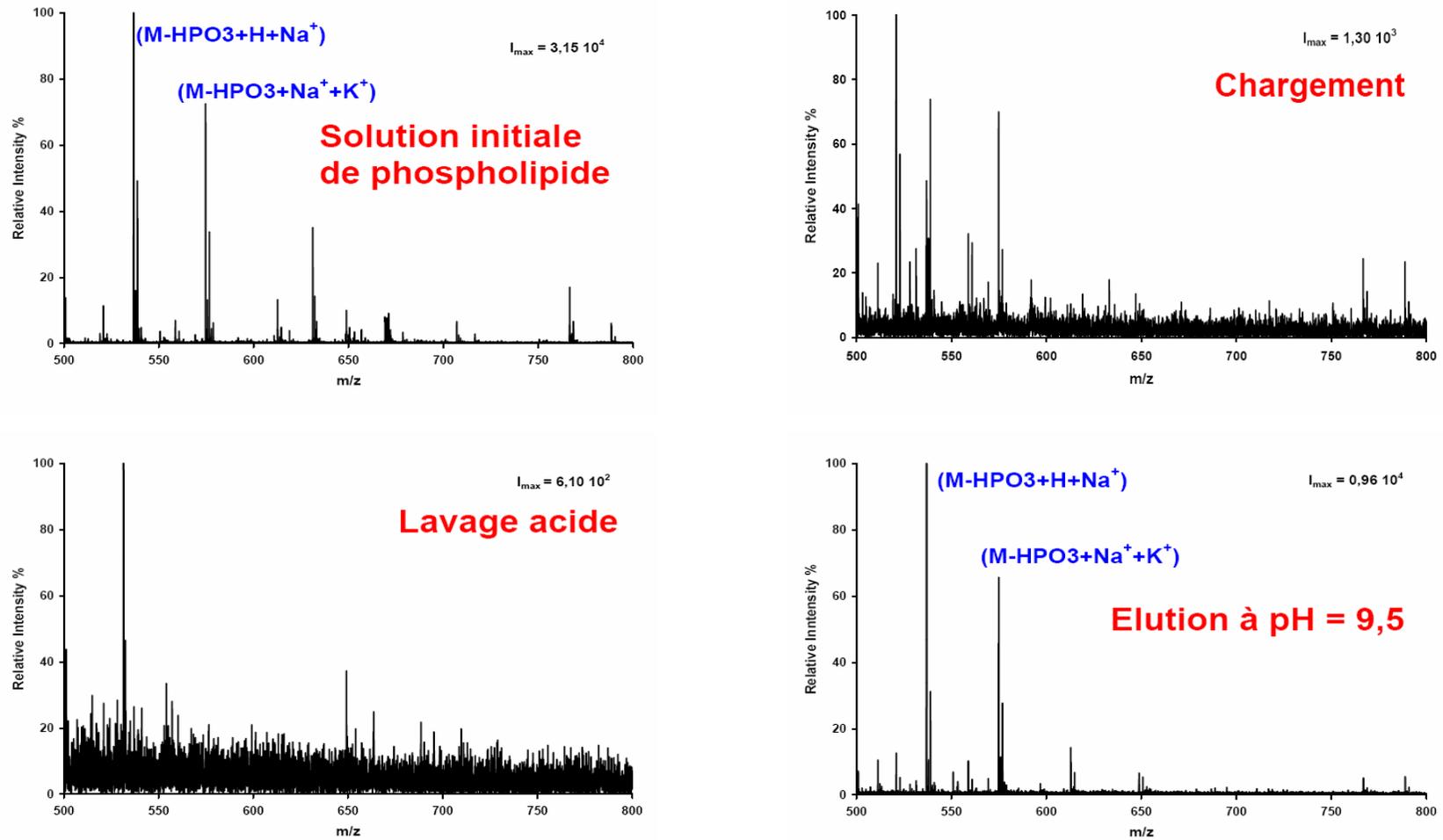


Figure 4.7 : Spectres de masse MALDI-TOF enregistrés à partir des différentes étapes de la rétention spécifique du Phospholipide DGPD sur une colonne monolithique IMAC avec la matrice DHB.

Résultats du test avec la matrice THAP

Les spectres de masse MALDI-TOF obtenus à partir de cette expérience sont représentés dans la Figure 4.8. La première remarque que nous pouvons effectuer à partir du spectre de masse de la solution initiale de l'échantillon et celui de l'élution, est que le phospholipide contient toujours son groupement HPO_3 . Ceci sans pouvoir éviter les adduits salins. Les espèces obtenues dans ce test sont $(\text{M}+\text{Na}^+)$ et $(\text{M}-\text{H}+2\text{Na}^+)$ dans le spectre de masse de la solution initiale et $(\text{M}-\text{H}+2\text{Na}^+)$ dans le spectre de masse l'élution. Le spectre de chargement et celui du lavage acide ne contiennent pas des pics de l'échantillon. Ce qui confirme sa rétention complète sur le support monolithique IMAC. Le (PDGD) est élué avec la solution d'acétate d'ammonium à $\text{pH} = 9,5$. Cependant, le rapport signal/bruit du spectre de masse est inférieur à celui obtenu précédemment en utilisant la matrice DHB.

2.4. Conclusion

Les tests préliminaires des colonnes monolithiques IMAC pour la rétention spécifique des molécules phosphorylées, réalisés sur une petite molécule modèle : Le 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphate (DGPD), sont probants. Afin de prouver d'une manière définitive le bon fonctionnement de ces colonnes, il faut les tester sur des échantillons protéomiques tels que le digest d'une protéine phosphorylée.

2.5. Test sur un échantillon protéomique

L'exemple d'analyse de phosphorylation le plus étudié dans la littérature, que ça soit pour la validation des dispositifs chromatographiques, colonnes ou autres, dédiés à l'enrichissement ou la rétention spécifique des phosphopeptides ou pour l'étude et la localisation de ces derniers, restait jusqu'aux débuts des années 2000 celui de bêta caséine [23-26]. Cette protéine, dont la séquence est présentée dans la Figure 4.9, fait partie des protéines du lait. Elle a une masse moyenne de 23583.29 g/mol et elle contient 5 phosphorylations portées par les sérines situées aux positions 30, 32, 33, 34 et 50 respectivement de sa séquence. Le nombre de phosphopeptides issus de la digestion de la bêta caséine avec la trypsine est variable, il dépend des conditions de la digestion et plus particulièrement du temps de la digestion, plus ce dernier est grand, plus le nombre de clivages manqués tend vers 0 et on obtient ainsi un grand nombre de peptides de faible masse moléculaire. Dans le cas contraire, on obtient moins de peptides et présentent des masses moléculaires plus élevées. La digestion théorique de la bêta caséine sur le serveur de protéomique permet d'avoir une liste contenant tous ces peptides www.expasy.org.

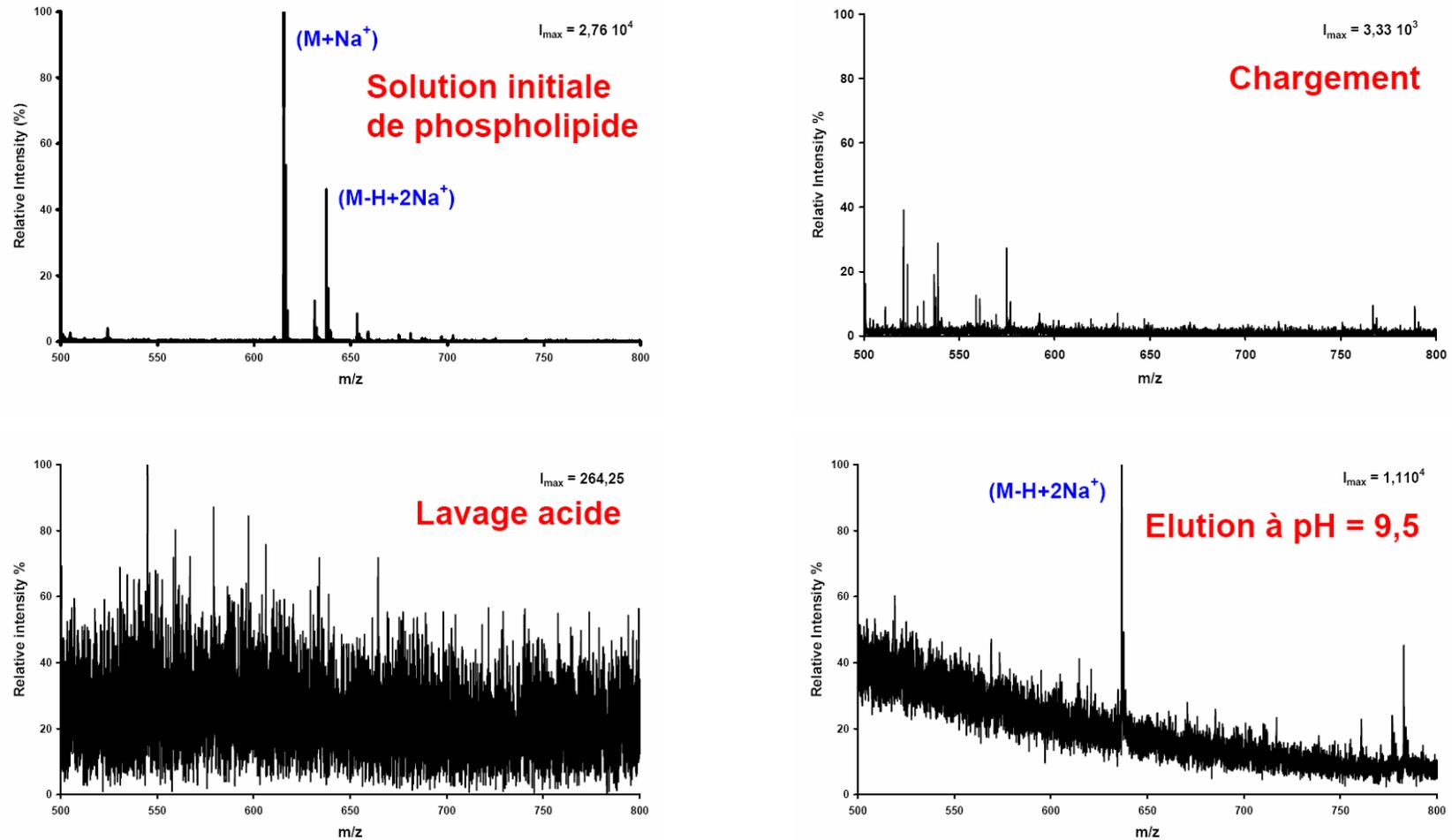


Figure 4.8 : Spectres de masse MALDI-TOF enregistrés à partir des différentes étapes de la rétention spécifique du Phospholipide DGPD sur une colonne monolithique IMAC avec la matrice THAP.

Chapitre IV : Partie I-A: Colonnes monolithiques IMAC

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

Cependant, il y a certains peptides qui sont obtenus quasi régulièrement tels que les deux fragments peptidiques suivants : **48-63** et **16-40** respectivement d'un rapport m/z égal 2061,82 et 3122,26.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	Met	Lys	Val	Leu	Ile	Leu	Ala	Cys	Leu	Val	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	15
16	Arg	Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Asn	Val	Pro	Gly	Glu	Ile	Val	Glu	Ser	30
31	Leu	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Ser	Ile	Thr	Arg	Ile	Asn	Lys	Lys	Ile	45
46	Glu	Lys	Phe	Gln	Ser	Glu	Glu	Gln	Gln	Gln	Thr	Glu	Asp	Glu	Leu	60
61	Gln	Asp	Lys	Ile	His	Pro	Phe	Ala	Gln	Thr	Gln	Ser	Leu	Val	Tyr	75
76	Pro	Phe	Pro	Gly	Pro	Ile	Pro	Asn	Ser	Leu	Pro	Gln	Asn	Ile	Pro	90
91	Pro	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Val	Val	Val	Pro	Pro	Phe	Leu	Gln	Pro	105
106	Glu	Val	Met	Gly	Val	Ser	Lys	Val	Lys	Glu	Ala	Met	Ala	Pro	Lys	120
121	His	Lys	Glu	Met	Pro	Phe	Pro	Lys	Tyr	Pro	Val	Glu	Pro	Phe	Thr	135
136	Glu	Ser	Gln	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr	Asp	Val	Glu	Asn	Leu	His	Leu	150
151	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu	Gln	Ser	Trp	Met	His	Gln	Pro	His	Gln	Pro	165
166	Leu	Pro	Pro	Thr	Val	Met	Phe	Pro	Pro	Gln	Ser	Val	Leu	Ser	Leu	180
181	Ser	Gln	Ser	Lys	Val	Leu	Pro	Val	Pro	Gln	Lys	Ala	Val	Pro	Tyr	195
196	Pro	Gln	Arg	Asp	Met	Pro	Ile	Gln	Ala	Phe	Leu	Leu	Tyr	Gln	Glu	210
211	Pro	Val	Leu	Gly	Pro	Val	Arg	Gly	Pro	Phe	Pro	Ile	Ile	Val		

Ser : sérine phosphorylée dans la bêta caséine.

Arg, Lys : acides aminés après lesquels la trypsine coupe.

Figure 4.9 : Séquence de la bêta-caséine.

L'étape suivante consiste à tester les colonnes monolithiques IMAC sur un digest de bêta caséine. Dans un premier temps, nous avons étudié la digestion de la bêta caséine avec la trypsine, dans le but de l'optimiser afin d'avoir une concentration assez suffisante en peptides phosphorylés.

Protocole standard de digestion de la Bêta Caséine

La littérature propose plusieurs protocoles de digestion de la bêta caséine en utilisant la trypsine. Pour le moment, nous avons choisi le protocole standard utilisé dans notre laboratoire. Ce protocole est composé de deux étapes. Dans la première étape, la protéine est déployée et les ponts disulfures sont réduits et alkylés dans le but de favoriser l'accès de l'enzyme aux sites de clivage. Etant donné que les ponts disulfures n'existent pas dans la bêta caséine, car elle ne contient qu'un seul acide aminé cystéine comportant le groupement –SH, la réduction et l'alkylation de la protéine ne seront pas nécessaires. 1 mg de bêta caséine est

solubilisé dans 1 mL de H₂O pure et chauffé ensuite à 70 °C pendant 1 heure à fin de déployer sa chaîne latérale.

La deuxième étape consiste à ajouter la trypsine sur la protéine en solution, en respectant le ratio massique E/S 1:25. 10 µL d'une solution de trypsine, d'une concentration de 1 µg/µL, dans du Tris HCl 20 mM à pH = 7,6 est ajoutée à 250 µL de la solution de protéine. La digestion s'est déroulée, pendant une nuit, à 37 °C. Ensuite, le digest est dessalé sur supports ZipTip® et analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF en utilisant la matrice DHB. Le dépôt des échantillons est réalisé avec 1µL de matrice suivi de 1µL de la solution de l'échantillon dessalé.

La Figure 4.10 représente le spectre de masse MALDI-TOF enregistré dans la gamme de m/z 700-3400, qui a été obtenu à partir du digest de bêta caséine selon le protocole standard de digestion.

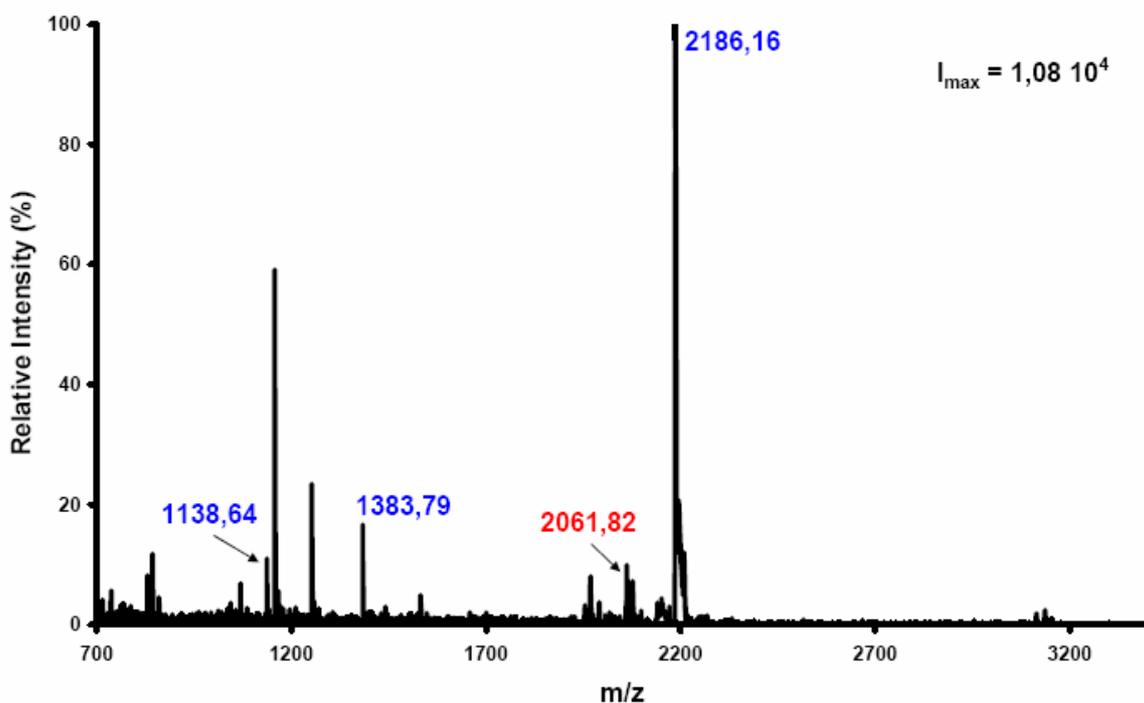


Figure 4.10 : Spectres de masse MALDI-TOF obtenu à partir des peptides de bêta caséine issus d'une digestion selon le protocole standard.

La conclusion que nous pouvons tirer du spectre de masse MALDI-TOF ci-dessus, est que le protocole standard de digestion n'est pas convenable pour la bêta caséine. Effectivement, le nombre de peptides obtenus ainsi que leur intensité sont faibles, la gamme de m/z allant de 2200 jusqu'à 3400 ne contenant quasiment aucun peptide. De plus, il y a un grand nombre de

Chapitre IV : Partie I-A: Colonnes monolithiques IMAC

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

peptides non identifiés. Concernant les phosphopeptides, le seul qui a été détecté est celui de $m/z = 2061,82$ avec une très faible intensité.

Test IMAC du digest de bêta caséine

Le mode opératoire suivi pour le test des colonnes monolithiques IMAC sur le digest de bêta caséine ressemble à celui utilisé, précédemment, pour la molécule modèle 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphate (DGPD). Tout d'abord, 1 μL de digest dessalé est injecté à travers la colonne à un débit de 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ensuite, la colonne est lavée avec une solution d'acide acétique 0,1 M pour éluer les peptides non phosphorylés qui ne sont pas retenus dans ces conditions. Enfin, l'élution est effectuée avec une solution aqueuse d'acétate d'ammonium 1% à $\text{pH} = 9,5$. Les solutions récoltées en sortie de la colonne sont analysées en spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode réflectron et positif, les échantillons sont déposés sur la cible MALDI en utilisant 1 μL de la matrice DHB et 1 μL de l'échantillon. Les spectres de masse sont enregistrés dans la gamme de m/z 700-3400.

2.6.Résultat

Les spectres de masse MALDI-TOF obtenus à partir du chargement et du lavage, ne contiennent pas de phosphopeptides. Les peptides non phosphorylés sont moins présents dans les spectres de cette expérience, tandis que le spectre de l'élution contient un seul peptide de la bêta caséine non phosphorylé de $m/z = 780,49$.

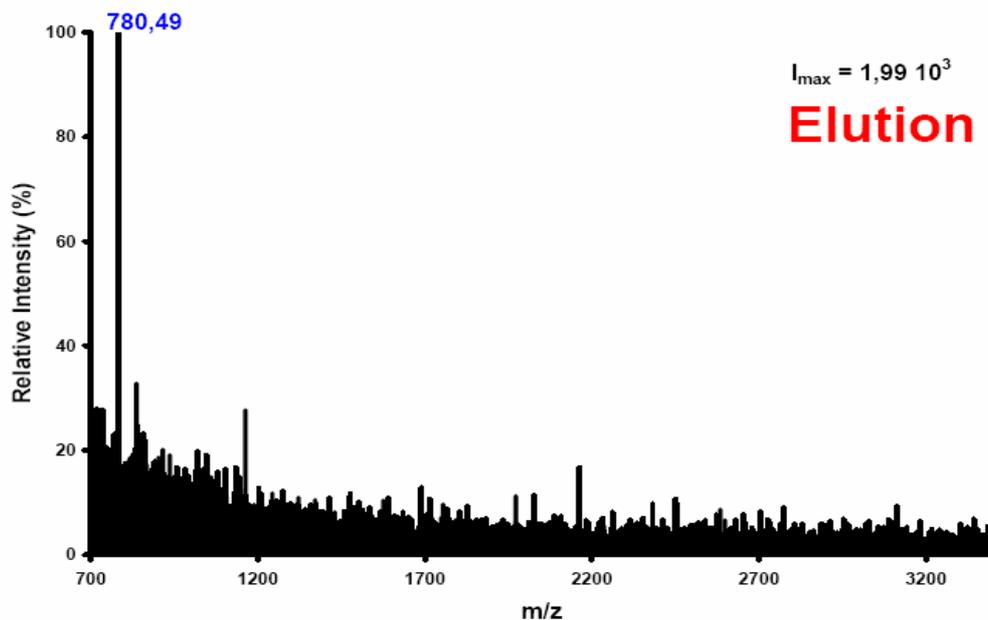


Figure 4.11: Spectre de masse MALDI-TOF obtenu à partir de l'élution du digest de bêta caséine.

Ceci est dû, soit au fait que la quantité de peptides injectée à travers la colonne monolithique IMAC n'est pas suffisante, soit au fait que les peptides restent accrochés à l'intérieur de la colonne.

Après une longue étude des protocoles de digestion, nous avons développé un nouveau protocole permettant d'avoir un très bon séquençage de bêta caséine ainsi qu'un nombre plus élevé de peptides phosphorylés avec une meilleure intensité.

2.7.Optimisation du protocole de digestion

Le nouveau protocole ne comporte pas de dénaturation. La bêta caséine est dissoute dans une solution de bicarbonate d'ammonium NH_4^+ , HCO_3^- 100 mM avec un pH = 8 à raison de 1 mg/mL. Ensuite, une solution de trypsine dans du bicarbonate d'ammonium d'une concentration de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ est ajoutée à la solution de protéine selon un ratio massique E/S de 1:50. La digestion est effectuée pendant une période allant de 2 à 6 heures seulement à 37°C. Une fois la digestion terminée, le digest est dessalé sur un support ZipTip®.

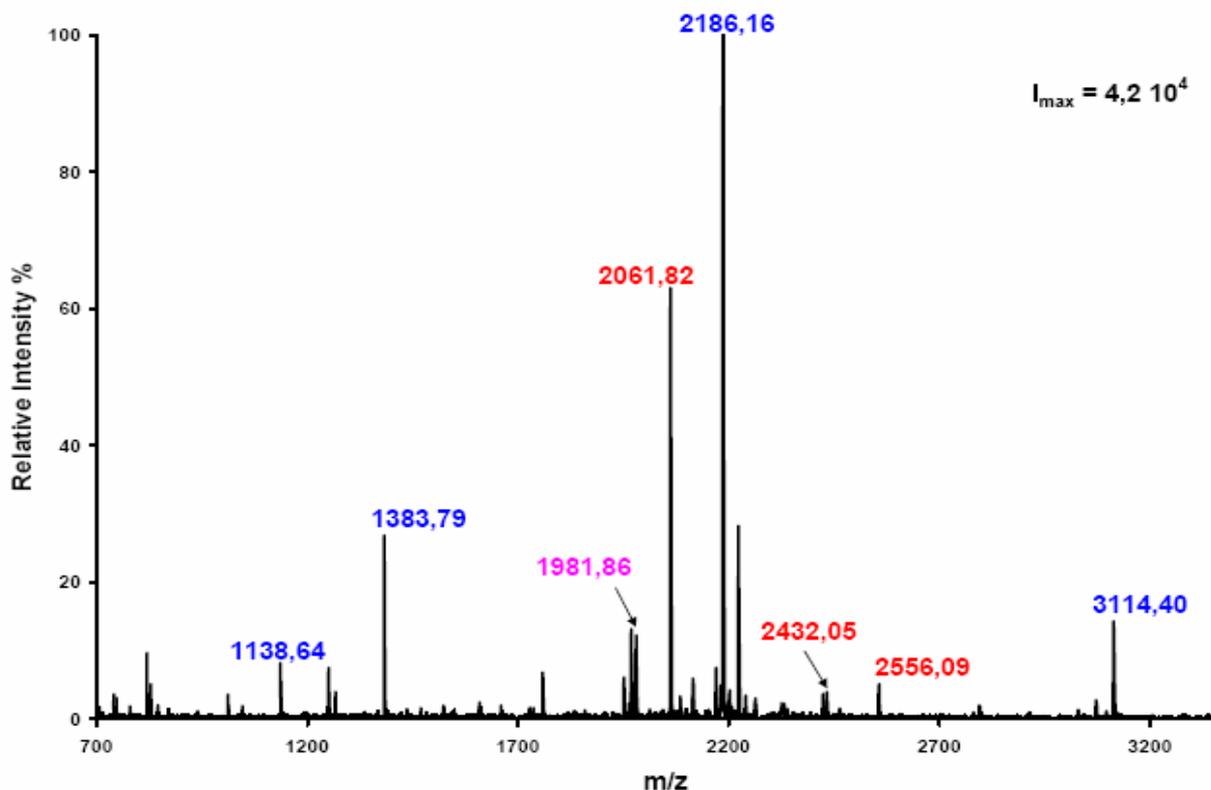
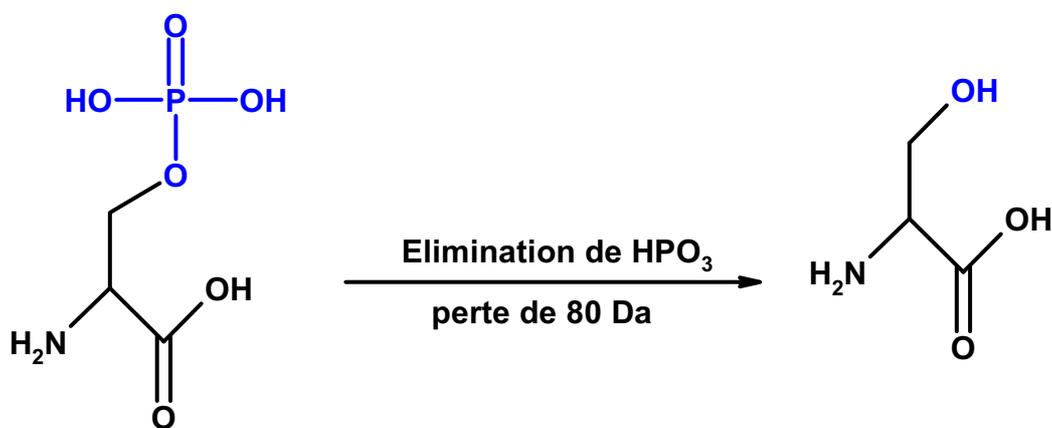


Figure 4.12 : Spectres de masse MALDI-TOF obtenu à partir des peptides de bêta caséine issus d'une digestion selon le protocole que nous avons développé.

Le spectre de masse est enregistré dans la gamme de m/z suivante : [700-3400]. La matrice utilisée est le DHB, préparée de la même manière qu'auparavant. Le dépôt des échantillons est réalisé avec 1 μ L de matrice suivi de 1 μ L de la solution de l'échantillon dessalé.

Contrairement au spectre de masse précédent, obtenu à partir du protocole standard, ce spectre contient beaucoup plus de pics qui correspondent aux fragments peptidiques (en bleu) de la bêta caséine avec des intensités élevées et moins de pics non identifiés. Trois phosphopeptides (en rouge) ont été détectés, celui à $m/z = 2061,82$ a une intensité de $2,7 \cdot 10^4$ qui correspond à une intensité relative de 64 % par rapport au pic le plus intense. L'utilisation du mode réflectron conduit à la perte de l'acide phosphorique H_3PO_4 et de l'acide méta phosphorique HPO_3 qui correspond respectivement à une perte de masse de 98 et 80 Da [27]. Dans notre cas, c'est l'élimination du groupement HPO_3 qui s'est produit, le fragment peptidique phosphorylé de $m/z = 2061,82$ a subi une élimination de l'acide méta phosphorique en donnant naissance au fragment de $m/z = 1981,86$.

La Figure 4.13 représente un schéma représentatif de l'élimination du groupement HPO_3 d'une phosphoserine accompagné d'une perte de masse de 80 Da.



Phosphoserine

Figure 4.13 : Schéma représentatif de l'élimination du groupement HPO_3 .

Test IMAC du digest de bêta caséine après optimisation

Le mode opératoire du test a connu deux changements. Le premier, concernant la quantité injectée, elle est passée de 1 μ L à 10 μ L afin d'augmenter la quantité injectée de peptides. Le deuxième, concernant la composition de la solution d'éluion. Nous avons introduit l'acétonitrile dans cette solution pour pouvoir décrocher les peptides non phosphorylés qui sont susceptibles de rester accrochés à l'intérieur de la colonne.

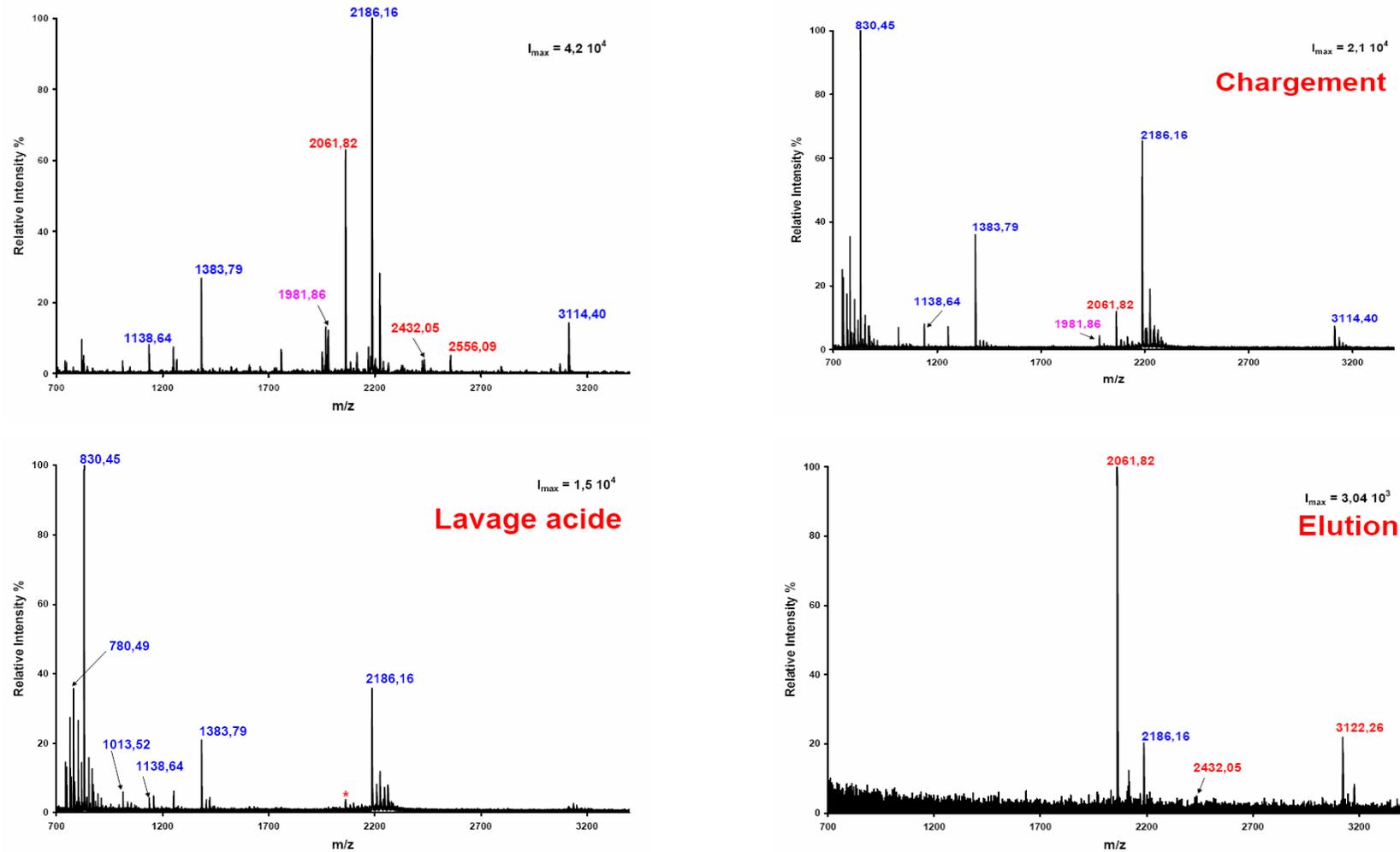


Figure 4.14 : Spectres de masse MALDI-TOF enregistrés à partir des différentes étapes du test de rétention spécifique du digest de bêta caséine sur une colonne monolithique IMAC.

La solution d'élution est constituée d'un mélange eau/ acétonitrile selon le rapport volumique 60 : 40 avec 1 % d'acide formique par rapport au mélange.

2.8.Résultat

Les spectres de masse MALDI-TOF représentés dans la Figure 4.14 montrent que le test de rétention spécifique des phosphopeptides de bêta caséine a été efficace. Le spectre de masse obtenu à partir de la solution de chargement révèle l'absence des phosphopeptides à l'exception du peptide à $m/z = 2061,82$ qui apparaît en faible concentration, cette présence peut-être expliquée par le fait que la capacité de chargement de la colonne a été atteinte et que cette quantité de ce phosphopeptide majoritaire n'a pas pu être retenue. La solution de lavage ne contient qu'une trace de ce phosphopeptide dans le bruit de fond comme le montre le spectre de masse correspondant. L'élution des phosphopeptides a spectaculairement réussi. Trois phosphopeptides ont été élués. Le pic majoritaire correspond au peptide à $m/z = 2061,82$ ce qui confirme l'explication de son apparition dans la solution de chargement. Cependant, il y a des remarques à faire concernant le spectre de masse de l'élution. La première remarque concerne l'intensité des pics correspondant aux phosphopeptides élués, elle est maximale dans notre cas, tandis que dans la littérature, ces pics n'ont jamais été majoritaires, ils ont une très faible intensité et ils sont le plus souvent dans le bruit de fond. La deuxième remarque concerne l'apparition d'un phosphopeptide dans l'élution qui n'est pas apparu dans le spectre du digest de bêta caséine. Il s'agit du peptide triphosphorylé à $m/z = 3122,26$. Par contre le peptide à $m/z = 2556,09$ ne fait pas partie des phosphopeptides élués. Probablement il est resté accroché dans la colonne monolithique IMAC. Dans d'autres expériences nous avons augmenté la teneur en acétonitrile dans la solution d'élution mais sans pouvoir détecter ce phosphopeptide dans le spectre de masse correspondant à l'élution. La dernière remarque est à propos du peptide à $m/z = 2186,16$, ce peptide sort dans toute les éluions que nous avons effectuées. Malgré les lavages intenses qui sont réalisés avant l'élution. Pour comprendre ce phénomène, nous avons calculé le pI des fragments peptidiques issus de la digestion de bêta caséine avec la trypsine à l'aide d'un logiciel en ligne sur le serveur de protéomique www.expasy.org. Le Tableau 4.3 représente les valeurs du pI calculées pour les peptides du digest de la bêta caséine. La valeur de pI du peptide à $m/z = 2186,16$ est très proche de celle des trois phosphopeptides retenus dans la colonne. Ceci montre que la structure de ce peptide lui permet de développer certaines interactions avec le support monolithique IMAC qui lui ont permis de résister au lavage et d'être retenu dans la colonne jusqu'à l'élution.

Tableau 4.3 : Les fragments peptidiques issus de la digestion de bêta caséine avec la trypsine et les valeurs de pI correspondants.

Peptides de Bêta Caséine	Position	Masse	pI ¹
RELEELNVPGEIVESLSSE ESITR	16-40¹	3122,2655	4,12
FQSEEQQTTEDELQDKIHPF	48-67	2556,0925	4,08
IEKFQSEEQQTTEDELQDK	45-63	2432,0500	4,00
DMPIQAFLLYQEPVLPVVR	199-217²	2186,1678	4,37
FQSEEQQTTEDELQDK	48-63	2061,8284	3,77
FQSEEQQTTEDELQDK	48-63³	1981,8621	3,77
LLYQEPVLPVVR	206-217	1383,7994	6,00
VKEAMAPKHK	113-122	1138,6401	9,70
HKEMPFK	121-128	1013,5237	8,60
VKEAMAPK	113-120	873,4862	8,56
AVPYPQR	192-198	830,4519	8,79
VLPVPQK	185-191	780,4978	8,72
EMPFK	123-128	748,3698	6,10
GPFPIV	218-224	742,4497	5,52

¹ Les séquences en rouge correspondent aux phosphopeptides

² Les séquences en noir correspondent aux peptides non phosphorylés

³ Les séquences en rose correspondent aux peptides issus de la bêta élimination d'un groupement phosphate d'un phosphopeptide.

Un résultat secondaire, mais très impressionnant a été observé avec les colonnes monolithiques IMAC. Il s'agit du pouvoir élevé de préconcentration et de purification des colonnes monolithiques IMAC. Après passage du digest à travers la colonne pendant le chargement, le nombre de peptides de bêta caséine que nous avons pu identifier est multiplié. Le spectre de masse de lavage ainsi que le spectre de chargement ci-dessus et son agrandissement dans la gamme de m/z 700-1300 représenté dans la Figure 4.15 révèlent la présence d'au moins 15 fragments peptidiques de bêta caséine.

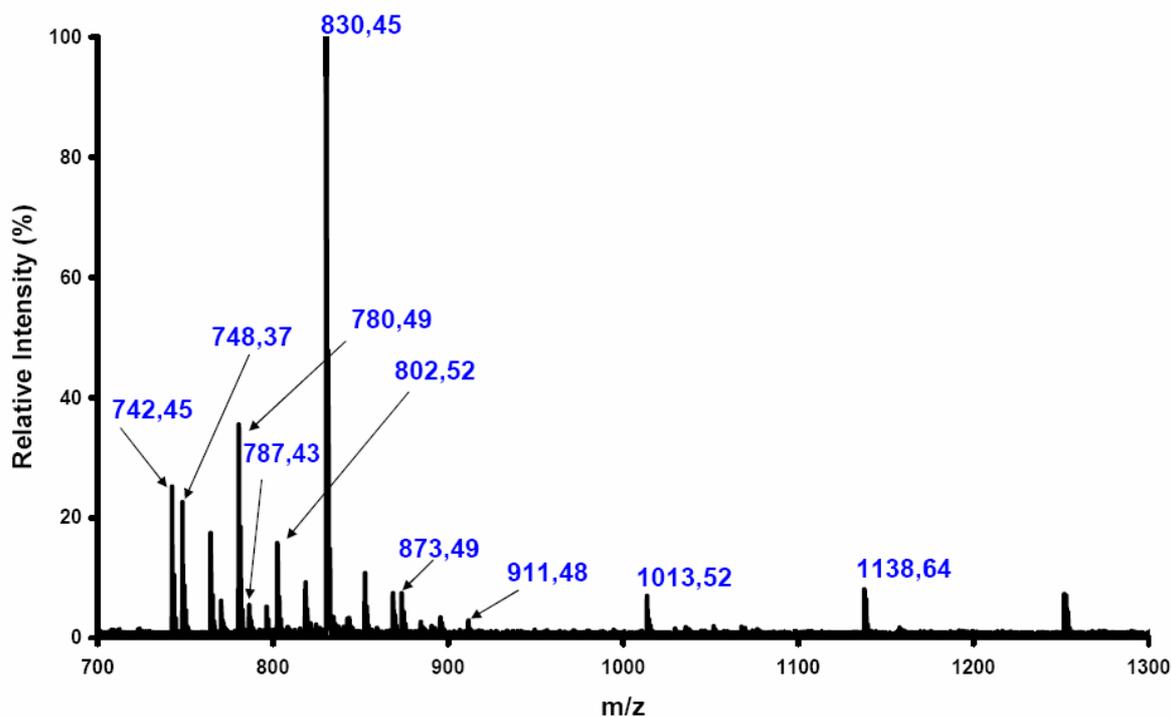


Figure 4.15 : Agrandissement sur la gamme m/z 700-1300 du spectre de masse MALDI-TOF obtenu pour le chargement du digest de bêta caséine sur la colonne monolithique IMAC.

3.Conclusion

Le développement des colonnes monolithiques IMAC à base de méthacrylate de glycidyl, de l'IDA et de Fe^{3+} pour l'enrichissement des phosphopeptides a été réussi. Les tests préliminaires de ces phases monolithiques sur un petit composé modèle, un phospholipide, sont probants. Ainsi, les colonnes monolithiques IMAC retiennent spécifiquement le phospholipide. L'optimisation de la digestion de la bêta caséine a permis d'avoir une bonne intensité des phosphopeptides. Ces derniers ont été retenus sur la colonne monolithique durant le chargement.

Cependant, les sites de rétention spécifique ont été surchargés avec les phosphopeptides ce qui a été traduit par la présence des traces du phosphopeptide à $m/z = 2061,82$. De plus, la présence du pic correspondant au peptide de $m/z = 2186,16$ dans le spectre de l'élution est justifiée par le fait que ce peptide a un point isoélectrique très proche de celui observé chez les phosphopeptides, ce qui lui a permis de rester accrocher dans la colonne.

Ces tests ont révélé que les colonnes monolithiques IMAC possèdent un pouvoir impressionnant de préconcentration et de purification. Dans le spectre de chargement, bien

Chapitre IV : Partie I-A: Colonnes monolithiques IMAC

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

qu'un grand nombre de peptides sont resté accroché sur le support, nous avons détecté plusieurs fragments peptidiques, 15 parmi eux sont issus de la digestion spécifique de bêta caséine avec la trypsine et le reste est probablement issus de la digestion non spécifique.

Enfin, les mêmes tests ont été réalisés avec des colonnes monolithiques IMAC mais cette fois-ci en utilisant d'autres ions métalliques tels que Al^{3+} et Cu^{2+} . Les résultats n'ont pas été concluants.

B. Colonnes monolithiques à base de nanoparticules d'oxydes métalliques

I. DEVELOPPEMENT DE COLONNES MONOLITHIQUES À BASE DE NANOPARTICULES (NPOM)

Le but de cette partie est le développement d'une autre alternative pour l'enrichissement des phosphopeptides que les colonnes monolithiques IMAC. Dans cette approche nous allons remplacer les ions métalliques par des nanoparticules d'oxydes métalliques (NPOM), qui seront capables de développer de fortes interactions avec les groupements phosphates des phosphopeptides, ou en général des molécules phosphorylées. Ces nanoparticules seront mélangées avec les constituant du mélange réactionnel avant sa polymérisation. Elles seront accrochées au monolithe à l'intérieur de la colonne par piégeage physique.

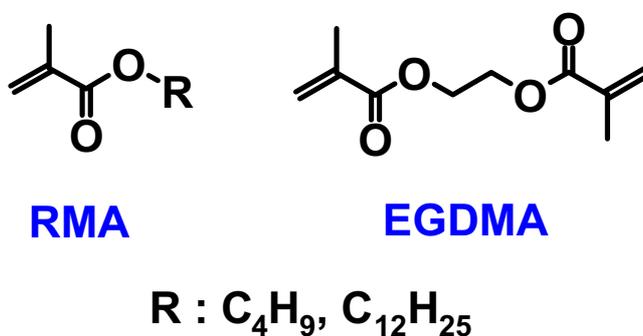


Figure 4.16 : Structures chimiques des monomères fonctionnels utilisés pour la préparation des colonnes monolithiques à base de NPOM.

Les monomères utilisés pour la préparation de ces colonnes monolithiques sont des monomères méthacrylates. Après de nombreux tests nous avons choisi des monomères fonctionnels hydrophobes. D'une part, ils permettent un bon contrôle des propriétés hydrodynamiques du support résultant. D'autre part, les interactions développées avec les échantillons peptidiques sont des interactions réversibles que nous pouvons détruire facilement en utilisant un solvant organique comme l'acétonitrile.

1.Préparation des colonnes monolithiques à base de NPOM

Les colonnes monolithiques à base de nanoparticules d'oxydes métalliques sont préparées dans des capillaires transparents aux irradiations UV. Ces capillaires ont un diamètre interne de 75 μm et une longueur de 15 à 20 cm. Comme tous les capillaires utilisés dans le travail de cette thèse, ces capillaires ont subi un traitement de parois internes dans le but d'accrocher le monolithe formé d'une manière covalente.

Le mélange réactionnel est constitué de monomères fonctionnel et réticulant, d'un porogène binaire, assurant la formation et l'ajustement de la taille des pores, et d'un photoamorceur. Les

monomères fonctionnels utilisés pour la préparation de ces colonnes sont identiques à ceux utilisés pour le développement des colonnes monolithiques de séparation dans le chapitre 2. Ils sont à base de méthacrylates et ils portent une fonction hydrophobe. Les NPOM sont ajoutées à une teneur massique de 10 % par rapport au mélange réactionnel.

Tableau 4.4 : Mélange réactionnel utilisé pour la préparation des colonnes monolithiques à base de nanoparticules d'oxydes métalliques.

Composition des Monomères (% vol)	Composition du Porogène (% vol)	Teneur vol en porogène	Amorceur
LMA/EGDMA 65/35	CyOH /Et(OH) ₂ 80/20	65 %	AIBN 1 % massique

Au début nous avons travaillé avec le méthacrylate de butyle, c'est un monomère contenant quatre carbones dans sa chaîne aliphatique, pour diminuer les interactions de type hydrophobes afin de ne pas trop retenir les peptides non phosphorylés. Cependant, la viscosité du mélange réactionnel est insuffisante pour maintenir les NPOM de façon homogène. Après polymérisation du mélange réactionnel, les supports obtenus étaient hétérogènes. Dans le reste de l'étude, les colonnes monolithiques sont préparées à base de méthacrylate de lauryl, comportant 12 carbones dans sa chaîne aliphatique.

Après préparation du mélange réactionnel, il est dégazé et injecté dans un capillaire qui est ensuite placé sous irradiations UV pendant une durée de 1 heure. Une fois la polymérisation terminée, la colonne est lavée abondamment au méthanol puis, séchée à l'étuve pendant une nuit à 80 °C.

2. Etude des colonnes monolithiques à base de NPOM

Nous avons étudié trois types de nanoparticules métalliques, l'oxyde de Zirconium ZrO₂, l'oxyde de Nickel Cobalt NiCoO₂, et le Ni activé Ni. Le Tableau 4.5 regroupe les caractéristiques des nanoparticules métalliques utilisées dans cette étude. Le choix de ces métaux est basé sur la littérature. Nous avons trouvé que les ions métalliques correspondants avaient été utilisés pour la préparation des dispositifs IMAC, dédiés à l'enrichissement des phosphopeptides, grâce aux interactions que développent les charges positives de ces ions avec les groupements phosphates des phosphopeptides.

Tableau 4.5 : Caractéristiques des nanoparticules métalliques utilisées pour la préparation des colonnes monolithiques dédiées à la rétention spécifique des phosphopeptides.

Nom	Formule chimique	Masse molaire (g/mol)	Surface spécifique (m ² /g)	Densité (g/cm ³) A 25°C	Taille (nm)
Dioxyde de Zirconium (IV)	ZrO ₂	123,22	35-45	5,89	20-30
Dioxyde de Nickel cobalt	NiCoO ₂	149,63	<10	6.6	<30 (xrd) <60 (BET)
Poudre de Nickel activé	Ni	58,69	—	—	90

Protocole

Les colonnes préparées sont testées sur le même digest de bêta caséine, utilisé dans la section A. Le protocole du test est identique à celui utilisé pour tester les colonnes monolithiques IMAC. 10 µL de digest sont chargés sur la colonne à une vitesse de 0,3 µL/min, suivie d'un lavage acide de la colonne pour éluer les peptides non phosphorylés. L'élution est réalisée à l'aide d'un mélange eau/acétonitrile avec 1 % d'acide formique. Les différentes solutions récoltées en aval de la colonne sont analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode réflectron et positif à l'aide de la matrice DHB.

2.1.Colonnes monolithiques à base de ZrO₂

Le dioxyde de zirconium est celui qui développe le plus d'interactions avec les groupements phosphates. Les spectres de masse MALDI-TOF obtenus à partir du test de cette colonne sont présentés dans la Figure 4.17. L'absence de pics dans le spectre de masse du chargement, à l'exception des deux pics à m/z = 780,49 et 830,45 de très faible intensité, révèle une grande capacité de chargement de la colonne. Le lavage de la colonne a permis d'éluer tous les peptides non phosphorylés. Cependant, des traces du phosphopeptide à m/z = 2061,82 ont été détectées, ils sont indiqués par une étoile rouge. Le spectre de masse ne contient aucun pic, ce qui implique que les peptides phosphorylés sont toujours à l'intérieur de la colonne.

Chapitre IV : Partie I-B. Colonnes monolithiques à base nanoparticules d'oxydes métalliques
Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

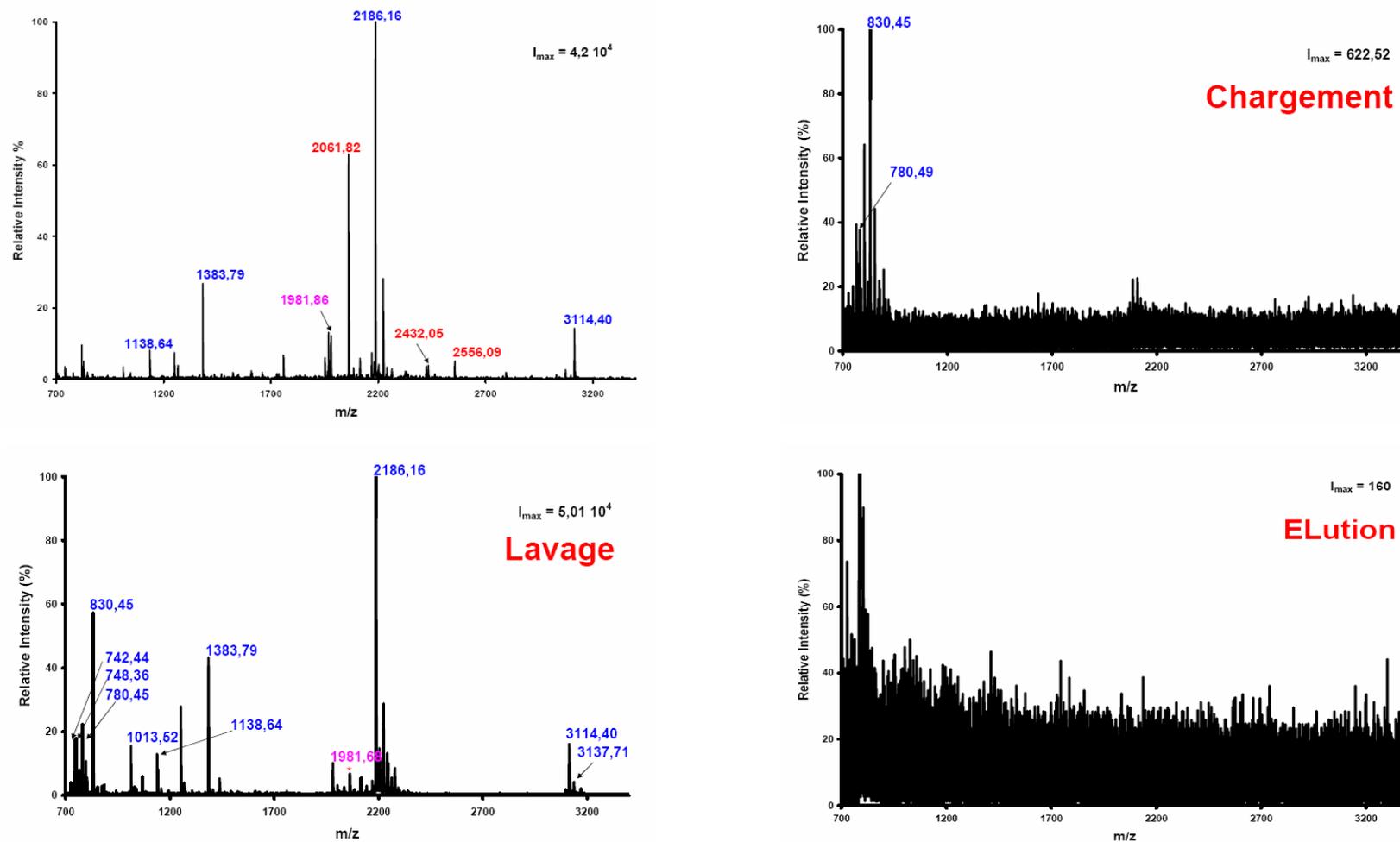


Figure 4.17 : Spectres de masse MALDI-TOF enregistrés à partir des différentes étapes du test de rétention spécifique du digest de bêta caséine sur une colonne monolithique à base de NPOM ZrO₂.

Après plusieurs tests, nous avons décidé de traiter la colonne avec une solution aqueuse de K_2HPO_4 afin d'éliminer les sites de rétention irréversible. Le spectre de masse obtenu à partir de l'élution est représenté dans la Figure 4.18. Les phosphopeptides ne sont pas élués malgré le traitement de la colonne.

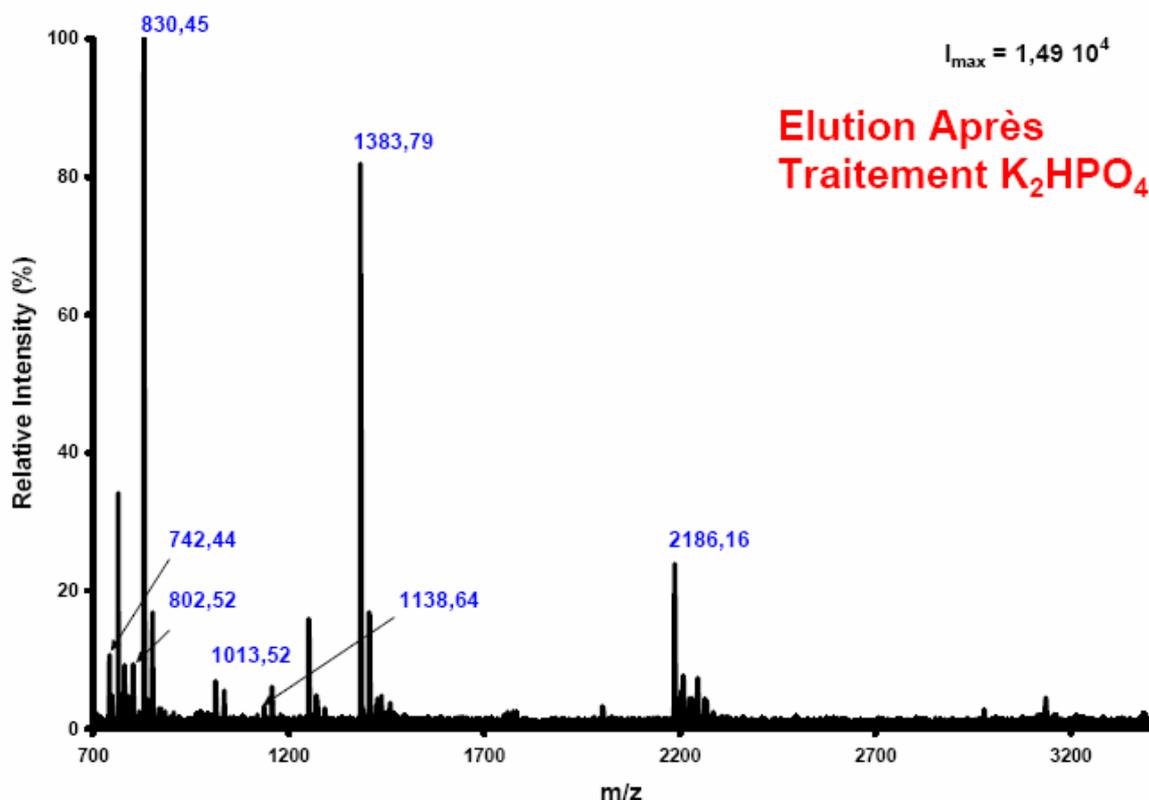


Figure 4.18 : Spectre de masse MALDI-TOF obtenu pour l'élution du digest de bêta caséine sur la colonne monolithique à base de NPOM ZrO_2 après traitement K_2HPO_4 .

2.2. Colonnes monolithiques à base de $NiCoO_2$

Le test des colonnes monolithiques à base de dioxyde de Nickel cobalt est effectué selon le même protocole qu'auparavant. Ces nanoparticules sont moins poreuses par rapport aux autres nanoparticules, avec une surface spécifique inférieure à $10 \text{ m}^2/\text{g}$ et une densité de $6,6 \text{ g}/\text{cm}^3$. De ce fait, ces nanoparticules précipitent vite dans le mélange réactionnel. Ce dernier doit être irradié immédiatement après homogénéisation par ondes ultrasoniques.

La Figure 4.19 représente les spectres de masses MALDI-TOF obtenus des différentes étapes du teste chromatographique sur les colonnes monolithiques à base de $NiCoO_2$.

Chapitre IV : Partie I-B. Colonnes monolithiques à base nanoparticules d'oxydes métalliques

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

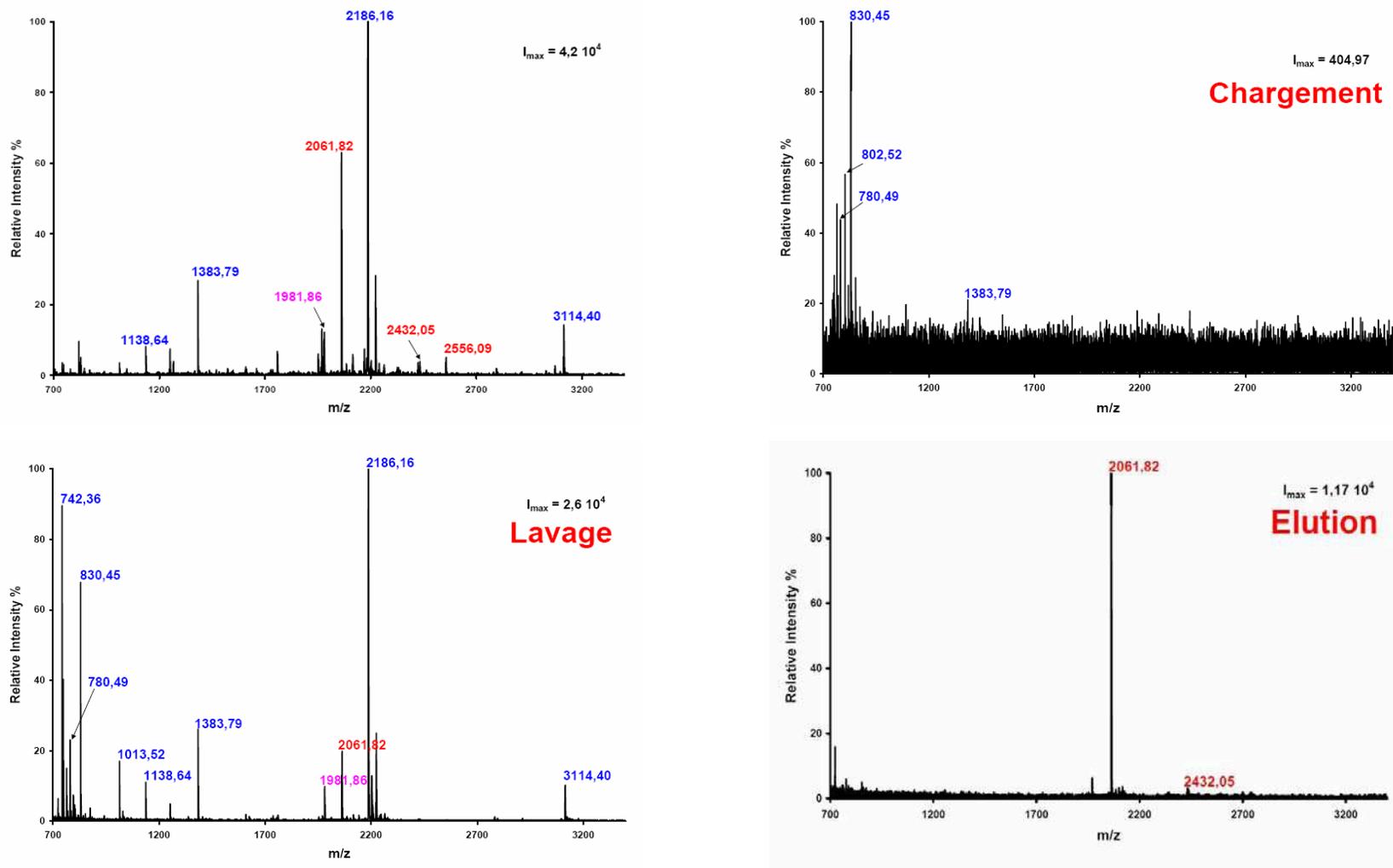


Figure 4.19 : Spectres de masse MALDI-TOF enregistrés à partir des différentes étapes du test de rétention spécifique du digest de bêta caséine sur une colonne monolithique à base de NPOM NiCoO₂.

Les colonnes monolithiques à base de dioxyde de Nickel Cobalt développent une bonne capacité de chargement quasiment identique à celle observée pour les colonnes monolithiques à base de dioxyde de zirconium. Cependant, le lavage révèle la présence du phosphopeptide de rapport m/z égale à 2061,82 qui a dû sûrement surcharger les sites de rétention spécifiques de la colonne étant donnée sa grande concentration par rapport aux autres phosphopeptides. L'élution des phosphopeptides retenus sur la colonne est réalisée avec succès. Le spectre de masse MALDI-TOF correspondant à l'élution contient deux pics des deux phosphopeptides de m/z égale à 2061,82 et 2432,05 respectivement avec une intensité relative de 100 % pour le premier phosphopeptide.

2.3.Colonnes monolithiques à base de Ni activé

Les bons résultats obtenus avec les colonnes monolithiques à base de nanoparticules de dioxyde de Nickel Cobalt nous ont encouragé à tester un autre type de nanoparticules très proche du précédent. Il ne s'agit pas cette fois-ci d'un oxyde, il s'agit simplement des nanoparticules du Nickel activé. De plus, l'ion métallique correspondant est largement utilisé pour le développement des supports de chromatographie d'affinité IMAC.

Après préparation des colonnes monolithiques à base du Nickel activé, elles sont testées sur le digest de bêta caséine déjà préparé. Les résultats du test sont représentés dans la Figure 4.20.

La présence de pics basse masse dans le spectre masse MALDI-TOF qui correspond au chargement montre que la colonne est surchargée. Etant donné que la quantité du digest injectée est la même que pour les colonnes monolithiques à base de NiCoO_2 , la capacité de chargement des colonnes à base du Ni activé est inférieure à celle des autres colonnes. Cependant, le spectre de masse MALDI-TOF qui correspond à l'élution ne contient qu'un seul phosphopeptide, celui qui a un rapport m/z égale à 2061,82 avec une intensité maximale de 100 %. Le spectre contient aussi deux pics correspondants à deux peptides non phosphorylé qui sont restés accrochés à l'intérieur de la colonne via des interactions non spécifiques. Le premier est à $m/z = 2186,16$ et le deuxième est à $m/z = 1981,86$ il est issu d'une bêta élimination du groupement phosphate du phosphopeptide de masse égale à 2061,82.

Chapitre IV : Partie I-B. Colonnes monolithiques à base nanoparticules d'oxydes métalliques

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

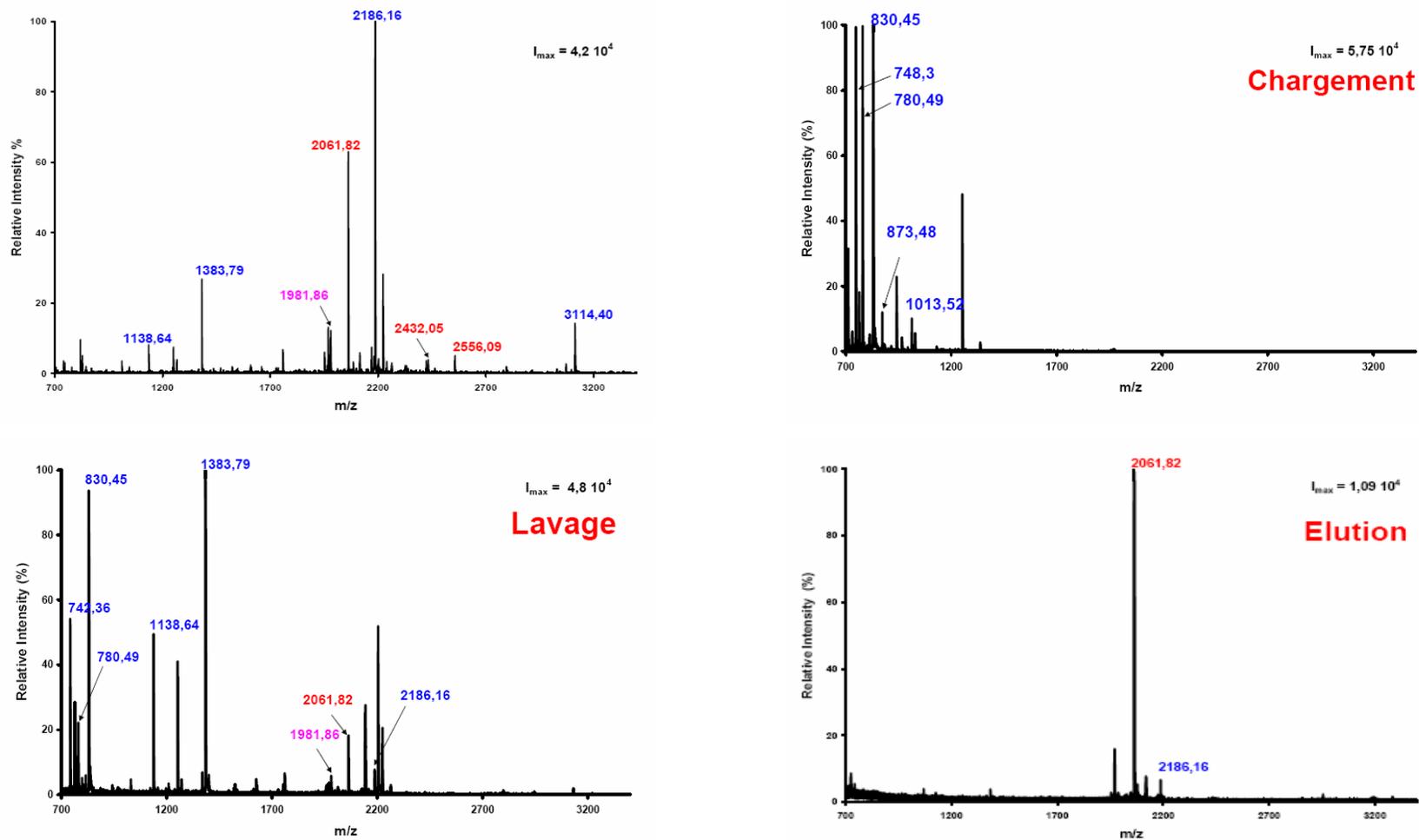


Figure 4.20 : Spectres de masse MALDI-TOF enregistrés à partir des différentes étapes du test de rétention spécifique du digest de bêta caséine sur une colonne monolithique à base de nanoparticules du Nickel activé.

3. Conclusion

Nous avons développé des colonnes monolithiques à base de nanoparticules d'oxydes métalliques dans des capillaires en silice fondue. Différents types de nanoparticules sont testés. Le premier type de nanoparticules est celui d'un oxyde d'un seul métal, le dioxyde de zirconium. Les tests effectués avec ces nanoparticules ont montré qu'elles ont une très grande affinité pour les phosphopeptides, ces derniers n'ont pas pu être élués. Les colonnes monolithiques à base ZrO_2 ont été traitées ensuite avec une solution de K_2HPO_4 afin d'éliminer les sites de rétention irréversibles, ceci n'a pas beaucoup changé la situation, les phosphopeptides ne sortent pas de la colonne lors de l'étape d'éluion.

Le deuxième type de nanoparticules est un oxyde de deux métaux, le dioxyde de Nickel Cobalt. La préparation d'un mélange réactionnel homogène contenant ces nanoparticules est un peu délicate. Les résultats obtenus avec ces nanoparticules sont excellents, deux des quatre phosphopeptides du digest de bêta caséine sont retenus spécifiquement pendant le chargement et sont ensuite élués pendant l'éluion.

Le troisième type de nanoparticules n'est pas sous forme d'oxyde. C'est une poudre métallique activée. Les nanoparticules du Nickel activé ressemblent beaucoup au dioxyde du Nickel Cobalt sauf qu'elles sont moins performantes. Leur capacité de chargement est faible par rapport aux dioxydes.

Notons que le support monolithique utilisé pour ces colonnes est à base du méthacrylate de lauryl, le montage de ces colonnes sur une nanoLC en ligne avec un spectromètre de masse (le Qstar par exemple), permettra de réaliser, en une seule étape, la séparation et l'analyse des peptides phosphorylés et non phosphorylés.

Partie II :

*Supports monolithiques pour la
chromatographie d'affinité de
Borates (BAC)*

I. INTRODUCTION

Après avoir développé deux techniques permettant l'enrichissement des phosphopeptides, basées sur les supports monolithiques, nous avons réalisé un dispositif chromatographique dédié à l'enrichissement des composés glycosylés. Ce dispositif est à base de matériaux monolithiques. Le principe de fonctionnement repose sur les interactions réversibles développées entre l'acide boronique et les diols.

II. DEVELOPPEMENT DE COLONNES MONOLITHIQUES A BASE VPBA

Les colonnes monolithiques dédiées à la séparation des molécules glycosylées sont préparées à base de l'acide 4-vinyle phényle boronique (VPBA). Ce monomère est introduit dans un mélange réactionnel contenant des monomères méthacryliques qui vont former le support monolithique. Nous avons choisi un couple de monomères fonctionnel/réticulant dont nous maîtrisons la polymérisation et l'ajustement des propriétés hydrodynamiques de la structure poreuse. Cependant, la quantité de VPBA utilisée ne peut dépasser un seuil au-delà duquel le contrôle des propriétés du monolithe résultant n'est plus possible.

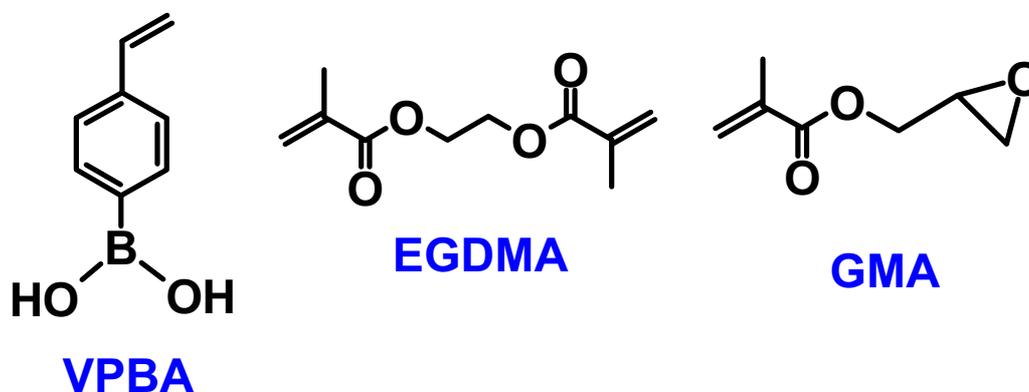


Figure 4.21 : Structures chimiques des monomères utilisés pour la préparation des colonnes monolithiques à base de l'acide phényle vinyle boronique (VPBA).

1. Préparation de colonnes monolithiques à base de VPBA

Les colonnes monolithiques sont préparées dans des capillaires transparents aux irradiations UV, dont les parois internes sont prétraitées. La longueur des colonnes est de 15 cm, tandis que le diamètre interne est de 75 μm . Le mélange réactionnel est composé de monomère fonctionnel, le méthacrylate de glycidyle GMA, d'un monomère réticulant, le EGDMA, d'un porogène binaire responsable de la formation et de l'ajustement des propriétés de la structure

poreuse et d'un photoamorceur, le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN). A ceci est ajouté une quantité de VPBA entre 7 et 10 % en masse par rapport aux monomères.

Tableau 4.6 : Mélange réactionnel utilisé pour la préparation des colonnes monolithiques à base d'acide phényle vinyle boronique (VPBA).

Monomères (% vol)	Porogène (% vol)	% massique du VPBA	Amorceur
GMA/EGDMA 75/25	Dodécanol/cyclohexanol 92/8	7-10	AIBN 1% mt

Le protocole de polymérisation est décrit d'une manière détaillée dans le chapitre 2. La durée de polymérisation est de 1 heure 30 minutes à 2 heures. Après polymérisation, les colonnes sont lavées abondamment et séchées à l'étuve durant une nuit.

2. Etudes des colonnes monolithiques à base de VPBA

Les colonnes monolithiques à base de l'acide 4-vinyle phényle boronique dédiées à la rétention spécifique des molécules glycosylées ont été testées avec deux composés naturels, la rutine et le Lewis b.

Protocole du test

Le protocole du test est composé de trois étapes :

- Chargement : durant lequel une faible quantité, environ 5 nmol, de la molécule glycosylée est injectée à travers la colonne à une vitesse ne dépassant pas les 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$.
- Lavage : la colonne monolithique est lavée abondamment afin d'évacuer les molécules qui ne sont pas retenues d'une manière spécifique ainsi que les impuretés.
- Elution : le éluion des molécules retenues spécifiquement sur la colonne est réalisé à l'aide d'une solution basique à base de la pipéridine. Dans certains cas, les composés sont tellement retenus que cette solution ne permet pas les éluer. Nous utilisons donc une solution d'acide fort à base de l'acide acétique dans le THF.

2.1. Test sur la rutine

La rutine est une substance naturelle présente dans de nombreux végétaux. Elle fait partie des polyphénols naturels Figure 4.22. Elle est utilisée dans certains médicaments pour ses

propriétés anti-inflammatoires et sa capacité de renforcer la résistance de la paroi des petits vaisseaux.

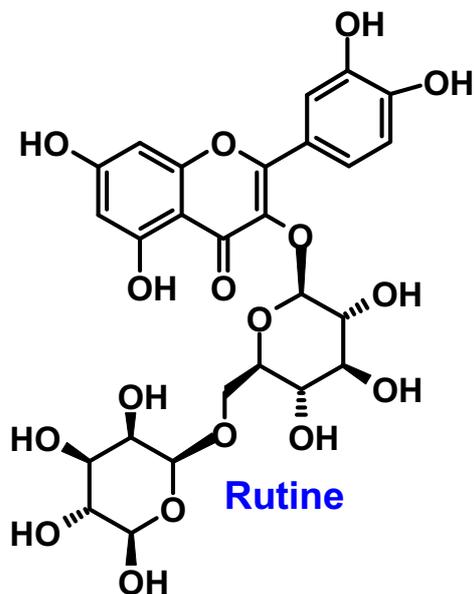


Figure 4.22 : Structure chimique de la Rutine

La Figure 4.23 représente les spectres de masse MALDI-TOF correspondants aux différentes étapes du test de l'enrichissement de la rutine. Dans le spectre de masse de la solution originale, le pic majoritaire correspond à l'espèce $(M+Na)^+$, qui est du à un adduit de sodium sur la rutine. L'absence de ce pic dans le spectre de masse du chargement montre que la rutine est bien retenue sur la colonne. Le spectre de masse du lavage contient quelques pics de faible intensité dus aux impuretés contenus dans le produit de départ.

Dans la dernière étape, la rutine est complètement éluée de la colonne. Le spectre de masse de l'éluion contient un pic majoritaire de l'espèce $(M+Na)^+$ qui correspond à la rutine avec un adduit de sodium.

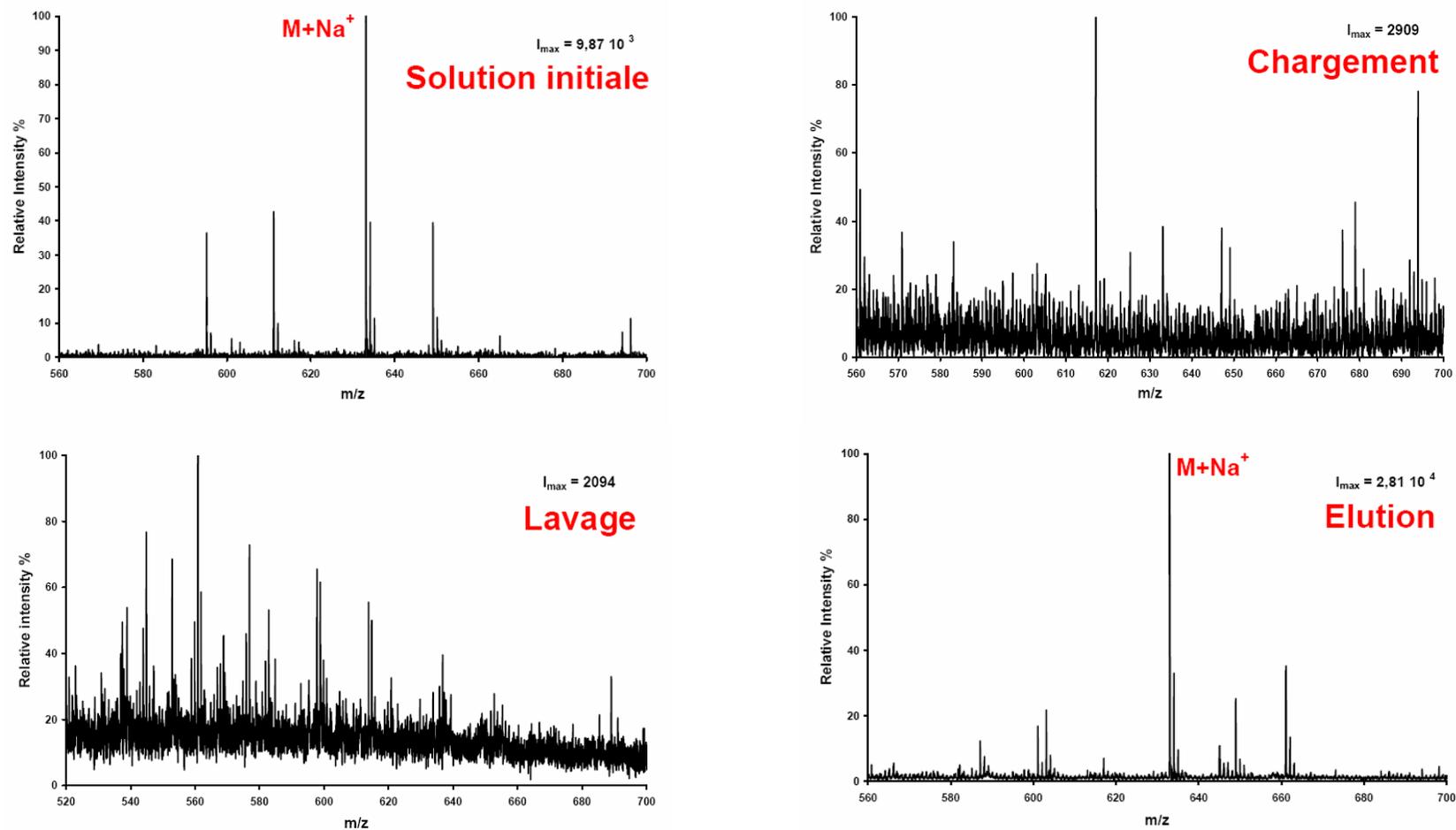


Figure 4.23 : Spectres de masse MALDI-TOF enregistrés à partir des différentes étapes du test de rétention spécifique de la Rutine sur une colonne monolithique à base de VPBA.

Une simple comparaison entre le spectre issu de la solution originale est celui issu de la solution d'élution montre, d'une part, que la rutine a été purifiée, le spectre de l'élution contient moins de pics d'impuretés avec des intensités faibles par rapport au spectre de la solution de départ et d'autre part, l'intensité du pic de l'espèce $(M+Na)^+$ dans le spectre de l'élution est plus grande que celle observée dans le pic de la solution originale. En plus de la fonction principale des colonnes monolithiques, l'enrichissement des composés glycosylés, ces colonnes possèdent un pouvoir intéressant de purification et concentration.

2.2. Test sur le Lewis B

Le Lewis b est un déterminant du groupe sanguin humain, c'est un tetrasaccharide de masse moyenne de 675,63 g/mol. Sa formule est la suivante : α -Fuc(1 \rightarrow 2)- β -Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -Fuc(1 \rightarrow 4)]-GlcNAc, Figure 4.24.

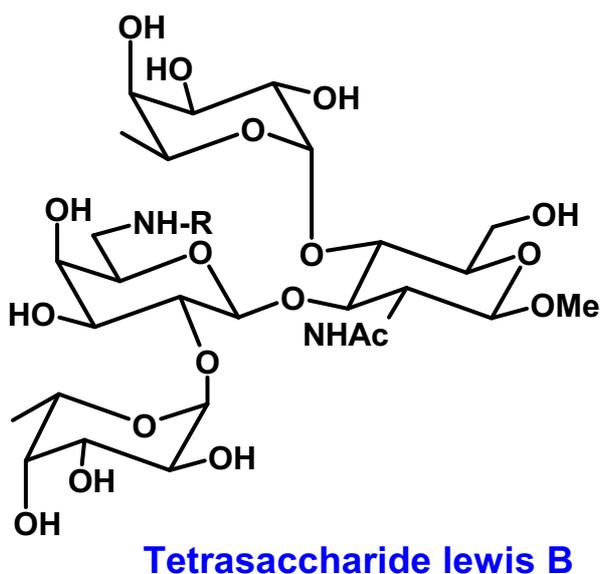


Figure 4.24 : Structure chimique du tetrasaccharide Lewis b.

Le spectre de masse de la solution initiale du tetrasaccharide Lewis b dans le méthanol contient un pic majoritaire avec une intensité relative maximale qui correspond à l'espèce $(M+Na)^+$. Les spectres de masse MALDI-TOF issus des différentes étapes du test de l'enrichissement du tetrasaccharide Lewis b sont représentés dans la Figure 4.25. L'absence du pic qui correspond à l'espèce $(M+Na)^+$ dans le spectre de masse MALDI-TOF de chargement et dans celui du lavage, montre que la molécule est retenue sur le support.

La molécule est éluée de la colonne en utilisant une solution basique à base de la pipéridine.

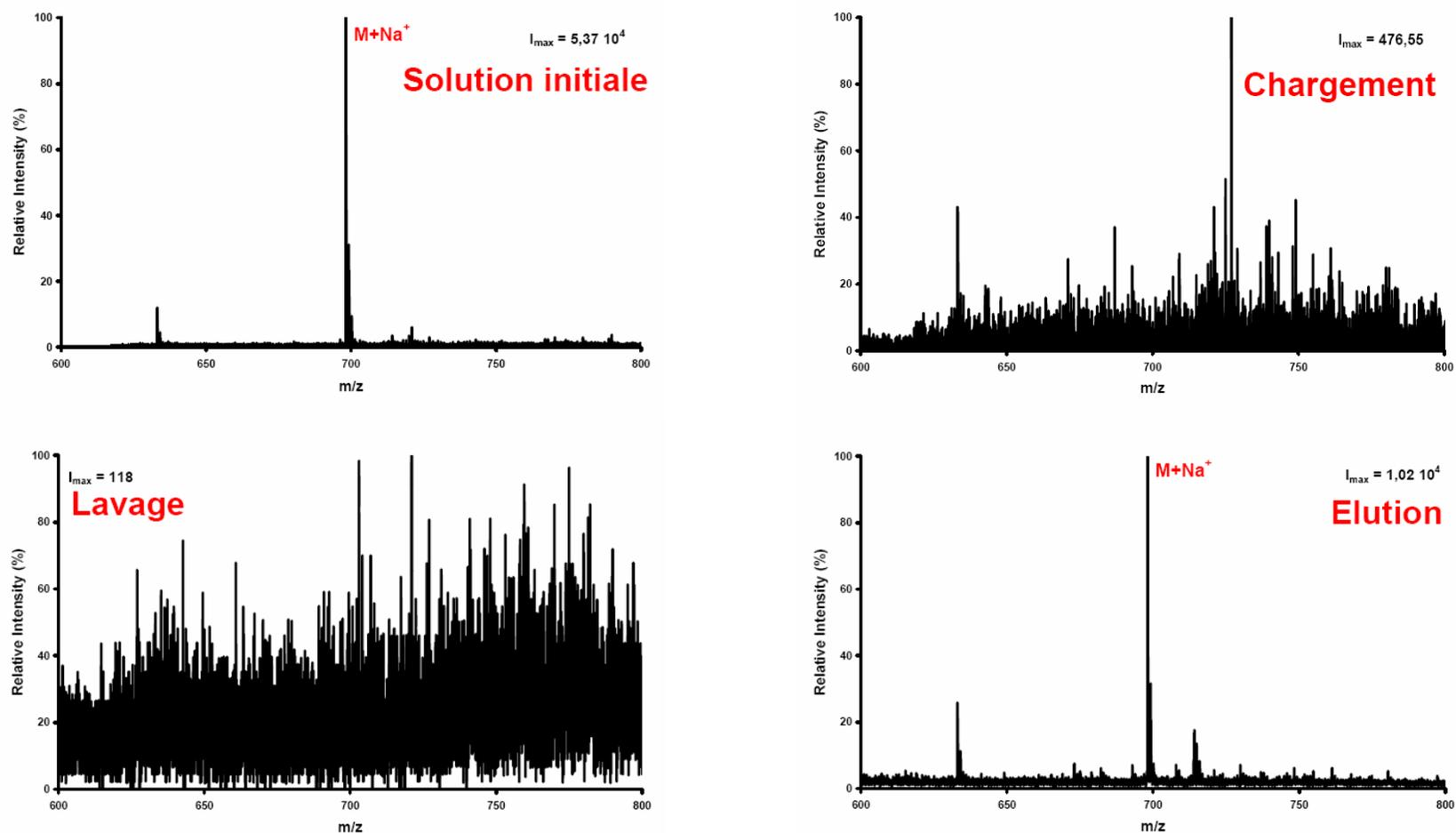


Figure 4.25 : Spectres de masse MALDI-TOF enregistrés à partir des différentes étapes du test de rétention spécifique du déterminant du groupe de sang humain Lewis-b sur une colonne monolithique à base de VPBA.

3. Conclusion

Dans cette partie nous avons mis en œuvre une technique pour l'enrichissement des composés glycosylés à base de l'acide 4-vinyle phényle boronique (VPBA) incorporé dans un support monolithique à base de méthacrylate de Glycidyle.

Les supports monolithiques sont préparés par polymérisation radicalaire initiée par voie photochimique dans des capillaires transparents aux irradiations UV de 15 cm de longueur.

La rétention spécifique et l'élution en fin du test, de ces composés glycosylés sont vérifiées à l'aide de deux substances naturelles. La première est la rutine, substance naturelle présente dans de nombreux végétaux, possédant des propriétés anti-inflammatoires. Le deuxième composé est le Lewis B, déterminant du groupe sanguin humain sous forme de tetrasaccharide de masse moyenne de 675,63 g/mol.

Références bibliographiques

- [1] Sickmann, Albert; Meyer, Helmut E. Phosphoamino acid analysis. *Proteomics* **2001**, *1*, 200-206.
- [2] Hemmings, Jr., H. C. *protein Kinases and Phosphatases Inhibitors. Vol. 30*, Humana Press, 1996.
- [3] Chalmers, Michael J.; Kolch, Walter; Emmett, Mark R.; Marshall, Alan G.; Mischak, Harald. Identification and analysis of phosphopeptides. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2004**, *803*, 111-120.
- [4] Mann, Matthias; Ong, Shao-En; Gronborg, Mads; Steen, Hanno; Jensen, Ole N.; Pandey, Akhilesh. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends in Biotechnology* **2002**, *20*, 261-268.
- [5] Porath, Jerker; Carlsson, Jan; Olsson, Ingmar; Belfrage, Greta. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature (London, United Kingdom)* **1975**, *258*, 598-599.
- [6] Kweon, Hye Kyong; Hkansson, Kristina. Selective Zirconium Dioxide-Based Enrichment of Phosphorylated Peptides for Mass Spectrometric Analysis. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 1743-1749.
- [7] Dubrovskaya, Anna; Souchelnytskyi, Serhiy. Efficient enrichment of intact phosphorylated proteins by modified immobilized metal-affinity chromatography. *Proteomics* **2005**, *5*, 4678-4683.
- [8] Guerrera, Ida Chiara; Predic-Atkinson, Jelena; Kleiner, Oliver; Soskic, Vukic; Godovac-Zimmermann, Jasminka. Enrichment of Phosphoproteins for Proteomic Analysis Using Immobilized Fe(III)-Affinity Adsorption Chromatography. *Journal of Proteome Research* **2005**, *4*, 1545-1553.
- [9] Kokubu, Makiko; Ishihama, Yasushi; Sato, Toshitaka; Nagasu, Takeshi; Oda, Yoshiya. Specificity of Immobilized Metal Affinity-Based IMAC/C18 Tip Enrichment of Phosphopeptides for Protein Phosphorylation Analysis. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 5144-5154.
- [10] Feuerstein, Isabel; Morandell, Sandra; Stecher, Guenther; Huck, Christian W.; Stasyk, Taras; Huang, Hong-Lei; Teis, David; Huber, Lukas A.; Bonn, Guenther K. Phosphoproteomic analysis using immobilized metal ion affinity chromatography on the basis of cellulose powder. *Proteomics* **2005**, *5*, 46-54.
- [11] Jin, Wen-Hai; Dai, Jie; Zhou, Hu; Xia, Qi-Chang; Zou, Han-Fa; Rong, Zeng. Phosphoproteome analysis of mouse liver using immobilized metal affinity purification and linear ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 2169-2176.
- [12] Lee, Yong-Moon; Venkataraman, Krishnan; Hwang, Sun-Il; Han, David K.; Hla, Timothy. A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **2007**, *84*, 154-162.

- [13] Feng, Shun; Ye, Mingliang; Zhou, Houjiang; Jiang, Xiaogang; Jiang, Xingning; Zou, Hanfa; Gong, Bolin. Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis. *Molecular and Cellular Proteomics* **2007**, *6*, 1656-1665.
- [14] Martins, Sonia; Andrade, Jorge; Karmali, Amin; Serralheiro, Maria Luisa. Screening of suitable immobilized metal chelates for adsorption of monoclonal antibodies against mutant amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Molecular Recognition* **2006**, *19*, 340-347.
- [15] Posewitz, Matthew C.; Tempst, Paul. Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 2883-2892.
- [16] Seeley, Erin H.; Riggs, Larry D.; Regnier, Fred E. Reduction of non-specific binding in Ga(III) immobilized metal affinity chromatography for phosphopeptides by using endoproteinase glu-C as the digestive enzyme. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2005**, *817*, 81-88.
- [17] Sykora, Corinna; Hoffmann, Ralf; Hoffmann, Peter. Enrichment of multiphosphorylated peptides by immobilized metal affinity chromatography using Ga(III)- and Fe(III)-complexes. *Protein & Peptide Letters* **2007**, *14*, 489-496.
- [18] Prikryl, Petr; Horak, Daniel; Ticha, Marie; Kucerova, Zdenka. Magnetic IDA-modified hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for IMAC protein separation. *Journal of Separation Science* **2006**, *29*, 2541-2549.
- [19] Feng, Shun; Pan, Chensong; Jiang, Xiaogang; Xu, Songyu; Zhou, Houjiang; Ye, Mingliang; Zou, Hanfa. Fe³⁺ immobilized metal affinity chromatography with silica monolithic capillary column for phosphoproteome analysis. *Proteomics* **2007**, *7*, 351-360.
- [20] Brill, Laurence M.; Salomon, Arthur R.; Ficarro, Scott B.; Mukherji, Mridul; Stettler-Gill, Michelle; Peters, Eric C. Robust Phosphoproteomic Profiling of Tyrosine Phosphorylation Sites from Human T Cells Using Immobilized Metal Affinity Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 2763-2772.
- [21] Wang, Jinglan; Zhang, Yangjun; Jiang, Hong; Cai, Yun; Qian, Xiaohong. Phosphopeptide detection using automated online IMAC-capillary LC-ESI-MS/MS. *Proteomics* **2006**, *6*, 404-411.
- [22] Yang, Xiaofeng; Wu, Huaping; Kobayashi, Tomoyoshi; Solaro, R. John; van Breemen, Richard B. Enhanced ionization of phosphorylated peptides during MALDI TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 1532-1536.
- [23] Gaucheron, F.; Molle, D.; Leonil, J.; Maubois, J. L. Selective determination of phosphopeptide b-CN(1-25) in a b-casein digest by adding iron: characterization by liquid chromatography with online electrospray-ionization mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Applications* **1995**, *664*, 193-200.
- [24] Bouhallab, S.; Oukhatar, N. A.; Molle, D.; Henry, G.; Maubois, J. L.; Arhan, P.; Bougle, D. L. Sensitivity of b-casein phosphopeptide-iron complex to digestive enzymes in ligated segment of rat duodenum. *Journal of Nutritional Biochemistry* **1999**, *10*, 723-727.

Chapitre IV : Supports monolithiques pour la chromatographie d'affinité

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

[25] Zhou, Huilin; Watts, Julian D.; Aebersold, Ruedi. A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 375-378.

[26] Oda, Yoshiya; Nagasu, Takeshi; Chait, Brian T. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 379-382.

[27] Reinders, Joerg; Sickmann, Albert. State-of-the-art in phosphoproteomics. *Proteomics* **2005**, *5*, 4052-4061.

Conclusion générale

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé de nouvelles phases stationnaires monolithiques à base de méthacrylate pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique.

La première partie du travail s'est déroulée dans le cadre du projet *BioChipLab*, nous avons développé deux types différents de supports monolithiques à base de méthacrylate. Des supports monolithiques à base de monomères réactifs pour des microréacteurs de digestion enzymatique et des supports monolithiques à base de monomères hydrophobes pour la séparation et la purification des échantillons avant leur analyse en spectrométrie de masse. Dans la deuxième partie du travail, nous avons optimisé les supports chromatographiques et nous avons développé de nouveaux supports pour la chromatographie d'affinité dédiés à la rétention spécifique des molécules biologiques phosphorylées et glycosylées.

Microréacteur de digestion enzymatique

Dans un premier temps nous avons préparé un support monolithique à base de monomère fonctionnel réactif, le méthacrylate de glycidyl pour le développement d'un microréacteur de digestion enzymatique. La trypsine est immobilisée de manière covalente en une seule étape dans des conditions douces. L'efficacité du microréacteur est démontrée lors de la digestion d'un certain nombre de protéines standard de masse différentes allant de 11,7 kD à 69 kD. Le temps de la digestion est extrêmement court par rapport à celui observé lors d'une digestion en solution. Cependant, la présence d'adduits salins sur les fragments peptidiques est observée lors des analyses MALDI-TOF. Nous avons introduit une étape de dessalage avec des supports commerciaux ZipTip® avant l'analyse par spectrométrie de masse.

Nous avons pu augmenté l'efficacité de la digestion en introduisant une étape de dénaturation. Cette dernière est effectuée selon un protocole classique avant d'introduire les protéines dans le microréacteur. Enfin, nous avons intégré un module de dessalage en amont du microréacteur sur la même colonne. Ce module est basé sur un support monolithique à base de méthacrylate de lauryl, monomère hydrophobe. L'intégration d'un module monolithique de dessalage permet d'une part de valoriser les supports monolithiques "home made" et de diminuer les charges étant donné que les supports monolithiques sont moins chers que leur analogues commerciaux, et d'autre part elle permet d'améliorer les conditions d'analyse sans manipuler de plus l'échantillon ce qui est considéré comme un pas vers l'automatisation du procédé.

Conclusion générale

Développement de nouvelles phases stationnaires monolithiques pour la nano-chromatographie et l'analyse protéomique

Supports monolithiques pour la nano-LC phase inverse

Le développement de supports monolithiques hydrophobes pour le traitement des échantillons protéomiques, réalisé en trois étapes, a conduit à la préparation d'une phase monolithique très performante à base de méthacrylate de lauryl.

Deux caractéristiques importantes des matériaux monolithiques ont été dévoilées au cours de cette étude. L'hétérogénéité et le gonflement de ces supports. L'étude morphologique par Microscopie Electronique à Balayage a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité des matériaux monolithiques, cette dernière est due à la présence d'une distribution de la densité de réticulation. D'autre part, l'étude de l'allure de la courbe représentant la perte de charge au cours d'une réaction de séparation à montrer que le support monolithique est gonflé avec l'acétonitrile malgré qu'il est réticulé à 35 %.

D'abord, nous avons réalisé une étude comparative entre des supports monolithiques préparés à base de monomères méthacrylates hydrophobes qui diffèrent par la longueur de leurs chaînes aliphatiques. Les monomères utilisés comportent 1, 4, 12 et 18 carbones dans leur chaîne aliphatique. Dans un premier temps, nous avons mesuré la perte de charge, ΔP des colonnes monolithiques lors d'une expérience de séparation. Ensuite, nous avons calculé la perméabilité B_0 et le diamètre moyen des pores d_p . Étant donné que ces paramètres seuls ne permettent pas de faire une comparaison qualitative entre les différentes colonnes étudiées. C'est pourquoi nous avons étudié le pouvoir de séparation et nous avons calculé les grandeurs de rétention de chaque colonne lors d'un test de séparation de deux molécules de structures chimiques très proches. Les résultats du test ont montré que la colonne monolithique obtenue à partir de la phase C12 reste la plus performante, étant donné que le temps de séparation est plus court par rapport à celui observé avec les autres colonnes et que son efficacité est beaucoup plus grande.

Ensuite, nous avons optimisé les colonnes monolithiques obtenues à partir de la phase C12 en étudiant l'influence de la technique de polymérisation ainsi que le débit de la phase mobile à travers les colonnes. L'allure de la courbe de Van Deemter est pratiquement linéaire à grand débit de la phase mobile, cela signifie que la colonne monolithique reste très efficace même à haut débit de la phase mobile.

Enfin, nous avons traité un échantillon protéomique très complexe, le plasma sanguin humain. Après la séparation du digest trypsique sur la colonne monolithique C12 et son analyse par

spectrométrie de masse FT-ICR nous avons pu identifier la totalité des protéines classique du plasma humain ainsi que la première protéine de la fuite tissulaire.

Chromatographie d'affinité

Dans cette partie de travail, l'objectif est de développer de nouveaux supports monolithiques dédiés à l'étude de certaines modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation, ainsi que l'enrichissement des molécules glycosylées.

Rétention spécifique des phosphopeptides

La rétention spécifique des peptides phosphorylés est réalisée selon deux approches. Dans la première, nous avons développé des supports monolithiques IMAC. Tandis que dans la deuxième nous avons préparé de nouvelles phases monolithiques basées sur des nanoparticules d'oxydes métalliques. Les deux approches ont montré leur efficacité vis-à-vis la rétention sélective des phosphopeptides. Après validation des colonnes monolithiques avec une molécule modèle, nous avons réalisé des tests avec le digest de bêta caséine, une protéine qui contient cinq phosphorylations. Les résultats des tests sont excellents, étant donné qu'après leur chargement sur les colonnes monolithiques, les peptides phosphorylés issus du digest de la protéine sont retenus de manière spécifique sur le support monolithique.

Rétention spécifique des molécules glycosylées

L'enrichissement des molécules glycosylées est effectué sur des supports monolithiques à base de méthacrylate de Glycidyle avec une petite quantité de l'acide 4-vinyle phényle boronique (VPBA). Les interactions que développent ce dernier avec les diols permettent de retenir spécifiquement les molécules comportant ce genre de fonction, notamment les molécules glycosylées. Les tests que nous avons réalisés sur deux molécules biologiques glycosylées, la rutine et le Lewis b ont révélé la grande efficacité de ces supports. La rétention et l'élution de molécules glycosylées sont très spécifiques et l'intensité des espèces éluées est maximale.

Résumé

Le séquençage du génome de nombreux organismes, en particulier le génome humain, n'a pas bien élucidé les mécanismes qui relient les gènes aux fonctions biologiques et aux divers états pathologiques. Par conséquent, une nouvelle approche en science et en médecine - baptisée analyse protéomique - est émergée pour mieux comprendre la complexité cellulaire, pour la découverte de nouveaux marqueurs des pathologies humaines et pour le développement de nouveaux médicaments.

Dans ce contexte général, l'objectif de ce travail de thèse est de développer de nouveaux dispositifs et supports chromatographiques miniatures, pour la préparation et la séparation des échantillons protéomiques. De plus, nous nous sommes intéressés au développement de nouveaux supports pour l'enrichissement de peptides issus de modifications posttraductionnelles, notamment la phosphorylation. Le caractère de ce travail de thèse est pluridisciplinaire. Il allie la chimie des polymères (synthèse de supports monolithiques via polymérisation radicalaire et polymérisation vivante contrôlée), la chimie analytique basée sur la microfluidique et l'analyse protéomique.

La première partie du travail s'est déroulée dans le cadre du projet *BioChipLab*, nous avons développé deux types différents de supports monolithiques à base de méthacrylate. Des supports monolithiques à base de monomères réactifs pour des microréacteurs de digestion enzymatique et des supports monolithiques à base de monomères hydrophobes pour la séparation et la purification des échantillons avant leur analyse en spectrométrie de masse. Dans la deuxième partie du travail, nous avons optimisé les supports chromatographiques et nous avons développé de nouveaux supports pour la chromatographie d'affinité dédiés à la rétention spécifique des molécules biologiques phosphorylées et glycosylées.