



HAL
open science

Les différentes méthodes d'analyse quantitative des protéines dans le domaine pharmaceutique : description, comparaison et nouvelles perspectives

Maud Fumex

► **To cite this version:**

Maud Fumex. Les différentes méthodes d'analyse quantitative des protéines dans le domaine pharmaceutique : description, comparaison et nouvelles perspectives. Sciences pharmaceutiques. 2019. hal-03297917

HAL Id: hal-03297917

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297917v1>

Submitted on 23 Jul 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2019

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

Le mardi 25 juin 2019, sur un sujet dédié à :

**Les différentes méthodes d'analyse quantitative des protéines dans le domaine
pharmaceutique : description, comparaison et nouvelles perspectives**

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Maud Fumex

née le 2 mars 1990

Membres du Jury

Président :	M. Igor CLAROT	Professeur de chimie analytique à la Faculté de Pharmacie de Nancy
Directeur :	M. Olivier HEUDI	Chef du laboratoire DMPK/Bioanalytics, Novartis Institute for Biomedical Research, Bâle, Suisse
Juges :	M. Jean-Louis MERLIN	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Unité de Biologie des Tumeurs, Institut de Cancérologie de Lorraine, Faculté de Pharmacie de Nancy
	Mme Isabelle PETRY	Pharmacien biologiste, Laboratoire d'analyses de biologie médicale Biomer, Lunéville

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2018-2019

DOYEN

Raphaël DUVAL

Vice-Doyen

Julien PERRIN

Directrice des études

Marie SOCHA

Conseil de la Pédagogie

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Présidente, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Présidente, Caroline GAUCHER

Chargés de Mission

Innovation pédagogique

Alexandrine LAMBERT

Référente ADE

Virginie PICHON

Référent dotation sur projet (DSP)

Marie-Paule SAUDER

Responsabilités

Filière Officine

Caroline PERRIN-SARRADO

Filière Industrie

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Filière Hôpital

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Pharma Plus ENSIC

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Pharma Plus ENSAIA

Xavier BELLANGER

Pharma Plus ENSGSI

Igor CLAROT

Cellule de Formation Continue et Individuelle

Luc FERRARI

Commission d'agrément des maîtres de stage

François DUPUIS

ERASMUS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Francine PAULUS

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Pierre LEROY

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Claude BLOCK

Pierre DIXNEUF

Chantal FINANCE

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

François BONNEAUX

Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Vincent LOPPINET
Alain NICOLAS
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Francine PAULUS
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

Section CNU

*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie, Biologie cellulaire
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
-----------------	----	---------------------------------

Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Loïc REPPPEL	82	<i>Biothérapie</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine CAPIZZI BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT ^H	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN ^H	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER ^H	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA ^H	86	<i>Physiologie</i>
Joël COULON ^H	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Florence DUMARCAY ^H	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS ^H	86	<i>Pharmacologie</i>
Reine EL OMAR	86	<i>Physiologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER ^H	86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD ^H	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT ^H	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>

ENSEIGNANTS (suite)

Section CNU

*

Discipline d'enseignement

Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Julie LEONHARD	86/01	<i>Droit en Santé</i>
Christophe MERLIN ^H	87	<i>Microbiologie environnementale</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Arnaud PALLOTTA	86	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Marianne PARENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Sophie PINEL ^H	85	<i>Informatique en Santé (e-santé)</i>
Anne SAPIN-MINET ^H	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Guillaume SAUTREY	85	<i>Chimie analytique</i>
Rosella SPINA	86	<i>Pharmacognosie</i>
Sabrina TOUCHET	86	<i>Pharmacochimie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT ^H	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIYOU ^H	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>

PROFESSEUR ASSOCIE

Julien GRAVOULET 86 *Pharmacie clinique*

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD 11 *Anglais*

^H *Maître de conférences titulaire HDR*

* *Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens

De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR ».

Remerciements

A Mr Olivier Heudi pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse et pour son implication et son aide dans la rédaction de ce manuscrit.

A Mr Igor Clarot pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury et de co-diriger cette thèse.

A Mme Isabelle Petry et à Mr Jean-Louis Merlin pour avoir accepté de juger mes travaux.

A Mr Alain Beck pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire durant mon stage de M2, et pour m'avoir orienté dans les débuts de la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier mes camarades de la faculté de pharmacie, avec qui j'ai passé de belles années. Un merci tout particulier à toi ma Ju' pour tous les souvenirs que nous avons créés ensemble depuis notre deuxième année. Et à toi Aurélie pour cette belle amitié qui s'est construite tout au long de nos expériences communes.

Un grand merci à toutes les personnes que j'ai rencontré durant mes études et qui m'ont apporté leur aide et leur amitié. A mes amis rencontrés durant mon expérience Erasmus, mon stage à Lille, mon Master parisien, mon stage à Saint-Julien et mon doctorat. Merci également à toutes les personnes qui m'ont encadré pendant mes diverses expériences professionnelles. Chacune d'entre elle a contribué à la rédaction de ce manuscrit, qui représente un condensé de toutes les techniques que j'ai apprises ces dernières années.

Un très grand merci à ma famille pour son soutien durant mes études de pharmacie. Merci à mes oncles et tantes lorrains pour leurs invitations régulières. Merci à mon parrain David pour n'avoir jamais manqué une occasion de me soutenir.

Un immense merci à mes parents, pour leur inébranlable soutien et leur patience, ainsi que pour les corrections qu'ils ont apporté à mon manuscrit.

Merci à toi Marie pour le modèle que tu représentes, par ta ténacité et ton courage.

Merci à toi Clara pour ta jovialité, ton énergie et ton écoute.

Anthony, je n'aurais pu espérer terminer mes études sur une fin plus heureuse. Un grand merci à toi pour ton soutien et ta présence ces derniers mois.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES ILLUSTRATIONS	3
LISTE DES TABLEAUX.....	4
ABREVIATIONS ET ACRONYMES.....	5
INTRODUCTION GENERALE.....	11
CHAPITRE I. LA PROTEOMIQUE : DEFINITION ET ENJEUX	13
1.1 Les biomarqueurs protéiques	13
1.2 Les protéines issues des biotechnologies	15
1.2.1 Les biotechnologies en quelques chiffres	15
1.2.2 Le cycle du biomédicament	17
1.2.3 La production de biomédicaments	18
1.2.4 Les anticorps monoclonaux et dérivés : un exemple de protéines thérapeutiques hautement complexes	19
1.2.4.1 Les anticorps monoclonaux : caractéristiques et défis analytiques	19
1.2.4.2 Les immuno-conjugués : un dérivé d'Acm en plein essor	22
1.3 Conclusions	24
CHAPITRE II. METHODES NON SPECIFIQUES POUR LA QUANTIFICATION DES PROTEINES.....	27
2.1 Mesure de protéines totales : méthodes colorimétriques et spectrophotométriques	27
2.1.1 Méthode du biuret	27
2.1.2 Méthode de Lowry	28
2.1.3 Méthode de Bradford	29
2.1.4 Dosage par l'acide bicinchoninique (BCA)	30
2.1.5 Méthode de Kjeldahl	31
2.1.6 Dosage par spectrophotométrie UV.....	32
2.1.7 Analyse en acides aminés.....	33
2.2 Mesures semi-quantitatives des protéines	34
2.2.1 Les méthodes séparatives.....	34
2.2.1.1 Electrophorèse sur gel	34
2.2.1.2 Western blot	35
2.2.1.3 Electrophorèse capillaire.....	36
2.2.1.4 Chromatographie en phase liquide par détection UV.....	37
2.2.2 Quantification relative par spectrométrie de masse	38
2.2.2.1 Préparation des échantillons	39
2.2.2.2 Systèmes d'introduction	41
2.2.2.3 Introduction à la spectrométrie de masse	42
2.2.2.3.1 Généralités.....	42
2.2.2.3.2 Sources d'ionisation les plus courantes.....	43

2.2.2.3.3	Les analyseurs et leurs modes d'acquisition	46
2.2.2.3.3.1	Analyseurs les plus couramment rencontrés.....	46
2.2.2.3.3.2	Spectromètres de masse en tandem.....	49
2.2.2.3.3.3	Comparaisons entre les différents types d'analyseurs.....	51
2.2.2.3.3.4	Les différents modes d'acquisition en MS.....	52
2.2.2.4	Les différentes stratégies de quantification semi-quantitative par MS	55
2.2.2.4.1	Quantification relative par marquage isotopique	55
2.2.2.4.1.1	Marquage métabolique	55
2.2.2.4.1.2	Marquage chimique ou enzymatique.....	57
2.2.2.4.2	Quantification relative sans marquage isotopique.....	60
2.2.2.4.2.1	Mesure de l'intensité du signal	61
2.2.2.4.2.2	Comptage du nombre de spectres (<i>spectral counting</i>).....	61
 CHAPITRE III. METHODES SPECIFIQUES POUR LA QUANTIFICATION DES		
PROTEINES.....		63
3.1 Les immuno-dosages.....		63
3.1.1	La technique ELISA	63
3.1.2	Les immuno-dosages multiplex	65
3.2 Quantification absolue par spectrométrie de masse : la dilution isotopique		69
3.2.1	Principe général	69
3.2.2	Les différents types d'étalons internes	71
3.2.2.1	Absolute QUAntification of proteins (AQUA).....	72
3.2.2.2	Concatémères de peptides marqués (QconCAT)	72
3.2.2.3	Protéines entières	73
3.2.2.3.1	Absolute SILAC	73
3.2.2.3.2	PSAQ	73
3.2.2.3.3	FLEXIQuant.....	74
3.2.2.3.4	Common Whole Antibody Internal Standard	75
3.2.2.3.5	SILuMAb.....	75
3.3 Les immuno-dosages couplés à la spectrométrie de masse.....		76
 CHAPITRE IV. COMPARAISON DES DIFFERENTES METHODES DE		
QUANTIFICATION		79
4.1 Comparaison des méthodes permettant la mesure des protéines totales		82
4.2 Comparaison des méthodes séparatives utilisées pour la quantification		82
4.3 Comparaison des méthodes de dosage spécifiques.....		83
4.3.1	Généralités	83
4.3.2	Exemple comparatif des méthodes ELISA et LC-MS/MS.....	84
4.3.3	Comparaison des méthodes de quantification relative et absolue par MS.	86
CONCLUSION GENERALE.....		91
BIBLIOGRAPHIE.....		95
RESUME :		112

Liste des illustrations

Figure 1. Nombre de créations d'entreprises de biotechnologies en France de 1954 à 2013, hors grands laboratoires pharmaceutiques.....	15
Figure 2. Principales aires thérapeutiques des biotechnologies de santé générant des produits.....	16
Figure 3. Classification pharmacologique des 173 biomédicaments commercialisés en France en 2014.	16
Figure 4. De l'idée au produit : genèse d'un médicament.....	17
Figure 5. Les différentes phases de production des protéines thérapeutiques et des anticorps monoclonaux.	19
Figure 6. Représentation schématique d'un anticorps monoclonal.	20
Figure 7. Schéma de l'Acm Trastuzumab représentant les principales modifications post-traductionnelles rencontrées et les différences de masse associées.....	21
Figure 8. Complexité des ADC.	23
Figure 9. Schéma de la réaction du biuret entre un ion cuivre (II) et les liaisons peptidiques des protéines à doser.	27
Figure 10. Loi de Beer-Lambert : définition de la relation entre l'absorbance et la concentration d'une solution.	28
Figure 11. Schéma de la réaction de la méthode de Lowry.....	29
Figure 12. Schéma de la réaction de la méthode de Bradford.	30
Figure 13. Schéma de la réaction du dosage par l'acide bicinchoninique. ...	31
Figure 14. Processus de quantification par spectrométrie de masse.	38
Figure 15. Les premières étapes du processus de quantification par spectrométrie de masse sont la préparation d'échantillon : enrichissement par extraction ou précipitation, puis digestion.	39
Figure 16. Exemple de quelques stratégies de préparation d'échantillons et de leur sensibilité de détection pour l'analyse de protéines dans le plasma ou le sérum.	39
Figure 17. Une étape de purification et de séparation des protéines digérées précède les analyses par MS.	41
Figure 18. La quantification est réalisée à partir d'analyses MS et MS/MS.	42
Figure 19. Structure générale d'un spectromètre de masse.	43
Figure 20. Représentation schématique de la source d'ionisation <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (MALDI).	44
Figure 21. Représentation schématique de la source <i>Electrospray Ionization</i> (ESI).	45
Figure 22. Principe de la formation du cône de Taylor.....	46
Figure 23. Structure schématique d'un analyseur de type Orbitrap.	47
Figure 24. Représentation schématique d'un analyseur quadripolaire.....	48
Figure 25. Représentation schématique d'un analyseur de type temps de vol.	48
Figure 26. Structure schématique d'un spectromètre de masse en tandem (MS/MS).	49
Figure 27. Les différents modes d'acquisition en protéomique quantitative.	54
Figure 28. Protocole de mise en application des stratégies de marquage SILAC (avec leucine) et ICAT.	56

Figure 29. Différences observées entre un peptide et son homologue marqué isotopiquement et utilisé comme étalon interne.	57
Figure 30. La stratégie iTRAQ.	59
Figure 31. Comparaison des principales méthodes de quantification relative par MS sans marquage isotopique.	60
Figure 32. Schémas des différents types de techniques ELISA.	64
Figure 33. Schémas des différents types d'analyses multiplexes : planaires ou en suspension.	65
Figure 34. Les cinq étapes de la détection d'analytes par le Bioplex®.	67
Figure 35. Processus général de validation d'une méthode de quantification absolue par spectrométrie de masse.	69
Figure 36. Les différentes stratégies de quantification absolue par dilution isotopique.	71
Figure 37. Représentation schématique de l'ImmunoSorbent Assay couplée à la MS (ISA-MS).	77
Figure 38. Représentation schématique d'un immuno-dosage couplé à la spectrométrie de masse, utilisant la stratégie des micro-colonnes de chromatographie d'affinité.	78
Figure 39. Profils de performances des méthodes de quantification des protéines par SRM/MS et par réaction anticorps-antigène.	83
Figure 40. Les différentes méthodes de quantification des protéines par spectrométrie de masse.	86
Figure 41. Comparaison des étalons internes sous forme de peptides AQUA, de concatémères QconCAT et de protéines entières PSAQ pour la quantification des toxines SEA et TSST-1 dans des échantillons d'urine. ...	88

Liste des tableaux

Tableau I. Les différents types de spectromètres de masse et leurs caractéristiques au regard de la quantification en protéomique.	51
Tableau II. Tableau comparatif des caractéristiques des différentes méthodes de quantification des protéines.	80

Abréviations et acronymes

A

AA	Acide Aminé
Ac	Anticorps
ACE	Electrophorèse capillaire d'affinité
Acm	Anticorps monoclonal
ADC	<i>Antibody Drug Conjugate</i>
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AQUA	<i>Absolute QUAntification of proteins</i>

B

BCA	Acide bicinchoninique
-----	-----------------------

C

CCP	Certificat Complémentaire de Protection
CDR	<i>Complementarity Determining Regions</i>
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> ou Electrophorèse Capillaire
CE-MS	Electrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse
CH	Domaine constant de la chaîne lourde
CHCA	Acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique
cICAT	<i>cleavable Isotope-Coded Affinity Tag</i>
CID	Collision Induite par Dissociation
cIEF	Focalisation isoélectrique capillaire
CL	Domaine constant de la chaîne légère
CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>

D

DAR	<i>Drug-to-Antibody Ratio</i>
2-DE	Electrophorèse à deux Dimensions
2D-LC	Chromatographie Liquide à deux Dimensions ⁴

DDA	<i>Data Dependent Acquisition</i>
DHB	<i>Acide 2,5-dihydroxybenzoïque</i>
DIA	<i>Data Independent Acquisition</i>
E	
ϵ	<i>Coefficient d'absorbance molaire</i>
EDTA	<i>Ethylènediaminetétraacétique</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
emPAI	<i>exponentially modified Protein Abundance Index</i>
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i>
F	
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLEXIQuant	<i>Full-Length EXpressed stable Isotope-labeled proteins for Quantification</i>
G	
Grb2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
H	
HABA	<i>Acide 2-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque</i>
HAP	<i>High Abundance Proteins</i>
HC	<i>Heavy Chain ou chaîne lourde</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
Hi	<i>Région Hinge</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR/AM	<i>High Resolution and Accurate Mass</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
I	
ICAT	<i>Isotope-Coded Affinity Tag</i>
Ig	<i>Immunoglobuline</i>

ISA-MS	<i>ImmunoSorbent Assay</i> couplée à la MS
iTRAQ	<i>isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation</i>
L	
LC	<i>Light Chain</i> ou chaîne légère
LC	<i>Liquid Chromatography</i> ou Chromatographie Liquide
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
LC-MS/MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en Tandem
LEEM	Les Entreprises du Médicament
LOD	Limite de Détection
LOQ	Limite de Quantification
M	
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MALDI-ToF	Source <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation</i> couplée à un temps de vol
MPT	Modification Post-Traductionnelle
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i> ou Spectrométrie de Masse
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> ou Spectrométrie de masse en tandem
MSI	<i>Mass Spectrometry Imaging</i> ou Imagerie par Spectrométrie de Masse
m/z	Rapport masse sur charge
N	
nanoLC	<i>nanoLiquid Chromatography</i>
n/a	non applicable
NHS	N-hydroxysuccinimide
NSAF	<i>Normalized Spectral Abundance Factor</i>
P	
PAI	<i>Protein Abundance Index</i>

PRM	<i>Parallel Reaction Monitoring</i>
PSAQ	<i>Protein Standard Absolute Quantification</i>
Q	
QconCAT	Concatémère de peptides marqués
QQQ	Triple quadripôle
Q-Orbitrap	Analyseur quadripolaire couplé à un Orbitrap
Q-ToF	Analyseur quadripolaire couplé à un temps de vol
Q-Trap	Analyseur quadripolaire couplé à un piège à ions
R	
R&D	Recherche & Développement
RP-HPLC	<i>Reverse Phase-High Performance/Pressure Liquid Chromatography</i>
S	
SDS	<i>Sodium DodecylSulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium DodecylSulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SELDI	<i>Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization</i>
SEA	<i>Staphylococcal Enterotoxin A</i>
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture</i>
SIL-IS	<i>Stable Isotope Labeled Internal Standard</i>
SILu TM Mab	<i>Stable-Isotope Labeled universal Monoclonal Antibody</i>
SIS	<i>Stable Isotope-labeled Standard peptides</i>
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
SWATH-MS	<i>Sequential Windowed data independent Acquisition of the Total High-resolution Mass Spectra</i>
T	
THAP	2,4,6-TriHydroxyAcétoPhénone
ToF	<i>Time of Flight</i> ou Temps de Vol
ToF/ToF	Temps de vol couplé à un temps de vol
TSST-1	<i>Toxic shock syndrome toxin-1</i>
U	

UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultra-Violet
V	
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VH	Domaine variable de la chaîne lourde
VL	Domaine variable de la chaîne légère
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
vp	particules virales
X	
XIC	<i>eXtracted Ion Chromatogram</i>
Z	
z/m	Rapport charge sur masse

Introduction générale

Ce manuscrit de thèse fait suite à mon stage de Master 2, réalisé au sein du Centre d'Immunologie Pierre Fabre. L'objectif était alors de développer une méthode de quantification d'un anticorps monoclonal (Acm) par de nouvelles approches par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Une première étude sur un Acm thérapeutique devait ensuite être transcrite pour le dosage d'une molécule dérivée : un Acm couplé à un cytotoxique (appelé immuno-conjugué). Ces travaux ont été largement inspirés d'une publication de 2014, dans laquelle un étalon interne appelé SILuTMMAB (pour *Stable-Isotope Labeled universal Monoclonal Antibody*) a été utilisé pour la quantification, elle-même effectuée à partir d'une chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) couplée à un spectromètre de masse de type triple quadripôle (Zhang *et al.*, 2014). Les résultats expérimentaux de ces travaux ne sont pas présentés dans ce manuscrit, mais un rapport bibliographique détaille et compare les différentes méthodes de quantification des protéines, dans le domaine pharmaceutique. Un intérêt tout particulier est apporté aux méthodes employées durant mon stage au sein des Laboratoires Pierre Fabre. L'objectif de ce manuscrit est de mettre en lumière le large spectre des méthodes permettant de quantifier les protéines depuis plus d'un siècle.

L'importance du dosage des protéines dans le milieu pharmaceutique s'illustre dans deux branches majeures : les biomarqueurs et les protéines thérapeutiques. Les biomarqueurs sont des molécules endogènes détectables à des taux définis en cas de changement physiologique chez un patient (maladie, grossesse, etc). Il est donc essentiel de pouvoir mesurer avec précision la concentration d'un biomarqueur dans un liquide biologique ou dans un tissu, à des fins de dépistage, de diagnostic, de détermination de la réponse à un traitement, de rechute après traitement, ou de toxicité d'une molécule. Les protéines thérapeutiques, quant à elles, sont généralement issues des biotechnologies, c'est-à-dire produites par des organismes vivants. De ce fait, elles sont soumises à toutes les règles du vivant : modifications post-traductionnelles, instabilité, hétérogénéité de structure, etc. C'est pourquoi, leur caractérisation et leur quantification est extrêmement complexe. Le développement de méthodes de dosage précises, spécifiques et robustes est donc indispensable à chaque étape de leur cycle de vie : recherches exploratoire, préclinique et clinique, développement, production, contrôle qualité, études de pharmacocinétique et de pharmacovigilance. Le premier chapitre de ce manuscrit a pour objectif de présenter ces deux grands types de protéines, afin d'expliquer l'importance de l'élaboration d'outils pour leur quantification.

La suite de ce manuscrit relate les différentes méthodes de quantification, classées en plusieurs catégories en fonction de leur spécificité. Le deuxième chapitre expose les méthodes de dosage non spécifiques. Les premières techniques décrites faisaient intervenir la colorimétrie ou la spectrophotométrie. Encore utilisées aujourd'hui grâce à leur faible coût et à

leur facilité de mise en œuvre, elles permettent le dosage des protéines totales dans un échantillon. Des méthodes séparatives, telles que l'électrophorèse ou la chromatographie, offrent une meilleure sensibilité de mesure. Elles ont démontré leur efficacité pour le dosage de biomarqueurs et de protéines thérapeutiques. La spectrométrie de masse (MS) semi-quantitative permet également un dosage non spécifique des protéines. Après que les éléments essentiels de cette technique auront été rappelés, la lumière sera faite sur les différentes stratégies de quantification relative par MS.

Le troisième chapitre porte sur les méthodes de dosage spécifiques. L'immuno-dosage est la méthode de choix à l'heure actuelle pour la quantification des protéines dans une matrice complexe. Elle est basée sur des interactions entre une molécule de ligand et son récepteur, pouvant être un anticorps (Ac) ou une autre macromolécule. Ce type d'analyse offre une grande sensibilité et un rendement élevé, et est adapté à la quantification de protéines dirigées contre une cible unique dans des études de pharmacocinétique. L'immuno-dosage le plus répandu est le test ELISA (pour *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), qui présente l'avantage de pouvoir traiter un grand nombre d'échantillons. Cependant, il ne permet pas de quantifier un mélange de plusieurs protéines (aussi appelé étude multiplexe), les anticorps de détection étant spécifiques d'une seule protéine à doser. Des immuno-dosages multiplex, de type planaire ou en suspension, permettent de pallier cet obstacle. Enfin, la MS est une méthode spécifique, sensible et précise, extrêmement développée pour le dosage des protéines. La dilution isotopique faisant intervenir des étalons internes marqués par des isotopes stables permet d'atteindre un haut niveau de précision pour une quantification absolue. Cette technologie en plein essor présente deux inconvénients majeurs pour son expansion, notamment en clinique : son coût important et la nécessité d'un personnel qualifié pour la mettre en pratique.

Le dernier chapitre de cette thèse établit une comparaison entre les différentes méthodes de quantification des protéines, afin de comprendre l'intérêt de chacune d'entre elle en fonction de l'utilisation que l'on cherche à en faire.

Chapitre I. La protéomique : définition et enjeux

La protéomique se définit comme étant l'étude de l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un organite, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme d'intérêt à un moment donné et sous des conditions données. Cet ensemble est appelé protéome. Dans le domaine pharmaceutique, la protéomique s'intéresse à la fois aux protéines biologiquement présentes dans un organisme (potentiels biomarqueurs), mais aussi à celles produites par les outils des biotechnologies, appelées biomédicaments.

Dans ce chapitre introductif, la protéomique sera mise en lumière, afin de comprendre l'importance et les enjeux du développement de méthodes quantitatives dans ce domaine. La protéomique sera détaillée sous ses deux principaux aspects : les biomarqueurs protéiques et les protéines issues des biotechnologies. Un intérêt tout particulier sera apporté au vaste domaine des anticorps monoclonaux, acteurs phares de la recherche pharmaceutique actuelle.

1.1 Les biomarqueurs protéiques

D'après le *National Institute of Health*, un biomarqueur est « une caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique » (Strimbu and Tavel, 2010). Dans le domaine médical, un biomarqueur peut être utilisé pour le dépistage (recherche d'une maladie), le diagnostic (caractérisation d'une maladie chez un individu), la réponse à un traitement, la rechute après traitement, ou encore la toxicité d'une molécule. Les biomarqueurs peuvent être des caractéristiques génétiques, des protéines, ou encore des métabolites. A l'heure actuelle, on peut distinguer deux types de biomarqueurs :

➤ **Le biomarqueur utilisé indépendamment d'un médicament spécifique, comme les tests de diagnostic ou de suivi clinique.**

Par exemple, il a été montré que le risque de cancer du sein et de l'ovaire chez la femme est fortement augmenté lorsqu'elle est porteuse d'une mutation génétique sur le gène suppresseur de tumeur BRCA1 ou BRCA2. Ces données permettent une prise en charge plus spécifique des patientes porteuses de ces mutations à risque (surveillance, examen d'imagerie, etc.), par rapport aux patientes sans prédisposition génétique (Paul and Paul, 2014).

De même, les protéines amyloïde β 42 et Tau sont des biomarqueurs diagnostiques de la maladie d'Alzheimer (Scheltens *et al.*, 2016).

➤ **Le biomarqueur « compagnon » d'un médicament, qui peut être de deux types :**

- *le biomarqueur utilisé une seule fois avant la prescription d'un médicament pour sélectionner les patients pouvant bénéficier ou non du traitement.*

Par exemple, si l'on s'intéresse au cancer colorectal métastatique, son traitement de référence est la chimiothérapie associant le 5-fluorouracile avec l'oxaliplatine (protocole FOLFOX), ou le 5-fluorouracile avec l'irinotécan (protocole FOLFIRI), associés ou non à une thérapie ciblée anti-EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (cetuximab, panitumumab) ou anti-VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (bevacizumab). Or, des études génétiques ont déjà montrées que les patients possédant des mutations sur les gènes RAS sont résistants aux anticorps monoclonaux anti-EGFR. De plus, des mutations sur les gènes B-RAF sont des facteurs de mauvais pronostic. Ces connaissances permettent d'adapter le traitement des patients concernés par ces mutations (Al-Marrawi *et al.*, 2013; Wong and Ma, 2014), en évitant de prescrire des thérapies extrêmement onéreuses qui seraient inefficaces.

De même, la recherche d'une surexpression du récepteur HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) et de la présence de récepteurs hormonaux (récepteurs à l'estrogène et à la progestérone) a un rôle important à jouer dans l'indication thérapeutique des patientes atteintes d'un cancer du sein. En effet, chez les patientes surexprimant HER2, l'anticorps monoclonal trastuzumab est le traitement de référence. Indépendamment de HER2, une surexpression de l'un des récepteurs hormonaux (statut RH+), conduit à la prescription d'une hormonothérapie (tamoxifène, anastrozole, letrozole ou exemestane). (OncoLogiK)

- *le biomarqueur utilisé durant la prise du médicament pour évaluer de façon précoce l'efficacité ou la toxicité de celui-ci (suivi thérapeutique).*

Par exemple, la surexpression des protéines phosphorylées de la voie de signalisation du récepteur EGFR permet de prédire la réponse au traitement anti-EGFR de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique, sans mutation sur le gène RAS (Harlé *et al.*, 2015).

Les marqueurs génétiques sont très informatifs mais difficiles d'application (biopsie, immunohistochimie). Il est donc préférable d'identifier des facteurs prédictifs faciles à doser et sans geste invasif pour le patient, comme la recherche de biomarqueurs dans des échantillons sanguins ou sériques. Dans ce manuscrit, nous allons nous intéresser exclusivement aux biomarqueurs protéiques. Un biomarqueur de qualité doit être spécifique, ainsi qu'identifiable et quantifiable avec précision et sensibilité. De nombreuses méthodes de dosage répondant à ces critères ont été développées et seront détaillées à partir du Chapitre II.

1.2 Les protéines issues des biotechnologies

D'après une définition du dictionnaire Larousse, les biotechnologies regroupent « toutes les techniques utilisant des êtres vivants (micro-organismes, animaux, végétaux), généralement après modification de leurs caractéristiques génétiques, pour la fabrication industrielle de composés biologiques ou chimiques (médicaments, matières premières industrielles) ou pour l'amélioration de la production agricole (plantes et animaux transgéniques ou organismes génétiquement modifiés) ». Il s'agit donc d'un mode de production par le vivant qui s'applique à de nombreux domaines englobant l'agronomie, la chimie, mais aussi l'industrie pharmaceutique. C'est ce dernier aspect qui nous intéresse ici.

Cette partie vise à exposer les différents aspects des biotechnologies pour la production de nouveaux médicaments, afin de comprendre le rôle et les enjeux du développement d'outils pour la quantification des protéines thérapeutiques.

1.2.1 Les biotechnologies en quelques chiffres

A l'origine de la pharmacie, les médicaments étaient des « petites molécules » issues des plantes et de l'industrie chimique. Aujourd'hui, les industries de biotechnologies, produisant des molécules plus complexes, s'emparent du marché. Une étude de « les entreprises du médicament » (LEEM) effectuée en 2014 traduit bien cette évolution, puisqu'en 2013, plus de 25 entreprises de biotechnologies ont été créées, contre 7 en 1990 (Figure 1). En 2013, on comptait 457 entreprises de biotechnologies en France, contre 388 en 2010, soit une augmentation de 18 % en trois ans (LEEM, 2014a).

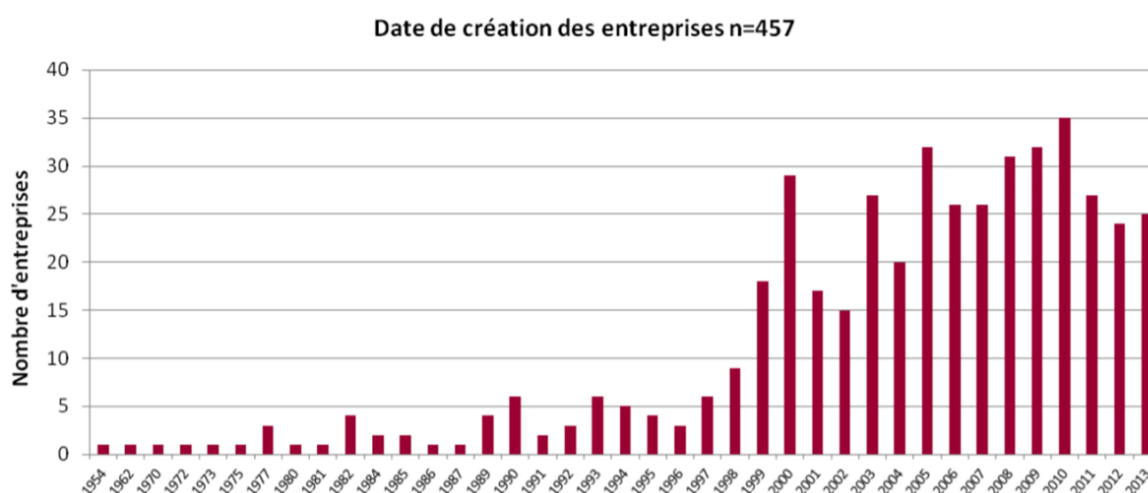


Figure 1. Nombre de créations d'entreprises de biotechnologies en France de 1954 à 2013, hors grands laboratoires pharmaceutiques.

D'après LEEM, 2014a.

Les médicaments issus des biotechnologies, appelés biomédicaments, interviennent dans le traitement de pathologies pour lesquelles aucun recours médicamenteux n'existe actuellement. Les aires thérapeutiques de l'onco-

hématologie et de l'infectiologie sont les plus représentées (32 et 16% respectivement), mais les biotechnologies concernent également la neurologie, la cardiologie et la transplantation (Figure 2) (LEEM, 2014a).

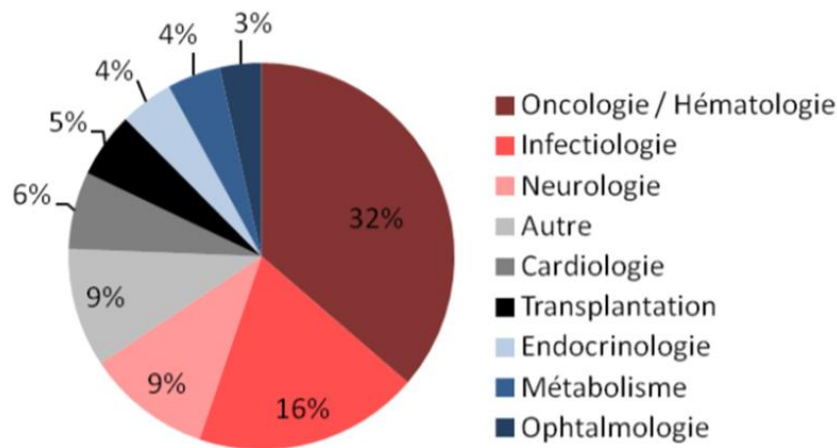


Figure 2. Principales aires thérapeutiques des biotechnologies de santé générant des produits.

La catégorie « Autre » concerne des entreprises qui ne sont spécialisées dans aucune des aires thérapeutiques proposées. D'après LEEM, 2014a.

Ces biomédicaments sont majoritairement des vaccins (35%) et des anticorps monoclonaux (17 %), suivis de près par les facteurs de croissance (10 %), les hormones (9 %) et les enzymes (8 %) (Figure 3) (LEEM, 2014b).

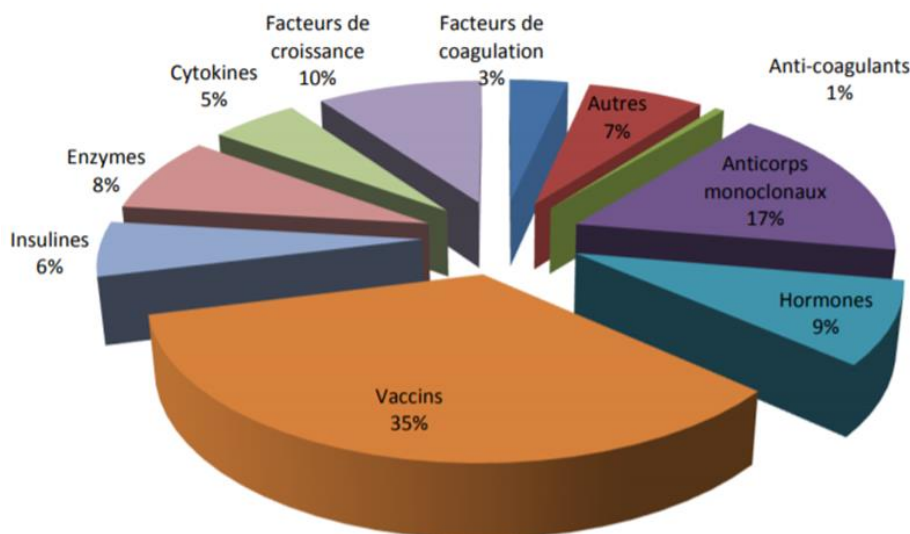


Figure 3. Classification pharmacologique des 173 biomédicaments commercialisés en France en 2014.

D'après LEEM, 2014b.

Il s'agit donc majoritairement de protéines (anticorps monoclonaux, cytokines, facteurs de croissance, enzymes, certains vaccins, hormones) (Beck *et al.*, 2007), qu'il est nécessaire de doser à différents stades de leur développement.

1.2.2 Le cycle du biomédicament

Un biomédicament, malgré sa complexité, suit le même cycle de vie qu'un médicament « classique » (Figure 4). Après une phase de recherche exploratoire, des études pré-cliniques puis cliniques sont réalisées. Parallèlement à ces études, la production à petite puis grande échelle du biomédicament est réalisée, accompagnée de contrôles qualité réguliers. Si les résultats des différentes étapes de recherche sont concluants, le médicament reçoit une autorisation de mise sur le marché (AMM), qui permet sa commercialisation. Pendant toute sa durée de commercialisation, le médicament est soumis à un contrôle appelé pharmacovigilance, dont le but est de signaler tous les cas d'effets secondaires non recensés durant les essais cliniques. (LEEM, 2018)

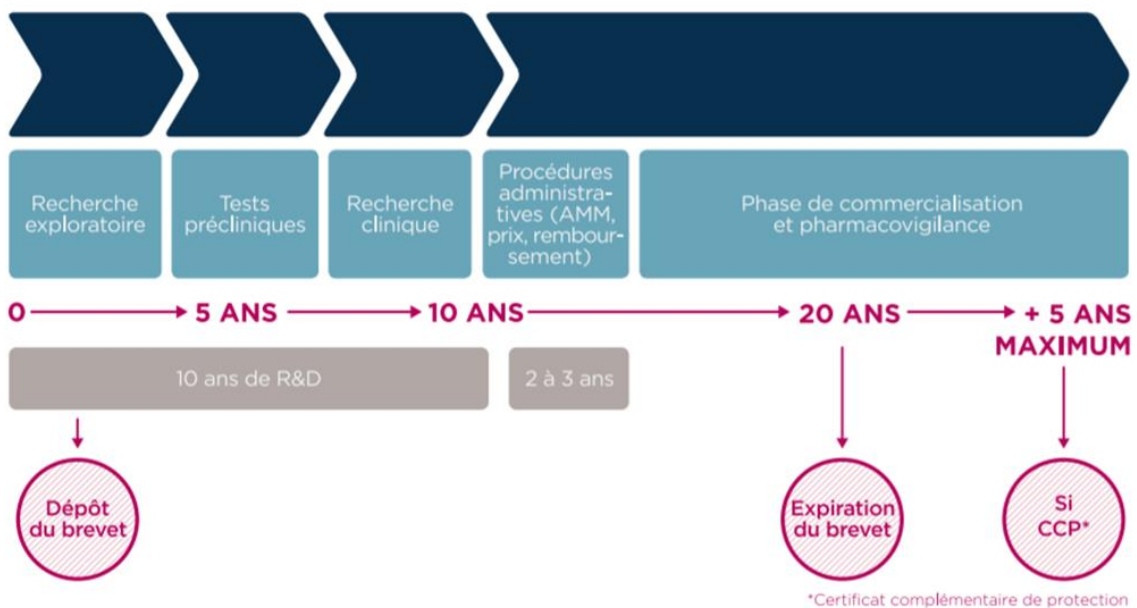


Figure 4. De l'idée au produit : genèse d'un médicament.

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché, R&D : Recherche & Développement, CCP : Certificat Complémentaire de Protection. D'après LEEM, 2018.

Tout au long du cycle de vie d'un biomédicament, dont font partie les protéines thérapeutiques, son analyse et sa quantification sont indispensables, pour diverses raisons :

- En recherche exploratoire : sa quantification permet sa caractérisation et son étude de biodisponibilité (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination).
- Durant les études pré-cliniques et cliniques : sa quantification permet d'établir sa pharmacologie de sécurité, sa biodisponibilité et la réponse des patients au traitement.
- Au cours de la production : la quantification permet de calculer les rendements et la productivité et d'effectuer des contrôles qualité.
- Pendant la commercialisation du médicament : sa quantification est nécessaire pour mesurer la réponse des patients au traitement et pour les déclarations de pharmacovigilance.

Une méthode de dosage fiable et efficace doit donc être mise au point dès la phase de recherche exploratoire. La phase de production des biomédicaments mérite une attention particulière, parce que c'est une étape clé dans leur cycle de vie, qui nécessite elle-même de nombreux contrôles.

1.2.3 La production de biomédicaments

La production des biomédicaments diffère de celle des médicaments « classiques ». En effet, elle est variable et fait intervenir plusieurs étapes, chacune pouvant être sujette à contamination et faisant donc l'objet de contrôles. Si l'on s'intéresse aux protéines thérapeutiques, leur production est schématiquement réalisée selon quatre phases distinctes (Figure 5) (LEEM, 2015) :

➤ La culture : des bioréacteurs permettent la croissance des cellules en présence d'une solution nutritive, composée de nutriments essentiels comme des acides aminés, des oligo-éléments, des vitamines, de l'oxygène... Dans ces conditions qui leurs sont favorables, les cellules préalablement modifiées génétiquement produisent les protéines thérapeutiques recherchées.

➤ La fermentation : afin d'augmenter la quantité de cellules et donc la productivité en protéines thérapeutiques, les cellules sont transvasées dans plusieurs fermenteurs successifs, dont la taille augmente progressivement.

➤ La filtration et la purification : après la production des protéines, celles-ci se trouvent en présence des cellules, des déchets cellulaires et de la solution nutritive. Afin d'isoler la protéine d'intérêt, des étapes de filtration et de purification par chromatographie sont réalisées, permettant d'atteindre une pureté de la biomolécule évaluée à 99 %.

➤ La dernière purification est une étape de polissage : elle est destinée à éliminer, par chromatographie, des impuretés à l'état de traces. Finalement, une filtration virale (pour éliminer les particules virales) et une filtration stérilisante sont réalisées afin d'augmenter encore la pureté.

LA PRODUCTION DE PROTÉINES THÉRAPEUTIQUES ET D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Elle se fait par culture de cellules animales, mais il existe aussi pour ce type de molécules d'autres voies de production : utilisation de bactéries, de levures, recours à des animaux ou végétaux transgéniques...

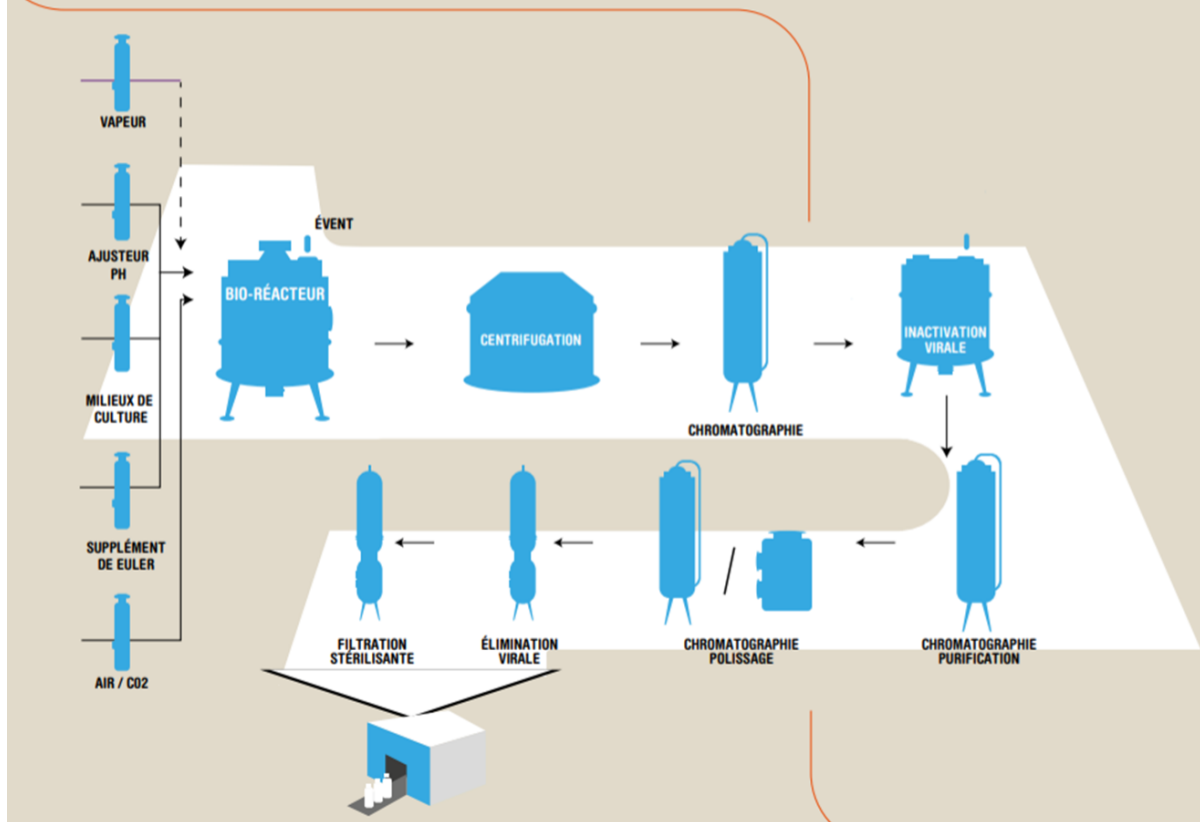


Figure 5. Les différentes phases de production des protéines thérapeutiques et des anticorps monoclonaux.

D'après LEEM, 2015.

A chacune de ces étapes, des contrôles doivent être réalisés sur les protéines, afin de vérifier leur intégrité, l'absence de contamination pouvant affecter le produit final, la productivité, etc. Pour cela, des méthodes de quantification spécifiques et sensibles sont nécessaires. Afin de mieux comprendre le défi analytique que représente la mise au point de telles méthodes, la lumière sera mise sur une classe de protéines thérapeutiques en plein essor : les anticorps monoclonaux et leurs dérivés.

1.2.4 Les anticorps monoclonaux et dérivés : un exemple de protéines thérapeutiques hautement complexes

1.2.4.1 Les anticorps monoclonaux : caractéristiques et défis analytiques

Un anticorps monoclonal ou Acm est une glycoprotéine tétramérique bivalente (deux sites de liaison aux antigènes) et bifonctionnelle (liaison aux antigènes et aux récepteurs Fc) d'environ 150 kDa. Les immunoglobulines (Ig) humaines sont réparties en cinq classes, nommées IgA, IgD, IgE, IgG et IgM, les IgG représentant la classe d'anticorps la plus utilisée en thérapeutique

(Beck *et al.*, 2009). A l'heure actuelle, la classe thérapeutique des Acms présente la plus grande croissance dans l'industrie pharmaceutique : plus de 50 IgG et dérivés ont déjà reçus une AMM pour des indications variées (cancers, maladies infectieuses...) (Klinguer-Hamour, Caussanel and Beck, 2009; Beck *et al.*, 2010).

Les IgG se composent de quatre chaînes polypeptidiques (Figure 6) :

➤ **Deux chaînes lourdes** (ou HC pour *Heavy Chain*) de 50 kDa chacune, liées entre elles par deux ponts disulfures interchaînes constituant la région *Hinge* (Hi). Ces HC sont formées d'un domaine variable (VH) et de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3).

➤ **Deux chaînes légères** (ou LC pour *Light Chain*) de 25 kDa chacune, liées aux chaînes lourdes par un pont disulfure interchaîne. Elles sont constituées d'un domaine variable (VL) et d'un domaine constant (CL), et se distinguent par deux sous-classes, nommées *kappa* et *lambda*.

Les domaines variables des chaînes légères et lourdes possèdent chacun trois régions hypervariables CDR (*Complementarity Determining Regions* ou région déterminant la complémentarité avec l'antigène), nommées CDR1, CDR2 et CDR3 (Beck *et al.*, 2009). Ce sont des notions importantes puisqu'elles confèrent aux anticorps leur spécificité pour une cible déterminée. La séquence protéique caractérisant ces domaines est unique pour chaque anticorps et donc à considérer pour leur quantification.

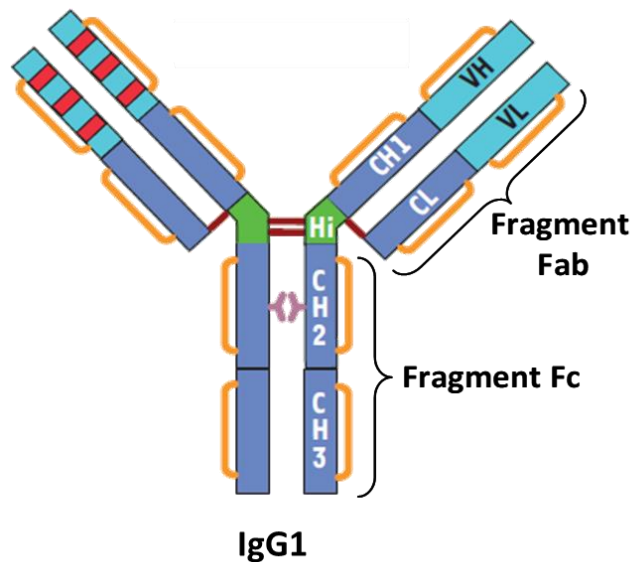


Figure 6. Représentation schématique d'un anticorps monoclonal.

CH : chaîne lourde (*heavy chain*), CL : chaîne légère (*light chain*), Hi : région *Hinge*, VL : région variable de la chaîne légère, VH : région variable de la chaîne lourde. D'après Beck *et al.*, 2009.

En plus de leur structure complexe et de leur grande taille, les Acms présentent des microhétérogénéités (pouvant être des modifications post-traductionnelles (MPTs)), qui rendent difficiles leur analyse et leur quantification (Beck *et al.*, 2013). Ces petites variabilités structurales peuvent être de natures diverses : différents glycoformes (N-glycosylation sur une

asparagine de la région CH2 par exemple), variations de charges (fonction de l'acidité/basicité de l'Acm), de taille (chaîne tronquée, présence d'introns...), modifications au niveau des cystéines (ponts disulfures additionnels, thioéthers...), oxydation (des méthionines et tryptophanes), ou encore mutations ponctuelles (Beck *et al.*, 2013).

Un exemple de ces microhétérogénéités est illustré par l'Acm Trastuzumab dans la Figure 7 (Beck, Sanglier-Cianférani and Van Dorsselaer, 2012). La structure générale de l'Acm est la même que celle décrite dans la Figure 6, mais de nombreuses modifications apportent sa spécificité à l'Acm. Par exemple, 12 ponts disulfures sont visibles, en plus des 4 toujours présents (traits orange sur le schéma). L'Acm peut présenter de nombreuses glycoformes, en fonction du type de glycosylation fixée sur l'asparagine du domaine CH2 (toutes les combinaisons possibles avec et sans fucose sont schématisées à droite de la figure). Les lysines C-terminales des chaînes lourdes peuvent également être manquantes dans la structure, alors que les méthionines peuvent être oxydées, entraînant respectivement une perte ou un incrément de masse de la molécule. Toutes ces variations dans la structure d'un Acm rendent sa caractérisation complexe à l'échelle moléculaire.

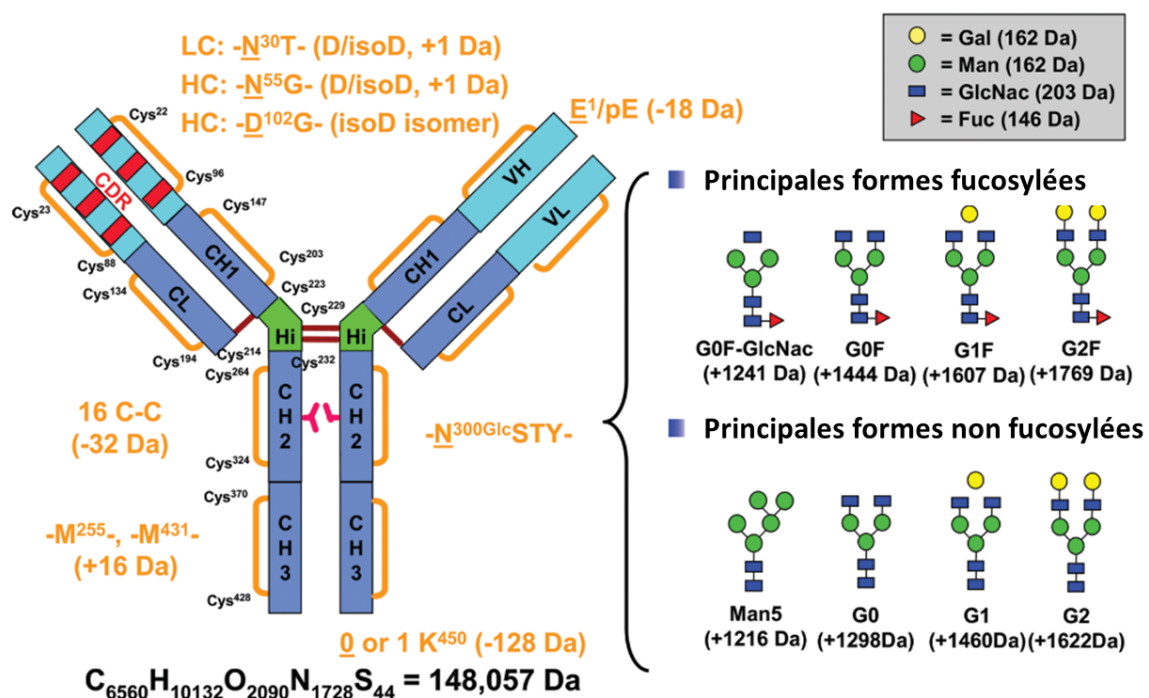


Figure 7. Schéma de l'Acm Trastuzumab représentant les principales modifications post-traductionnelles rencontrées et les différences de masse associées.

Les modifications sont multiples : 12 ponts disulfures additionnels sont schématisés par un trait orange (16 au total, en ajoutant les constants, représentés en rouge) ; les 8 glycoformes possibles sont schématisées à droite et fixées à l'asparagine 300 (N³⁰⁰) du domaine CH2 ; un acide pyroglutamique, noté pE, peut être présent au niveau des extrémités N-terminales des chaînes lourdes, à la place de l'acide glutamique ; les lysines C-terminales des chaînes lourdes (K⁴⁵⁰) peuvent être tronquées, conduisant à une perte de masse de 128 Da ; les méthionines 255 et 431 peuvent être oxydées ; la déamidation des asparagines et l'isomérisation des acides aspartiques ont également été décrites dans les régions CDR. LC : chaîne légère (*light chain*), HC : chaîne lourde (*heavy chain*). D'après Beck *et al.*, 2012.

Par ailleurs, le développement de traitements dits « biosimilaires » est rendu difficile en raison de ces particularités structurales des Acms. Un biosimilaire se définit comme étant « un médicament produit à partir d'une cellule, d'un organisme vivant ou dérivé de ceux-ci et dont l'efficacité et les effets indésirables sont équivalents à ceux de son médicament biologique de référence. Son AMM répond à des exigences réglementaires strictes afin de démontrer que sa qualité pharmaceutique, son efficacité et ses effets indésirables sont cliniquement équivalents à ceux du médicament biologique de référence » (HAS). Afin de satisfaire au mieux ces exigences, le développement de méthodes de caractérisation fine et de quantification des Acms est indispensable, mais long et laborieux. C'est pourtant la seule issue permettant de reproduire au mieux ces Acms à moindre coût (biosimilaire), voire d'améliorer leur activité thérapeutique (*biobetter*) (Beck, Sanglier-Cianféron and Van Dorsselaer, 2012; Beck *et al.*, 2015).

Pour pallier les problèmes posés par les microhétérogénéités, la structure des Acms peut être simplifiée, en délétant par exemple les lysines C-terminales, en introduisant des mutations, en contrôlant la glycosylation, etc (Beck *et al.*, 2010). Des dérivés d'Acms sont également développés, dans le but d'augmenter la spécificité d'action, de diminuer les coûts et de simplifier la production. On peut citer, par exemple, les anticorps bi- et multi-spécifiques, possédant au moins deux cibles thérapeutiques, les immuno-conjugués, qui associent un Acm et un cytotoxique, les anticorps polyclonaux, dirigés contre plusieurs épitopes d'un même antigène, ou encore les *protein scaffold*, protéines correspondant à une partie d'un Acm (Beck *et al.*, 2010). Développons plus précisément le cas des immuno-conjugués, molécules en plein essor dans le domaine de l'oncologie notamment.

1.2.4.2 Les immuno-conjugués : un dérivé d'Acm en plein essor

Un immuno-conjugué, aussi appelé ADC pour *Antibody Drug Conjugate*, est une chimiothérapie ciblée résultant de la combinaison d'un anticorps, qui apporte sa sélectivité pour une cible, et d'un cytotoxique, qui apporte sa toxicité (Haeuw, Caussanel and Beck, 2009; Janin-Bussat *et al.*, 2015). Il est composé de trois parties distinctes (Figure 8A) :

➤ **Un anticorps monoclonal** : sa haute affinité, sa grande sélectivité pour un antigène cible déterminé et surexprimé dans les cellules cancéreuses et sa longue demi-vie confèrent à l'ADC une durée d'action et une efficacité importante.

➤ **Un linker, ou agent de liaison** : il est très stable dans la circulation sanguine et permet la libération du cytotoxique dans les cellules cancéreuses ciblées. Son rôle est la liaison covalente du cytotoxique au niveau des lysines, des cystéines ou des oligosaccharides d'un anticorps (Haeuw, Caussanel and Beck, 2009). Dans le cas d'une chimie de couplage sur les cystéines, après réduction ménagée des ponts disulfures interchaînes de l'anticorps, 8 cystéines sont potentiellement disponibles sur les anticorps chimériques, humanisés ou humain de type IgG1 pour accueillir les

cytotoxiques et aboutir à un mélange de plusieurs espèces moléculaires (Figure 8B).

➤ **Un agent cytotoxique ou *drug*** : il apporte sa toxicité pour les cellules cancéreuses en prolifération. Il peut s'agir d'agents intercalants, d'agents alkylants, d'inhibiteurs de polymérisation de la tubuline, etc. (Haeuw, Caussanel and Beck, 2009)

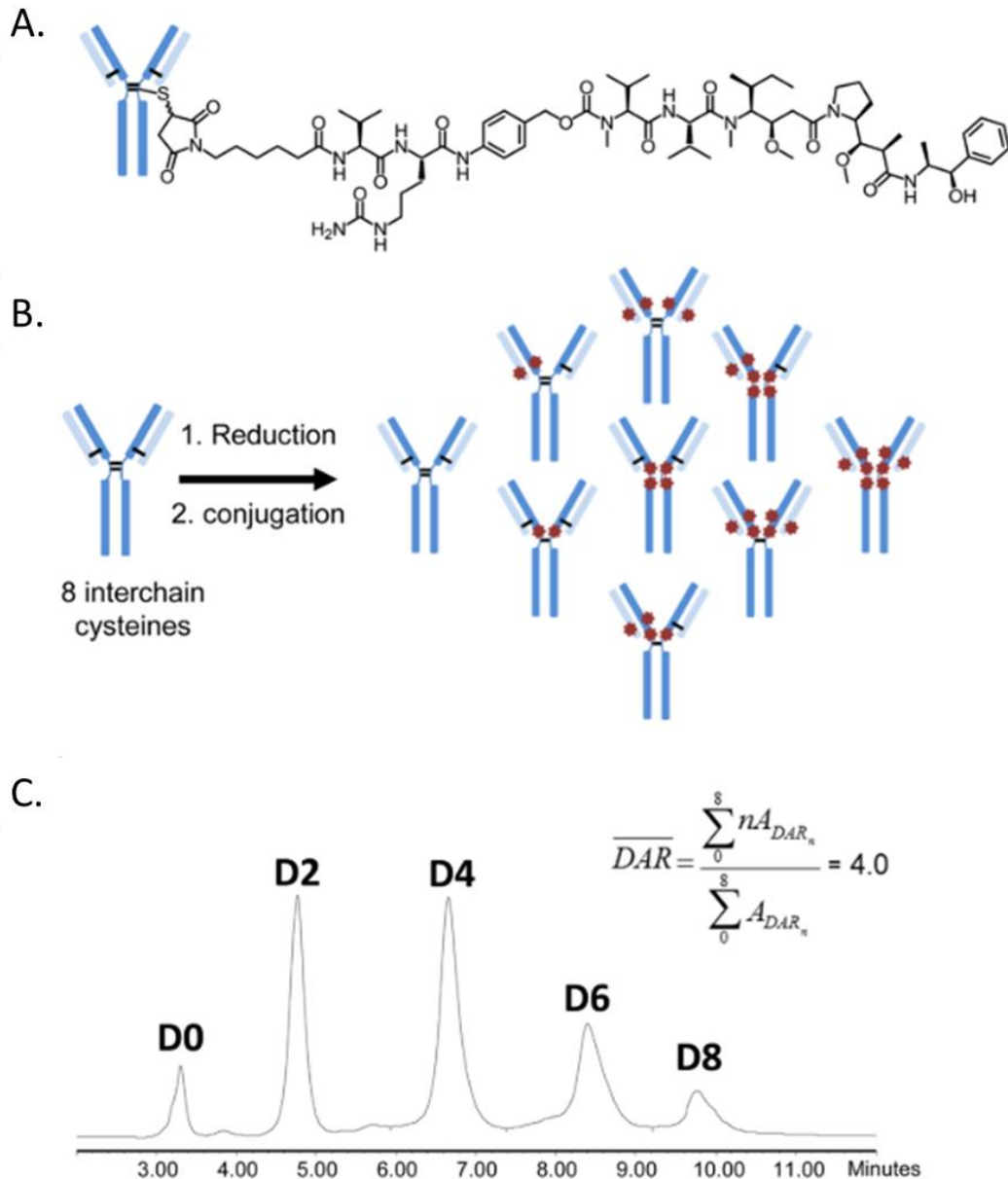


Figure 8. Complexité des ADC.

A. Structure schématisée d'un ADC, le brentuximab vedotin. **B.** Représentation schématique de la formation d'un ADC, les cytotoxiques étant fixés au niveau des cystéines. Les ponts disulfures sont représentés par des lignes noires et les cytotoxiques par des étoiles rouges. **C.** Chromatogramme d'interaction hydrophobe permettant la détermination de la position des cytotoxiques sur l'Acm et du DAR moyen (conditions d'analyse : HPLC, colonne 2.1*4.6 mm, détection UV, température ambiante). DAR : *drug-to-antibody ratio*. D'après Debaene et al., 2014.

Le cytotoxique peut se fixer sur différents sites sur l'Acm. Par exemple, dans le cas d'une fixation sur les cystéines (au nombre de 8), il peut occuper entre 0 et 8 sites, de manière aléatoire. Ce paramètre, qu'il est impossible de contrôler pendant la production, doit être caractérisé avant tout usage thérapeutique. Afin de pouvoir déterminer le nombre et la position des cytotoxiques sur l'Acm, le rapport « cytotoxique sur Acm », appelé DAR pour *Drug-to-Antibody Ratio*, a été créé (Figure 8C) (Debaene *et al.*, 2014). Des méthodes d'analyse et de quantification précises et robustes sont indispensables pour la détermination de ces DAR et la caractérisation des ADC.

A l'heure actuelle, seuls quatre ADC ont été approuvés par les agences américaines et européennes de santé (la FDA (*Food and Drug Administration*) et l'EMA (*European Medicines Agency*)), mais 80 sont en cours d'études cliniques pour le traitement de tumeurs solides ou hématologiques (Beck *et al.*, 2019).

1.3 Conclusions

Finalement, la quantification des protéines a un double enjeu. Elle intervient à la fois dans la recherche de biomarqueurs de diagnostic et de réponse au traitement et à la fois dans la recherche et la production de médicaments d'origine protéique.

La quantification des protéines intervient à plusieurs niveaux dans le cycle de vie du médicament. Tout d'abord, la mise au point d'une méthode de quantification sensible et spécifique est établie au stade de la recherche exploratoire. Elle permet de caractériser les protéines et de faire des études de pharmacologie. Puis, ce dosage est employé au cours des études précliniques et cliniques, et en production pour le calcul des rendements, de la productivité, pour le contrôle qualité, etc. Ensuite, il est nécessaire pendant les études de pharmacovigilance, une fois que le traitement est sur le marché et administré au patient. Dans un deuxième temps, c'est donc au niveau du patient que la méthode de dosage protéique mise au point intervient. Elle a d'abord un rôle à jouer pour le diagnostic, grâce à la recherche de biomarqueurs spécifiques d'une pathologie. Le dosage est également nécessaire pour le suivi du traitement chez le patient, et notamment lors des études d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination. Enfin, il permet d'estimer la réponse des patients au traitement, et de décider de sa poursuite ou non.

Pour être efficace, une méthode de quantification des protéines doit répondre à plusieurs critères :

- Haute **sensibilité** (faibles limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)),
- Haute **spécificité**, pour éviter les interférences avec d'autres constituants,
- **Large gamme dynamique linéaire** pour une quantification précise,

- **Reproductibilité** intra- et inter-laboratoire,
- **Répétabilité**,
- Grande **précision** de la mesure (courbes de calibration, étalonnage interne),
- **Durée d'analyse** la plus faible possible,
- **Faible coût** pour une large diffusion auprès des structures habilitées (hôpitaux, cliniques, laboratoires d'analyses médicales, entreprise pharmaceutique, laboratoire de recherche, etc),
- **Facilité d'utilisation** pour une diffusion aisée,
- Capacité de **multiplexage** élevée (dosage de plusieurs protéines en une seule analyse).

A l'heure actuelle, de nombreuses méthodes permettent le dosage de protéines, mais aucune ne répond à l'ensemble de ces critères, chacune ayant des avantages et des inconvénients propres. Il est donc important d'avoir tous les éléments permettant de choisir la méthode qui conduit à l'information recherchée. La suite de ce manuscrit consiste en une description et une comparaison des méthodes usuelles pour la quantification des protéines.

Chapitre II. Méthodes non spécifiques pour la quantification des protéines

2.1 Mesure de protéines totales : méthodes colorimétriques et spectrophotométriques

Ces méthodes colorimétriques de dosage des protéines sont faciles à mettre en œuvre, rapides, bon marché, mais non spécifiques. Elles permettent le dosage des protéines totales, de manière plus ou moins sensibles selon les réactions, mais demeurent très utilisées aujourd'hui (Goldring, 2012).

2.1.1 Méthode du biuret

La méthode du biuret est issue de la réaction entre des ions cuivre (II) et les groupements amine des liaisons peptidiques des protéines à doser, en milieu alcalin (Figure 9). C'est un dosage adapté aux polypeptides possédant au moins trois liaisons peptidiques (trois acides aminés), pour qu'un complexe puisse se former. Cette réaction est à l'origine d'une coloration bleu-violet, proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques participant à la réaction, donc à la concentration en protéines totales du milieu. Le réactif de coloration utilisé est le réactif de Gornall, composé de sulfate de cuivre donnant la couleur bleue à la solution, d'hydroxyde de sodium pour rendre le milieu basique, de tartrate double de sodium et de potassium pour piéger les ions Cu^{2+} et éviter leur précipitation et enfin d'iodure de potassium pour éviter la réduction des ions cuivriques. (Krohn, 2011)

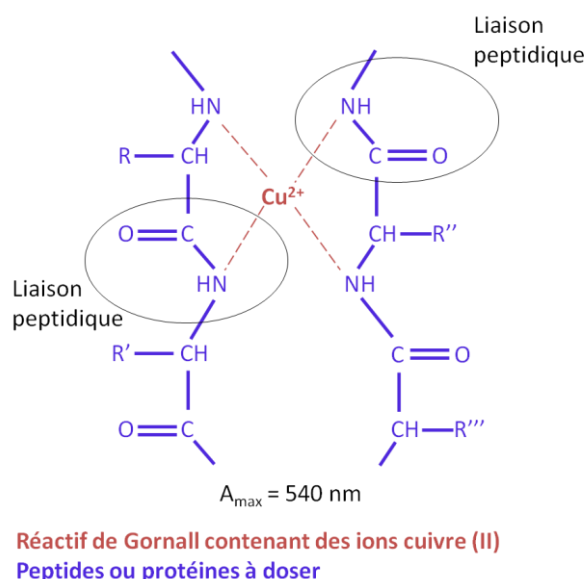


Figure 9. Schéma de la réaction du biuret entre un ion cuivre (II) et les liaisons peptidiques des protéines à doser.
D'après Krohn, 2011.

Une détection de l'intensité de la coloration par spectrophotométrie Ultra-Violet (UV) à 540 nm est ensuite nécessaire pour établir une droite étalon par application de la loi de Beer-Lambert (Figure 10), puis pour déterminer la concentration en protéines d'un échantillon inconnu.

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C$$

A : absorbance pour une longueur d'onde λ (sans unité).

ϵ : coefficient d'absorbance molaire, pour une longueur d'onde λ , une entité de nature chimique donnée et une température donnée ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$).

l : longueur du trajet optique (= épaisseur de la cuve du spectrophotomètre UV) (cm).

C : concentration molaire de la solution ($mol \cdot L^{-1}$).

Figure 10. Loi de Beer-Lambert : définition de la relation entre l'absorbance et la concentration d'une solution.

Les principaux avantages de cette méthode sont sa rapidité d'exécution et son bas coût. En revanche, elle est peu sensible puisqu'elle possède une limite de quantification élevée (de l'ordre du mg/mL) et ne peut donc être appliquée que pour des échantillons très concentrés en protéines. De plus, des problèmes d'interférences avec d'autres substances que les protéines d'intérêt peuvent fausser les résultats de dosage (lipides, bilirubine, hémoglobine, dextran, citrate, tris, acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), etc.) (Krohn, 2011).

Si cette méthode a été introduite en 1914 par Riegler puis souvent modifiée (Kingsley, 1939; Hiller, Greif and Beckman, 1948; Gornall, Bardawill and David, 1949), elle n'en reste pas moins encore utilisée actuellement pour doser les protéines totales du sérum par exemple (Tichy *et al.*, 2009).

2.1.2 Méthode de Lowry

La méthode de Lowry pour le dosage des protéines totales a été mise au point en 1951 par Oliver H. Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Elle a apporté une si grande amélioration pour le dosage protéique que la publication l'ayant dévoilée fait partie de l'une des références les plus citées de la littérature scientifique.

La méthode de Lowry consiste en une amélioration de la réaction du Biuret par l'ajout d'une étape supplémentaire. Dans un premier temps, l'échantillon contenant les protéines à doser est traité avec le réactif de Gornall, afin de créer un complexe cuivrique en milieu alcalin. Dans un deuxième temps, un second réactif de nature phosphomolybdique-phosphotungstique est utilisé et appelé réactif de Folin phénol. Il doit être frais donc préparé extemporanément. Ce dernier est réduit par les complexes cuivre-protéines, ce qui entraîne l'apparition d'une coloration bleu foncé, dont l'absorbance peut être mesurée à 750 nm (Figure 11). Comme précédemment, une droite d'étalonnage est tracée, permettant la détermination de la

concentration en protéines totales de l'échantillon à doser. (Lowry *et al.*, 1951; Noble and Bailey, 2009; Krohn, 2011)

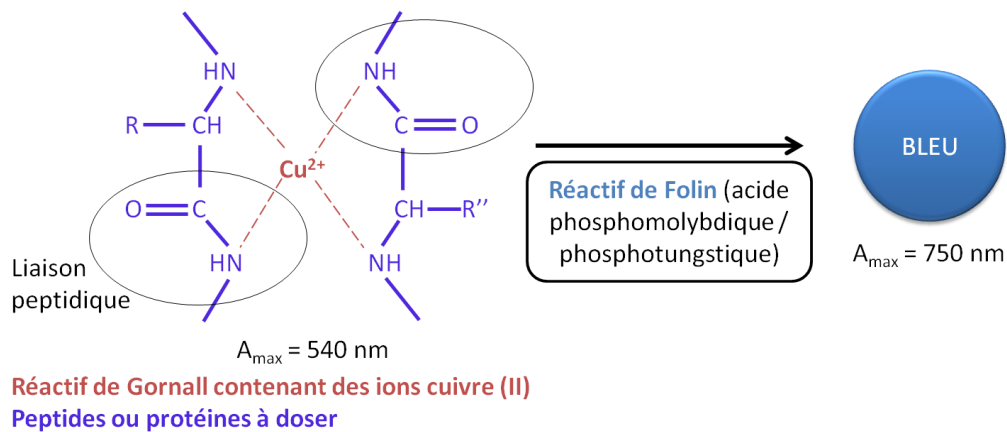


Figure 11. Schéma de la réaction de la méthode de Lowry.

Une première réaction commune à celle du biuret est suivie d'une réduction du réactif de Folin, à l'origine d'une coloration bleue absorbant à 750 nm. D'après Krohn, 2011.

Il s'agit d'une méthode plus complexe à mettre en application que celle du Biuret, mais 100 fois plus sensible. Sa limite de quantification est de l'ordre de quelques $\mu\text{g/mL}$, ce qui permet de doser des échantillons pauvres en protéines et des échantillons dilués. De plus, elle permet de supprimer un certain nombre d'interférences faussant les résultats du test du biuret, grâce à l'étape supplémentaire avec le réactif de Folin. Cependant, elle présente deux grands inconvénients. Tout d'abord, le degré de coloration varie beaucoup d'une protéine à une autre, rendant la méthode moins constante que celle du biuret. Ensuite, l'intensité de la coloration n'est pas strictement proportionnelle à la concentration en protéines, en raison d'interférences avec d'autres substances que les protéines à doser (acide urique, guanine, xanthine). (Lowry *et al.*, 1951; Noble and Bailey, 2009)

Depuis sa découverte en 1951, cette méthode de dosage des protéines totales est citée dans de très nombreux articles scientifiques, et ne cesse d'être utilisé de nos jours (Koç Öztürk *et al.*, 2016; Longo *et al.*, 2016).

2.1.3 Méthode de Bradford

La méthode de liaison des protéines au bleu de Coomassie ou méthode de Bradford a été introduite pour la première fois par Marion M. Bradford en 1976 (Bradford, 1976), et est toujours utilisée dans certains travaux à l'heure actuelle (Iranpour *et al.*, 2016).

Ce procédé consiste à mettre en contact un colorant appelé bleu de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) avec l'échantillon de protéines à doser. Le bleu de Coomassie à l'état anionique est rouge et présente un maximum d'absorption à 465 nm. Après mélange entre le colorant et les protéines, un complexe se crée au niveau des chaînes latérales basiques et aromatiques des acides aminés et le bleu de Coomassie est visible sous sa forme cationique de couleur bleue, avec un maximum d'absorption à 595 nm (Figure 12). L'intensité de la coloration bleue est proportionnelle à la quantité

de protéines présentes dans l'échantillon. Ce processus de complexation est très rapide (quelques minutes) et stable dans le temps (pendant une heure environ), rendant la manipulation aisée à mettre en place. Par une mesure de l'absorbance de la coloration par spectrophotométrie UV à 595 nm, une droite d'étalonnage est établie grâce à la relation de Beer-Lambert, qui permet de déterminer la concentration en protéines totales d'un échantillon donné. (Bradford, 1976; Krohn, 2011)

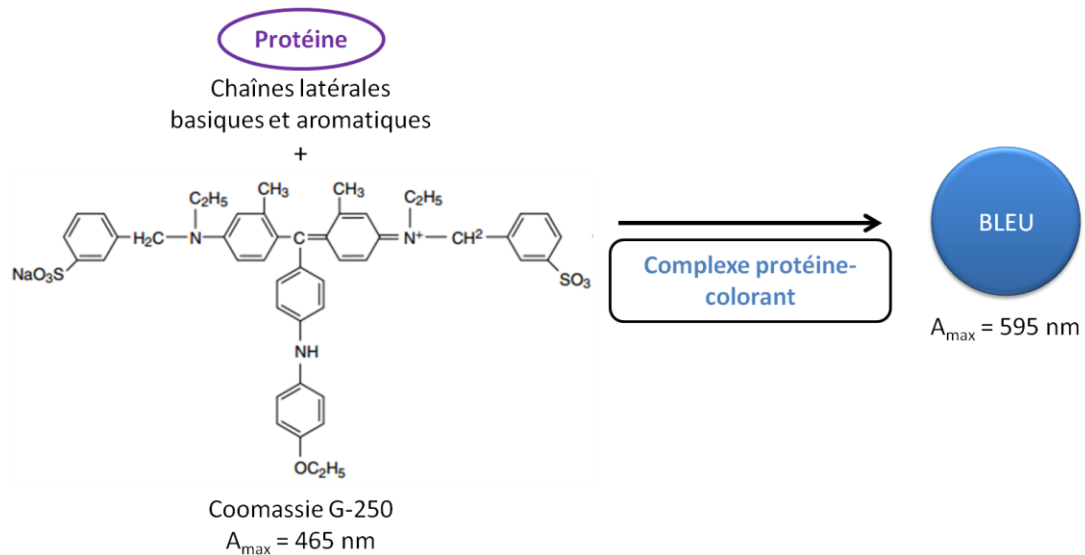


Figure 12. Schéma de la réaction de la méthode de Bradford.

Création d'un complexe protéine-colorant de Coomassie de couleur bleue absorbant à 595 nm. D'après Krohn, 2011.

Cette méthode est quatre fois plus sensible que la méthode de Lowry, avec une limite de quantification de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$. Cependant, la linéarité de l'intensité de la coloration est observée sur un intervalle étroit de concentrations et diminue beaucoup pour des concentrations de l'ordre du mg/mL . Il est donc nécessaire de diluer les échantillons protéiques avant le dosage. Peu d'interférences avec des cations ou des carbohydrates sont identifiées. Des interférences en présence d'agents tampons fortement alcalins et de détergents (*sodium dodecyl sulfate*, Triton X-100, détergents pour verrerie) sont cependant relevées. De plus, cette méthode n'est pas applicable à des peptides de bas poids moléculaires, en raison de grandes variations de réponse. (Bradford, 1976; Noble and Bailey, 2009; Krohn, 2011)

2.1.4 Dosage par l'acide bicinchoninique (BCA)

Cette méthode, mise au point par Paul Smith en 1985 (Smith *et al.*, 1985), est elle aussi une amélioration de la méthode du Biuret. Elle est similaire à la méthode de Lowry, mais pose moins de problèmes d'interférences.

Elle se déroule en deux étapes, la première correspondant au test du Biuret. Les protéines réduisent des ions Cu^{2+} en ions Cu^+ en milieu alcalin, puis l'acide bicinchoninique (BCA) crée un complexe avec les ions cuivre (I), à l'origine d'une coloration violette qui absorbe à 562 nm (Figure 13). L'intensité

de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes. L'établissement d'une gamme d'étalonnage permet alors de connaître la concentration en protéines de la solution. (Smith *et al.*, 1985; Krohn, 2011)

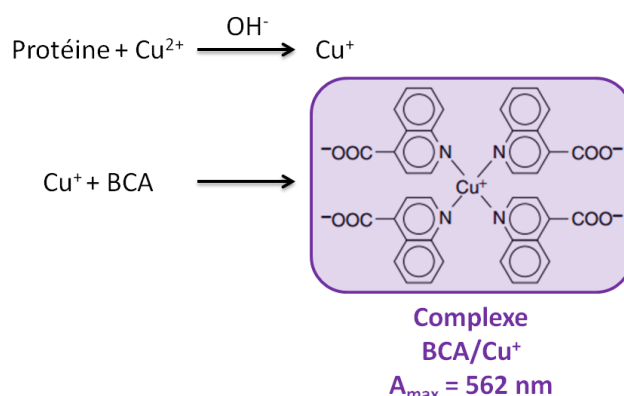


Figure 13. Schéma de la réaction du dosage par l'acide bicinchoninique.

La réaction du biuret permet la réduction de l'ion cuivre (II). S'ensuit la complexation de Cu^+ avec le BCA. D'après Krohn, 2011; Smith *et al.*, 1985.

Cette méthode est tout à fait similaire à la méthode de Lowry, avec une sensibilité du même ordre ($\mu\text{g}/\text{mL}$, gamme de travail de $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ à $2 \text{ mg}/\text{mL}$), mais elle présente l'intérêt d'être moins sensible aux interférences, et notamment à celles provoquées par les détergents, certains tampons et des agents dénaturants (guanidine, urée). De plus, la couleur obtenue est stable dans le temps (pendant une semaine environ), contrairement à celle obtenue par la méthode de Lowry. En revanche, les agents chélatant le cuivre produisent des interférences avec le BCA (EDTA par exemple), ainsi que les solutions tampons susceptibles de modifier le pH. (Smith *et al.*, 1985; Krohn, 2011)

Malgré son manque de spécificité, la méthode de dosage par le BCA est encore utilisée aujourd'hui pour le dosage des protéines totales en solution, comme en relate la littérature actuelle (Bonichon *et al.*, 2016; PAVELEK *et al.*, 2016).

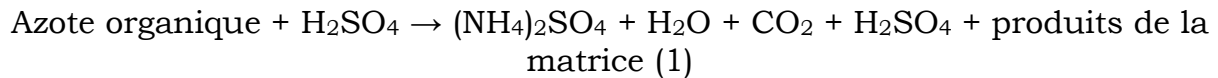
2.1.5 Méthode de Kjeldahl

Cette méthode a été décrite en 1883 par le chimiste danois Johan Kjeldahl (Kjeldahl, 1883). Elle permet le dosage de l'azote, puis par extrapolation celui des protéines. Elle a été initialement créée afin de doser les protéines présentes dans la bière, pour l'usine Carlsberg, et demeure aujourd'hui la méthode de référence dans ce domaine (Lynch & Barbano, 1999). Elle a ensuite été étendue à l'agro-alimentaire. Toutefois, la méthode dite de Kjeldahl est également utilisée dans le milieu médical pour le dosage des protéines totales, pour sa sensibilité et sa précision qui sont supérieures à celles de la méthode du Biuret par exemple (Chromy, Vinklarkova, Sprongl, & Bittova, 2015; Vinklarkova *et al.*, 2015).

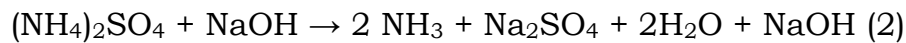
La mise en place de la méthode de Kjeldahl est plus complexe que celles décrites précédemment, puisqu'elle se déroule en plusieurs phases et qu'elle

nécessite des installations spécifiques en laboratoire. Le dosage se décline en trois étapes : la digestion, la distillation et la titration (Chromy et al., 2015 ; Vinklarkova et al., 2015) :

➤ **Première étape** : durant la digestion, tout l'azote organique (contenu dans les protéines) doit être décomposé en ions ammoniums. Pour cela, les protéines sont portées à ébullition en présence d'acide sulfurique et d'un catalyseur (sulfate de potassium) à une température excédant les 400°C. D'abord de couleur noire, le mélange devient progressivement incolore après digestion des composés organiques (équation (1)).



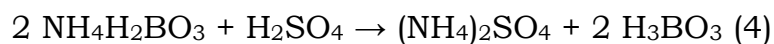
➤ **Deuxième étape** : durant la distillation, les ions ammoniums (NH_4^+) sont transformés sous leur forme volatile, l'ammoniac (NH_3), grâce à l'ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium en excès (équation (2)).



L'ammoniac est alors entraîné par les vapeurs d'eau par distillation. Les vapeurs d'ammoniac sont condensées au contact d'un réfrigérant et recueillies dans une solution contenant de l'acide borique qui va les transformer en dihydrogénoborate d'ammonium, selon l'équation (3) :



➤ **Troisième étape** : le dosage de l'ammoniac, et par extrapolation des protéines, se fait grâce à l'utilisation d'un acide fort, généralement l'acide sulfurique, et d'indicateurs colorimétriques tels que le rouge de méthyle ou le bleu de bromothymol, dont la couleur change entre les pH 4 et 6 (équation 4).



La méthode de Kjeldahl, comme nous l'avons vu, est plus laborieuse à mettre en place que les autres méthodes de dosage des protéines totales. En revanche, elle offre de plus grandes précision et sensibilité. Ses limites de détection et de quantification sont de quelques mg/L. Par ailleurs, elle demeure utilisée en chimie clinique, pour le dosage des protéines totales dans le sérum, le plasma ou les urines humains (Chromý *et al.*, 2015; Vinklarkova *et al.*, 2015).

2.1.6 Dosage par spectrophotométrie UV

Cette méthode est basée sur la propriété spécifique des protéines à absorber la lumière UV à 280 nm, grâce à leurs acides aminés aromatiques, le tryptophane (A_{max} : 280 nm), la tyrosine (A_{max} : 275 nm) et la phénylalanine (A_{max} : 257 nm) (Oliveira and Domingues, 2018). Ainsi, ce dosage simple et rapide consiste à mesurer l'absorbance d'une solution de protéines à 280 nm par spectrophotométrie UV, puis à en déterminer la concentration par l'application de la loi de Beer-Lambert (Figure 10). Une droite d'étalonnage à l'aide d'un échantillon de concentration connue en protéines peut être ou non

établie au préalable, son équation permettant d'en déduire la concentration en protéines du milieu.

Cette méthode est très simple d'utilisation, rapide et très peu coûteuse et permet de doser les protéines totales contenues dans des échantillons. Néanmoins, elle nécessite l'utilisation de solvants qui n'absorbent pas à 280 nm, au risque que des interférences avec les protéines biaisent les résultats. De plus, elle n'est applicable que pour des échantillons peu concentrés, sinon l'absorbance excédera 1, alors qu'elle doit être comprise entre 0 et 1 pour une meilleure fiabilité des résultats.

Par ailleurs, la précision de cette méthode dépend de la détermination correcte du coefficient d'absorbance molaire (noté ϵ , cf. Figure 10) (Oliveira and Domingues, 2018). Ce paramètre peut être soit déterminé expérimentalement, soit estimé à partir de la séquence primaire de la protéine (séquence en acides aminés), grâce à des programmes informatiques, comme ProtParam par exemple (un programme d'ExPASy). Cependant, dans ce dernier cas, la structure n'est pas prise en compte, ce qui peut affecter la valeur du coefficient d'absorbance molaire. Par exemple, la présence d'une modification post-traductionnelle comme la sulfatation affecte l'absorption des tyrosines à 280 nm (Bettelheim, 1954; Huttner, 1984), ce qui n'est pas considéré par ProtParam.

2.1.7 Analyse en acides aminés

Une autre méthode permettant la mesure des protéines totales associe la chromatographie (cf. paragraphe 2.2.1.4) à la colorimétrie. Elle est extrêmement précise et fiable pour la quantification de protéines (Rutherford and Dunn, 2011; Rossi *et al.*, 2015). Dans cette technique, les peptides ou protéines subissent d'abord une hydrolyse afin de briser les liaisons peptidiques et de libérer tous les acides aminés (AA) de la chaîne. L'hydrolyse peut être enzymatique, acide (acide chlorhydrique ou sulfurique) ou alcaline (solution d'hydroxyde de sodium) (Fauconneau, 1956). Les AA sont ensuite séparés par chromatographie échangeuse d'ions, avant d'être dérivés en sortie de colonne avec de la ninhydrine qui se lie aux groupements NH_2 terminaux des AA, permettant leur détection à 570 nm (sauf pour la proline détectée à 440 nm). Par comparaison à des standards, la concentration et le nombre de chaque AA puis, par extension, la concentration de peptides ou protéines dans l'échantillon sont déterminés.

Cette méthode de dosage est extrêmement précise et sensible. Cependant, elle entraîne la dégradation des composés après l'hydrolyse et ne permet donc pas de distinguer des protéines de structures différentes. Par ailleurs, elle nécessite des équipements spécifiques, la rendant peu accessible. Elle est idéale pour le dosage d'une protéine purifiée et isolée, mais ne peut être employée pour le dosage de protéines dans un échantillon complexe.

2.2 Mesures semi-quantitatives des protéines

Dans ce paragraphe, nous aborderons les méthodes non spécifiques qui offrent une quantification relative, basée sur la différence d'intensité entre deux espèces. Elles ne permettent pas une mesure précise de la concentration, mais une estimation de l'abondance d'une espèce par rapport à une autre.

2.2.1 Les méthodes séparatives

2.2.1.1 Electrophorèse sur gel

L'électrophorèse sur gel est une méthode séparative basée sur la taille et la charge des protéines à identifier. La plus courante en protéomique est la *Sodium DodecylSulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), qui contient un agent dénaturant, le SDS, et un polymère de type polyacrylamide pour la séparation. Après le dépôt des protéines dans les puits d'une matrice de polymère plongée dans un bain de tampon conducteur, une tension est appliquée, permettant la migration des protéines en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire. La révélation des différentes bandes de protéines obtenues est effectuée majoritairement à l'aide de deux colorants, le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent. Le bleu de Coomassie (également utilisé dans la méthode de Bradford) a pour propriété de se lier aux protéines, permettant ainsi leur détection. Les ions argent, quant à eux, en se fixant sur les chaînes latérales des acides aminés, sont réduits en argent métallique sous influence d'un agent réducteur. Les bandes du gel apparaissent alors de couleur grise. La coloration au nitrate d'argent offre une sensibilité environ cent fois supérieure à celle au bleu de Coomassie (Syrový and Hodný, 1991). En revanche, elle est moins reproductible et plus contraignante à mettre en place puisqu'elle nécessite trois étapes, contre une pour le bleu de Coomassie. Il existe également des agents de révélation radioactifs ou fluorescents (Weiss, Weiland and Görg, 2009).

La quantification par électrophorèse peut être effectuée de diverses manières (Syrový and Hodný, 1991). Tout d'abord, il est possible de mesurer la densitométrie des bandes de protéines sur le gel. Pour cela, les protéines doivent être séparées dans une électrophorèse haute performance sur gel de polyacrylamide de petit diamètre (0.05-0.3 mm). Puis, la densité des bandes est mesurée et comparée à une gamme étalon établie avec des protéines de concentrations connues. Il est également possible de doser les protéines par détection UV. Pour ce faire, les bandes de protéines doivent migrer en dehors du gel avant d'être transférées en continu dans les cuves d'un spectrophotomètre UV pour être finalement détectées à 230 nm. Leur absorbance permet alors, grâce à la loi de Beer-Lambert, de déterminer la concentration de la solution.

Pour augmenter les capacités séparatives du gel d'électrophorèse, des gels à deux dimensions (2-DE) ont été développés et sont très utilisés en protéomique (Ong and Pandey, 2001). Dans ce cas, les protéines sont séparées en fonction de leurs points isoélectriques selon un gradient de pH dans la première dimension. Le gel est ensuite transféré dans la deuxième dimension,

qui est généralement une électrophorèse de type SDS-PAGE, dans laquelle les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire.

L'inconvénient lié à l'électrophorèse sur gel pour la quantification est l'imprécision due à l'incomplète coloration des bandes de protéines sur tout le gel (Syrový and Hodný, 1991). Des variabilités dans le dosage sont également possibles en fonction de la porosité du gel, donc de sa densité. Celle-ci est déterminée en amont, en fonction de la taille des protéines à séparer.

Une détection par spectrométrie de masse peut réduire les imprécisions dues à une détection par coloration. Pour ce faire, les protéines sont séparées puis digérées directement sur un gel de polyacrylamide. Les peptides obtenus sont alors extraits du gel et analysés par spectrométrie de masse (Ong and Pandey, 2001). Les principales difficultés résultant de cette technique sont un pouvoir résolutif insuffisant pour séparer correctement toutes les protéines d'un échantillon (inhérent à la technique de l'électrophorèse sur gel), une gamme dynamique étroite et un débit d'analyse restreint.

2.2.1.2 Western blot

Le Western blot, décrit pour la première fois en 1979 par une équipe bâloise (Towbin, Staehelin and Gordon, 1979), est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection de protéines d'intérêt à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre celles-ci et détectés par chimioluminescence. Sa mise en œuvre consiste en plusieurs étapes, la première étant une électrophorèse sur gel, comme décrit dans le paragraphe 2.2.1.1. En revanche, à la place d'une détection par coloration, les protéines du gel, après leur migration, sont transférées sur une membrane de nitrocellulose sous influence d'un champ électrique. Les protéines se retrouvent « copiées » dans des positions identiques à celles qu'elles avaient sur le gel d'électrophorèse. Les sites de la membrane non occupés par les protéines sont ensuite bloqués à l'aide d'albumine de sérum bovin ou de lait. L'objectif est de ne pas laisser d'espaces vides sur lesquels l'anticorps primaire serait susceptible de se fixer. Puis, un anticorps primaire spécifique est mis en contact avec la membrane afin de se fixer aux protéines cibles. Un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à la biotine, à la peroxydase de raifort, à la phosphatase alcaline ou encore à un agent fluorescent, est alors incubé avec la membrane afin de permettre une détection par chimioluminescence, fluorescence ou colorimétrie (en fonction de la nature de l'agent de détection couplé à l'anticorps secondaire). L'intensité du signal détecté est proportionnelle à la concentration en protéines présente dans chaque bande de la membrane. Une quantification devient alors possible par densitométrie. Depuis 1979, le western blot a beaucoup évolué et diverses méthodes de transfert et de détection ont été proposées (Kurien and Scofield, 2006).

Le western blot est peu utilisé pour le dosage des protéines dans le milieu pharmaceutique car la succession des étapes nécessaires à sa réalisation entraîne des pertes de protéines, créant des biais dans le dosage. Une quantification absolue demeure donc complexe, mais une quantification relative permet de donner un ordre d'idée de l'abondance d'une protéine dans un mélange. Le manque de suivi à chaque étape étant un problème pour la

fiabilité de la quantification, les laboratoires Bio-Rad (Taylor *et al.*, 2013; Taylor and Posch, 2014) ont proposés des méthodologies pour la validation de chacune des étapes, permettant d'augmenter la reproductibilité et la précision. Il existe quelques exemples de quantification par western blot pour des applications en recherche, tels que le dosage de l'expression de l'antigène précoce D de l'Epstein Barr Virus dans différentes lignées cellulaires (Lin, Choi and Pagano, 1985), dont les résultats sont comparables à ceux obtenus par un test ELISA (cf. paragraphe 3.1), ou encore le titrage de certaines protéines responsables de la formation de granules de stress dans des lignées cellulaires cancéreuses (Rollins *et al.*, 2017).

2.2.1.3 Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (CE pour *Capillary Electrophoresis*) est un outil d'analyse et de séparation d'espèces en solution. Son principe rejoint celui de l'électrophorèse sur gel, mais l'électrophorèse capillaire est pratiquée en milieu liquide. Le mélange de protéines à séparer est injecté dans un capillaire de diamètre et de longueur choisis, dépendant de la taille des protéines à analyser. Sous influence d'un champ électrique et au sein d'un tampon de séparation, aussi appelé électrolyte, les protéines sont séparées selon leur rapport charge sur masse (z/m), puis détectées le plus souvent par UV, fluorescence ou spectrométrie de masse. Il existe de nombreuses techniques d'analyses par CE, la plus répandue étant la CE de zone (CZE pour *Capillary Zone Electrophoresis*). Il est également possible de séparer des espèces selon leur point isoélectrique grâce à la focalisation isoélectrique capillaire (cIEF), ou d'étudier l'affinité de complexes non-covalents grâce à la CE d'affinité (ACE). La CE-SDS est également répandue pour l'analyse des protéines en conditions dénaturantes, le SDS permettant de déployer les protéines en brisant les liaisons non-covalentes à l'origine de leur structure tridimensionnelle.

La CE est de plus en plus employée en protéomique grâce à ses hautes performances séparatives, à sa grande sensibilité (nécessaire dans le cas de la détection ou du dosage de protéines très peu abondantes en matrices complexes) et à sa faible consommation d'échantillon (quelques picomoles de protéines suffisent à une analyse) (Guzman, Blanc and Phillips, 2008; van Tricht *et al.*, 2015).

Le dosage de protéines par CE a récemment été décrit. La CE couplée à la spectrométrie de masse (CE-MS) a permis la quantification relative du profil de glycosylation de divers Acms (Giorgetti *et al.*, 2018). Couplée avec un détecteur par fluorescence, elle a aussi permis de quantifier des peptides β amyloïdes dans le fluide cérébrospinal, biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer (Crosnier de Lassichère *et al.*, 2018). Pour cette dernière étude, une limite de quantification de 0.05 nM a été obtenue et les résultats sont aussi satisfaisants que ceux obtenus par ELISA (cf. paragraphe 3.1), mais comme la CE ne nécessite pas d'anticorps et offre une limite de quantification très basse, elle est présentée comme plus avantageuse. Les inconvénients majeurs de la CE sont son manque de répétabilité et son manque de

robustesse. Ces problèmes sont en partie résolus par la chromatographie, décrite dans le paragraphe suivant.

2.2.1.4 Chromatographie en phase liquide par détection UV

La chromatographie en phase liquide (LC pour *Liquid Chromatography*) est la méthode séparative la plus utilisée en biochimie et en chimie analytique. Elle permet la séparation de composés migrant dans un liquide (phase mobile) au travers d'une phase solide (phase stationnaire), contenue dans une colonne chromatographique. La séparation est effectuée grâce aux interactions chimiques ou physiques des analytes avec les phases mobile et stationnaire. La détection est généralement réalisée par UV-visible, fluorescence ou spectrométrie de masse. Il existe de nombreux types de LC, parmi lesquels on peut citer :

- La **chromatographie de partage** : la séparation s'opère en fonction de la polarité des composés analysés. Elle peut être de deux sortes :
 - En *mode normal*, la phase stationnaire est polaire et la phase mobile est apolaire. Les composés les plus polaires seront donc les plus retenus par la phase stationnaire, donc les derniers à être élués.
 - En *mode inverse*, la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile est polaire. Les composés les plus hydrophobes seront les plus retenus par la colonne chromatographique. Cette technique est extrêmement répandue pour l'analyse de peptides et de protéines, en raison de leur caractère hydrophobe.
- La **chromatographie d'affinité** : elle est basée sur des interactions biologiques entre un ligand spécifique (greffé sur la phase stationnaire) et son substrat, la protéine à analyser.
- La **chromatographie par exclusion stérique** : elle permet une séparation des protéines en fonction de leur taille.
- La **chromatographie par échange d'ions** : elle permet une séparation des protéines en fonction de leur charge.

La chromatographie peut être à haute performance (HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography*), voire à très haute performance (UHPLC pour *Ultra High Performance Liquid Chromatography*). Lorsqu'elle est utilisée seule, sans couplage, elle permet la quantification relative des protéines, en mesurant l'intensité du signal détecté ou l'aire sous les pics chromatographiques. L'abondance d'une protéine par rapport à d'autres peut ainsi être estimée dans un échantillon contenant un mélange de protéines variées. Cette méthode ne permet pas une quantification précise ni absolue, mais elle est spécifique, robuste, répétable et facile à mettre en œuvre. Elle a par exemple permis la quantification de protéines des adénovirus de types 26 et 35, utilisés comme vecteur pour la fabrication de vaccins, grâce à la mesure de l'aire sous les pics (van Tricht *et al.*, 2018).

La HPLC ou UHPLC en phase inverse (RP-HPLC pour *Reverse Phase-HPLC*) est très souvent utilisée en couplage avec la spectrométrie de masse pour l'analyse des peptides et protéines. Il est également possible de coupler plusieurs types de chromatographies différents (échange d'ions et RP-HPLC, exclusion stérique et RP-HPLC par exemple), afin d'améliorer les performances de la séparation et de la quantification (Donato *et al.*, 2011).

2.2.2 Quantification relative par spectrométrie de masse

La quantification des protéines par spectrométrie de masse est le fruit d'une succession d'étapes préparatoires puis analytiques, schématisées chronologiquement par le processus de la Figure 14.

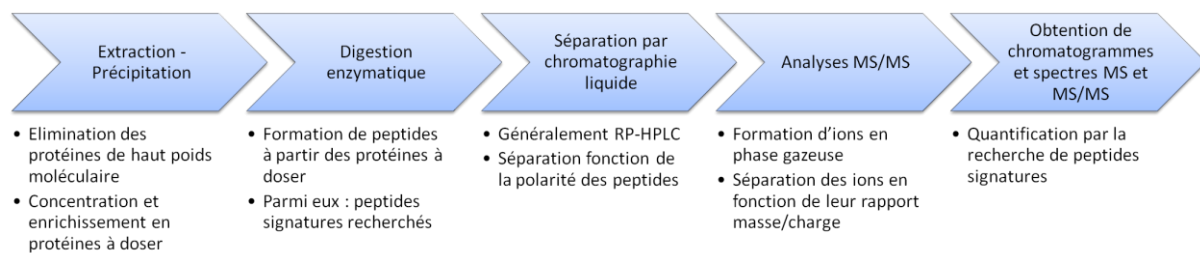


Figure 14. Processus de quantification par spectrométrie de masse.

RP-HPLC : *Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography* (chromatographie liquide haute performance en phase inverse), MS/MS : *tandem mass spectrometry* (spectrométrie de masse en tandem).

Tout d'abord, les protéines et peptides en mélange complexe (sérum, plasma, urine, salive, etc) sont extraites et/ou précipitées afin de les concentrer pour une sensibilité d'analyse plus élevée. Puis, lorsque les protéines à quantifier sont de taille importante (anticorps monoclonaux par exemple), une digestion enzymatique de ces protéines en peptides est nécessaire afin qu'elles puissent être séparées puis détectées par le spectromètre de masse. Une fois ces étapes préparatoires effectuées, les protéines digérées sont séparées par un système dit « d'introduction », le plus courant étant la chromatographie liquide haute performance (HPLC). Enfin, les protéines sont analysées puis quantifiées par spectrométrie de masse (MS). Chaque étape sera explicitée ci-après, dans l'ordre chronologique du passage des protéines.

2.2.2.1 Préparation des échantillons

Si l'on s'intéresse exclusivement au dosage des protéines en milieu complexe (sérum, plasma), des étapes préparatoires sont nécessaires avant l'analyse par MS (Figure 15). Une première étape d'enrichissement peut être réalisée, avant la digestion enzymatique des protéines de grandes tailles.

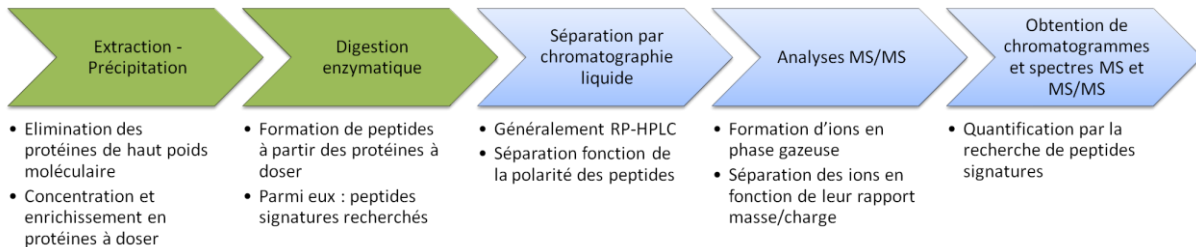


Figure 15. Les premières étapes du processus de quantification par spectrométrie de masse sont la préparation d'échantillon : enrichissement par extraction ou précipitation, puis digestion.

De nombreuses techniques d'enrichissement existent, en fonction de l'abondance des analytes à doser (Figure 16). Elles ont pour but de concentrer l'échantillon pour augmenter la sensibilité analytique. Elles permettent d'améliorer la reproductibilité des dosages, le profil des pics chromatographiques des analytes peu abondants, les limites de détection et de quantification, ainsi que d'augmenter la quantité d'échantillon injectée.

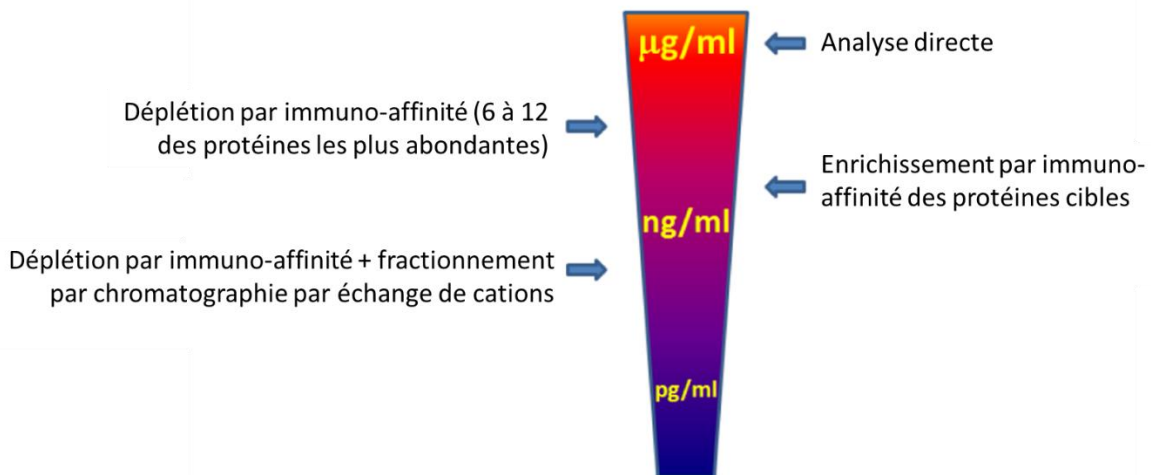


Figure 16. Exemple de quelques stratégies de préparation d'échantillons et de leur sensibilité de détection pour l'analyse de protéines dans le plasma ou le sérum.
D'après Pan et al., 2009.

- **Précipitation des protéines :**

Quand les protéines ou peptides d'intérêt sont de bas poids moléculaire, une simple précipitation des protéines (c'est-à-dire sans digestion enzymatique) est effectuée pour la préparation d'échantillon, à l'aide d'un solvant volatile (acétonitrile, acétone...) ou d'autres solvants (acide trichloracétique, sulfate d'ammonium). (Lehmann *et al.*, 2013)

- **Extraction en phase solide :**

Il s'agit d'une technique de préparation d'échantillon basée sur la chromatographie d'adsorption, c'est-à-dire la chromatographie de partage en mode normal ou inverse, par échange d'ions ou par immuno-affinité. C'est une méthode rapide pour extraire sélectivement, concentrer et purifier des analytes cibles. Les peptides et protéines pouvant créer des interférences sont éliminés sélectivement de la colonne durant les étapes de lavage et les analytes d'intérêt sont élués dans un extrait hautement enrichi. (Lehmann *et al.*, 2013)

- **Extraction ou déplétion par immuno-affinité :**

L'immuno-capture implique des interactions non-covalentes entre des anticorps monoclonaux (Acms) et les protéines ou peptides d'intérêt. Les Acms purifiés sont immobilisés sur un support solide (agarose poreux, billes magnétiques). Les échantillons complexes (sérum, urine) sont ensuite ajoutés sur le support solide et les protéines cibles se fixent spécifiquement sur les Acms immobilisés. Les composants de la matrice non liés aux Acms sont éliminés par des étapes de lavage. Puis, les molécules cibles capturées sont éluées et récupérées dans un échantillon enrichi en analytes à doser, de l'ordre du ng/mL (Figure 16). (Lehmann *et al.*, 2013)

Lorsque des protéines de haut poids moléculaire (HAP pour *High Abundance Proteins*) sont présentes dans l'échantillon, elles peuvent masquer la détection des protéines moins abondantes. Les HAP sont présentes à des concentrations de l'ordre du g/L dans le plasma, la principale étant l'albumine (40 g/L). Les protéines et peptides moins abondants, tels que les cytokines, sont présents à des concentrations de l'ordre du ng/L. Pour pouvoir les détecter, il est nécessaire de dépléter les HAP du milieu par immuno-affinité (Figure 16). L'immunoprécipitation, à l'aide d'anticorps immobilisés, est la déplétion la plus commune. (Lehmann *et al.*, 2013)

- **Digestion enzymatique :**

Les protéines sont des molécules de poids moléculaire élevé (150 kDa pour un Acms par exemple). Or, les spectromètres de masse habituellement utilisés pour la quantification présentent une gamme dynamique étroite, ne permettant pas l'étude des protéines de grandes tailles sous leur forme intacte. Ainsi, une digestion enzymatique des protéines, conduisant à un mélange de nombreux peptides, est nécessaire pour les analyses MS. La digestion la plus communément utilisée est la digestion trypsique. La trypsine est une enzyme qui clive spécifiquement les protéines au niveau des extrémités C-terminales des arginines (notées R) et des lysines (notées K). Son action entraîne l'obtention de nombreux peptides dits « trypsiques », dont la structure en acides aminés présente une lysine ou une arginine à l'extrémité C-terminale. Ces peptides seront ensuite analysés par MS pour la quantification des protéines desquelles ils proviennent. Par extrapolation, la concentration en protéines sera considérée comme identique à celle des peptides. Plusieurs peptides peuvent être dosés simultanément pour moyenniser les résultats obtenus et améliorer la fiabilité du dosage. Le contrôle de cette étape est critique pour réduire les variabilités entre échantillons. Ainsi, il est nécessaire

de maîtriser le ratio protéine:enzyme, le temps d'incubation, la composition du tampon de digestion et le traitement précédant l'étape de digestion (réduction par dithiothréitol, alkylation par iodoacétamide...). (Lehmann *et al.*, 2013)

Toutes ces étapes sont des préambules indispensables pour le dosage des peptides et protéines. Cependant, il est important de noter que chacune d'entre elles peut entraîner des pertes de peptides ou de protéines à doser (fixation des protéines sur les anticorps anti-HAP, précipitation ou extraction partielle, digestion incomplète, etc), ce qui peut introduire un biais dans la quantification.

2.2.2.2 Systèmes d'introduction

Préalablement aux analyses par MS, une étape de séparation des peptides (protéines digérées par voie enzymatique) est nécessaire afin de purifier les analytes d'intérêt et de faciliter le traitement des données obtenues par MS (Figure 17).

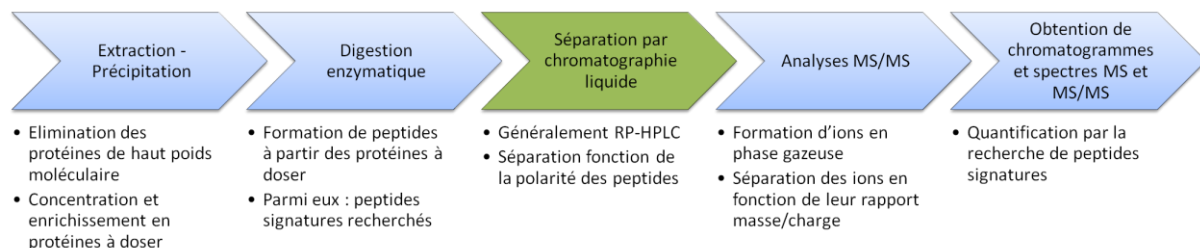


Figure 17. Une étape de purification et de séparation des protéines digérées précède les analyses par MS.

Généralement, la chromatographie liquide est utilisée pour la séparation. Des colonnes de type HPLC ou UHPLC sont les plus fréquemment utilisées. Les colonnes de type UHPLC sont plus performantes que les HPLC, d'où leur large utilisation en protéomique quantitative (Stackhouse, Miller and Gadgil, 2011; Li *et al.*, 2012; Beck *et al.*, 2013; Zhao and Lin, 2014; El Amrani *et al.*, 2016; Vidova and Spacil, 2017). En effet, elles offrent une résolution plus haute pour une meilleure séparation des composés, une sensibilité plus élevée et une vitesse d'analyses plus rapide (Zhao and Lin, 2014). Des systèmes de type nanoLC (*nanoLiquid Chromatography*) ont également été développés afin de miniaturiser la chromatographie. Les avantages de la nanoLC résultent de son très petit diamètre interne, qui permet une faible consommation d'échantillons et améliore la séparation et la sensibilité. Le débit appliqué en nanoLC peut aller du nL/min au µL/min, contrairement aux colonnes classiques pour lesquelles le débit est de l'ordre du mL/min. En revanche, une nanoLC est moins robuste et plus sensible lors de sa manipulation qu'une colonne HPLC (l'interface avec la MS est complexe à manipuler) (Vidova and Spacil, 2017). Par ailleurs, il est important de contrôler le débit en sortie de colonne lors d'un couplage nanoLC-ESI-MS, afin de maintenir un spray stable dans la source d'ionisation. Des sources

nanospray adaptées aux débits des colonnes nanoLC permettent d'assurer la compatibilité entre les deux équipements (nanoLC et source ESI).

En chromatographie, les protéines sont soumises à un gradient de séparation, basé sur la composition d'au moins deux phases mobiles différentes. Généralement, les colonnes de chromatographie utilisées sont en phase inverse (phase stationnaire greffée apolaire, phase mobile polaire), en raison de leur facilité de couplage à la MS (Anderson and Hunter, 2006; Li *et al.*, 2012; Wagner-Rousset *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Bros *et al.*, 2015; Janin-Bussat *et al.*, 2015). Elles permettent la séparation du mélange peptidique en fonction du degré d'hydrophobicité : les molécules les plus hydrophiles sortiront avant les plus hydrophobes. D'autres types de chromatographies, tels que l'échange d'ions, l'hydrophilie, la mobilité ionique, l'exclusion stérique, sont également employés, seuls ou en couplage pour une chromatographie en deux dimensions (2D-LC) (Simon *et al.*, 2014; Ehkirch *et al.*, 2018). Ces couplages sont notamment développés pour l'étude qualitative et quantitative des ADCs, pour déterminer le DAR ou doser les cytotoxiques libres (Ehkirch *et al.*, 2018; Beck *et al.*, 2019).

Il existe d'autres systèmes d'introduction couplés à la spectrométrie de masse, tels que l'électrophorèse capillaire qui est en plein essor (Gahoual *et al.*, 2016; Giorgetti *et al.*, 2018), la résonance plasmonique de surface (Visser and Heck, 2008; Musso *et al.*, 2015) et les immuno-dosages (Stauber *et al.*, 2009; Trenchevska, Nelson and Nedelkov, 2016; Lanshoeft, Cianférani and Heudi, 2017). A l'heure actuelle, ces techniques sont encore peu utilisées en protéomique quantitative.

2.2.2.3 Introduction à la spectrométrie de masse

2.2.2.3.1 Généralités

Une fois enrichies, digérées en peptides, puis purifiées et séparées par le système d'introduction, les protéines sont analysées par spectrométrie de masse (Figure 18).

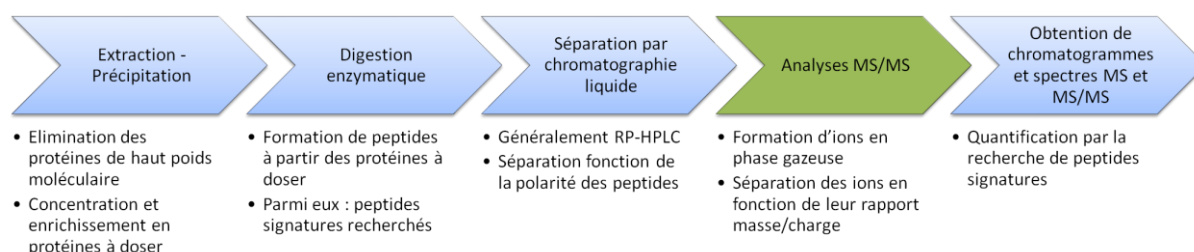


Figure 18. La quantification est réalisée à partir d'analyses MS et MS/MS.

La spectrométrie de masse (MS) est une méthode d'analyse des molécules en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Il existe de nombreux types de spectromètres de masse possédant chacun leurs spécificités, mais la Figure 19 schématise la structure commune à tous.

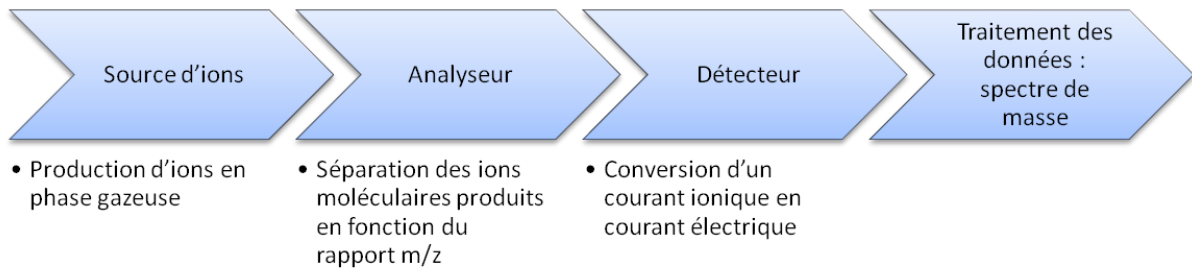


Figure 19. Structure générale d'un spectromètre de masse.

Les analytes sont d'abord injectés dans le spectromètre de masse sous forme liquide, solide ou gazeuse, puis ionisés par la source d'ions. Celle-ci les transforme en ions moléculaires en phase gazeuse. Il existe de nombreux types de sources d'ions et les deux plus fréquentes pour la protéomique sont les sources *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation* (MALDI) et *ElectroSpray Ionization* (ESI). Elles seront détaillées dans le paragraphe 2.2.2.3.2. Les ions moléculaires sont ensuite séparés en fonction de leur rapport m/z dans un analyseur. Il en existe un grand nombre, chacun ayant un mode de séparation spécifique.

Une fois séparés, les ions viennent frapper un détecteur, permettant la conversion d'un courant ionique en un courant électrique, capable d'être lu par le système de traitement des données. Ce dernier va alors tracer un spectre en temps réel, représentant l'intensité des ions moléculaires en fonction du rapport m/z . Sur le spectre, un pic correspond à un ion de charge et de masse données. Une même protéine peut présenter plusieurs pics correspondant à différents états de charge. Il existe plusieurs types de détecteurs, qui ne seront pas détaillés dans ce manuscrit car ils ne représentent pas des éléments clés pour la quantification des protéines.

2.2.2.3.2 Sources d'ionisation les plus courantes

Le rôle de la source d'ionisation est de produire des ions moléculaires en phase gazeuse à partir des molécules à analyser. Sa polarité peut être positive ou négative selon que l'on veut retenir les cations ou les anions, respectivement. Il existe plusieurs moyens de parvenir à la production des ions, définissant différents types de source. Les deux modes d'ionisation les plus couramment utilisés en protéomique sont le MALDI et l'ESI, c'est pourquoi nous nous intéresserons exclusivement à ceux-ci.

- **Source de désorption/ionisation sur matrice assistée par laser :**

La Figure 20 présente le principe de cette source MALDI (pour *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) de manière schématique. Les échantillons de molécules à analyser sont mélangés avec une matrice cristalline ou non, dont la nature dépend de l'analyte. Par exemple, l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) est fréquemment utilisé pour l'analyse de peptides et protéines de masse inférieure à 10 kDa, l'acide sinapinique ou l'acide 2-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque (HABA) sont indiqués pour l'analyse de protéines de masse supérieure à 10 kDa, l'acide 2,5-

dihydroxybenzoïque (DHB) sert à l'étude des carbohydrates, et le 2,4,6-trihydroxyacétophénone (THAP) est utilisé pour l'étude des oligonucléotides de masse inférieure à 3.5 kDa. La concentration finale de l'échantillon à analyser ne doit pas excéder la dizaine de picomoles. Ce mélange est ensuite déposé et séché sur l'un des spots d'une plaque MALDI, laquelle est introduite dans la chambre d'ionisation sous vide du spectromètre de masse. Un faisceau laser vient ensuite frapper l'échantillon, provoquant la désorption de la matrice et de l'échantillon. Cela forme une « plume » dans laquelle les analytes sont ionisés par la matrice grâce à l'énergie d'excitation du laser (Figure 20). (Greaves and Roboz, 2013)

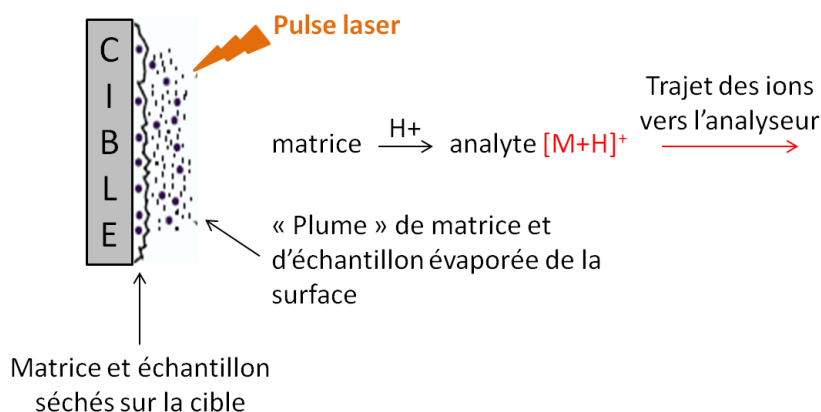


Figure 20. Représentation schématique de la source d'ionisation *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI).

M : la molécule à analyser, H⁺ : un proton. D'après Greaves & Roboz, 2013.

L'ionisation par MALDI permet l'obtention d'ions principalement monochargés, ce qui facilite l'interprétation des spectres MS. De plus, elle consomme peu d'échantillon, d'où sa large utilisation en protéomique lorsque le volume d'échantillon à analyser est limité. Les sources MALDI sont fréquemment couplées à un analyseur de type temps de vol (cf. paragraphe 2.2.2.3.3), pour former un ensemble appelé MALDI-ToF. Ce type d'appareil a une sensibilité de gamme de m/z quasiment illimitée et une précision de masse qui diminue avec l'augmentation des m/z. En raison de la complexité des fluides biologiques, l'approche MALDI-ToF nécessite un préfractionnement ou une purification des analytes d'intérêt avant leur analyse.

Une alternative intéressante au MALDI-ToF est le SELDI-ToF (pour *Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization*), qui utilise des surfaces chromatographiques activées sur les spots des plaques MALDI, pour préfractionner les échantillons de protéines avant la détection. C'est une technique toujours utilisée dans les études protéomiques et pour la recherche de biomarqueurs, malgré son manque de reproductibilité, de précision de masse et de spécificité, surtout dans le cas des protéines peu abondantes. (Greaves and Roboz, 2013; Lehmann *et al.*, 2013)

Les sources MALDI et SELDI nécessitant un support solide, il est impossible de les coupler directement à la chromatographie, ce qui rend difficile leur utilisation en protéomique quantitative. Un couplage hors ligne

reste cependant possible (Luczak, Marczak and Stobiecki, 2014). Il existe également des méthodes de quantification en imagerie par spectrométrie de masse utilisant une source MALDI (Buchberger *et al.*, 2018).

- **Source d'ionisation par électrospray :**

La source ESI (pour *ElectroSpray Ionization*) est constituée de deux tubes concentriques en acier transportant un gaz nébuliseur et l'échantillon à analyser sous forme liquide (Figure 21). Elle fonctionne selon le mode de l'électronébulisation : les analytes sont ionisés grâce à l'action de la chaleur d'un gaz nébuliseur (diazote généralement) et d'un courant électrique, à l'origine de la formation de gouttes. Après nébulisation, un gaz de séchage (diazote généralement) est utilisé pour désolvater les gouttes en gouttelettes. (Greaves and Roboz, 2013)

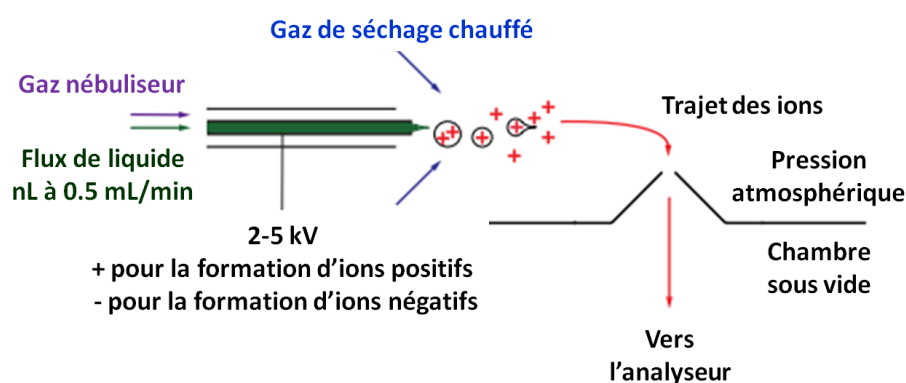


Figure 21. Représentation schématique de la source *Electrospray Ionization* (ESI).
D'après Greaves & Roboz, 2013.

Comme la taille des gouttes diminue, leur densité de charge augmente jusqu'au point où les gouttelettes sont instables. La nébulisation stable du flux de liquide apparaît quand un cône de Taylor est créé à la pointe de la source ESI (Figure 22). En effet, comme les gouttelettes sont séchées, la densité de charges augmente, entraînant la désintégration des gouttelettes par action de forces coulombiennes pour former un cône de Taylor, depuis lequel des ions protonés ou déprotonés sont libérés. Les ions désolvatés libérés de leur matrice liquide se dirigent alors vers la phase gazeuse. Les ions entrent dans l'analyseur en formant un angle pour éviter le passage de molécules neutres. A faible débit, comme en nano-ESI, l'évaporation spontanée est suffisante, le gaz séchant n'est alors pas nécessaire. (Greaves and Roboz, 2013)

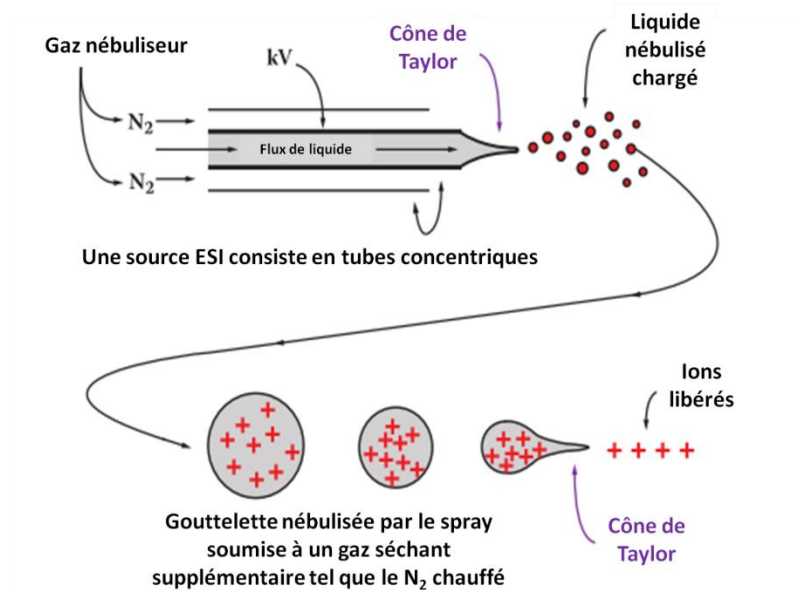


Figure 22. Principe de la formation du cône de Taylor.

D'après Greaves & Roboz, 2013.

La source ESI est la plus répandue et elle est très utilisée en protéomique, en raison de son rendement d'ionisation élevé. De plus, elle permet l'ionisation d'échantillons liquides, offrant la possibilité d'un couplage direct avec la chromatographie liquide ou l'électrophorèse capillaire. La séparation des peptides par chromatographie préalable aux analyses MS est indispensable en quantification, et rend donc la source ESI incontournable dans ce domaine. Par ailleurs, la source ESI peut être facilement couplée à de nombreux types d'analyseurs, les plus courants étant le quadripôle, le temps de vol, le piège à ions ou encore l'Orbitrap.

2.2.2.3.3 Les analyseurs et leurs modes d'acquisition

2.2.2.3.3.1 Analyseurs les plus couramment rencontrés

- **Analyseur de type piège à ions (Ion Trap) :**

Le piège à ions analyse et fragmente des ions dans un unique espace, le « piège », délimité généralement par trois électrodes. Une radiofréquence avec ou sans tension continue est utilisée pour capturer les ions. Un balayage de l'amplitude de la radiofréquence conduit à l'expulsion des ions ayant un m/z spécifique vers le détecteur.

L'analyse en tandem de type MS/MS (ou MS²) est possible après fragmentation des ions en utilisant une radiofréquence correspondant à la fréquence de résonance des ions. Les ions fragments résultant sont ensuite piégés et peuvent eux-mêmes être soumis à des fragmentations successives (MSⁿ). Cet analyseur permet une manipulation aisée des ions et est très efficace pour l'identification de peptides. Il était utilisé dans les premières études quantitatives en protéomique. Cependant, sa gamme dynamique étroite limite son utilisation dans ce domaine. (Greaves and Roboz, 2013; Lehmann *et al.*, 2013)

- **Analyseur de type Orbitrap :**

Le principe de l'analyseur de type Orbitrap est identique à celui du piège à ions, mais sa structure et ses caractéristiques diffèrent. Il est constitué de deux électrodes, une interne fusiforme placée co-axialement dans une autre, externe et fendue, résultant en un courant électrostatique quadri-logarithmique (Figure 23). Les ions sont injectés dans le centre du piège en formant un angle. Ils suivent alors une trajectoire complexe : ils adoptent à la fois un mouvement rotatif autour de l'électrode interne et une oscillation axiale le long de la même électrode. L'oscillation latérale des ions le long de l'électrode interne induit un courant transitoire dans l'électrode externe. La périodicité de l'oscillation axiale est proportionnelle au m/z des ions. Un courant d'images est généré, enregistré et interprété à l'aide de la Transformée de Fourier, permettant de fournir des valeurs de m/z et des intensités. (Greaves and Roboz, 2013; Lehmann *et al.*, 2013)

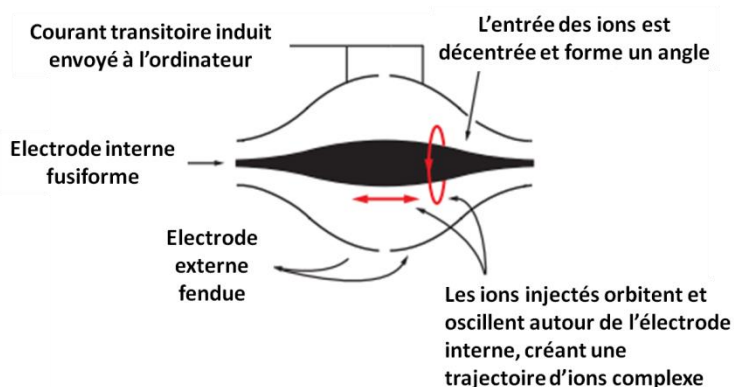


Figure 23. Structure schématique d'un analyseur de type Orbitrap.

D'après Greaves & Roboz, 2013.

Sa haute résolution peut atteindre 200 000, ce qui est supérieur à tous les autres types d'analyseurs (excepté l'analyseur à résonance cyclotronique ionique). L'Orbitrap présente une haute précision de masse et une large gamme dynamique (> 1000). Cependant, le nombre d'ions qu'il peut contenir est limité, ce qui peut altérer la détection de composés peu abondants (Greaves and Roboz, 2013).

- **Analyseur de type quadripolaire (Q) :**

L'analyseur quadripolaire est constitué de quatre électrodes métalliques parallèles (Figure 24). Lorsqu'un potentiel φ_0 est appliqué, un champ quadripolaire est créé entre les électrodes. Comme elles sont raccordées électriquement deux à deux, deux sont soumises au potentiel φ_0 et les deux autres au potentiel $-\varphi_0$. La polarité des électrodes est rapidement inversée, ce qui confère aux ions une trajectoire oscillante. Certains auront une trajectoire stable et atteindront le détecteur. D'autres heurteront le pré-filtre (relié électriquement à l'analyseur), les électrodes ou les parois du spectromètre, se déchargeront et seront entraînés par le système de pompage, sans jamais atteindre le détecteur. (Bouchonnet, 2009; Greaves and Roboz, 2013)

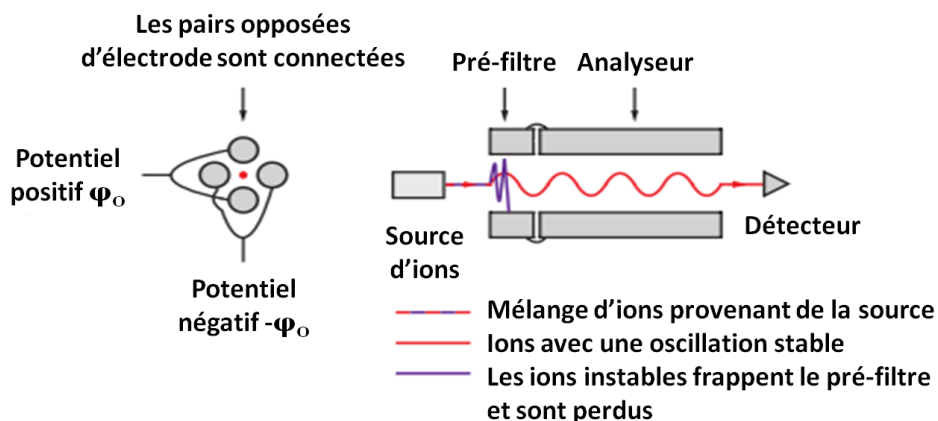


Figure 24. Représentation schématique d'un analyseur quadripolaire.
D'après Greaves & Roboz, 2013.

Le quadripôle est fréquemment couplé à d'autres analyseurs pour former des systèmes hybrides de type MS/MS. On le retrouve couramment associé à un analyseur de type temps de vol (Q-ToF), à deux autres quadripôles (triple quadripôle, QQQ), à un Orbitrap (Q-Orbitrap), ou encore à un piège à ions (Q-Trap). Le triple quadripôle est la configuration la plus utilisée pour la quantification en protéomique. Il offre une haute sensibilité et une très bonne sélectivité, même dans des mélanges complexes. (Lehmann *et al.*, 2013)

- **Analyseur de type temps de vol (ToF pour *Time of Flight*) :**

Un analyseur de type temps de vol sépare les ions en fonction du temps qu'ils mettent à parcourir une zone de vol, jusqu'au détecteur (Figure 25). Les molécules ionisées par la source arrivent dans la zone d'accélération où elles sont soumises à une différence de potentiel V , ce qui leur permet d'acquérir une énergie cinétique. Les ions peuvent alors parcourir la zone de vol, qui est sous vide et libre de champ, grâce à la vitesse acquise dans la zone d'accélération. La séparation est effectuée à cette étape : les ions les moins lourds arrivent en premier au détecteur situé à l'extrémité de l'appareil. La séparation est donc effectuée uniquement en fonction de la masse des ions, leur charge étant constante. (Bouchonnet, 2009)

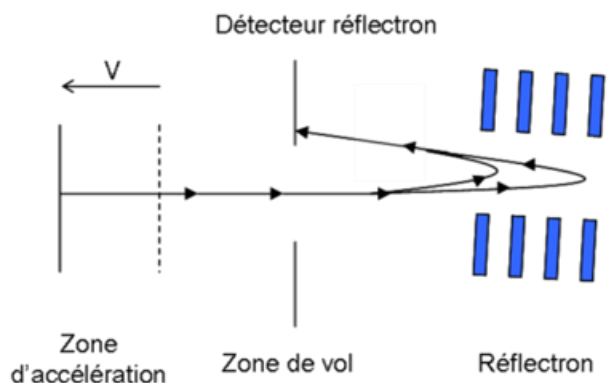


Figure 25. Représentation schématique d'un analyseur de type temps de vol.
 V : différence de potentiel appliquée entre les deux grilles de la zone d'accélération. D'après Wikipedia, source choisie pour la clarté de l'iconographie.

Afin d'augmenter la résolution de la méthode, un réflecteur électrostatique ou réflectron équipe systématiquement les analyseurs à temps de vol. Sans l'utilisation du mode réflecteur, le ToF présente de faibles résolution et précision de masse mais une bonne sensibilité. Le réflectron permet d'améliorer la résolution des pics obtenus mais diminue grandement la sensibilité, en raison de la perte des plus petits ions lors de la seconde accélération qu'il implique.

2.2.2.3.3.2 Spectromètres de masse en tandem

Pour les analyses de protéomique quantitative, ce sont principalement des spectromètres de masse en tandem (MS/MS) qui sont employés. Ils ont pour rôle de fragmenter les ions, afin d'obtenir un niveau d'information supplémentaire, allant de la MS/MS ou MS² à la MSⁿ. Une analyse en tandem peut être réalisée au sein d'un unique analyseur, comme c'est le cas du piège à ions (cf. paragraphe 2.2.2.3.3.1). Il est également possible de coupler plusieurs analyseurs, conduisant à un appareil dont la structure est décrite ci-dessous.

• Structure générale

A la différence d'un spectromètre de masse simple (Figure 19), un spectromètre de masse en tandem possède de surcroît une cellule de collision, un second analyseur et un second détecteur (Figure 26).

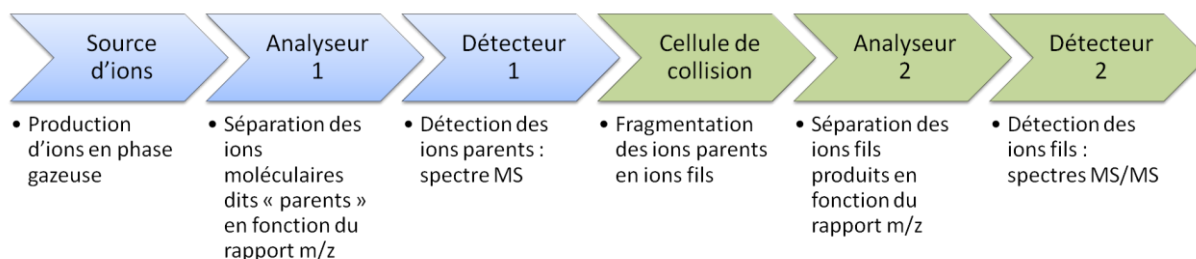


Figure 26. Structure schématique d'un spectromètre de masse en tandem (MS/MS).

Les cellules vertes représentent les différences observées avec un spectromètre de masse simple (Figure 19).

Les ions sont d'abord acheminés vers le premier analyseur, qui les trie, les sépare et isole ceux ayant un rapport m/z préalablement défini (ou étant contenus dans une gamme de m/z préalablement définie). Ces ions présélectionnés sont appelés « ions parents » ou « ions précurseurs ». Les ions parents sont ensuite acheminés vers une cellule de collision dans laquelle ils sont fragmentés en « ions fils » (ou « ions fragments ») par un gaz inerte tel que l'argon ou le diazote. Le deuxième analyseur a pour rôle de séparer, voire d'isoler ces ions fils, qui seront ensuite détectés (ou à nouveau fragmentés dans le cas d'une MSⁿ). Deux spectres sont donc enregistrés : le spectre MS des ions parents et le spectre MS/MS des ions fils.

- **Analyseur de type quadripôle couplé à un temps de vol (Q-ToF) :**

Dans ce cas, le premier analyseur est un quadripôle et le second un temps de vol. Il s'agit d'un système MS à haute résolution (HRMS pour *High Resolution Mass Spectrometry*) qui combine la sélectivité et la spécificité du quadripôle avec la grande précision de masse, la haute résolution et la grande vitesse d'analyse du ToF. Avec ce type d'appareil, il est notamment possible de réaliser des cartes peptidiques, pour lesquelles il n'y a pas de présélection des ions parents et des ions fils (mode *full scan*). Ces analyses de très haute résolution, appelées « *bottom-up* », offrent la possibilité de déterminer la structure globale d'une protéine.

- **Analyseur de type quadripôle couplé à un Orbitrap (Q-Orbitrap) :**

Dans ce cas, le premier analyseur est un quadripôle et le second un Orbitrap. Ce type d'appareil associe la sélectivité et la spécificité du quadripôle à la haute résolution et la bonne précision en masse de l'Orbitrap. Il est adapté aux modes d'acquisition de la protéomique quantitative (SRM, MRM, cf. paragraphe 2.2.2.3.3.4), et moins onéreux que le Q-ToF, donc utilisé pour le dosage de protéines (Hanke *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2009).

- **Analyseur de type triple quadripolaire (QQQ) :**

Dans ce cas, les deux analyseurs et la cellule de collision sont des quadripôles. Ce système présente une grande sensibilité qui permet de caractériser structuralement des protéines d'intérêt et de les quantifier de manière sélective, sensible et spécifique. C'est l'appareil phare pour les modes d'acquisition des données en protéomique quantitative (SRM, MRM, cf. paragraphe 2.2.2.3.3.4), d'où sa large utilisation dans ce domaine (Li *et al.*, 2012; Heudi *et al.*, 2014; Lassman *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

2.2.2.3.3 Comparaisons entre les différents types d'analyseurs

Le Tableau I résume les caractéristiques des différents spectromètres de masse utilisés pour la quantification de peptides et protéines.

Tableau I. Les différents types de spectromètres de masse et leurs caractéristiques au regard de la quantification en protéomique.

n/a : non applicable, SRM : *Selected Reaction Monitoring*, MRM : *Multiple Reaction Monitoring*. D'après Lehmann et al., 2013.

	QQQ	Q-ToF	Q-Orbitrap	Piège à ions	Orbitrap	MALDI-ToF/ToF
Sélectivité/spécificité	Elevé	Très élevé	Très élevé	Elevé	Très élevé	Très élevé
Gamme dynamique	Très élevé	Elevé	Elevé	Faible	Moyen	Moyen
SRM/MRM	Très élevé	n/a	Elevé	Elevé	n/a	n/a
Profile/Full scan	Faible	Très élevé	Très élevé	Faible	Elevé	n/a
Robustesse	Très élevé	Moyen	Moyen	Très élevé	Moyen	Elevé
Coût	+++	++++	+++	++	+++	+++
Utilisation en quantification	Très élevé	Elevé	Elevé	Faible	Moyen	Faible

Ces données indiquent que l'analyseur de type triple quadripolaire, équipé d'une source ESI, est le plus adapté pour des analyses quantitatives en protéomique. Il s'agit du système le plus fréquemment utilisé, en raison de sa grande sensibilité de détection et de sa haute sélectivité. L'un des problèmes des analyseurs de types temps de vol et piège à ions pour la quantification, spécifiquement dans la perspective d'analyses multiplexes, est leur gamme dynamique étroite (Lehmann *et al.*, 2013). Par ailleurs, les modes d'acquisition appelés SRM et MRM sont les plus adaptés aux mesures quantitatives. Or, ils ne sont pas applicables sur certains appareils (Orbitrap, MALDI-ToF, etc.), contrairement au QQQ. Détaillons ce dernier point.

2.2.2.3.3.4 Les différents modes d'acquisition en MS

Il existe différentes approches pour la MS quantitative. La première est dite à l'aveugle (*shotgun* ou *discovery proteomics*) et est utilisée pour les étapes de recherche exploratoire. La deuxième, appelée protéomique ciblée (*targeted proteomics*), est destinée au dosage de protéines connues et recherchées. Ces deux stratégies font intervenir différents modes d'acquisition des données par MS (Shi *et al.*, 2016; Vidova and Spacil, 2017).

- **Data Dependent Acquisition (DDA) :**

Ce mode est utilisé pour la *shotgun proteomics*. Dans ce cas, un nombre fixe d'ions précurseurs est présélectionné avant l'analyse par MS, puis fragmenté par MS/MS selon une deuxième sélection en masse. Les spectres d'ions fils résultant sont ensuite assignés aux séquences peptidiques leur correspondant par comparaison avec des bases de données. Cette approche est peu précise et sélective et elle est aujourd'hui peu utilisée en protéomique quantitative.

- **Selected Reaction Monitoring (SRM) :**

Ce mode est utilisé en protéomique ciblée puisqu'il permet de présélectionner des ions parents et des ions fils connus et recherchés (Figure 27A). Au couple ion parent > ion fils est associée une transition. Chacune de ces transitions sera analysée en MS/MS. Un dérivé de ce mode est le **Multiple Reaction Monitoring (MRM)**, avec lequel un même ion parent peut avoir plusieurs ions fils. Les appareils de type triple quadripôle sont les plus adaptés à ce mode, grâce à leur très haute sélectivité et à leur bonne sensibilité. Cependant, ce n'est pas limité à ce type d'analyseur puisque une quantification SRM avec un Q-ToF a montré des résultats similaires à ceux obtenus avec un QQQ, en termes de linéarité et de précision, offrant des données qualitatives et quantitatives en une seule analyse (Lanshoeft, Wolf, Heudi, *et al.*, 2016). Ce mode, en éliminant au maximum l'effet matrice, permet d'augmenter la sensibilité et la sélectivité des analyses d'un à deux ordres de grandeur par rapport au mode *full scan* (Anderson and Hunter, 2006; Lange *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2012). C'est le mode le plus utilisé en MS quantitative, mais en raison du manque de résolution des triples quadripôles, des modes compatibles avec des spectromètres de masse à haute résolution ont été développés.

- **Parallel Reaction Monitoring (PRM) :**

Plus récemment, des spectromètres de masse hybrides, dans lesquels le troisième quadripôle est substitué par un analyseur de masse à hautes résolution et précision en masse (HR/AM pour *High Resolution and Accurate Mass*), ont été développés pour effectuer de la quantification ciblée. Ces appareils peuvent être soit de type Quadripôle-Orbitrap (QqOrbitrap) (Gallien *et al.*, 2012; Bourmaud, Gallien and Domon, 2016), soit Quadripôle-Temps de vol (QqToF) (Schilling *et al.*, 2015). Le mode PRM est utilisé pour la quantification à partir de ces appareils. Avec ce mode, les deux premières étapes sont identiques au mode SRM, à savoir présélection d'ions parents

dans le premier quadripôle et fragmentation en ions fils dans le deuxième (Figure 27A). La troisième étape diffère, puisque tous les ions fils sont analysés par un Orbitrap ou un ToF (on parle de spectres MS/MS entiers ou *full MS/MS*). La sélection des ions pour la quantification se fait après l'acquisition. Ce mode offre les avantages d'une haute résolution et d'une bonne précision en masse, donc d'une quantification très précise, et d'une capacité de multiplexage bien supérieure aux modes SRM ou MRM (entre 1 et 1000 peptides analysés simultanément avec le mode PRM).

L'inconvénient majeur des modes SRM, MRM et PRM est leur capacité de multiplexage limitée. Même si le mode PRM permet d'augmenter le nombre de peptides analysés, une perte de sensibilité est observée avec l'augmentation du degré de multiplexage (Shi *et al.*, 2016).

- **Data Independent Acquisition (DIA) :**

Le mode DIA permet de pallier au problème de multiplexage. En effet, tous les ions d'une gamme de masse sélectionnée par MS (encadrant le m/z de tous les peptides suivis) sont fragmentés par MS/MS et tous les ions fils obtenus sont analysés par un appareil de très haute résolution, permettant de faire du *shotgun proteomics* (Figure 27A). Les spectromètres de masse adaptés à ce mode sont les mêmes que pour le PRM, à savoir le QqOrbitrap ou le QqToF.

Il existe un mode DIA adapté à la protéomique ciblée, appelé SWATH-MS pour « *Sequential Windowed data independent Acquisition of the Total High-resolution Mass Spectra* » (Gillet *et al.*, 2012). Avec cette méthode, des spectres MS/MS sont enregistrés sur des gammes de masse d'ions précurseurs de 25 Da sélectionnées de façon consécutive, sur une gamme de masse de 400 à 1200 m/z par exemple (425, 450, 475, 500 m/z , etc). Cette stratégie offre un niveau de multiplexage maximal, puisque tous les ions qui entrent dans le spectromètre de masse sont analysés et détectés. En revanche, une perte de sensibilité est observée, puisque seuls les ions les plus intenses seront détectés. La majeure difficulté de ce mode réside dans l'analyse et l'interprétation de la grande quantité de données produites. Quelques logiciels ont été développés pour faciliter ce traitement de données, comme OpenSWATH (Röst *et al.*, 2014), mais il demeure difficile.

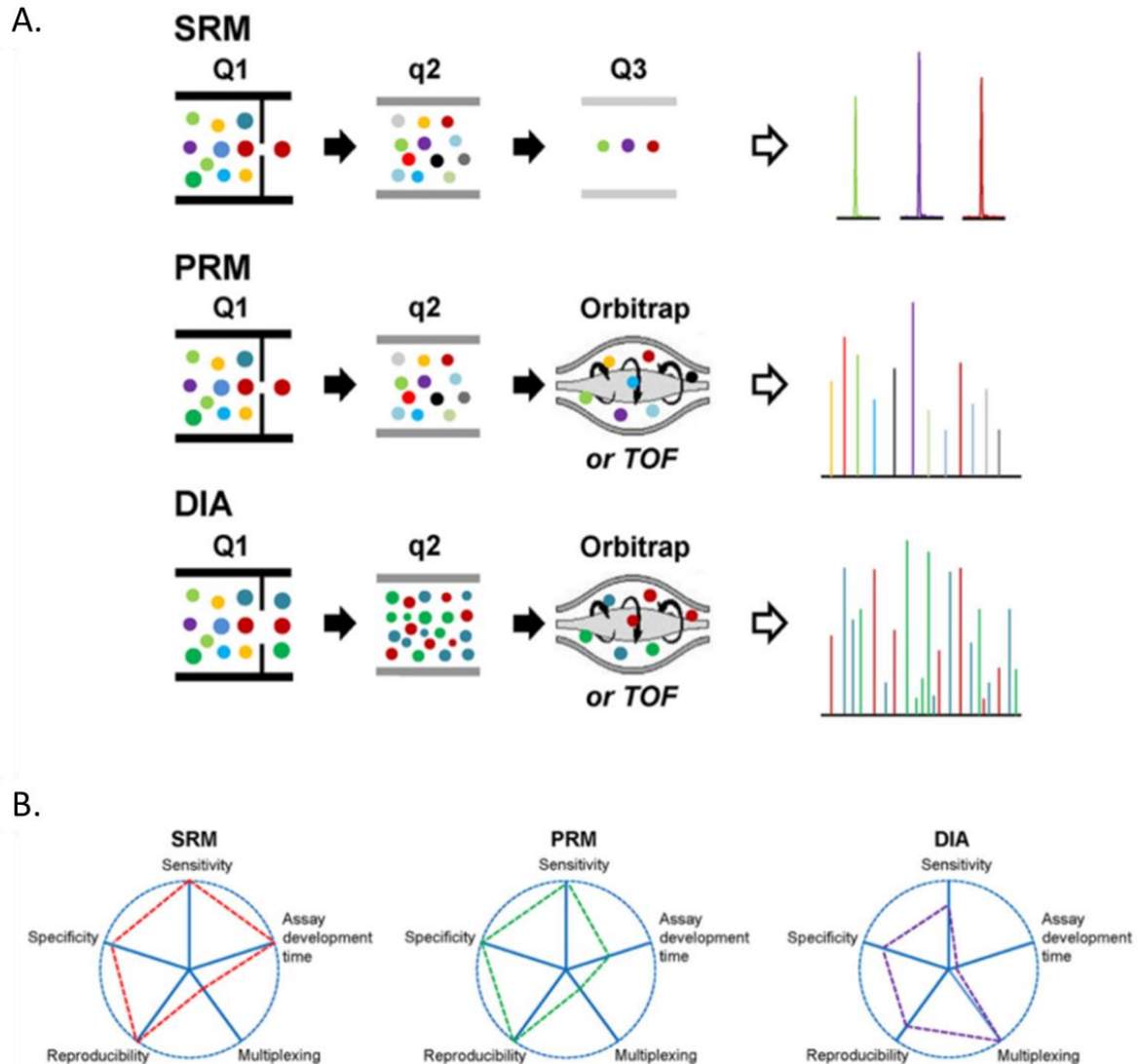


Figure 27. Les différents modes d'acquisition en protéomique quantitative.

A. Représentation schématique des modes SRM, PRM et DIA. Dans le mode SRM, l'ion précurseur d'un peptide spécifique est sélectionné dans le premier quadripôle (Q1), puis transmis dans le second quadripôle (Q2) pour fragmentation. Les ions fils produits sont sélectionnés (généralement trois) dans le troisième quadripôle (Q3) pour la détection. Dans le mode PRM, les deux premières étapes sont identiques au mode SRM, mais dans la dernière étape, tous les ions fragments issus du peptide cible sont analysés par spectrométrie de masse haute résolution (Orbitrap ou ToF). Dans le mode DIA, tous les ions contenus dans une gamme de m/z définie sont isolés dans le Q1, fragmentés dans le Q2 et le mélange complexe de tous les ions produits sont analysés par MS à haute résolution. **B.** Comparaisons des performances de quantification des modes SRM, PRM et DIA. Dans les diagrammes, chaque variable analytique est représentée par un rayon (qui part du centre). Sa longueur indique l'ordre de grandeur des variables. Le mode PRM présente une capacité multiplexe similaire au mode SRM, mais avec une plus grande spécificité due à l'utilisation d'un spectromètre de masse haute résolution pour analyser les ions fils. SRM : *Selected Reaction Monitoring*, PRM : *Parallel Reaction Monitoring*, DIA : *Data Independent Acquisition*. D'après Shi et al., 2016.

Si l'on compare les trois modes principaux utilisés pour la protéomique ciblée (SRM, PRM et DIA) (Figure 27B), il est clair que l'avantage majeur du mode DIA est sa grande capacité de multiplexage (Shi *et al.*, 2016). Cet atout est obtenu au détriment de la sensibilité, de la spécificité et de la

reproductibilité des analyses. Ces caractéristiques sont par contre les points forts des approches SRM et PRM. La spécificité du mode PRM est un peu supérieure à celle du mode SRM, en raison de l'utilisation d'un spectromètre de masse haute résolution pour analyser les ions fils. En revanche, le temps de développement d'une méthode par SRM est inférieur à celui par PRM.

Une comparaison des quatre modes d'acquisition DDA, DIA, MRM et PRM a été effectuée grâce au dosage, par ces quatre approches, d'ATP kinases chez des patients atteints d'un cancer du poumon et traités avec un inhibiteur de kinase (Hoffman *et al.*, 2018). Le mode DIA a permis d'augmenter de 21% le nombre de kinases identifiées par rapport au DDA, mais la quantification avec ces deux modes était de moins bonne qualité que celle obtenue en MRM ou PRM. Les modes MRM et PRM étaient, eux, plus adaptés pour évaluer la réponse des patients au traitement, grâce à des données quantitatives plus précises. Une meilleure reproductibilité a été obtenue avec le mode PRM grâce à la haute résolution, alors que le mode MRM a offert une sensibilité plus élevée, en détectant de courts peptides, doublement chargés.

En fonction du type d'analyses à effectuer, il faut au préalable définir le mode le plus adapté. Il existe alors de nombreuses manières de quantifier un échantillon : de manière absolue ou relative, avec étalonnage interne, avec marquage isotopique, etc.

2.2.2.4 Les différentes stratégies de quantification semi-quantitative par MS

2.2.2.4.1 Quantification relative par marquage isotopique

2.2.2.4.1.1 Marquage métabolique

Une première stratégie, appelée SILAC (pour *Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*), correspond au marquage isotopique stable des acides aminés dans des cellules (Ong *et al.*, 2002). Pour ce faire, des cellules d'intérêts (de patients malades par exemple) et des cellules contrôles (de patients sains) sont mises en culture dans deux conditions différentes : l'une avec des acides aminés non marqués (isotopes légers) et l'autre avec des acides aminés marqués par des isotopes stables du carbone, de l'azote ou de l'hydrogène généralement (C^{13} , N^{15} et deutérium) (Figure 28A).

L'azote 15 est souvent choisi en protéomique en raison de sa faible abondance naturelle (0.37%) (Yu *et al.*, 2019). De plus, les acides aminés lysine et arginine sont couramment marqués (Lanquar *et al.*, 2007; Ong and Mann, 2007), mais un marquage sur la leucine a également été décrit (Jiang and English, 2002; Ong *et al.*, 2002). Le marquage isotopique sur les lysines et les arginines est avantageux par rapport à un marquage sur les leucines, car ce sont des acides aminés tryptiques. En effet, lors d'une digestion à la trypsine (la plus couramment employée), les protéines sont hydrolysées au niveau de leurs arginines et de leurs lysines. Ainsi, tous les peptides issus de cette digestion possèdent soit une seule lysine soit une seule arginine, donc une augmentation de masse de +8 ou +10 Da après marquage isotopique. Dans le cas des leucines marquées, il est nécessaire de connaître le nombre

de résidus contenus par les peptides pour en déduire l'incrément de masse après marquage, ce qui rend le suivi plus complexe.

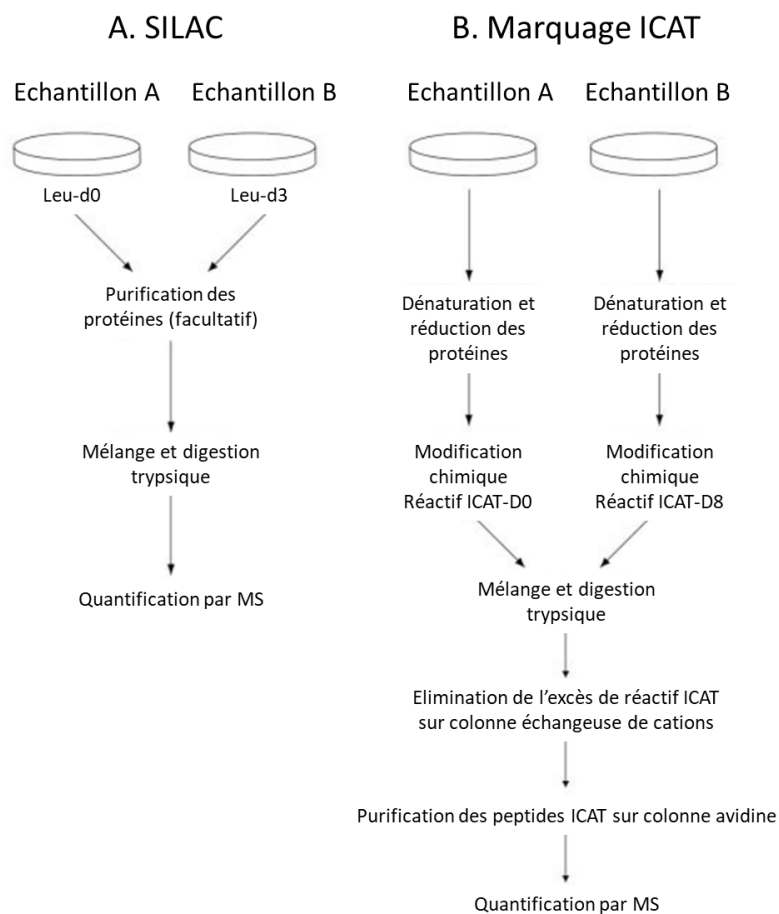


Figure 28. Protocole de mise en application des stratégies de marquage SILAC (avec leucine) et ICAT.

A. Approche SILAC. La culture cellulaire est réalisée dans un milieu contenant soit des leucines normales (d0) soit des leucines marquées au deutérium (d3). Les deux populations de protéines sont mélangées juste après la lyse des cellules, puis analysées par MS pour la quantification. **B.** Approche ICAT. Elle permet d'étudier des protéines qui ne proviennent pas de sources vivantes, mais elle requiert des étapes de modification chimique et de purification par affinité. SILAC : *Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*, ICAT : *Isotope-Coded Affinity Tag*. D'après Ong et al., 2002.

Durant la culture, chacun des deux échantillons de cellules (marqué par SILAC et non marqué) produira les mêmes protéines et/ou peptides. Les propriétés physico-chimiques des protéines marquées ne sont donc pas modifiées, seule leur masse globale diffère de l'échantillon non marqué. Cette différence de masse n'est pas visible sur le chromatogramme (Figure 29A), mais il est possible de distinguer les deux échantillons par spectrométrie de masse (Figure 29B). La quantification relative est basée sur la différence d'abondance entre les deux espèces (lourdes et légères).

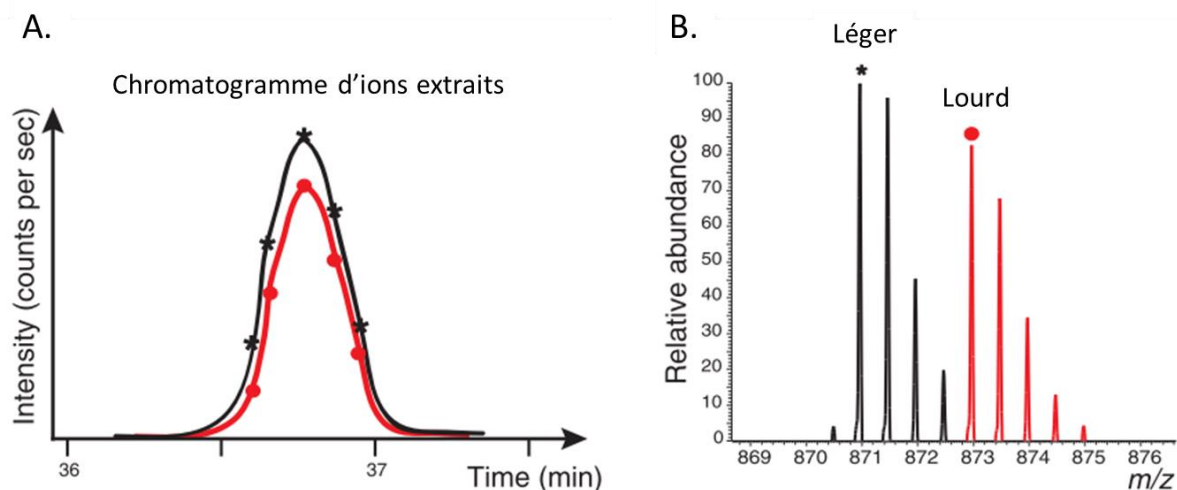


Figure 29. Différences observées entre un peptide et son homologue marqué isotopiquement et utilisé comme étalon interne.

Les graphes présentés ne sont pas issus de données expérimentales. **A.** Chromatogramme d'ions extraits d'un peptide lourd (en rouge) et d'un peptide léger (en noir). Les deux peptides co-éluent, mais leur différence d'intensité (donc d'abondance) est visible. La quantification est effectuée à partir de la différence d'intensité ou d'aire sous les pics des espèces. **B.** Spectre de masse sur lequel sont représentés en noir un peptide non marqué doublement chargé et en rouge un peptide homologue marqué isotopiquement. Le peptide lourd présente une masse de 4 Da de plus que le peptide léger et son abondance correspond à 85% de celle du peptide non marqué. D'après Ong and Mann, 2005.

Le mélange des deux échantillons est réalisé très tôt dans la procédure, ce qui permet de limiter les erreurs de dosage dues à la préparation d'échantillons et aux analyses LC-MS/MS, puisqu'elles se répercutent de la même manière sur les deux conditions (Figure 28A). Le rapport d'intensité des signaux MS des deux espèces donne une information sur la variation d'expression des protéines d'une condition par rapport à une autre. Pour le marquage SILAC, les cellules doivent être sous une seule condition donnée. Or, ce n'est pas toujours le cas, ce qui peut biaiser les quantifications.

2.2.2.4.1.2 Marquage chimique ou enzymatique

Les protéines et peptides peuvent être marqués via différentes réactions enzymatiques ou chimiques. La plus ancienne est l'incorporation d'un atome d'oxygène lourd (O^{18}) dans le groupement carboxyle C-terminal durant la digestion enzymatique en eau lourde (Rose *et al.*, 1983). Des marqueurs de masses isotopiques peuvent également être introduits par réaction chimique sur différents acides aminés. Par exemple, les groupements thiol des chaînes latérales des cystéines peuvent être modifiés par un réactif deutéré appelé ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tag*), pour comparer deux protéomes entre eux (Figure 28B) (Gygi *et al.*, 1999). Le réactif est constitué d'un groupement biotine permettant la purification des peptides par affinité, d'un bras espaceur contenant huit atomes d'hydrogène (léger) ou huit deutériums (lourd) et d'un groupe réactif spécifique des groupements thiol. Cependant, le deutérium a tendance à altérer la migration des espèces en chromatographie. De plus, toutes les protéines ne contiennent pas de résidus cystéines et, quand elles en contiennent, celles-ci peuvent posséder des MPTs, empêchant leur réaction avec ICAT. Ainsi, d'autres approches ont été développées, par marquage au

deutérium des extrémités N-terminales (Münchbach *et al.*, 2000), par estérification des acides carboxyliques à l'aide de méthanol deutéré (Goodlett *et al.*, 2001) ou par marquage au carbone 13, appelé cICAT (*cleavable ICAT*) (Hansen *et al.*, 2003). Dans ce dernier cas, le bras espaceur est clivable en milieu acide, permettant de se débarrasser de la partie biotinylée et d'améliorer la séparation chromatographique.

Une autre approche par marquage chimique a été développée, appelée iTRAQ (pour *isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*). Dans cette technique, des groupements isobares sont liés de façon covalente aux groupements amine des extrémités N-terminales et de la chaîne latérale des acides aminés (lysine) des peptides à quantifier (Ross *et al.*, 2004). Ces groupements sont constitués d'un groupe rapporteur, d'un bras espaceur et d'un agent réactif spécifique des amines primaires, le N-hydroxysuccinimide (NHS) (Figure 30A). La masse du groupe rapporteur varie de 114 à 117 Da et celle du bras espaceur de 28 à 31 Da, en fonction du nombre d'isotopes lourds de carbone, d'azote et d'oxygène incorporés (^{13}C , ^{15}N et ^{18}O) (Figure 30A et B). L'association entre ces deux entités est faite de sorte à ce que les *tags* aient tous une masse identique de 145 Da. Le NHS réagit avec les fonctions amine des peptides, pour former une liaison amide (Figure 30B), ce qui permet de lier les *tags* aux peptides. Cette réaction est effectuée après l'extraction et la digestion tryptique des protéines en peptides. Lorsque des peptides identiques sont liés à différents *tags*, ils présentent la même masse et la même hydrophobicité, donc leur séparation par chromatographie n'est pas altérée. De plus, ils sont visibles comme un seul et même peptide en MS (Figure 30C). En revanche, après fragmentation dans le spectromètre de masse (par Collision Induite par Dissociation (CID)), les liaisons amide se brisent, le bras espaceur est perdu et les groupements rapporteurs sont libérés dans le spectromètre de masse. Une quantification indirecte et relative des peptides peut ainsi être réalisée, en comparant les intensités des groupes rapporteurs entre elles. Généralement, les analyses sont effectuées avec un MALDI-ToF/ToF.

Il est également possible de faire de la quantification absolue avec cette méthode. Dans ce cas, un *tag* réagit avec une concentration connue d'un peptide spécifique utilisé comme étalon interne. Son intensité peut ainsi être comparée à celle des autres peptides présents dans l'échantillon et liés à d'autres *tags*.

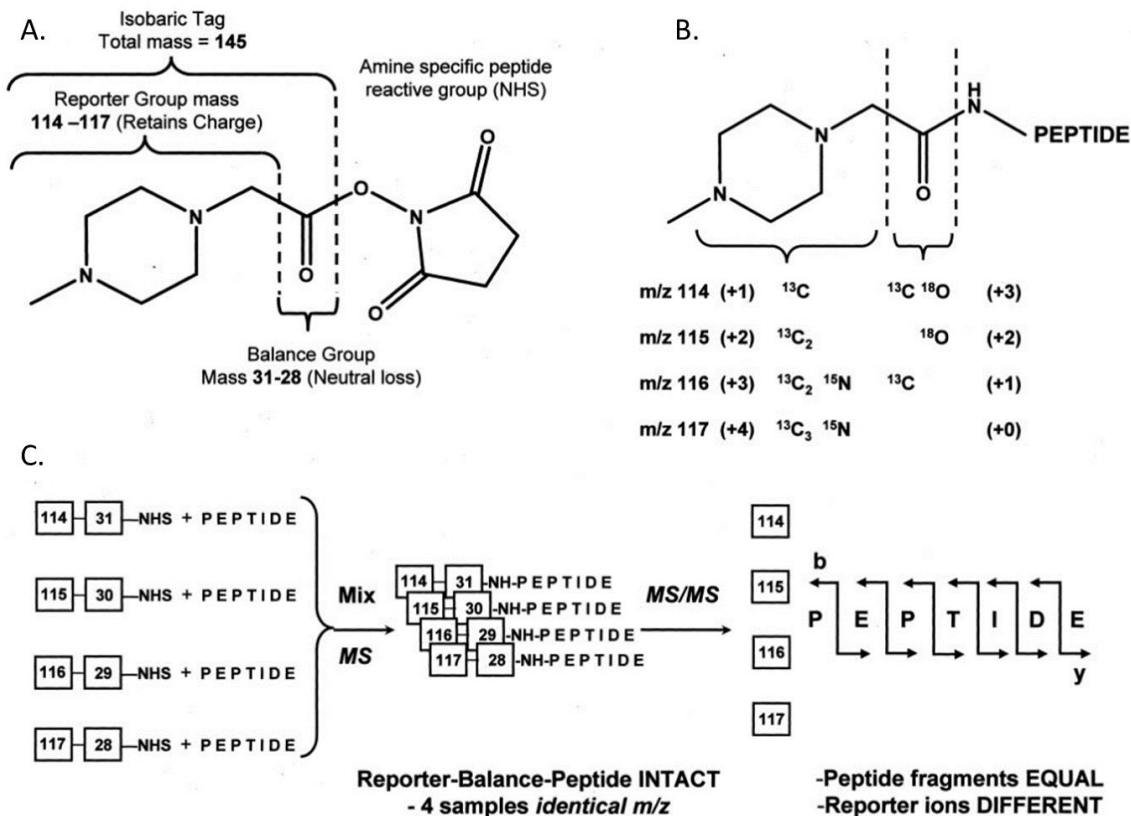


Figure 30. La stratégie iTRAQ.

A. Structure des *tags* isobares. La molécule complète consiste en un groupe « rapporteur » (de type N-méthylpipérazine), un bras espaceur (de type carbonyle) et un groupement réactif aux peptides, un ester de N-hydroxysuccinimide (NHS). La masse globale du rapporteur et du bras espaceur est constante, grâce à l'incorporation d'isotopes lourds de type ^{13}C , ^{15}N et ^{18}O (B). Le nombre et la position des atomes enrichis en isotopes n'a aucun effet sur la séparation chromatographique et la spectrométrie de masse. Le groupe rapporteur présente un m/z qui varie de 114.1 à 117.1 et le bras espaceur de 28 à 31. Ainsi, la masse totale du *tag* est maintenue constante (145.1 Da) pour les quatre composés différents. **B.** Quand le *tag* réagit avec un peptide, il forme une liaison amide avec les groupements amine des peptides (N-terminal ou groupe amine des lysines). Ces liaisons amide fragmentent par CID de manière similaire aux liaisons peptidiques. Cependant, après fragmentation de la liaison amide, le groupement carbonyle du bras espaceur est perdu (perte de neutre), mais la charge est retenue par le groupe rapporteur restant. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de centres enrichis dans chaque partie de la molécule. **C.** Schéma du marquage isotopique de peptides, permettant d'avoir quatre combinaisons isobares avec quatre groupes rapporteurs de masses différentes. Le mélange des quatre peptides identiques, chacun marqué avec un *tag* différent, apparaît comme un unique ion précurseur en MS (m/z identiques). Après CID, les quatre ions correspondant aux groupes rapporteurs présentent des masses différentes (114-117 Da). Tous les autres ions fragments (b-, y-, etc.) sont isobares. La concentration relative en peptides est alors déduite des intensités relatives des ions rapporteurs libres. CID : Collision Induite par Dissociation. D'après Ross et al., 2004.

La stratégie iTRAQ est commercialement disponible et elle est largement utilisée en protéomique (Sadowski *et al.*, 2006; Ow *et al.*, 2008; Luczak, Marczak and Stobiecki, 2014). Elle présente l'avantage de pouvoir analyser quatre à huit échantillons différents en une seule et même analyse, donc d'augmenter le débit d'analyse (Ong and Mann, 2005; Ow *et al.*, 2008). De plus, l'utilisation d'une plaque MALDI permet d'étudier plusieurs fois un même échantillon pour obtenir des informations additionnelles, contrairement

à l'ESI habituellement employé en protéomique quantitative. Combinée à un analyseur de type ToF/ToF, cette méthode offre de très hautes spécificité et sélectivité, donc une mesure quantitative précise. En revanche, il est important d'avoir une bonne séparation chromatographique, afin d'éviter la coélution de peptides différents mais de masses similaires. Cela conduirait à des peptides rapporteurs identiques, ce qui fausserait la quantification. Par ailleurs, les ions rapporteurs ont des masses basses (de 114 à 117 Da), donc ils ne sont pas analysables avec des appareils de type piège à ions, qui ont une gamme dynamique étroite.

2.2.2.4.2 Quantification relative sans marquage isotopique

Les approches de quantification avec marquage isotopique présentent certaines limites. La préparation d'échantillon est complexe et coûteuse et un rendement de marquage de 100% ne peut être obtenu. C'est pourquoi, des approches de quantification sans marquage ont été développées. Elles consistent en la comparaison d'intensités de signaux, d'aires de pics, ou de fréquence des événements MS/MS attribués aux peptides d'une protéine donnée, approche appelée « comptage spectral » (« *spectral counting* ») (Figure 31).

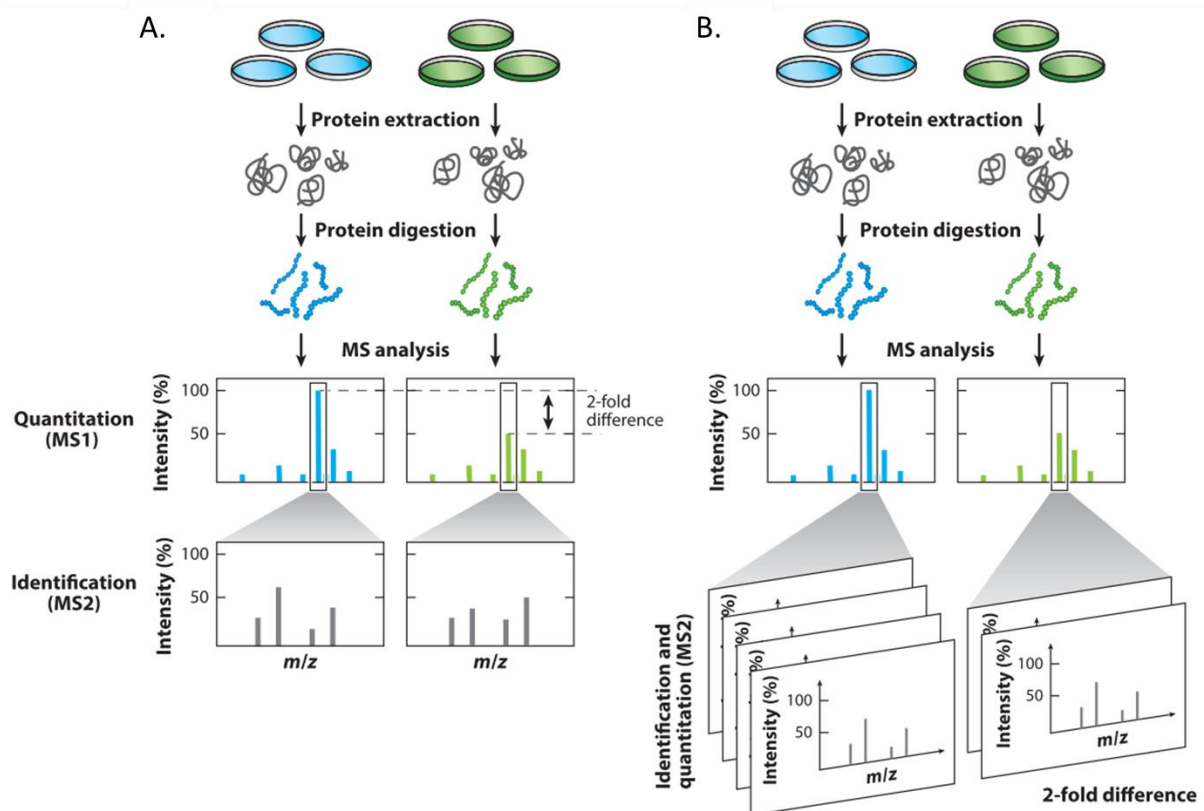


Figure 31. Comparaison des principales méthodes de quantification relative par MS sans marquage isotopique.

A. Mesure de l'intensité du signal. La quantification est réalisée à partir de la hauteur des pics ou de l'aire sous les courbes durant la MS et l'identification des protéines grâce à la MS/MS. **B.** Comptage spectral. Dans cette approche, la quantification et l'identification des protéines sont réalisées à partir des spectres MS/MS. La quantification dépend du nombre de spectres identifiés pour chaque peptide. D'après Ankney et al., 2018.

2.2.2.4.2.1 Mesure de l'intensité du signal

Dans cette approche, la quantification est réalisée à partir des chromatogrammes d'ions extraits (XIC pour *eXtracted Ion Chromatogram*) de chaque peptide. Les aires sous les pics (ou la hauteur des pics) sont intégrées pour chaque peptide à un temps de rétention donné. La valeur d'intensité pour chaque peptide dans une analyse peut ensuite être comparée aux signaux d'une ou plusieurs autres analyses pour donner une information quantitative relative. (Bantscheff *et al.*, 2007; Ankney, Muneer and Chen, 2018)

Le temps de rétention est un aspect important pour la quantification et le traitement des données par cette technique. Un programme LC robuste et reproductible est donc nécessaire pour permettre une quantification précise et minimiser les identifications incorrectes de peptides. Ce travail peut être réalisé par des logiciels, tels que DeepQuanTR, adapté pour les analyses LC-MALDI-MS (Fugmann, Neri and Roesli, 2010). Il a permis de quantifier 320 protéines membranaires de lignées de cellules myéloïdes, dans le but d'identifier des antigènes à des fins thérapeutiques (Strassberger *et al.*, 2014).

Cette technique de dosage présente l'avantage de pouvoir analyser des protéines intactes, bien que des étalons internes marqués isotopiquement soient généralement utilisés dans ces cas-là (Lanshoeft, Cianférani and Heudi, 2017; Jin, Burton and Moore, 2018; Beck *et al.*, 2019). Le traitement d'échantillon est ainsi limité et des variations structurales peuvent être étudiées (MPTs, cytotoxiques dans le cas des ADCs, etc). En termes de précision de la quantification, des résultats similaires ont été obtenus pour le dosage d'une IgG1 humaine au niveau de la protéine entière et au niveau peptidique (Lanshoeft, Cianférani and Heudi, 2017).

Avec cette méthode, la quantification des peptides est réalisée à partir des spectres *full MS*, alors que les spectres MS/MS sont utilisés pour leur identification (Figure 31A). Or, les spectres MS et MS/MS sont obtenus dans une même analyse, l'acquisition de spectres MS/MS étant basée sur les résultats de la MS. L'identification et la quantification des peptides sont donc en compétition, ce qui oblige à trouver un équilibre. Un temps d'analyse trop long dédié à l'identification des peptides aura un impact négatif sur la quantification, et inversement. (Bantscheff *et al.*, 2007; Ankney, Muneer and Chen, 2018)

2.2.2.4.2.2 Comptage du nombre de spectres (*spectral counting*)

Cette approche est basée sur l'observation empirique que plus une protéine est présente dans un échantillon, et plus il y aura de spectres MS/MS produits pour les peptides de cette protéine. Ainsi, une quantification relative peut être réalisée en comparant le nombre de spectres MS/MS entre une série d'analyses. A la différence de la quantification par l'intensité du signal, le comptage du nombre de spectres permet l'identification et la quantification des protéines à partir des données MS/MS (Figure 31B). (Bantscheff *et al.*, 2007)

Bien qu'intuitive et attractive, cette technique est encore controversée parce qu'elle ne mesure aucune propriété physique directe d'un peptide. Néanmoins, la corrélation entre la quantité de protéines et le nombre de spectres MS/MS existe et a conduit les chercheurs à étendre le concept à l'estimation des niveaux d'expression des protéines de manière absolue. Un indice d'abondance des protéines (PAI pour *Protein Abundance Index*) a été mis au point, correspondant au rapport entre le nombre de peptides identifiés pour une protéine et le nombre total de peptides théoriques que la protéine peut produire. Cet indice a ensuite été amélioré en une forme modifiée exponentiellement (emPAI pour *exponentially modified PAI*) et montre de meilleurs résultats pour la quantification. Cette méthode est moins précise que les méthodes de quantification avec marquage, mais elle permet tout de même d'estimer l'abondance en protéines totales. Des modèles informatiques ont été développés afin de prédire les peptides qui seront détectés par le spectromètre de masse pour une protéine donnée, offrant une base plus sûre pour la quantification. (Bantscheff *et al.*, 2007; Ankney, Muneer and Chen, 2018)

Le comptage de spectres a notamment été utilisé pour la quantification relative de protéines chez des patients atteints de rétinopathie diabétique, afin de comparer leur abondance avec celles de patients présentant un trou ou un pli maculaire non diabétique (Loukovaara *et al.*, 2015).

Une des limites de cette méthode concerne le fait que le nombre de peptides générés par un clivage protéolytique dépend de la longueur de la protéine. Par conséquent, la quantification de protéines de taille inférieure à 20 kDa sera moins précise que celle des protéines de grandes tailles. Des méthodes permettent de résoudre cette problématique, en normalisant les données du comptage de spectres sur la base de la longueur des protéines ou de leur masse moléculaire. Un facteur d'abondance spectrale normalisé (NSAF pour *Normalized Spectral Abundance Factor*) a été créé. Il correspond au rapport entre le nombre de spectres obtenus pour une protéine et la longueur de la protéine, lui-même divisé par la somme des rapports spectres obtenus/longueur pour toutes les protéines de l'analyse. Une méthode de quantification absolue a également été mise au point, sur la base d'un algorithme. Cependant, il demeure complexe de contrôler la variabilité des analyses LC, des efficacités d'ionisation, etc. (Ankney, Muneer and Chen, 2018)

Chapitre III. Méthodes spécifiques pour la quantification des protéines

3.1 Les immuno-dosages

3.1.1 La technique ELISA

La méthode de dosage immuno-enzymatique ELISA (pour *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) est basée sur une réaction antigène-anticorps spécifique (Engvall and Perlmann, 1971). Elle permet le dosage d'un antigène (méthode directe) ou d'un anticorps (méthode indirecte) contenus dans du sérum. Il existe différents types d'ELISA (Figure 32) (Slimani *et al.*, 2018) :

- **ELISA direct** (Figure 32A) : l'échantillon de sérum est directement introduit dans des puits (microplaque de 96 puits généralement), afin que l'antigène à doser se fixe sur la surface. Un anticorps primaire dirigé contre l'antigène est ajouté. Cet anticorps est conjugué à une enzyme qui, après ajout d'un substrat, sera converti en signal fluorescent ou chromogénique. Une détection par UV, fluorescence ou tout autre technique de détection adaptée permettra alors de doser l'antigène recherché, à partir d'une droite d'étalonnage.
- **ELISA indirect** (Figure 32B) : dans ce cas, ce n'est pas l'antigène qui est directement détecté, mais l'anticorps dirigé contre lui. Son application consiste en la fixation d'un antigène connu sur un support solide. Le sérum est ajouté, permettant la fixation de l'anticorps à doser sur l'antigène. Un anticorps secondaire conjugué à une enzyme est ensuite introduit et un substrat permet la détection par un signal chromogénique ou fluorescent. Cette méthode est très connue en clinique pour le dépistage du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Gauthier and Turner, 1989).
- **ELISA en sandwich** (Figure 32C) : un anticorps de capture dirigé contre l'antigène à doser est fixé au support (microplaque de 96 puits par exemple), permettant la liaison de l'antigène à doser contenu dans le sérum. Un anticorps primaire spécifique de l'antigène, puis un anticorps secondaire conjugué à une enzyme sont ensuite ajoutés. Un substrat permettra la détection et le dosage de l'antigène. Cette technique est similaire à la méthode directe, mais elle est plus spécifique et plus sensible pour le dosage, puisque deux anticorps sont utilisés pour une même cible. Cependant, elle est complexe à mettre en œuvre en raison de la difficulté de production de tous les anticorps spécifiques nécessaires.

- **ELISA en compétition** (Figure 32D) : cette technique est plus complexe que les précédentes. Elle permet le dosage d'un antigène ou d'un anticorps. Dans ce cas, un agent inhibiteur (antigène ou anticorps), non conjugué à une enzyme, est mis en compétition pour une même cible avec l'analyte à doser, conjugué à une enzyme. L'analyte à doser déplacera l'inhibiteur de ses sites de fixation, ce qui permettra de le quantifier.

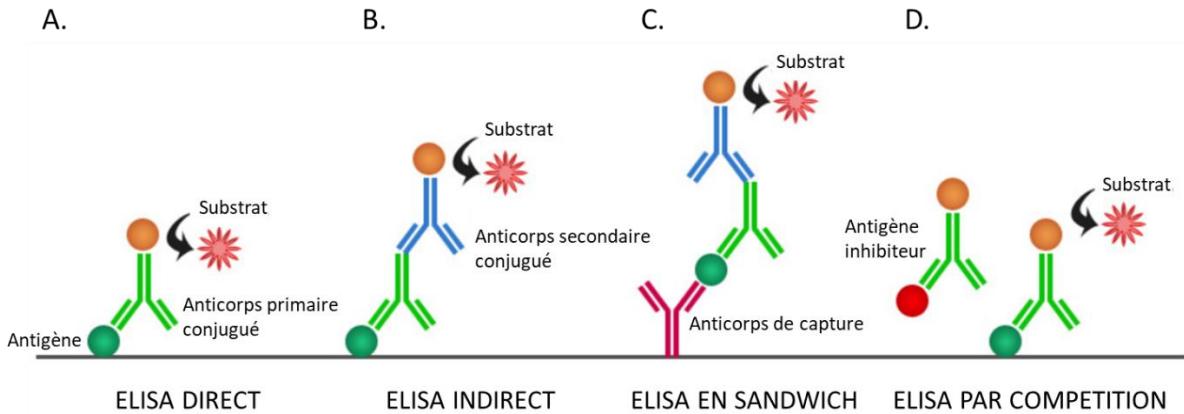


Figure 32. Schémas des différents types de techniques ELISA.

A. Détection directe de l'antigène à doser. **B.** Détection indirecte de l'antigène par le dosage de l'anticorps dirigé contre lui. **C.** L'antigène est pris en sandwich entre un anticorps de capture et un anticorps primaire. **D.** L'antigène est détecté par compétition avec un antigène inhibiteur. D'après Slimani et al., 2018.

Simple à mettre en œuvre, peu coûteuse et très spécifique, cette méthode est extrêmement répandue pour le dosage de protéines dans le sang, aussi bien dans le milieu médical (hôpitaux, laboratoires d'analyse) que dans la recherche pharmaceutique (recherche de biomarqueurs, quantification d'Acms et de protéines dans le sérum, etc). Par exemple, l'ELISA a été employée pour quantifier les inhibiteurs de tyrosine kinase géfitinib et imatinib (Saita, Fujito and Mori, 2005; Saita, Shin and Fujito, 2013) et l'inhibiteur multikinase sorafénib (Saita *et al.*, 2015) dans le sérum humain pour des études de pharmacocinétiques. Des limites de détection allant de 40 pg/mL à 0.04 µg/mL ont été obtenues. Un exemple plus connu est le cas du dépistage du VIH, réalisé par un test ELISA pour la détection d'anticorps anti-VIH et de l'antigène p24, protéine de la capsid du virus, dans le sang des patients (Gauthier and Turner, 1989; Shafiee *et al.*, 2015). Les anticorps sont détectés de manière indirecte et p24 par un ELISA en sandwich.

Les tests ELISA sont très précis et facile à mettre en œuvre une fois que l'anticorps dirigé contre la protéine à doser a été généré. Cependant, ils présentent quelques limites (Ezan and Bitsch, 2009). Tout d'abord, la production des anticorps demande beaucoup de temps et peut s'avérer onéreuse. De plus, des réactions non spécifiques avec d'autres protéines contenues dans le sérum peuvent altérer la qualité des immuno-dosages. Il est également possible qu'un épitope soit masqué par des changements conformationnels, de la protéolyse ou des modifications post-traductionnelles, biaisant ainsi le résultat du dosage. Par ailleurs, il est nécessaire de réaliser

un immuno-dosage différent pour chaque protéine à doser, travail laborieux et coûteux. Des dosages dits « multiplex » ont été développés pour pallier ce dernier problème, et augmenter le rendement d'analyse.

3.1.2 Les immuno-dosages multiplex

Le terme « multiplex » désigne la détection d'une multitude de protéines ou peptides en une seule analyse (Vignali, 2000). Ces immuno-dosages sont basés sur le principe de l'ELISA en sandwich, avec la possibilité de quantifier plusieurs composés simultanément. Il existe deux types principaux de dosages multiplex : les dosages planaires et les dosages en suspension à partir de microbilles (Figure 33) (Vignali, 2000; Tighe *et al.*, 2015). Les systèmes planaires sont similaires à un test ELISA : des ligands de capture de haute affinité sont immobilisés sur une phase solide, généralement une plaque micropuits ou une lame. L'échantillon de sérum est ensuite déposé, entraînant la fixation des protéines à doser, qui sont alors détectées par des anticorps marqués (Figure 33A). Dans les systèmes en suspension, des ligands de capture de haute affinité sont immobilisés sur des microbilles plastiques activées par fluorescence, puis mélangés avec l'échantillon contenant les protéines à doser en phase liquide. L'ajout d'anticorps de détection marqués avec un colorant permet l'analyse haute résolution d'un signal fluorescent spécifique par des méthodes de cytométrie en flux (Figure 33B).

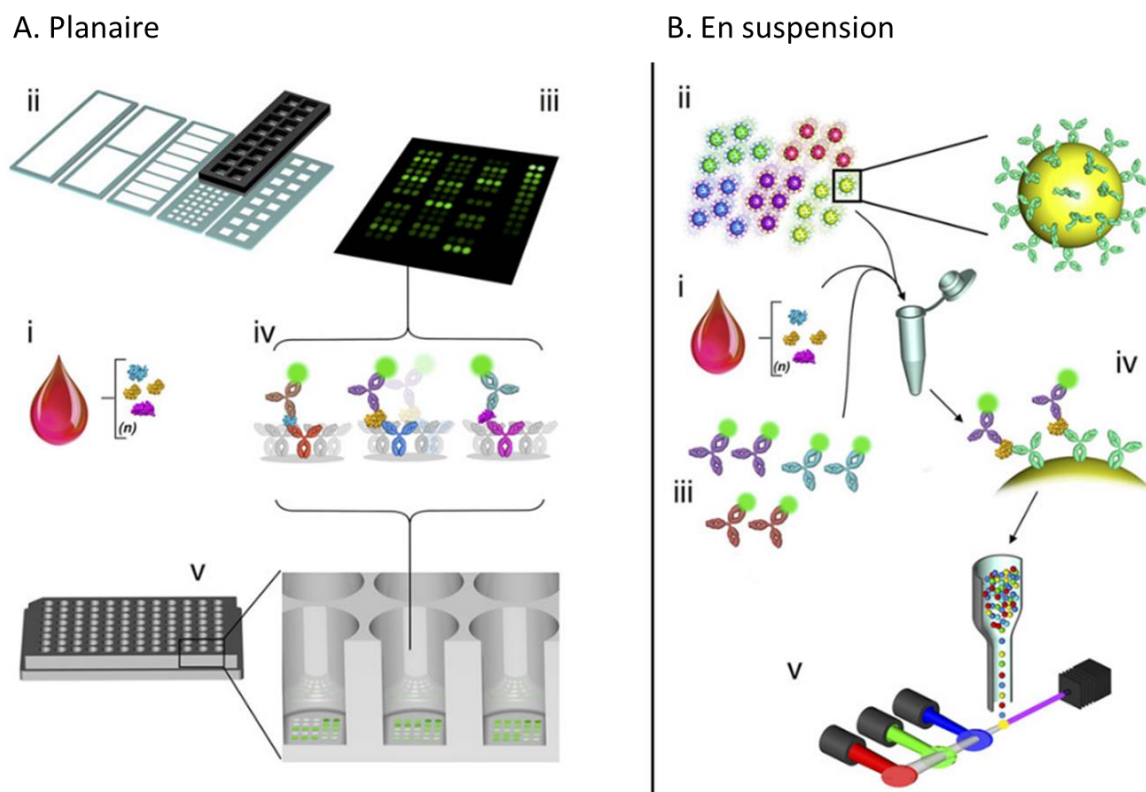


Figure 33. Schémas des différents types d'analyses multiplexes : planaires ou en suspension.

A. Les dosages planaires peuvent être réalisés sur une lame ou sur une microplaque. (i) L'antigène à doser est contenu dans un échantillon de sérum de patient. (ii) Les dosages réalisés sur une lame peuvent se présenter sous différentes configurations. Les anticorps

spécifiques des antigènes à doser sont imprimés de manière robotique sur la surface de la lame activée. (iii) L'échantillon de sérum est appliqué et chaque analyse est traitée individuellement comme sur des microplaques 96 puits, avec des étapes de blocage, lavage, etc. (iv) La détection est réalisée grâce à des anticorps secondaires spécifiques de chaque antigène et conjugué à un marqueur chimioluminescent ou fluorescent. (v) Les dosages réalisés sur une microplaque contiennent des anticorps imprimés dans les puits. La plaque peut ainsi être traitée comme un ELISA classique. **B.** (i) Dans le cas des immuno-dosages en suspension, l'antigène à doser est aussi contenu dans un échantillon de sérum. (ii) Des milliers de microbilles de plastique de l'ordre du micromètre sont infusées avec un (ou plusieurs) colorants chimioluminescents ou fluorescents et avec une surface activée, de sorte qu'un anticorps de capture puisse s'y fixer. De nombreuses séries de billes sont préparées, chacune ayant des anticorps de capture spécifiques selon l'analyte à doser et une signature fluorescente unique permettant l'identification. (iii) L'échantillon de sérum et les billes sont mélangés. Des anticorps de détection conjugués avec un marqueur chimioluminescent ou fluorescent (distinct de ceux contenus dans les billes), sont ajoutés à la fin des étapes d'incubation et de lavage. (iv) Chaque bille contient ainsi un "sandwich" composé de l'analyte cible capturé et de l'anticorps de détection conjugué à un marqueur. (v) Après des étapes de lavage, les billes sont séparées et les marqueurs chimioluminescents ou fluorescents excités par des lasers. La lumière émise est collectée par des détecteurs pour une analyse quantitative. D'après Tighe et al., 2015.

A titre d'exemple, le principe de la technologie Bioplex® (Luminex), basée sur des microbilles, sera décrit plus précisément (Figure 34). Le système Bio-Plex multiplex permet la détection et la quantification de multiples analytes (protéines et peptides ou acides nucléiques) dans un volume d'échantillon unique. Il s'agit d'une méthode basée sur le principe ELISA (principe du « sandwich »), en microplaques de 96 puits, avec comme support des microbilles magnétiques de 8 µm de diamètre, en suspension et identifiées par un code couleur spécifique. Sur chaque microbille est fixé un anticorps (anticorps primaire) spécifique du biomarqueur que l'on souhaite quantifier. L'échantillon à tester est placé dans les puits où se trouvent déjà les microbilles. Si l'analyte que l'on veut doser est présent dans l'échantillon, il va se fixer sur la bille portant l'anticorps lui correspondant. Un anticorps biotinylé (anticorps secondaire) est ensuite déposé afin de fermer le « sandwich » ; il se lie à l'anticorps primaire. Enfin, de la streptavidine est incorporé dans chaque puits. Elle se lie à la biotine de l'anticorps secondaire et permet l'émission de fluorescence. Un système de détection constitué de deux lasers (un vert et un rouge) analyse ensuite chaque puits et permet d'identifier d'une part le biomarqueur étudié via le code couleur de la bille correspondante (premier laser), et d'autre part la quantité de biomarqueur (second laser).

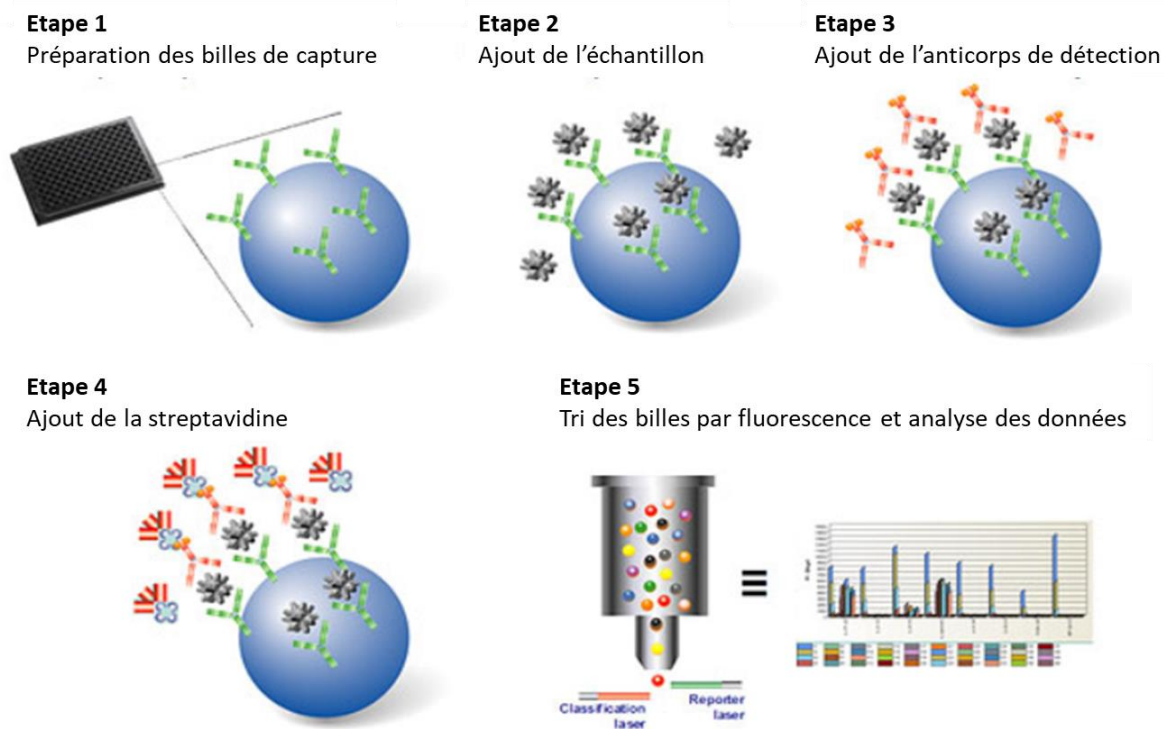


Figure 34. Les cinq étapes de la détection d'analytes par le Bioplex®.

Etape 1 : Les anticorps primaires sont liés aux billes magnétiques. **Etape 2 :** Ajout de l'échantillon. Fixation des analytes à doser sur les anticorps primaires. **Etape 3 :** Fixation des anticorps biotinylés aux anticorps primaires. **Etape 4 :** La streptavidine se fixe à la biotine et émet de la fluorescence. **Etape 5 :** Un échantillon du mélange réactionnel final est aspiré par le détecteur. Le mélange de billes passe au travers du détecteur, où un premier laser identifie l'analyte présent sur la bille et un second laser le quantifie. D'après Bio-Rad.

La technologie Bioplex est utilisée en recherche, comme par exemple pour la compréhension du mécanisme d'action de l'Acm anti-HER2 Trastuzumab (Lion *et al.*, 2016), ou pour la détection simultanée de 15 cytokines humaines dans des cellules du sang périphérique (de Jager *et al.*, 2003). Grâce à cette méthode, la spécificité de l'analyse a été augmentée, les réactions croisées diminuées, mais la limite de détection est supérieure à celle obtenue avec un test ELISA (de Jager *et al.*, 2003). Il a également été possible de quantifier des biomarqueurs prédictifs de réponse chez des patients atteints d'un cancer colorectal et traités avec des Acms anti-EGFR (Perkins *et al.*, 2010; Harlé *et al.*, 2015). Sur la base de ces études, les auteurs proposent une association de traitements, afin d'augmenter les chances de survie des patients (Harlé *et al.*, 2015). La variation des niveaux d'expression de cytokines et de facteurs de croissance dans des tissus de rats soumis à une irradiation par radiothérapie et de ceux de protéines de la signalisation du récepteur HER dans le cancer du sein a pu être quantifiée grâce au Bioplex (Chergui *et al.*, 2009; Gallet *et al.*, 2011). D'autres outils multiplex ont également permis la quantification de cytokines pro-inflammatoires dans le plasma humain (Prabhakar, Eirikis and Davis, 2002) ou d'anticorps antinucléaires chez des patients atteints d'une maladie rhumatismale (Rouquette, Desgruelles and Laroche, 2003).

Les immuno-dosages multiplex permettent de réduire considérablement les coûts et les durées d'analyse. En revanche, leur validation pour une utilisation en clinique est complexe et à l'heure actuelle, il n'existe aucune réglementation standardisée permettant leur utilisation pour l'analyse et la quantification de biomarqueurs dans le milieu médical (Boja *et al.*, 2011). En effet, leur approbation repose sur leur capacité à proposer des performances fonctionnellement équivalentes à celles d'une technique alternative bien établie, ce qui n'est pas aisé.

Par ailleurs, ces technologies multiplexes présentent les mêmes inconvénients que les tests ELISA « singleplex », à savoir la difficulté de se procurer des anticorps spécifiques des protéines à doser, la détection de réactions non spécifiques avec d'autres protéines présentes dans l'échantillon, ou encore un épitope masqué empêchant la protéine de se fixer à l'anticorps. Ces immuno-dosages sont utilisés essentiellement pour la recherche de biomarqueurs, plutôt que pour la quantification de protéines thérapeutiques. L'un des obstacles pour cette dernière application est la « boîte noire » que représentent ces méthodes, puisqu'elles ne permettent pas de visualiser directement les protéines contenues dans les échantillons.

Le développement d'autres méthodes robustes, plus sensibles et spécifiques que les immuno-dosages semble donc indispensable. La spectrométrie de masse apparaît comme une méthode de choix pour la quantification absolue des protéines et des peptides dans des échantillons biologiques.

3.2 Quantification absolue par spectrométrie de masse : la dilution isotopique

Le protocole suivi pour la quantification absolue de protéines et peptides par spectrométrie de masse est similaire à celui utilisé pour la quantification relative : enrichissement, digestion enzymatique, séparation des peptides par un système d'introduction et analyse par MS. Cependant, la succession de ces étapes entraîne de nombreuses manipulations, pouvant être à l'origine de pertes d'analytes, ce qui peut engendrer des erreurs de dosage. De plus, l'efficacité d'ionisation et la détection par MS dépendent des propriétés physico-chimiques des protéines à doser. Pour pallier ces problèmes, de nombreuses stratégies de quantification absolue ont été développées. Elles sont basées sur la mesure d'une différence d'intensité entre la protéine à doser et un étalon interne, généralement marqué isotopiquement.

3.2.1 Principe général

La validation d'une méthode de quantification absolue en MS suit le processus décrit dans la Figure 35. Des étalons internes marqués par des isotopes stables sont utilisés pour permettre de déterminer la quantité réelle et exacte de protéines. Le marquage isotopique correspond généralement à l'incorporation des isotopes stables du carbone (C^{13}) et de l'azote (N^{15}) dans les peptides ou protéines utilisés comme étalon interne, à la place des atomes de carbone et d'azote naturellement présents. Cela ne modifie pas les propriétés physico-chimiques de l'étalon interne mais entraîne un incrément de masse, qui dépend du nombre d'atomes d'azote et de carbone incorporés. Cette différence de masse n'est pas visible sur le chromatogramme (Figure 29A). En revanche, le peptide marqué sera distingué du peptide à doser grâce à la MS (Figure 29B).

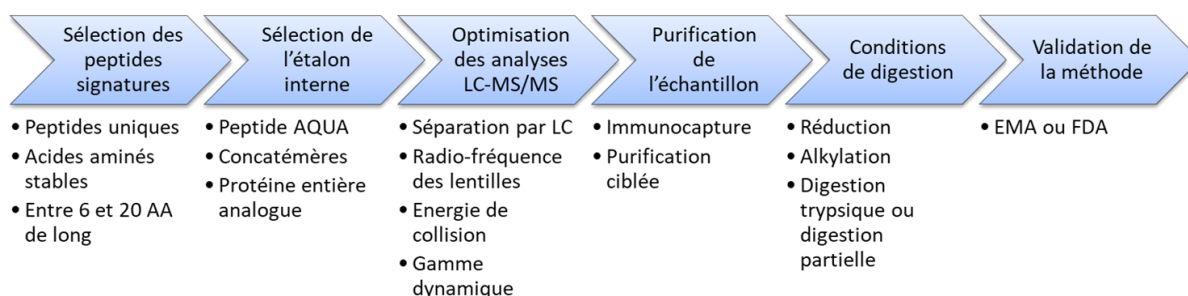


Figure 35. Processus général de validation d'une méthode de quantification absolue par spectrométrie de masse.

AA : Acide Aminé, AQUA : *Absolute QUAntification of proteins*, LC : *Liquid Chromatography*, LC-MS/MS : LC couplée à de la spectrométrie de masse en tandem, EMA : *European Medicines Agency*, FDA : *Food an Drug Administration*.

Lors des analyses par LC-MS/MS, des peptides dits signatures (ou protéotypiques) communs à l'analyte à doser et à son étalon interne sont recherchés. Plusieurs critères déterminent la sélection des peptides protéotypiques (Heudi *et al.*, 2008; McAvoy *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014; Lanshoeft, Wolf, Heudi, *et al.*, 2016) :

- **Unicité** de séquence : ils doivent être communs à la protéine à quantifier (et à ses isoformes si elle en a) et à l'étalon interne.
- **Protéotypicité** : ils doivent être spécifiques pour éviter les chevauchements avec d'autres protéines présentes dans le mélange complexe.
- **Susceptibilité aux analyses MS** : ils doivent être suffisamment intenses, stables et longs pour être détectés par MS (entre 6 et 20 acides aminés). Des petits peptides de taille inférieure à 6 AA sont moins spécifiques et peuvent entraîner davantage d'interférences, en plus d'être plus difficilement détectables par MS. A l'inverse, la gamme de masse limite des spectromètres de masse peut empêcher la détection de longs peptides de taille supérieure à 20 AA. De plus, leur forte hydrophobicité peut compliquer la séparation par LC. La synthèse de longs peptides est également complexe et leur coût élevé.
- **Eviter** les peptides pouvant contenir des **modifications** : éviter les peptides contenant des méthionines et des tryptophanes (pouvant s'oxyder), ceux contenant des cystéines (pouvant être alkylées) et ceux contenant des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylations...).
- Eviter les peptides dont les séquences se terminent par les peptides KR, RK, RR ou KK, puisque R et K sont les sites de clivage de la trypsine.

Des approches *in silico* existent afin d'identifier les peptides signatures, telles que le logiciel Skyline. En réalisant une digestion tryptique théorique, il permet de déterminer si les peptides tryptiques sont uniques à la protéine à doser ou s'ils sont communs à d'autres protéines du protéome étudié (homme, souris, rat, singe, etc.), grâce à une confrontation avec des bases de données. Il est possible d'y préciser les AA que l'on souhaite éviter dans les peptides signatures, pour une étude plus précise. A partir de ces recherches, les peptides sont sélectionnés selon les critères cités ci-dessus. Leur séquence peut alors être confrontée à l'ensemble du protéome étudié pour vérification, grâce à des outils tels que Uniprot, NeXtProt ou Blast.

Dans une démarche de validation d'une méthode de quantification absolue par MS, il est nécessaire de déterminer le type d'étalon interne avec lequel on souhaite travailler, une fois les peptides signatures sélectionnés (Figure 35). Une description détaillée des étalons existants sera réalisée dans le paragraphe suivant. L'optimisation des conditions d'analyse des peptides par LC-MS/MS précède ensuite la mise au point des conditions de purification et de digestion (réduction, alkylation, type d'enzyme utilisée...). La méthode peut alors être validée par la FDA ou l'EMA.

3.2.2 Les différents types d'étalons internes

Pour une quantification précise, l'étalon interne doit subir les mêmes étapes préparatoires que les protéines à doser (préfractionnement, digestion enzymatique, analyse LC-MS/MS). Plus l'étalon est ajouté tardivement dans la préparation d'échantillon, plus il y a de risques d'erreurs dans la quantification. De nombreuses stratégies ont été développées, s'intégrant tout au long des étapes de la quantification (Figure 36). Les étalons internes peuvent être des protéines entières marquées, ajoutées dès la première étape de préparation (Figure 36A), des concatémères de peptides marqués (QconCAT), ajoutés avant la digestion trypsique (Figure 36B), ou des peptides marqués, ajoutés au moment des analyses LC-MS/MS (peptides AQUA) (Figure 36C).

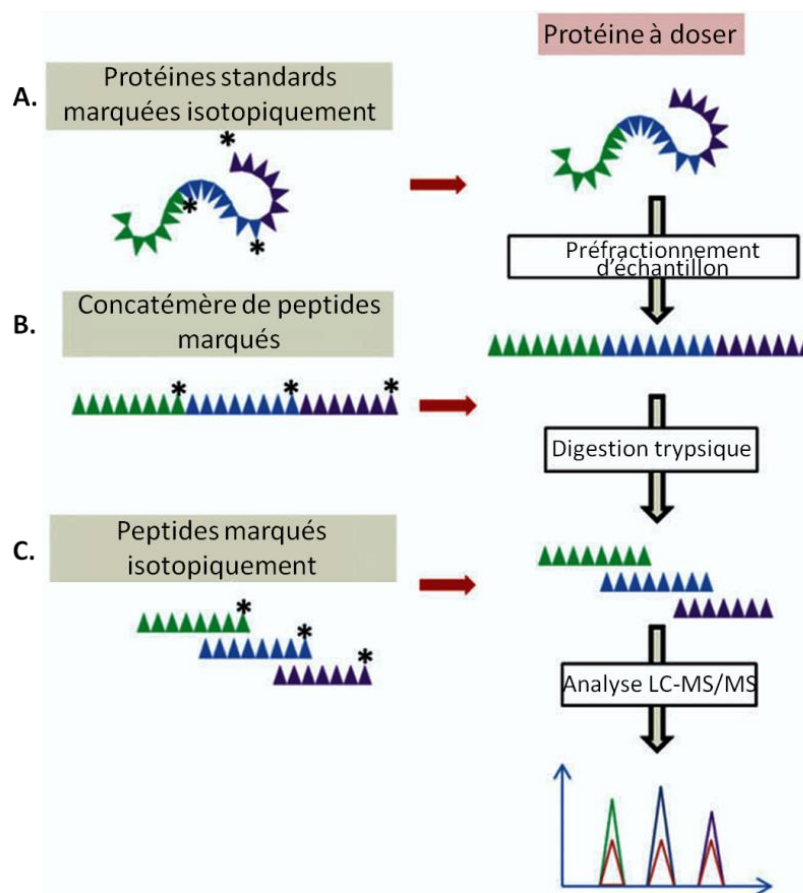


Figure 36. Les différentes stratégies de quantification absolue par dilution isotopique. **A.** Protéines entières marquées isotopiquement, ajoutées dès l'étape de préfractionnement. **B.** Concatémère de peptides marqués, ajoutés avant la digestion trypsique. **C.** Peptides signatures marqués et ajoutés en amont des analyses LC-MS/MS. D'après Lehmann et al., 2013.

Par ces méthodes, il est possible de quantifier plusieurs protéines d'un même mélange par le suivi de peptides spécifiques de chaque protéine (quantification multiplexe) (Huillet *et al.*, 2012; Simpson and Beynon, 2012; Gilquin *et al.*, 2017). La quantification de protéines modifiées telles que les immunoconjugués, les radioéléments ou encore les fragments de protéines est également réalisable (Lanshoeft, Wolf, Walles, *et al.*, 2016).

3.2.2.1 Absolute QUAntification of proteins (AQUA)

L'approche AQUA consiste en l'utilisation de peptides standards marqués par des isotopes stables (*Stable Isotope-labeled Standard (SIS) peptides*) comme étalon interne. Ils doivent être identiques aux peptides tryptiques de la protéine à doser, mais avec un incrément de masse dû à la présence d'atomes de carbone et d'azote marqués. Après préfractionnement et digestion tryptique des protéines à quantifier, les peptides SIS sont ajoutés dans des quantités connues, afin d'être analysés par LC-MS/MS (Figure 36C). Les peptides à quantifier et les peptides SIS sont détectés au même temps de rétention et ont des propriétés d'ionisation comparables, mais sont facilement distinguables par la différence de masse due au marquage isotopique. Grâce à l'élaboration d'une droite d'étalonnage, la concentration de la protéine d'intérêt est calculée. Pour une quantification plus précise, plusieurs peptides de la même protéine peuvent être dosés simultanément.

Cette stratégie a été mise au point en 2003 pour la quantification de protéines issues d'un lysat cellulaire de levure, et de leurs formes phosphorylées (Gerber *et al.*, 2003). De nombreuses autres protéines ont été dosées avec cette technique, telles que l'AcM Rituximab dans le plasma humain (Mekhssian, Mess and Garofolo, 2014) ou des protéines de transport au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Gomez-Zepeda *et al.*, 2019).

De tels peptides étalons présentent les avantages d'être faciles à produire par synthèse chimique grâce à leurs petites tailles et d'être disponibles commercialement. En revanche, ils ne répondent pas totalement aux critères de quantification absolue, en raison de leur introduction à la dernière étape du processus de préparation d'échantillon. Ainsi, ils écartent les biais dus aux mesures analytiques par LC-MS/MS, mais pas ceux dus au préfractionnement et à la digestion tryptique.

3.2.2.2 Concatémères de peptides marqués (QconCAT)

Décrite pour la première fois en 2005, la production de concatémères de peptides tryptiques est une alternative à l'approche AQUA (Beynon *et al.*, 2005). Le standard QconCAT consiste en la succession de plusieurs peptides SIS différents, formant une simili protéine. Ils sont produits par un système d'expression procaryote (*E. Coli*) contenant des acides aminés marqués par des isotopes stables. Cette séquence polypeptidique est ajoutée dans l'échantillon complexe contenant la protéine à doser avant la digestion tryptique (Figure 36B). Ainsi, elle subit à la fois la digestion enzymatique et les analyses LC-MS/MS, afin de limiter les pertes dues à ces deux étapes. Cette méthode est particulièrement bien adaptée pour des analyses multiplexes, ou pour la quantification d'une protéine unique en utilisant plusieurs peptides protéotypiques (Simpson and Beynon, 2012).

Cependant, une séquence polypeptidique synthétique partielle n'est pas digérée de la même manière qu'une protéine entière, donc elle ne supprime pas totalement les pertes induites par la digestion enzymatique. Etant introduite après l'étape de préfractionnement, elle ne répond pas non plus entièrement aux exigences de la quantification absolue.

3.2.2.3 Protéines entières

L'approche la plus précise consiste en l'utilisation de protéines entières similaires voire identiques aux protéines à doser, mais marquées isotopiquement (Figure 36A). Elles sont ajoutées avant tout traitement d'échantillon, dès la première étape du processus de quantification. Cette méthode peut théoriquement aider à contrôler les variabilités à toutes les phases du dosage. Leur unique biais concerne les modifications post-traductionnelles, qui ne sont pas présentes dans leur système d'expression. N'ayant aucune modification, elles ne peuvent être strictement identiques aux protéines endogènes qui en possèdent. Cependant, cet aspect ne pose pas de problème dans le cas des protéines thérapeutiques synthétisées chimiquement ou dans des cellules procaryotes (Acms par exemple), chez lesquelles il n'y a pas de modifications post-traductionnelles des chaînes latérales des acides aminés. L'inconvénient majeur de ces protéines entières est plutôt leur production complexe et longue, qui les rend extrêmement coûteuses. De nombreux types d'étalons internes sous forme de protéines entières sont disponibles commercialement. Nous allons nous arrêter sur les plus communes.

3.2.2.3.1 Absolute SILAC

La technologie *Absolute SILAC* est une adaptation de SILAC pour la quantification absolue (Hanke *et al.*, 2008). Cela permet de quantifier le nombre de copies de protéines par cellule. Le nombre de copies par cellule de la protéine Grb2 (pour *Growth factor receptor bound protein 2*) dans différents types cellulaires a été déterminé à partir de l'*Absolute SILAC* (Hanke *et al.*, 2008). La quantification a été effectuée par nanoLC couplée à un système hybride de type LTQ-Orbitrap équipé d'une source ESI, en mode d'acquisition DDA.

3.2.2.3.2 PSAQ

La technologie PSAQ (pour *Protein Standard Absolute Quantification* ou Quantification Absolue par une Protéine Standard) a été mise au point par la société *Promise Advanced Proteomics* (Brun *et al.*, 2007; Picard *et al.*, 2012; Lebert *et al.*, 2015). Ce type d'étalon interne est strictement identique à la protéine à doser, mais marqué par des isotopes stables. Cela rend possible la quantification absolue d'un mélange de différentes protéines présentant des séquences très proches. Cette approche est transférable à toutes les protéines et à tous les types de sérum. De plus, le même standard PSAQ peut être utilisé à la fois pour des études précliniques et pour les différentes phases d'études cliniques, la méthode étant facilement adaptable à différentes espèces (souris, rat, singe, homme). Son inconvénient majeur réside dans le coût important de production des protéines, qui limite son utilisation.

Le premier exemple d'utilisation de PSAQ en pharmacocinétique a été décrit pour la quantification d'un Acm dans du sérum de singe (*marmoset*), après administration sous-cutanée de cet Acm (Heudi *et al.*, 2008). Une limite de détection de 5 µg/mL a été obtenue et une bonne corrélation avec la méthode ELISA a été observée. De même, des anticorps anti-infliximab ont été dosés dans du sérum de patients traités par l'Acm infliximab (El Amrani *et al.*,

2016). La limite de quantification obtenue est de 0.5 µg/mL, pour un intervalle de linéarité de 0.5 à 20 µg/mL. Par comparaison avec un test ELISA, la LC-MS/MS a permis d'utiliser de plus faibles quantités de sérum (2 µL) et d'étalon interne (10 ng). La technique PSAQ a également permis le dosage de biomarqueurs. Par exemple, quatre biomarqueurs cardiovasculaires ont été dosés simultanément chez des patients atteints d'un infarctus du myocarde (Huillet *et al.*, 2012) et quatre biomarqueurs de lésions rénales aiguës ont été quantifiés dans des échantillons d'urine (Gilquin *et al.*, 2017). Une adaptation de la méthode PSAQ a également permis de quantifier sept peptides protéotypiques de la protéine Tau, biomarqueur de la maladie d'Alzheimer (Bros *et al.*, 2015).

3.2.2.3.3 **FLEXIQuant**

La technologie FLEXIQuant (pour *Full-Length EXpressed stable Isotope-labeled proteins for Quantification*) diffère un peu de celles précédemment citées. En effet, au lieu de suivre des peptides marqués par des isotopes stables (après digestion trypsique), FLEXIQuant permet d'analyser des protéines entières (Singh *et al.*, 2009). Les protéines FLEXIQuant sont synthétisées par des germes de blé et tagguées en leur extrémité N- ou C-terminale avec le His6-tag et un peptide trypsique artificiel, le FLEX-peptide, de séquence en acides aminés « TENLYFQGDISR » (Singh *et al.*, 2009). Elles possèdent également dans leur séquence des lysines et des arginines marquées par des isotopes stables de carbone et d'azote. Après digestion trypsique, le peptide FLEX est libéré et il peut être suivi par LC-MS/MS pour une quantification relative, absolue et le suivi de l'abondance des modifications post-traductionnelles (MPTs). A l'heure actuelle, il est difficile d'étudier les MPTs, du fait de leur grande variabilité, de leur diversité et de leur caractère ubiquitaire. En plus de leur difficulté à les discriminer et à les quantifier, leurs positions au sein des protéines est complexe à déterminer. La technologie FLEXIQuant a été créée dans le but de répondre à cette problématique. Par ailleurs, cette technique est compatible avec l'immunoprécipitation et permet donc l'analyse de protéines peu abondantes, de sous-populations de protéines, de complexes protéiques et de changements quantitatifs de MPTs.

Cette stratégie a été testée pour doser le degré de phosphorylation de deux sous-unités de l'*anaphase-promoting complex*, CDC27 and APC5, en présence d'un poison, le nocodazole (Singh *et al.*, 2009). La chromatographie de type nano-HPLC couplée à un spectromètre de masse en tandem, le LTQ-Orbitrap, a été utilisée. Cela a permis de montrer une augmentation de la phosphorylation au cours du temps, sous influence du poison.

Pour ces trois premières stratégies décrites, la production des étalons est longue et onéreuse puisqu'elle doit être réalisée pour chaque lignée cellulaire ou pour chaque protéine à doser. Pour pallier cet inconvénient, des étalons dits « universels » ont été développés.

3.2.2.3.4 Common Whole Antibody Internal Standard

En 2012, un premier anticorps entier « commun » marqué par des isotopes stables et utilisé comme étalon interne a été décrit, dérivé des *Stable Isotope Labeled Internal Standard* (SIL-IS) (Li *et al.*, 2012). Il s'agit d'un anticorps entier de type immunoglobuline G2 (IgG2), qui possède des séquences peptidiques communes avec d'autres anticorps (de type IgG2 et IgG1 notamment). Il est produit dans un milieu de culture cellulaire contenant des leucines marquées par des isotopes stables de carbone 13 et d'azote 15, leur conférant une masse de +7 Da par rapport aux leucines non marquées. Cette différence de masse avec les Acms à doser non marqués permet de discriminer les deux sur un spectre de masse pour la quantification. Avec cette stratégie, quatre Acms de type IgG2 et quatre de type IgG1 ont été quantifiés par UPLC couplé à un triple quadripôle (Li *et al.*, 2012). Les concentrations obtenues sont exactes, précises et comparables à celles obtenues par un test ELISA. Un Ac entier de type IgG1 a également été produit pour être utilisé comme étalon interne « universel » (Phillip *et al.*, 2017). Marqué au niveau des lysines et des arginines à plus de 99% par du carbone 13, il a permis le dosage d'une IgG1 humaine.

Ces étalons internes présentent l'avantage de pouvoir être utilisés pour doser plusieurs types d'IgG différents, ce qui est beaucoup moins onéreux que la stratégie AQUA, QconCAT ou PSAQ par exemple.

3.2.2.3.5 SILuMAB

SILuTMMAB ou *Stable-Isotope Labeled universal Monoclonal Antibody* est un exemple d'anticorps entier de type SIL-IS. C'est une immunoglobuline de type G1 (IgG1), marquée par des isotopes stables de carbone 13 et d'azote 15 au niveau des lysines et des arginines des chaînes lourdes et légères (Zhang *et al.*, 2014). Cela confère un incrément de masse de +8 et +10 Da aux lysines et aux arginines, respectivement. De nature IgG1, il est dit universel parce que c'est le type d'anticorps le plus fréquemment rencontré et produit. En revanche, il possède une chaîne légère *lambda*, minoritaire par rapport aux chaînes *kappas*. Grâce au caractère « universel » de SILuTMMAB, huit peptides protéotypiques des domaines constants des Acms, présents dans toutes les IgG1 humaines de chaînes légères *lambda*, peuvent être suivis pour la quantification.

SILuTMMAB est commercialisé par Sigma et a été décrit pour des études de pharmacocinétique préclinique (Zhang *et al.*, 2014). Les anticorps dosés sont le Remicade® (Infliximab), ainsi que trois anticorps produits par Merck. Tous sont introduits dans du sérum de singe *cynomolgus*. Après une étape d'immunoprécipitation automatisée à l'aide d'un anticorps anti-humain de chèvre biotinylé, les Acms sont digérés à la trypsine. Huit peptides sont suivis par LC-MRM/MS (triple quadripôle) pour la quantification. Grâce à l'élaboration d'une courbe de calibration, la concentration des anticorps testés est calculée. Après comparaison aux données obtenues par des tests ELISA, il s'avère que les deux méthodes ne donnent pas exactement les mêmes résultats : les concentrations issues de la LC-MRM/MS sont plus élevées que celles issues des ELISA, pour des raisons qu'il reste à éclaircir.

L'Ac marqué SILu™MAB présente l'avantage d'être facilement disponible commercialement et à un coût raisonnable. Son caractère universel permet d'envisager une large utilisation s'étendant à tous les anticorps de type IgG1, voire aux IgG de types 2, 3 et 4. Un seul et même étalon interne peut donc être utilisé pour le dosage de nombreux anticorps monoclonaux différents, contrairement aux peptides AQUA, QconCAT, etc. De plus, il est introduit dès le premier niveau du processus de quantification et est donc soumis aux mêmes étapes que les anticorps à doser. Cela limite les biais dus aux pertes provoquées par la succession du préfractionnement et de la digestion.

En revanche, sa qualité d'IgG le limite à la quantification d'anticorps. Il ne peut être utilisé pour le dosage d'autres types de protéines thérapeutiques ou de potentiels biomarqueurs. De plus, sa structure constituée d'une chaîne légère *lambda* est limitante dans le choix des peptides signatures à suivre. En effet, ceux-ci ne peuvent appartenir qu'à une chaîne légère de type *lambda*, chose rare pour les Acms thérapeutiques. Par ailleurs, SILu™MAB n'est pas strictement identique aux anticorps à quantifier, donc ne réagira pas nécessairement de la même manière lors des étapes préparatoires, ce qui peut biaiser le dosage. Enfin, il est important de noter que cette approche « universelle » ne peut être appliquée que dans le cadre d'études précliniques chez l'animal. Il est impossible de l'appliquer à l'homme dans des études cliniques, puisqu'il s'agit d'une IgG humaine. Les peptides protéotypiques suivis correspondent donc à des séquences d'IgG endogènes des patients.

3.3 Les immuno-dosages couplés à la spectrométrie de masse

Afin de faire face aux problèmes que posent les immuno-dosages, à savoir la difficulté d'analyser plusieurs protéines en même temps et leur incapacité à déceler les différentes protéoformes d'une protéine (induites entre autres par des modifications post-traductionnelles), un couplage des tests basés sur la réaction antigène-anticorps avec la spectrométrie de masse a été proposé. Il existe différents types de couplages.

Par exemple, une méthode appelée *ImmunoSorbent Assay* couplée à la MS (ISA-MS) fait intervenir des anticorps secondaires reliés par un lien photoclivable à un peptide étiquette ou « *tag* » (Figure 37A) (Stauber *et al.*, 2009). Après la réaction de reconnaissance de l'antigène par l'anticorps, la microplaque est placée sous une lumière UV afin de libérer le peptide étiquette, analysé ensuite par un spectromètre de masse de type MALDI-ToF (Figure 37B). Avec cette méthode, une augmentation par 1000 de la sensibilité par rapport à un test ELISA classique (détection par UV) a été obtenue (Stauber *et al.*, 2009). Une détection d'antigènes jusqu'à 250 amol est décrite, contre 200 fmol avec un ELISA.

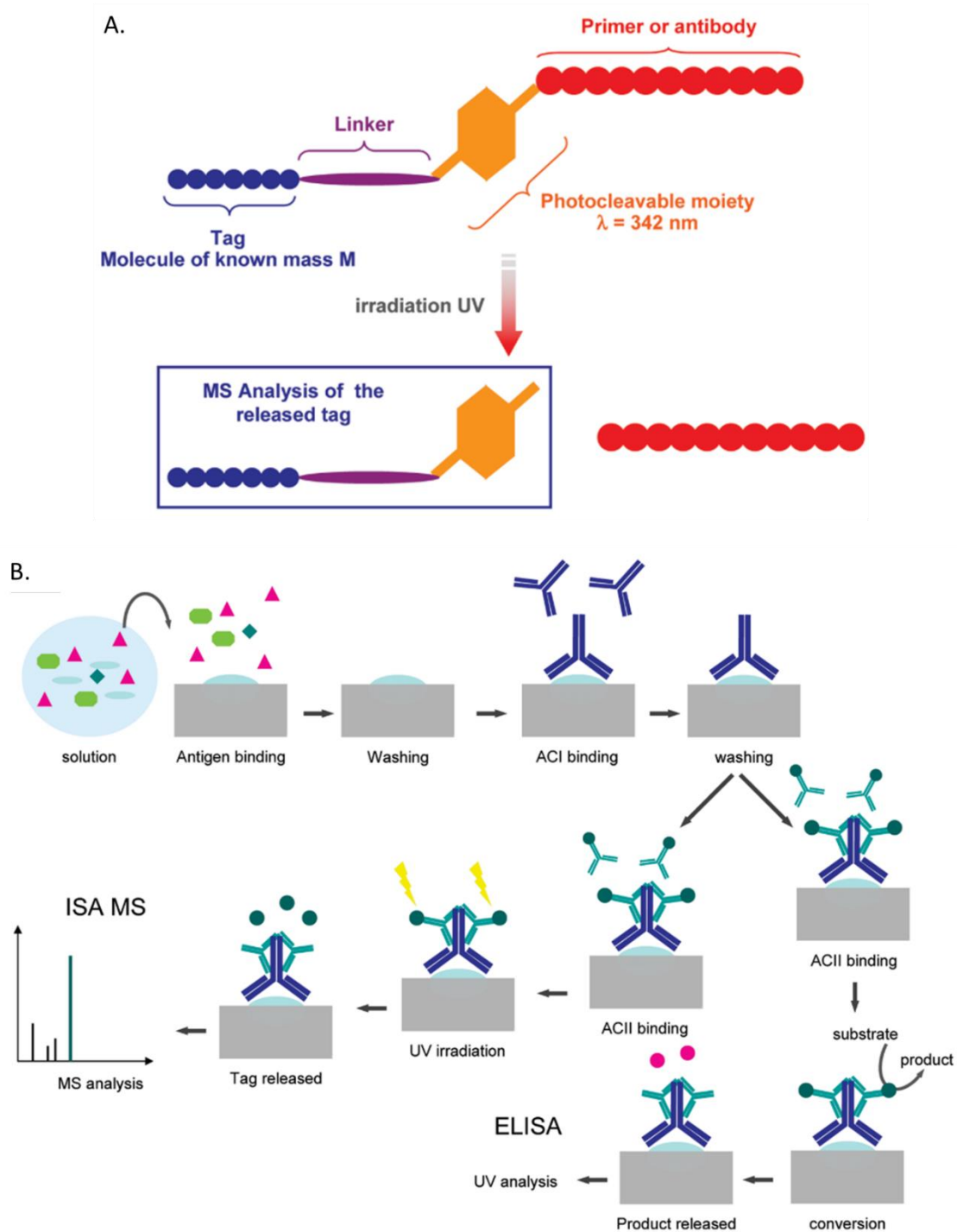


Figure 37. Représentation schématique de l'ImmunoSorbent Assay couplée à la MS (ISA-MS).

A. Schéma représentant le peptide étiquette (ou « tag ») photoclivable relié à un anticorps de détection (Ac secondaire). Le peptide étiquette est clivé par photodissociation sous un laser UV, puis analysé par spectrométrie de masse de type MALDI, permettant la détection indirecte d'un antigène. **B.** Comparaison entre les méthodes ELISA et ISA-MS. D'après Stauber et al., 2009.

Une autre méthode consiste en l'utilisation de micro-colonnes d'affinité, situées à l'extrémité des cônes fixés aux micro-pipettes, dérivées avec des anticorps spécifiques des protéines à doser (Trenchevska, Nelson and Nedelkov, 2016). Cela permet de récupérer rapidement et de manière contrôlée

les protéines des échantillons biologiques complexes. Après des étapes de lavage, les protéines sont éluées, puis analysées par MALDI-ToF (Figure 38).

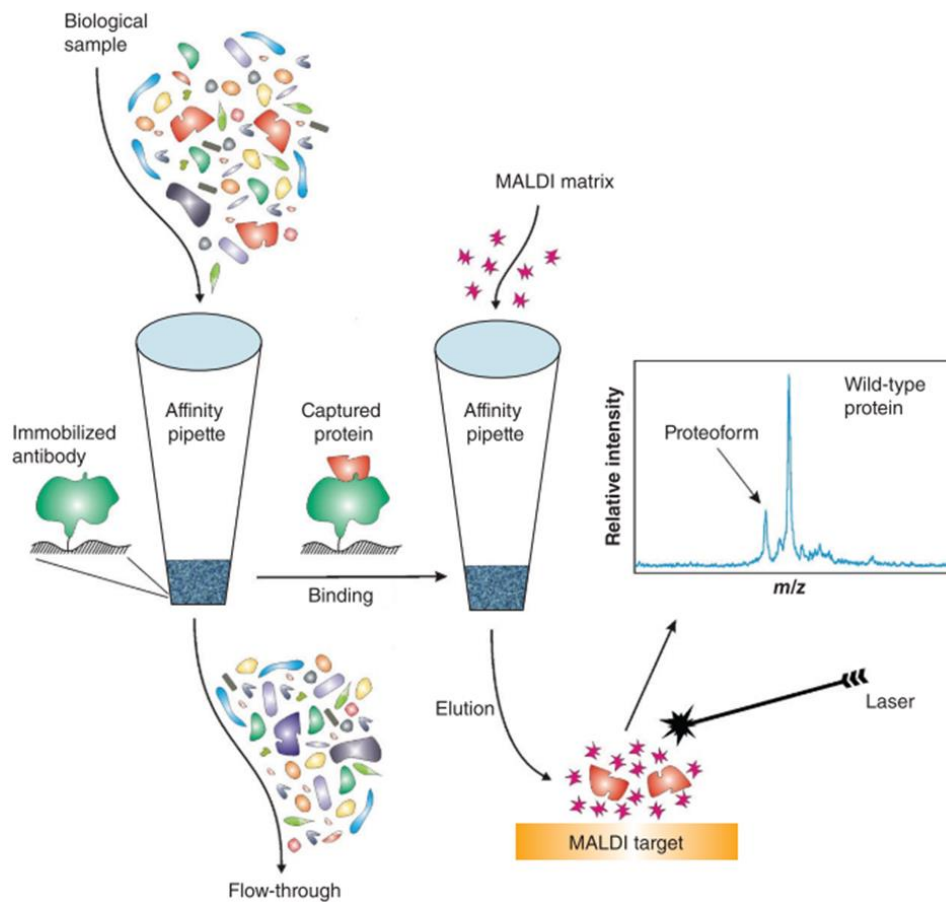


Figure 38. Représentation schématique d'un immuno-dosage couplé à la spectrométrie de masse, utilisant la stratégie des micro-colonnes de chromatographie d'affinité.

D'après Trenchevska et al., 2016a.

Cette méthode a permis de quantifier simultanément plusieurs protéoformes de protéines endogènes, avec des limites de détection et de quantification inférieures à 10 pg/mL, et notamment pour les protéines RANTES, la protéine de liaison du rétinol, la sérum amyloïde A, l'apolipoprotéine C-III (Trenchevska *et al.*, 2016; Trenchevska, Nelson and Nedelkov, 2016), ou encore l'insuline et ses analogues thérapeutiques (Nedelkov *et al.*, 2018). La spectrométrie de masse de type MALDI-ToF est généralement utilisée. Plus récemment, des méthodes par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), après enrichissement par un immuno-dosage, ont été décrites (Lanshoeft, Cianférani and Heudi, 2017; Nedelkov *et al.*, 2018). La limite de détection a été diminuée d'un facteur 10 par cette technique (1.5 pM contre 15 pM avec un MALDI-ToF) (Nedelkov *et al.*, 2018).

Ces méthodes permettent, tout comme les immuno-dosages multiplex non couplés, le dosage de plusieurs protéines en une seule analyse. En outre, la spectrométrie de masse apporte une importante augmentation de la spécificité et de la sensibilité des analyses (faibles LOD), ouvrant la porte au dosage de protéines présentes en très faibles concentrations dans le sang.

Chapitre IV. Comparaison des différentes méthodes de quantification

Afin d'établir une comparaison des différentes méthodes de quantification en protéomique, rappelons d'abord les critères auxquels elles doivent répondre :

- Haute **sensibilité** (faibles limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ))
- Haute **spécificité**, pour éviter les interférences avec d'autres constituants
- **Large gamme dynamique linéaire** pour une quantification précise
- **Reproductibilité** intra- et inter-laboratoire
- **Répétabilité**
- Grande **précision** de la mesure (courbes de calibration, étalonnage interne)
- **Durée d'analyse** la plus faible possible
- **Faible coût** pour une large diffusion auprès des structures habilitées (hôpitaux, cliniques, laboratoires d'analyses médicales, entreprise pharmaceutique, laboratoire de recherche, etc)
- **Facilité d'utilisation** pour une diffusion aisée
- Capacité de **multiplexage** élevée (dosage de plusieurs protéines en une seule analyse)

Parmi toutes les méthodes de dosage décrites dans ce manuscrit, aucune ne répond à l'ensemble des critères requis. Le choix de la méthode doit donc dépendre de l'application et du résultat recherchés. Le Tableau II récapitule un certain nombre de paramètres permettant une comparaison de chacune de ces méthodes.

Tableau II. Tableau comparatif des caractéristiques des différentes méthodes de quantification des protéines.

Les méthodes de **mesure des protéines totales** sont mises en évidence en **vert**, les **méthodes séparatives** en **bordeaux** et les **méthodes spécifiques** en **orange**. LOQ : limite de quantification, BCA : acide bicinchoninique, UV : ultraviolet, ϵ : coefficient d'absorbance molaire, 2D-E : électrophorèse à deux dimensions, 1D : à une dimension, Acs : anticorps, ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, MS : spectrométrie de masse, LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Méthodes	LOQ	Zone de linéarité	Spécificité	Durée d'analyse	Coût	Facilité d'utilisation	Capacité de multiplexage	Références
Biuret	mg-g/L	g/L	Protéines totales	1-2h	Faible	+++	-	(Tichy <i>et al.</i> , 2009; Krohn, 2011)
Lowry	mg/L	Faible linéarité - interférences	Protéines totales	1-2h	Faible	+++	-	(Lowry <i>et al.</i> , 1951)
Bradford	mg/L	Intervalle de linéarité étroit (mg/L)	Protéines totales	1-2h	Faible	+++	-	(Bradford, 1976)
BCA	mg/L	mg-g/L - peu d'interférences	Protéines totales	1-2h	Faible	+++	-	(Smith <i>et al.</i> , 1985)
Kjeldahl	mg-g/L	g/L	Protéines totales	4h	Faible	++	-	(Chromý <i>et al.</i> , 2015; Vinklarkova <i>et al.</i> , 2015)
Spectrophotométrie UV	Dépend de l' ϵ de la protéine à doser	Dépend de l' ϵ de la protéine à doser	Protéines totales	1h	Faible	++++	-	
Analyse en acides aminés	nmol – μ g - μ M	nmol – μ g - μ M	Protéines totales	24h	Elevé	++	-	(Rutherford and Dunn, 2011)
Electrophorèse sur gel	ng (dépend du révélateur utilisé)	Dépend du révélateur utilisé	Plus élevée avec l'électrophorèse 2D que 1D	4-8h	Modéré	+++	+	(Weiss, Weiland and Görg, 2009)
Western blot	μ g	μ g	Plus élevée qu'avec la 2D-E grâce à l'utilisation d'Acs spécifiques	24-36h	Elevé	++	+	(Lin, Choi and Pagano, 1985; Rollins <i>et al.</i> , 2017)
Electrophorèse capillaire	nM (pour une détection par fluorescence)	nM	Intermédiaire	2h	Elevé	+++	++	(Crosnier de Lassichère <i>et al.</i> , 2018)
Chromatographie en phase liquide	μ g – g (dépend de la taille de la colonne)	μ g – g (dépend de la taille de la colonne)	Intermédiaire	3-4h	Elevé	+++	+	(van Tricht <i>et al.</i> , 2018)

ELISA	ng-mg/L	ng-mg/L	Elevée mais interférences possibles	24h	Intermédiaire – production d’Acs onéreuse	+++	-	(Saita, Fujito and Mori, 2005; Saita, Shin and Fujito, 2013; Saita <i>et al.</i> , 2015)
Immuno-dosage multiplex	ng/L	ng/L	Elevée mais interférences possibles	1-24h	Intermédiaire – production d’Acs onéreuse	+++	+++	(Prabhakar, Eirikis and Davis, 2002; de Jager <i>et al.</i> , 2003; Rouquette, Desgruelles and Laroche, 2003; Harlé <i>et al.</i> , 2015; Lion <i>et al.</i> , 2016)
LC-MS/MS	µg-mg/L	µg-mg/L	Très élevée	3-48h	Très élevé	+	+++	(Heudi <i>et al.</i> , 2008; Huillet <i>et al.</i> , 2012; Li <i>et al.</i> , 2012; Mekhssian, Mess and Garofolo, 2014; Zhang <i>et al.</i> , 2014; Bros <i>et al.</i> , 2015; El Amrani <i>et al.</i> , 2016; Gilquin <i>et al.</i> , 2017)
Immuno-dosage-MS	ng-mg/L	ng-mg/L	Elevée mais interférences possibles	4-24h	Très élevé (MS)	+ (MS)	+++	(Stauber <i>et al.</i> , 2009; Trenchevska <i>et al.</i> , 2016; Lanshoeft, Cianfèrari and Heudi, 2017; Nedelkov <i>et al.</i> , 2018)

4.1 Comparaison des méthodes permettant la mesure des protéines totales

Les méthodes colorimétriques ont une faible sensibilité (de l'ordre du mg/L au g/L) et une faible spécificité (dosage des protéines totales) (Tableau II). En revanche, leurs courtes durées d'analyses, leur faible coût et leur facilité d'utilisation les rend incontournables lorsqu'un dosage rapide est nécessaire. Elles sont donc parfaitement adaptées au stade de la recherche exploratoire, pour le dosage d'une protéine purifiée. Elles permettent par exemple d'estimer la concentration d'une protéine unique, avant une étude plus ciblée. Parmi ces approches, la spectrophotométrie UV est la plus rapide et la plus aisée, mais elle manque de sensibilité et de précision, alors que la méthode de Kjeldahl est la plus longue et complexe à mettre en œuvre. Les méthodes du biuret, de Lowry, de Bradford et au BCA seront donc préférées. Une comparaison des méthodes de Lowry et de Bradford a été réalisée pour le dosage des protéines contenues dans des particules de la membrane externe de bactéries Gram négatif (Rossi *et al.*, 2015). Elle montre que le test de Lowry offre de meilleures linéarité et reproductibilité. Il est donc mieux adapté pour ce dosage.

Enfin, l'analyse en acides aminés offre de bonnes sensibilité et précision de mesure, grâce à une dérivaison des acides aminés avec la ninhydrine. En revanche, sa durée d'analyse est longue et sa mise en œuvre complexe. Le choix de la méthode doit dépendre de l'analyte à doser, puisque sa réponse peut différer d'un test à l'autre. Par exemple, il ne faut doser par spectrophotométrie UV que des protéines possédant un nombre suffisant d'acides aminés aromatiques afin que leur coefficient d'absorbance molaire soit significatif.

4.2 Comparaison des méthodes séparatives utilisées pour la quantification

Parmi les méthodes séparatives, les plus sensibles, spécifiques et précises sont l'électrophorèse capillaire et la chromatographie (Tableau II). Elles impliquent néanmoins un coût plus élevé puisqu'elles nécessitent un appareillage spécifique. Ces méthodes peuvent être utilisées au stade de recherche exploratoire, mais elles ont également démontré leur efficacité à des stades plus avancés, tels que la recherche de biomarqueurs ou la quantification du profil de glycosylation de divers Acms (Crosnier de Lassichère *et al.*, 2018; Giorgetti *et al.*, 2018). Grâce à leur pouvoir séparatif, elles permettent la quantification de protéines contenues dans des mélanges complexes (Crosnier de Lassichère *et al.*, 2018).

Le western blot est peu utilisé pour la quantification, en raison de sa longue durée d'analyse et de sa complexité de mise en œuvre (production d'AcS spécifiques dirigés contre l'analyte à doser, détection par chimioluminescence impliquant une chambre noire, etc). De plus, les nombreuses étapes précédant la détection peuvent induire des biais importants dans le dosage. Il est

néanmoins parfois utilisé en complément d'une autre méthode de dosage, pour sa validation (Chergui *et al.*, 2009; Gallet *et al.*, 2011). L'électrophorèse sur gel est la plus simple et la moins coûteuse de ces méthodes. Son pouvoir séparatif demeure faible, donc sa spécificité aussi. Toutes ces techniques n'offrent que des résultats de quantification relative, en comparant l'intensité d'un signal par rapport à un autre. Un couplage avec la spectrométrie de masse permet néanmoins de surmonter cette difficulté.

4.3 Comparaison des méthodes de dosage spécifiques

4.3.1 Généralités

Les tests ELISA apportent une haute sensibilité, une haute spécificité et une mise en application plutôt aisée (Figure 39). Ce sont les tests de choix pour le dosage de nombreux biomarqueurs. Cependant, la durée d'analyse d'un ELISA est de 24 heures environ et ses capacités de multiplexage sont limitées (Tableau II). Les immuno-dosages multiplex offrent des durées d'analyse et des limites de détection et de quantification sensiblement inférieures aux ELISA. Néanmoins, la production de tous les anticorps nécessaires à une analyse multiplexe est onéreuse et longue, ce qui pourrait justifier la faible diffusion de cette méthode.

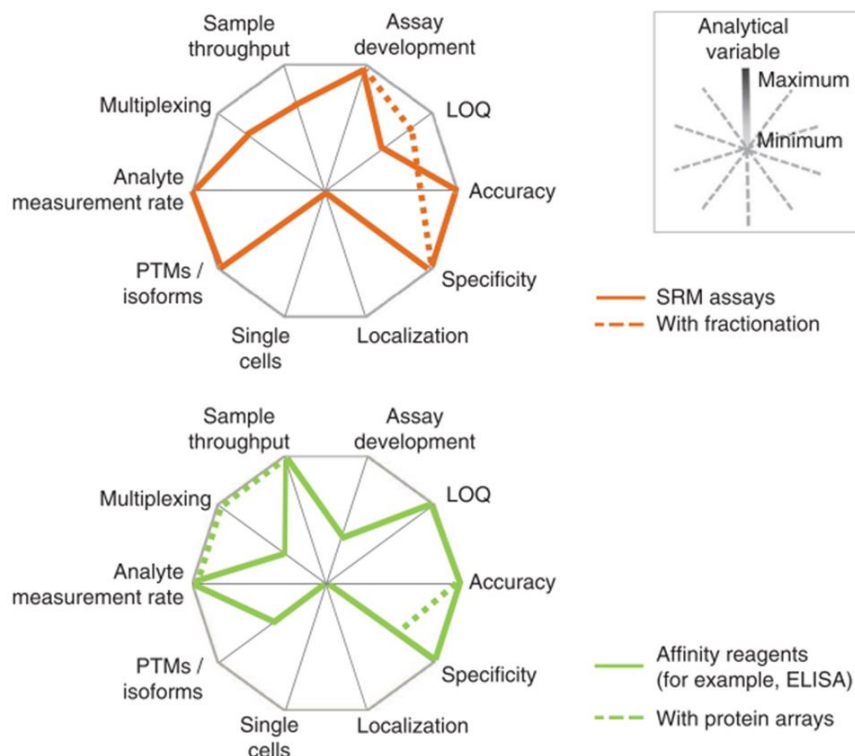


Figure 39. Profils de performances des méthodes de quantification des protéines par SRM/MS et par réaction anticorps-antigène.

A. Performances du dosage par SRM. **B.** Performances des immuno-dosages de type ELISA. Dans les diagrammes, chaque variable analytique est représentée par un rayon (qui part du centre). D'après Picotti and Aebersold, 2012.

Les techniques de quantification par spectrométrie de masse n'offrent pas d'amélioration en termes de sensibilité, de linéarité, ni de durée d'analyse (Tableau II). En effet, la LOQ et la linéarité, de l'ordre du μg au mg/L , sont supérieures à celle de certains tests ELISA (Figure 39). De plus, les durées d'analyse varient de 3 à 48 heures, contre 24h pour un test ELISA. En LC-MS/MS, ces durées sont très variables parce qu'elles dépendent du traitement d'échantillons (digestion enzymatique sur la nuit, réduction, alkylation, etc.), de la durée du gradient de séparation (fonction du type de chromatographie employée), des caractéristiques physico-chimiques des analytes (acidité, hydrophobicité, charge, masse moléculaire, capacité d'ionisation, etc) et de la complexité de l'échantillon. Cependant, la MS est la méthode qui permet d'avoir la plus haute spécificité, grâce au suivi de peptides protéotypiques communs à l'analyte à doser et à des étalons internes structurellement très proches. De plus, la haute résolution des spectromètres de masse permet de distinguer deux protéines de rapports m/z très proches et de limiter ainsi les interférences. Par ailleurs, leur capacité de multiplexage élevée (Figure 39) permet de répondre aux besoins de la recherche de biomarqueurs multiples (Huillet *et al.*, 2012) et d'études de pharmacocinétique de mélanges d'Acms (Xu *et al.*, 2014). Enfin, la MS présente une haute précision de mesure, grâce à l'utilisation d'étalons internes de différentes natures. Ainsi, une quantification absolue peut être atteinte, lorsque ces étalons sont introduits suffisamment tôt au cours de la préparation d'échantillons.

Le couplage d'un immuno-dosage à la MS améliore significativement la sensibilité (jusqu'à un facteur 1000) par comparaison à un ELISA avec détection UV ou à une analyse LC-MS/MS (Tableau II). De plus, il permet des analyses multiplexes et l'identification des protéines dosées. Les immuno-dosages sont généralement employés en amont d'une analyse par MALDI-ToF ou LC-MS, et apparaissent donc davantage comme une méthode hautement spécifique d'enrichissement des échantillons préalable à une analyse par MS, que comme une méthode de couplage à part entière.

4.3.2 Exemple comparatif des méthodes ELISA et LC-MS/MS

Afin de pouvoir établir un argumentaire comparatif entre le test ELISA et la LC-MS/MS, l'exemple de la quantification des protéines Tau, biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer, va être traité dans ce paragraphe.

Historiquement, la quantification de la protéine Tau est réalisée par des immuno-dosages. Cependant, ils présentent une faible linéarité, un manque de spécificité et de sélectivité au regard des multiples protéoformes de Tau et ils ne permettent pas le multiplexage. Une étude a comparé deux méthodes de quantification de Tau : l'immuno-dosage commercialement disponible et l'*Immunoaffinity LC-MS/MS* (IA-MS) (McAvoy *et al.*, 2014). Pour cette deuxième technique, un étalon interne de type PSAQ correspondant à la protéine Tau marquée par du C^{13} et du N^{15} a été employé. La protéine Tau a été purifiée par immunoaffinité, digérée à la trypsine, et quantifiée par LC-MS/MS, grâce au suivi d'un peptide signature. Le dosage par IA-MS a permis d'obtenir une LOQ basse de 0.25 pmol/L (aucune information n'est donnée sur la LOQ de

l'immuno-dosage). De plus, les deux méthodes (IA-MS et immuno-dosage) ont une bonne corrélation (coefficient de corrélation de 0.95) et offrent donc des résultats proches. Cependant, l'immuno-dosage surestime la concentration de Tau par rapport à l'IA-MS, pour des concentrations de travail supérieures à 500 pg/mL.

Une autre étude a comparé les résultats obtenus par un test ELISA et par LC-MS/MS (Bros *et al.*, 2015). La LC-MS/MS a été précédée d'une précipitation des protéines, d'une extraction en phase solide et d'une digestion trypsique (Bros *et al.*, 2015). Un étalon interne correspondant à la protéine Tau recombinante marquée par du N¹⁵ a été employé. Sept peptides protéotypiques communs à l'étalon interne et à Tau ont été suivis. La zone de linéarité obtenue est de 0.3 à 32.7 ng/mL et la LOQ de 0.3 à 2 ng/mL, en fonction du peptide signature considéré. En revanche, deux coefficients de corrélation des droites de calibration des sept peptides sont inférieurs à 0.96 et cinq sont inférieurs à 0.99, ce qui est assez bas. De plus, de grandes variabilités sont observées pour la concentration de la protéine Tau, entre les différents peptides étudiés. La concentration de Tau est entre 8 et 22 fois plus élevée en fonction du peptide signature utilisé pour la mesurer. Finalement, ces peptides servent essentiellement comme biomarqueurs indépendants, plutôt que pour la quantification de la protéine Tau. Si l'on compare les résultats obtenus par ELISA et par LC-MS/MS, pour l'un des peptides la concentration obtenue par MS est 17 à 25 fois supérieure à celle obtenue par ELISA (en fonction de l'échantillon considéré). Cette différence est expliquée par de possibles incompatibilités entre le tampon utilisé et le test ELISA, à l'origine d'effets de matrice.

Ces différences observées entre les immuno-dosages et la LC-MS/MS peuvent être la cause de divers biais. Des interférences avec d'autres protéines contenues dans l'échantillon peuvent justifier la sur-estimation de la concentration par immuno-dosage. Par ailleurs, Tau possède six isoformes, des formes tronquées et des MPTs (glycosylation, oxydation, phosphorylation) sur plus de 80 sites. Ainsi, la concentration peut être sous-estimée par MS si les peptides protéotypiques choisis contiennent l'un de ces sites. Il est donc essentiel de choisir des peptides sans MPT ni troncature. Ces observations remettent également en cause l'intérêt de suivre sept peptides différents pour quantifier la protéine Tau. Se limiter à deux ou trois peptides pourrait être suffisant.

Les immuno-dosages ont des faiblesses dans la spécificité analytique, principalement dues à la spécificité des Acs utilisés pour la capture et la détection. Les méthodes LC-MS/MS mesurent, quant à elles, directement le peptide cible avec une spécificité analytique basée sur le temps de rétention du peptide, son m/z et son profil de fragmentation. Ainsi, en termes de spécificité, la MS devance l'immuno-dosage. En termes de précision de la mesure, les deux méthodes sont souvent comparables. Cependant, la difficulté du choix des peptides protéotypiques et la succession des étapes préparatoires nécessaires avant une analyse MS peuvent entraîner une sous-estimation de la mesure par cette approche. Ainsi, aucune de ces deux méthodes ne peut se substituer à l'autre. Elles apportent chacune des réponses complémentaires.

Le choix doit dépendre des moyens, du temps à disposition et de la réponse désirée.

4.3.3 Comparaison des méthodes de quantification relative et absolue par MS

La MS propose un large spectre de méthodes pour la quantification des protéines. La question du choix de la méthode se pose donc. Pour y répondre, établissons une comparaison de ces outils. La Figure 40 illustre les différentes méthodes de quantification par MS et leurs niveaux de variations. On observe que le risque d'erreur augmente de gauche (marquage métabolique) à droite (sans marquage). Lorsqu'un marquage est réalisé au niveau cellulaire, les cellules marquées suivent les mêmes étapes que les cellules non marquées, limitant le risque d'erreur. Dans le cas des marquages chimiques et par introduction d'un étalon interne, deux situations sont présentées, n'ayant pas le même taux de variabilité.

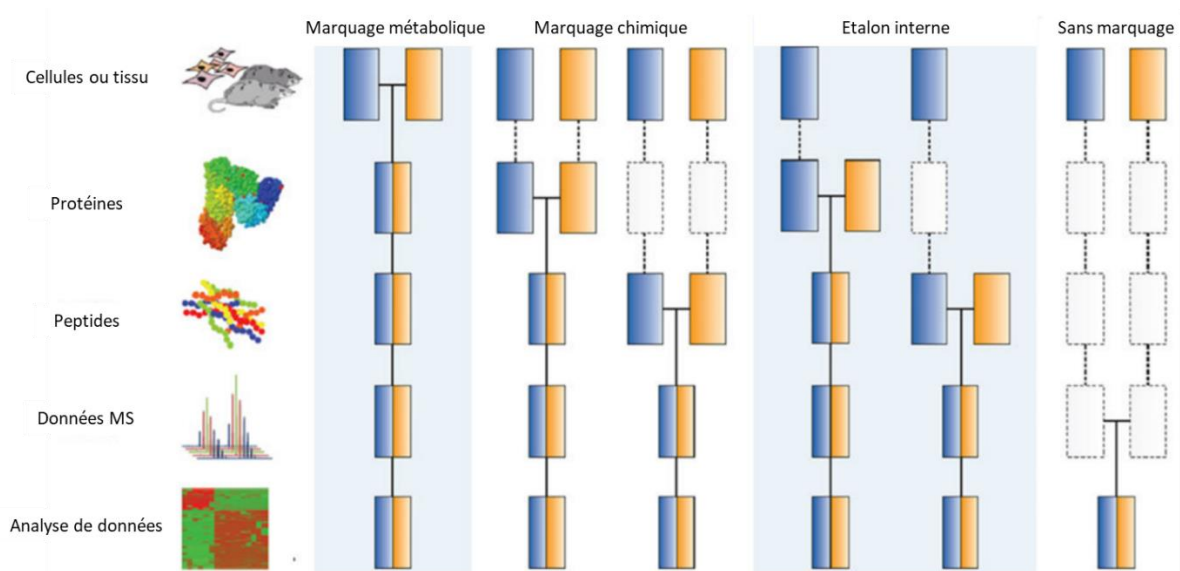


Figure 40. Les différentes méthodes de quantification des protéines par spectrométrie de masse.

Les encadrés orange et bleus représentent deux conditions expérimentales différentes. Les lignes horizontales indiquent que les échantillons sont mélangés. Les lignes en pointillés indiquent les étapes auxquelles des variations expérimentales peuvent conduire à des erreurs sur la quantification finale des protéines. D'après Bantscheff et al., 2012.

On observe que les approches sans marquage sont les moins précises parmi toutes les techniques de quantification par MS (Figure 40). En effet, si l'on considère le processus expérimental global, toutes les variations entre les analyses sont reflétées dans les données obtenues. Ainsi, le nombre d'étapes expérimentales doit être maintenu à un minimum et tous les efforts doivent être faits pour contrôler la reproductibilité à chaque étape. De plus, elles requièrent de complexes analyses statistiques. Enfin, tout particulièrement pour le comptage de spectres, la linéarité n'est pas claire et la précision est relativement faible.

Néanmoins, les méthodes de quantification sans marquage méritent d'être considérées pour diverses raisons. Tout d'abord, elles permettent d'identifier un grand nombre de protéines dans une gamme de détection étroite. De plus, elles ne nécessitent pas de milieu ou de réactifs spécifiques et sont donc moins onéreuses. Elles sont également plus simples et rapides à mettre en œuvre parce qu'il ne faut pas déterminer l'efficacité du marquage au préalable. Enfin, elles permettent de comparer un grand nombre d'analyses, alors que les méthodes avec marquage sont limitées dans leurs capacités de multiplexage. Elles sont donc bien adaptées au *screening* large de protéines, dans le cadre de la recherche de biomarqueurs ou de la caractérisation de nouveaux protéomes.

Une étude comparative des méthodes de dosage sans marquage et par marquage iTRAQ a été réalisée pour la caractérisation du protéome de la bactérie *Methylocella silvestris* (Patel *et al.*, 2009). Elle met en évidence l'intérêt de l'approche sans marquage dans ce contexte, qui permet de consommer moins de protéine (moins de 1 µg par analyse contre 100 µg avec iTRAQ), de réduire le temps d'analyse à moins de 3 jours contre 6 avec iTRAQ et d'identifier le plus grand nombre de protéines (421 contre 178 avec iTRAQ). Cette étude de *screening* large de protéines démontre donc l'intérêt des méthodes sans marquage. Une autre étude comparant les approches par comptage du nombre de spectres, aires sous les pics, emPAI et iTRAQ montre certaines limites au marquage iTRAQ, notamment en termes de sensibilité et de spécificité du dosage de protéines de faibles abondances (Dowle, Wilson and Thomas, 2016). A l'inverse, pour ces mêmes conditions, le comptage de spectres propose des résultats plus encourageants que les approches iTRAQ et emPAI. La mesure de l'aire sous les pics demeure néanmoins la méthode avec la plus haute précision et sensibilité.

Les méthodes les plus précises pour la quantification par MS sont celles qui font intervenir des peptides ou protéines marqués. Le marquage métabolique est présenté dans la Figure 40 comme étant le plus précis. En marquant l'ensemble des protéines d'une lignée cellulaire, il permet de déterminer le nombre de copies de protéines par cellule. Les répliques de protéines à doser, tels que les étalons internes de type PSAQ, sont, quant à elles, adaptées à une quantification ciblée. Elles permettent le dosage de protéines connues et recherchées, qu'elles soient endogènes ou thérapeutiques.

Néanmoins, ces approches basées sur des peptides ou protéines marqués présentent certaines limites. La préparation d'échantillon est complexe, et notamment le développement des étalons internes marqués, qui est laborieux, coûteux (surtout pour la technologie PSAQ) et incomplet (un rendement de marquage de 100% ne peut être obtenu). De plus, elles nécessitent des concentrations élevées d'échantillons.

Une comparaison de trois méthodes de marquage isotopique a été établie afin d'en déterminer la plus sensible et la plus spécifique (Brun *et al.*, 2007). Pour ce faire, les toxines superantigéniques staphylococciques SEA (*staphylococcal enterotoxin A*) et TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin-1*)

contenues dans des échantillons d'urine ont été quantifiées. Des étalons internes de types peptides AQUA, concatémères de peptides QconQAT et protéine entière PSAQ ont été utilisés et ajoutés à différentes étapes de la quantification (Figure 41A). Trois peptides protéotypiques ont été suivis pour SEA et quatre pour TSST-1. La quantification a été effectuée par nanoLC couplée à un spectromètre de masse de type Q-ToF, en mode DDA.

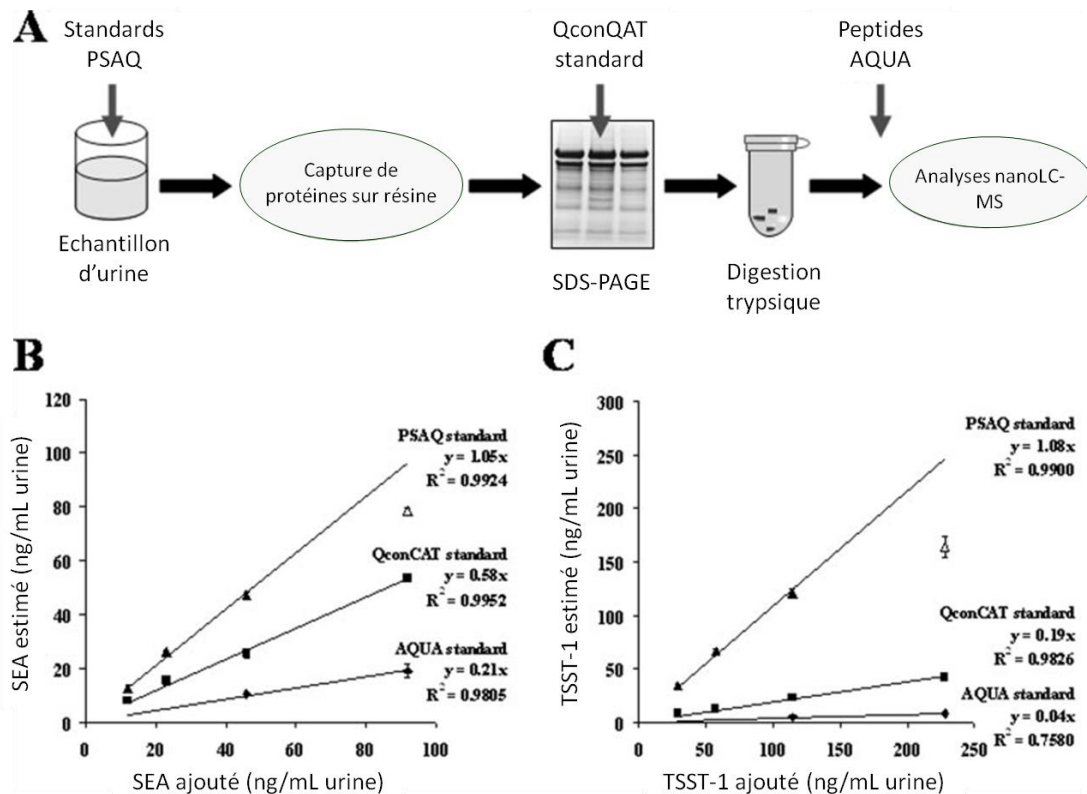


Figure 41. Comparaison des étalons internes sous forme de peptides AQUA, de concatémères QconCAT et de protéines entières PSAQ pour la quantification des toxines SEA et TSST-1 dans des échantillons d'urine.

A. Les échantillons d'urine ont été contaminés avec différentes quantités de SEA et de TSST-1. Trois types d'étalons sont utilisés pour la quantification des toxines : les peptides AQUA, les concatémères QconCAT et des toxines PSAQ. Les étalons ont été ajoutés aux échantillons d'urine à différentes étapes du processus d'analyse. **B.** et **C.** La comparaison des trois méthodes de dilution isotopiques pour le titrage de SEA (exemple du peptide NVTVQELDLQAR) (**B**) et TSST-1 (peptide LPTPIELPLK) (**C**) est présentée. Chaque point de donnée est une valeur moyenne \pm l'écart-type des trois répliques analytiques. SEA : *staphylococcal enterotoxin A*, TSST-1 : *toxic shock syndrome toxin-1*. D'après Brun et al., 2007.

Les graphes des Figure 41B et Figure 41C présentent les concentrations estimées de SEA et de TSST-1, calculées avec chacun des trois standards, en fonction de la quantité de toxine ajoutée. On observe que les étalons AQUA et QconCAT sous-estiment beaucoup les quantités de toxines dans l'urine. En revanche, PSAQ permet d'obtenir une quantification très précise, avec des pentes de 1.05 et 1.08 pour SEA et TSST-1, respectivement. De plus, pour les deux toxines étudiées, la méthode PSAQ offre la meilleure linéarité (R^2 de 0.99 dans les deux cas), également satisfaisante pour SEA avec QconCAT (Figure 41B et C). Les peptides AQUA et QconCAT sont ajoutés tardivement dans le processus de quantification, ce qui peut expliquer leur manque de précision et de linéarité (Figure 41A).

La méthode PSAQ offre donc la quantification la plus exacte parmi les trois étalons testés, puisqu'elle subit toutes les étapes préparatoires aux analyses par LC-MS/MS. En revanche, son inconvénient majeur est son coût de production plus élevé que celui des peptides AQUA et des concatémères QconCAT. Ainsi, le choix de la stratégie dépend du type d'analyse à réaliser et des moyens à disposition pour la mettre en œuvre.

Les grands défis de la quantification par MS, qui limitent sa large diffusion, sont son prix très élevé et sa difficulté de mise en œuvre. Ainsi, des structures telles que les hôpitaux, les cliniques ou les laboratoires d'analyses médicales ne possèdent pas nécessairement les moyens permettant l'achat et l'entretien de spectromètres de masse. De même, il est nécessaire d'avoir un personnel qualifié et familier avec ces appareils, ce qui n'est pas le cas à l'heure actuelle dans ces structures. Ces obstacles freinent l'utilisation en routine de la MS, alors que d'un point de vue purement pratique, elle peut être utilisée à tous les stades du développement d'un nouveau médicament d'origine protéique (recherche, pharmacocinétique, production, contrôle qualité, etc), ainsi que pour la recherche et le dosage de biomarqueurs. En effet, c'est une méthode aux multiples possibilités d'analyses (différents modes d'acquisition, analyseurs variés, diverses approches quantitatives...), pouvant répondre aux attentes de très nombreux projets.

Conclusion générale

Nous avons vu dans le premier chapitre de ce manuscrit que la quantification des protéines a un double enjeu. Elle intervient à la fois dans la recherche de biomarqueurs de diagnostic et de réponse au traitement et à la fois dans le cycle de vie des médicaments d'origine protéique. La mise au point d'une méthode de quantification sensible et spécifique est établie au stade de la recherche exploratoire. Elle permet de caractériser les protéines et de faire des études de pharmacocinétique. Ce dosage est ensuite employé au cours des études précliniques et cliniques, ainsi qu'en production pour le calcul des rendements, de la productivité, pour le contrôle qualité, etc. Il est également nécessaire pendant les études de pharmacovigilance, une fois que le traitement est sur le marché et administré au patient. C'est alors au niveau du patient que la méthode de dosage protéique mise au point intervient. Elle a d'abord un rôle à jouer pour le diagnostic, grâce à la recherche de biomarqueurs spécifiques d'une pathologie. Le dosage est également nécessaire pour le suivi du traitement chez le patient, et notamment lors des études d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination. Enfin, il permet d'estimer la réponse des patients au traitement, et de décider de sa poursuite ou non.

Les méthodes de dosage des protéines sont de natures diverses. Le second chapitre de ce manuscrit a d'abord présenté celles qui sont non spécifiques, mais qui sont le point de départ de la quantification des protéines. Au début du XX^{ème} siècle, les premiers tests ont vu le jour, dont les plus connus sont le test du biuret et de Bradford. Ces méthodes sont basées uniquement sur la détection d'azote dans les chaînes d'acides aminés des protéines, c'est pourquoi elles sont non spécifiques et peu précises. Elles sont donc utiles pour la détection et la quantification de protéines totales dans des échantillons simples. Les méthodes semi-quantitatives ont ensuite été abordées dans ce second chapitre. Il s'agit d'une part des méthodes séparatives, telles que l'électrophorèse capillaire ou sur gel, le western blot ou encore la chromatographie. Tous ces exemples sont des méthodes de séparation et de purification des protéines, qui peuvent être employées pour la quantification dans certains cas. D'autre part, la spectrométrie de masse permet une quantification relative en comparant l'abondance de deux espèces entre elles. Cela peut être réalisée avec ou sans marquage isotopique.

Dans la troisième partie de ce manuscrit, les méthodes spécifiques pour la quantification ont été mises en lumière. Les immuno-dosages, qui représentent la technologie la plus utilisée à l'heure actuelle, ont été exposés dans un premier temps. Il s'agit de la détection des protéines par des anticorps spécifiques, puis de leur révélation par différentes techniques telles que la spectrophotométrie UV ou la fluorescence principalement. Ces tests sont employés en routine aujourd'hui, mais présentent néanmoins quelques limites. Tout d'abord, il est difficile de réaliser des études simultanées de plusieurs protéines présentes dans un même échantillon, même si des immuno-dosages dits « multiplex » existent et sont commercialisés. De plus,

leur spécificité est mise à l'épreuve lors d'analyses d'échantillons complexes. En effet, il peut y avoir des problèmes d'interférences avec d'autres protéines présentes dans l'échantillon de plasma ou de sérum. Enfin, l'obtention et la purification des anticorps anti-anticorps nécessaires à ces tests sont complexes. Pour pallier ces inconvénients, la spectrométrie de masse apparaît comme un outil majeur pour la quantification absolue des protéines, et a donc été décrite dans un deuxième temps. En plus de sa grande spécificité, elle présente une haute résolution et une grande sensibilité (ces trois paramètres sont variables en fonction du type de spectromètre de masse utilisé), qualités indispensables à un dosage rapide, fiable et précis. La stratégie de dilution isotopique, qui fait intervenir des étalons internes de structure proche ou identique à la protéine à doser et marqués isotopiquement, permet également un dosage précis. La MS semble donc l'alternative la plus à même de répondre aux problématiques actuelles de la caractérisation des protéines. Cependant, cette technique demeure complexe et elle nécessite une grande expertise, donc du personnel formé et qualifié. De plus, son coût d'obtention est très élevé, ce qui freine sa large utilisation.

De nombreuses perspectives s'ouvrent à la spectrométrie de masse, qui est une technique qui évolue très rapidement et pour laquelle le champ d'exploitation semble infini. Historiquement, la LC-MS/MS quantitative était plus communément employée pour mesurer des protéines relativement abondantes. Cependant, avec le développement des immuno-dosages couplés à la MS et d'instruments plus sensibles, la quantification de protéines peu abondantes est maintenant possible (McAvoy *et al.*, 2014; Lanshoeft, Cianférani and Heudi, 2017; Zhang *et al.*, 2017). Par ailleurs, les triples quadripôles généralement utilisés pour la quantification présentent des limites, et notamment en termes de résolution et de précision en masse. De nombreuses méthodes se développent donc avec des spectromètres de masse à haute résolution, tels que le QqToF ou le QqOrbitrap (Lanshoeft, Wolf, Heudi, *et al.*, 2016; Lanshoeft, Cianférani and Heudi, 2017; Beck *et al.*, 2019).

Dans le domaine des molécules thérapeutiques, celles-ci sont de plus en plus modifiées afin de limiter les effets indésirables et d'augmenter la spécificité du traitement et donc son efficacité. Par exemple, les Acms peuvent être bi- ou multi-spécifiques, polyclonaux, tronqués ou encore couplés à des agents cytotoxiques pour former des ADCs. Or, il est plus complexe d'analyser et de doser ces nouvelles formes d'Acms. Cela conduit au développement de méthodes de quantification plus sophistiquées, qui analysent les molécules intactes (Lanshoeft, Cianférani and Heudi, 2017). C'est une technique récente, qui est limitée par le coût important de son développement, mais qui est de plus en plus décrite. Il est également possible de faire de la quantification partielle d'Acm, en utilisant d'autres enzymes que la trypsine (papaïne, IdeS...), qui conduisent à des fragments de taille plus importante que les peptides tryptiques (Fab, Fc, etc) (Beck *et al.*, 2013).

Une autre méthode en plein essor est la quantification par Imagerie par Spectrométrie de Masse (MSI pour *Mass Spectrometry Imaging*) (El Ayed, 2010; Buchberger *et al.*, 2018). C'est un outil permettant de créer des images moléculaires pour visualiser la distribution spatiale de molécules dans

différents types d'échantillons tissulaires. Elle combine les informations obtenues par MS avec la distribution spatiale de fines coupes d'échantillons. Avec cette méthode, il est possible de faire de la quantification relative de protéines, en comparant les intensités d'un même ion entre différentes coupes ou entre différents ions d'une même coupe. La quantification absolue par MSI est plus complexe, et requiert l'utilisation d'un étalon interne (Swales *et al.*, 2019). Celui-ci peut être l'analyte à doser marqué isotopiquement (Shariatgorji *et al.*, 2014; Bergman *et al.*, 2016) ou un composé de structure proche de l'analyte (Swales *et al.*, 2019). La MSI présente l'avantage d'une rapide préparation d'échantillons et elle permet de quantifier plusieurs molécules à partir d'un seul et même échantillon. De plus, elle combine un résultat quantitatif avec la distribution spatiale de molécules directement sur une coupe tissulaire. Cependant, comme l'analyse n'est effectuée que sur une petite partie d'un échantillon, elle n'est pas représentative du tissu entier. D'autres aspects peuvent biaiser la quantification, tels que des effets de suppression d'ions dus à l'hétérogénéité de certains tissus, des efficacités d'ionisation différentes entre plusieurs molécules quantifiées, ou l'abondance biologique des molécules, qui peut varier d'une région de tissu à une autre. Cette technique demeure donc un défi pour la protéomique quantitative. A l'heure actuelle, elle est principalement appliquée au dosage de petites molécules (antibiotiques, neurotransmetteurs, etc) (Shariatgorji *et al.*, 2014, 2016; Bergman *et al.*, 2016; Chumbley *et al.*, 2016).

Bibliographie

Al-Marrawi, M. Y. *et al.* (2013) 'Off-label use of cetuximab plus sorafenib and panitumumab plus regorafenib to personalize therapy for a patient with V600E BRAF-mutant metastatic colon cancer', *Cancer Biology and Therapy*, 14(August), pp. 703–710. doi: 10.4161/cbt.25191.

El Amrani, M. *et al.* (2016) 'Quantification of active infliximab in human serum with liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a tumor necrosis factor alpha -based pre-analytical sample purification and a stable isotopic labeled infliximab bio-similar as internal standard', *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V., 1454, pp. 42–48. doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.070.

Anderson, L. and Hunter, C. L. (2006) 'Quantitative Mass Spectrometric Multiple Reaction Monitoring Assays for Major Plasma Proteins', *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(4), pp. 573–588. doi: 10.1074/mcp.M500331-MCP200.

Ankney, J. A., Muneer, A. and Chen, X. (2018) 'Relative and Absolute Quantitation in Mass Spectrometry–Based Proteomics', *Annual Review of Analytical Chemistry*, 11(1), pp. 49–77. doi: 10.1146/annurev-anchem-061516-045357.

El Ayed, M. (2010) *Applications de l'Imagerie par Spectrométrie de masse MALDI à la Recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire*. Thèse de doctorat d'université. Lille : Université de Lille 1, 207 p.

Bantscheff, M. *et al.* (2007) 'Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4), pp. 1017–1031. doi: 10.1007/s00216-007-1486-6.

Bantscheff, M. *et al.* (2012) 'Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(4), pp. 939–965. doi: 10.1007/s00216-012-6203-4.

Beck, A. *et al.* (2007) 'Peptides as tools and drugs for immunotherapies', *Journal of Peptide Science*, 13(9), pp. 588–602. doi: 10.1002/psc.852.

Beck, A. *et al.* (2009) 'Anticorps thérapeutiques et dérivés : une palette de structures pour une pléthore d'indications', *médecine/sciences*, 25(12), pp. 1024–1032. doi: 10.1051/medsci/200925121024.

Beck, A. *et al.* (2010) 'Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 10(5), pp. 345–352. doi: 10.1038/nri2747.

Beck, A. *et al.* (2013) 'Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products', *Analytical Chemistry*, 85(2), pp. 715–736. doi: 10.1021/ac3032355.

Beck, A. *et al.* (2015) 'Cutting-edge mass spectrometry characterization of originator, biosimilar and biobetter antibodies', *Journal of Mass Spectrometry*,

50(2), pp. 285–297. doi: 10.1002/jms.3554.

Beck, A. *et al.* (2019) ‘Cutting-edge multi-level analytical and structural characterization of antibody-drug conjugates: present and future’, *Expert Review of Proteomics*. Taylor & Francis, 0(0), pp. 1–26. doi: 10.1080/14789450.2019.1578215.

Beck, A., Sanglier-Cianféron, S. and Van Dorsselaer, A. (2012) ‘Biosimilar, Biobetter, and Next Generation Antibody Characterization by Mass Spectrometry’, *Analytical Chemistry*, 84(11), pp. 4637–4646. doi: 10.1021/ac3002885.

Bergman, H.-M. *et al.* (2016) ‘Quantitative mass spectrometry imaging of small-molecule neurotransmitters in rat brain tissue sections using nanospray desorption electrospray ionization’, *The Analyst*, 141(12), pp. 3686–3695. doi: 10.1039/C5AN02620B.

Bettelheim, F. R. (1954) ‘Tyrosine-o-sulfate in a peptide from fibrinogen’, *Journal of the American Chemical Society*, 76(10), pp. 2838–2839. doi: 10.1021/ja01639a073.

Beynon, R. J. *et al.* (2005) ‘Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides’, *Nature Methods*, 2(8), pp. 587–589. doi: 10.1038/nmeth774.

Bio-Rad. Bio-Plex® Multiplex Immunoassays - Multiplex Assays Design. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.bio-rad.com/fr-fr/applications-technologies/bio-plex-multiplex-immunoassays?ID=LUSM0ZMNI> (page consultée le 11/04/2019).

Boja, E. S. *et al.* (2011) ‘The Journey to Regulation of Protein-Based Multiplex Quantitative Assays’, *Clinical Chemistry*, 57(4), pp. 560–567. doi: 10.1373/clinchem.2010.156034.

Bonichon, M. *et al.* (2016) ‘Development of immobilized-pepsin microreactors coupled to nano liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the quantitative analysis of human butyrylcholinesterase’, *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V., 1461, pp. 84–91. doi: 10.1016/j.chroma.2016.07.058.

Bouchonnet, S. (2009) *La spectrométrie de masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse*. Tec & Doc. Edited by Tec & Doc Lavoisier. Tec & Doc Lavoisier Ed., France, 195 p.

Bourmaud, A., Gallien, S. and Domon, B. (2016) ‘Parallel reaction monitoring using quadrupole-Orbitrap mass spectrometer: Principle and applications’, *PROTEOMICS*, 16(15–16), pp. 2146–2159. doi: 10.1002/pmic.201500543.

Bradford, M. M. (1976) ‘A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding’, *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Bros, P. *et al.* (2015) 'Antibody-free quantification of seven tau peptides in human CSF using targeted mass spectrometry', *Frontiers in Neuroscience*, 9(September), pp. 1–8. doi: 10.3389/fnins.2015.00302.

Brun, V. *et al.* (2007) 'Isotope-labeled Protein Standards', *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(12), pp. 2139–2149. doi: 10.1074/mcp.M700163-MCP200.

Buchberger, A. R. *et al.* (2018) 'Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights', *Analytical Chemistry*, 90(1), pp. 240–265. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04733.

Chergui, F. *et al.* (2009) 'Validation of a Phosphoprotein Array Assay for Characterization of Human Tyrosine Kinase Receptor Downstream Signaling in Breast Cancer', *Clinical Chemistry*, 55(7), pp. 1327–1336. doi: 10.1373/clinchem.2008.116632.

Chromý, V. *et al.* (2015) 'The Kjeldahl Method as a Primary Reference Procedure for Total Protein in Certified Reference Materials Used in Clinical Chemistry. I. A Review of Kjeldahl Methods Adopted by Laboratory Medicine', *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(2), pp. 106–111. doi: 10.1080/10408347.2014.892820.

Chumbley, C. W. *et al.* (2016) 'Absolute Quantitative MALDI Imaging Mass Spectrometry: A Case of Rifampicin in Liver Tissues', *Analytical Chemistry*, 88(4), pp. 2392–2398. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04409.

Crosnier de Lassichère, C. *et al.* (2018) 'Online Preconcentration in Capillaries by Multiple Large-Volume Sample Stacking: An Alternative to Immunoassays for Quantification of Amyloid Beta Peptides Biomarkers in Cerebrospinal Fluid', *Analytical Chemistry*, 90(4), pp. 2555–2563. doi: 10.1021/acs.analchem.7b03843.

Debaene, F. *et al.* (2014) 'Innovative Native MS Methodologies for Antibody Drug Conjugate Characterization: High Resolution Native MS and IM-MS for Average DAR and DAR Distribution Assessment', *Analytical Chemistry*, 86(21), pp. 10674–10683. doi: 10.1021/ac502593n.

Donato, P. *et al.* (2011) 'Comprehensive chromatographic separations in proteomics', *Journal of Chromatography A*, 1218(49), pp. 8777–8790. doi: 10.1016/j.chroma.2011.05.070.

Dowle, A. A., Wilson, J. and Thomas, J. R. (2016) 'Comparing the Diagnostic Classification Accuracy of iTRAQ, Peak-Area, Spectral-Counting, and emPAI Methods for Relative Quantification in Expression Proteomics', *Journal of Proteome Research*, 15(10), pp. 3550–3562. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00308.

Ehkirch, A. *et al.* (2018) 'Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products', *Journal of Chromatography B*. Elsevier B.V, 1086, pp. 176–183. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.04.010.

Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) 'Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G', *Immunochemistry*, 8(9), pp. 871–874. doi: 10.1016/0019-2791(71)90454-X.

Ezan, E. and Bitsch, F. (2009) 'Critical comparison of MS and immunoassays for the bioanalysis of therapeutic antibodies', *Bioanalysis*, 1(8), pp. 1375–1388. doi: 10.4155/bio.09.121.

Fauconneau, G. (1956) 'Dosage des protéines et des acides aminés et détermination de leur valeur nutritive. (1)', *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences*, 5(3), pp. 255–274.

Fugmann, T., Neri, D. and Roesli, C. (2010) 'DeepQuanTR: MALDI-MS-based label-free quantification of proteins in complex biological samples', *PROTEOMICS*, 10(14), pp. 2631–2643. doi: 10.1002/pmic.200900634.

Gahoual, R. *et al.* (2016) 'Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products', *Journal of Chromatography B*. Elsevier B.V., 1032, pp. 61–78. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.05.028.

Gallet, P. *et al.* (2011) 'Long-Term Alterations of Cytokines and Growth Factors Expression in Irradiated Tissues and Relation with Histological Severity Scoring', *PLoS ONE*. Edited by Y. Cao, 6(12), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0029399.

Gallien, S. *et al.* (2012) 'Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer', *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(12), pp. 1709–1723. doi: 10.1074/mcp.O112.019802.

Gauthier, D. K. and Turner, J. G. (1989) 'Anti-HIV antibody testing: Procedures and precautions', *American Journal of Infection Control*, 17(4), pp. 213–225. doi: 10.1016/0196-6553(89)90131-4.

Gerber, S. a *et al.* (2003) 'Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), pp. 6940–6945. doi: 10.1073/pnas.0832254100.

Gillet, L. C. *et al.* (2012) 'Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis', *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(6), pp. 1–17. doi: 10.1074/mcp.O111.016717.

Gilquin, B. *et al.* (2017) 'Multiplex and accurate quantification of acute kidney injury biomarker candidates in urine using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) and targeted proteomics', *Talanta*. Elsevier, 164(July 2016), pp. 77–84. doi: 10.1016/j.talanta.2016.11.023.

Giorgetti, J. *et al.* (2018) 'Monoclonal antibody N-glycosylation profiling using capillary electrophoresis – Mass spectrometry: Assessment and method validation', *Talanta*, 178, pp. 530–537. doi: 10.1016/j.talanta.2017.09.083.

Goldring, J. P. D. (2012) 'Protein Quantification Methods to Determine Protein Concentration Prior to Electrophoresis', *Protein Electrophoresis: Methods and Protocols*. Edited by B. T. Kurien and R. H. Scofield. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology), 869, pp. 287–304. doi: 10.1007/978-1-61779-821-4.

Gomez-Zepeda, D. *et al.* (2019) 'LC-MS/MS-based quantification of efflux transporter proteins at the BBB', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V., 164, pp. 496–508. doi: 10.1016/j.jpba.2018.11.013.

Goodlett, D. R. *et al.* (2001) 'Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(14), pp. 1214–1221. doi: 10.1002/rcm.362.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. (1949) 'Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction', *Journal of Biological Chemistry*, 177(11), pp. 751–766.

Greaves, J. and Roboz, J. (2013) *Mass Spectrometry for the Novice*. CRC Press Ed., US, 309 p.

Guzman, N. A., Blanc, T. and Phillips, T. M. (2008) 'Immunoaffinity capillary electrophoresis as a powerful strategy for the quantification of low-abundance biomarkers, drugs, and metabolites in biological matrices', *Electrophoresis*, 29(16), pp. 3259–3278. doi: 10.1002/elps.200800058.Immunoaffinity.

Gygi, S. P. *et al.* (1999) 'Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags', *Nature Biotechnology*, 17(10), pp. 994–999. doi: 10.1038/13690.

Haeuw, J. F., Caussanel, V. and Beck, A. (2009) 'Les immunoconjugués, anticorps «armés» pour combattre le cancer', *Medecine/Sciences*, 25, pp. 1046–1052. doi: 10.1051/medsci/200925121046.

Hanke, S. *et al.* (2008) 'Absolute SILAC for Accurate Quantitation of Proteins in Complex Mixtures Down to the Attomole Level', *Journal of Proteome Research*, 7(3), pp. 1118–1130. doi: 10.1021/pr7007175.

Hansen, K. C. *et al.* (2003) 'Mass Spectrometric Analysis of Protein Mixtures at Low Levels Using Cleavable ¹³C-Isotope-coded Affinity Tag and Multidimensional Chromatography', *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(5), pp. 299–314. doi: 10.1074/mcp.M300021-MCP200.

Harlé, A. *et al.* (2015) 'Expression of pEGFR and pAKT as response-predictive biomarkers for RAS wild-type patients to anti-EGFR monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancers', *British Journal of Cancer*, 113(4), pp. 680–685. doi: 10.1038/bjc.2015.250.

HAS (Haute Autorité de Santé). Les médicaments biosimilaires – L'essentiel. [En ligne]. Disponible sur : https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2807411/fr/les-medicaments-biosimilaires (page consultée le 15/04/2019).

Heudi, O. *et al.* (2008) 'Towards Absolute Quantification of Therapeutic Monoclonal Antibody in Serum by LC-MS/MS Using Isotope-Labeled Antibody Standard and Protein Cleavage Isotope Dilution Mass Spectrometry', *Analytical Chemistry*, 80(11), pp. 4200–4207. doi: 10.1021/ac800205s.

Heudi, O. *et al.* (2014) 'Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantitative analysis of ceritinib in human plasma and its application to pharmacokinetic studies', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(28), pp. 7389–7396. doi: 10.1007/s00216-014-8125-9.

Hiller, A., Greif, R. L. and Beckman, W. W. (1948) 'Determination of protein in urine by the biuret method', *Journal of Biological Chemistry*, 176(3), pp. 1421–1429.

Hoffman, M. A. *et al.* (2018) 'Comparison of Quantitative Mass Spectrometry Platforms for Monitoring Kinase ATP Probe Uptake in Lung Cancer', *Journal of Proteome Research*, 17(1), pp. 63–75. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00329.

Huillet, C. *et al.* (2012) 'Accurate Quantification of Cardiovascular Biomarkers in Serum Using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ™) and Selected Reaction Monitoring', *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(2), pp. 1–12. doi: 10.1074/mcp.M111.008235.

Huttner, W. B. (1984) 'Determination and Occurrence of Tyrosine O-Sulfate in Proteins', *Methods in Enzymology*, 107, pp. 200–223.

Iranpour, S. *et al.* (2016) 'Enhanced stimulation of anti-breast cancer T cells responses by dendritic cells loaded with poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticle encapsulated tumor antigens', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), p. 168. doi: 10.1186/s13046-016-0444-6.

de Jager, W. *et al.* (2003) 'Simultaneous Detection of 15 Human Cytokines in a Single Sample of Stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells', *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(1), pp. 133–139. doi: 10.1128/CDLI.10.1.133-139.2003.

Janin-Bussat, M.-C. *et al.* (2015) 'Characterization of antibody drug conjugate positional isomers at cysteine residues by peptide mapping LC-MS analysis', *Journal of Chromatography B*. Elsevier B.V., 981–982, pp. 9–13. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.12.017.

Jiang, H. and English, A. M. (2002) 'Quantitative Analysis of the Yeast Proteome by Incorporation of Isotopically Labeled Leucine', *Journal of Proteome Research*, 1(4), pp. 345–350. doi: 10.1021/pr025523f.

Jin, W., Burton, L. and Moore, I. (2018) 'LC-HRMS quantitation of intact antibody drug conjugate trastuzumab emtansine from rat plasma', *Bioanalysis*, 10(11), pp. 851–862. doi: 10.4155/bio-2018-0003.

Kingsley, G. R. (1939) 'The determination of serum total protein, albumin, and globulin by the biuret reaction', *Journal of Biological Chemistry*, 131, pp. 197–

200.

Kjeldahl, J. (1883) 'Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern', *Journal of Analytical Chemistry*, (22), pp. 366–382. doi: 10.1007/BF01338151.

Klinguer-Hamour, C., Caussanel, V. and Beck, A. (2009) 'Anticorps thérapeutiques et maladies infectieuses', *médecine/sciences*, 25(12), pp. 1116–1120. doi: 10.1051/medsci/200925121116.

Koç Öztürk, L. *et al.* (2016) 'Investigation of the N-terminal coding region of MUC7 alterations in dentistry students with and without caries', *Balkan Journal of Medical Genetics*, 19(1), pp. 71–76. doi: 10.1515/bjmg-2016-0009.

Krohn, R. I. (2011) 'The colorimetric Detection and Quantitation of Total Protein', *Current Protocols in Cell Biology*, 52. doi: 10.1002/0471143030.cba03hs52.

Kurien, B. T. and Scofield, R. H. (2006) 'Western blotting', *Methods*, 38, pp. 283–293. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.11.007.

Lange, V. *et al.* (2008) 'Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial', *Molecular Systems Biology*, 4(222), pp. 1–14. doi: 10.1038/msb.2008.61.

Lanquar, V. *et al.* (2007) '15N-Metabolic labeling for comparative plasma membrane proteomics in Arabidopsis cells', *PROTEOMICS*, 7(5), pp. 750–754. doi: 10.1002/pmic.200600791.

Lanshoeft, C., Wolf, T., Walles, M., *et al.* (2016) 'The flexibility of a generic LC-MS/MS method for the quantitative analysis of therapeutic proteins based on human immunoglobulin G and related constructs in animal studies', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V., 131, pp. 214–222. doi: 10.1016/j.jpba.2016.08.039.

Lanshoeft, C., Wolf, T., Heudi, O., *et al.* (2016) 'The use of generic surrogate peptides for the quantitative analysis of human immunoglobulin G1 in pre-clinical species with high-resolution mass spectrometry', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(6), pp. 1687–1699. doi: 10.1007/s00216-015-9286-x.

Lanshoeft, C., Cianféroni, S. and Heudi, O. (2017) 'Generic Hybrid Ligand Binding Assay Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry-Based Workflow for Multiplexed Human Immunoglobulin G1 Quantification at the Intact Protein Level: Application to Preclinical Pharmacokinetic Studies', *Analytical Chemistry*, 89(4), pp. 2628–2635. doi: 10.1021/acs.analchem.6b04997.

Lassman, M. E. *et al.* (2014) 'Practical Immunoaffinity-Enrichment LC-MS for Measuring Protein Kinetics of Low-Abundance Proteins', *Clinical Chemistry*, 1224(1530-8561 (Electronic)), pp. 1217–1224. doi: 10.1373/clinchem.2014.222455.

Lebert, D. *et al.* (2015) 'Absolute and multiplex quantification of antibodies in serum using PSAQ™ standards and LC-MS/MS', *Bioanalysis*, 7(10), pp. 1237–1251. doi: 10.4155/bio.15.56.

LEEM (Les Entreprises du Médicament). Les biotechnologies de santé en France. Le rapport du Comité Biotechnologies de santé du LEEM – Edition 2014a. [En ligne]. Disponible sur : https://www.leem.org/sites/default/files/Rapport%20final%20version%2028%2005%2014%20valid%20C3%A9e%20COPIL_0.pdf (page consultée le 10/04/2019).

LEEM (Les Entreprises du Médicament). Biomédicaments en France – état des lieux 2014b. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.leem.org/sites/default/files/Biom%C3%A9dicaments-etat-des-lieux-2014.pdf> (page consultée le 10/04/2019).

LEEM (Les Entreprises du Médicament). Bilan Economique des Entreprises du Médicament - Edition 2018. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.leem.org/publication/bilan-economique-des-entreprises-du-medicament-edition-2018-french-pharmaceutical> (page consultée de 10/04/2019).

LEEM (Les Entreprises du Médicament). Infographie – Innovation & Santé. Pourquoi les biomédicaments sont-ils si coûteux à produire ? – 2015. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.leem.org/media/pourquoi-les-biomedicaments-sont-ils-si-couteux-produire> (page consultée le 10/04/2019).

Lehmann, S. *et al.* (2013) 'Quantitative Clinical Chemistry Proteomics (qCCP) using mass spectrometry: general characteristics and application', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(5), pp. 919–935. doi: 10.1515/cclm-2012-0723.

Li, H. *et al.* (2012) 'General LC-MS/MS method approach to quantify therapeutic monoclonal antibodies using a common whole antibody internal standard with application to preclinical studies', *Analytical Chemistry*, 84, pp. 1267–1273. doi: 10.1021/ac202792n.

Lin, J. C., Choi, E. I. and Pagano, J. S. (1985) 'Qualitative and quantitative analyses of Epstein-Barr virus early antigen diffuse component by western blotting enzyme-linked immunosorbent assay with a monoclonal antibody', *Journal of virology*, 53(3), pp. 793–799.

Lion, M. *et al.* (2016) 'Trastuzumab as a preoperative monotherapy does not inhibit HER2 downstream signaling in HER2-positive breast cancer', *Oncology Letters*, 12(3), pp. 2028–2032. doi: 10.3892/ol.2016.4891.

Longo, D. L. *et al.* (2016) 'Cytotoxicity and cytokine expression induced by silorane and methacrylate-based composite resins', *Journal of Applied Oral Science*, 24, pp. 338–343. doi: 10.1590/1678-775720150449.

Loukovaara, S. *et al.* (2015) 'Quantitative Proteomics Analysis of Vitreous

Humor from Diabetic Retinopathy Patients', *Journal of Proteome Research*, 14(12), pp. 5131–5143. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00900.

Lowry, O. H. *et al.* (1951) 'Protein measurement with the folin phenol reagent', *Journal of Biological Chemistry*, 193, pp. 265–275.

Luczak, M., Marczak, L. and Stobiecki, M. (2014) 'Optimization of Plasma Sample Pretreatment for Quantitative Analysis Using iTRAQ Labeling and LC-MALDI-TOF/TOF', *PLoS ONE*. Edited by J. M. Koomen, 9(7), p. e101694. doi: 10.1371/journal.pone.0101694.

Lynch, J. M. and Barbano, D. M. (1999) 'Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products.', *Journal of AOAC International*, 82(6), pp. 1389–98.

McAvoy, T. *et al.* (2014) 'Quantification of Tau in Cerebrospinal Fluid by Immunoaffinity Enrichment and Tandem Mass Spectrometry', *Clinical Chemistry*, 60(4), pp. 683–689. doi: 10.1373/clinchem.2013.216515.

Mekhssian, K., Mess, J.-N. and Garofolo, F. (2014) 'Application of high-resolution MS in the quantification of a therapeutic monoclonal antibody in human plasma', *Bioanalysis*, 6(13), pp. 1767–1779. doi: 10.4155/bio.14.111.

Münchbach, M. *et al.* (2000) 'Quantitation and Facilitated de Novo Sequencing of Proteins by Isotopic N-Terminal Labeling of Peptides with a Fragmentation-Directing Moiety', *Analytical Chemistry*, 72(17), pp. 4047–4057. doi: 10.1021/ac000265w.

Musso, J. *et al.* (2015) 'Biomarkers probed in saliva by surface plasmon resonance imaging coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in array format', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(5), pp. 1285–1294. doi: 10.1007/s00216-014-8373-8.

Nedelkov, D. *et al.* (2018) 'Top-down mass spectrometric immunoassay for human insulin and its therapeutic analogs', *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V, 175, pp. 27–33. doi: 10.1016/j.jprot.2017.08.001.

Noble, J. E. and Bailey, M. J. A. (2009) 'Chapter 8. Quantitation of Protein', in *Methods in Enzymology*. 1st edn. Elsevier Inc., pp. 73–95. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1.

Oliveira, C. and Domingues, L. (2018) 'Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), pp. 81–92. doi: 10.1007/s00253-017-8623-8.

OncoLogiK. Sein (principes de prise en charge). [En ligne]. Disponible sur : [http://www.oncologik.fr/index.php/Interregion:Sein_\(principes_de_prise_en_charge\)#cite_note-ia-20](http://www.oncologik.fr/index.php/Interregion:Sein_(principes_de_prise_en_charge)#cite_note-ia-20) (page consultée le 10/04/2019).

Ong, S.-E. *et al.* (2002) 'Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics', *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(5), pp. 376–386. doi: 10.1074/mcp.M200025-MCP200.

- Ong, S.-E. and Mann, M. (2005) 'Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative.', *Nature chemical biology*, 1(5), pp. 252–62. doi: 10.1038/nchembio736.
- Ong, S.-E. and Pandey, A. (2001) 'An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics', *Biomolecular Engineering*, 18(5), pp. 195–205. doi: 10.1016/S1389-0344(01)00095-8.
- Ong, S. and Mann, M. (2007) 'Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture for Quantitative Proteomics', in *Methods in Molecular Biology*, pp. 37–52. doi: 10.1007/978-1-59745-255-7_3.
- Ow, S. Y. *et al.* (2008) 'Quantitative Shotgun Proteomics of Enriched Heterocysts from *Nostoc* sp. PCC 7120 Using 8-Plex Isobaric Peptide Tags', *Journal of Proteome Research*, 7(4), pp. 1615–1628. doi: 10.1021/pr700604v.
- Pan, S. *et al.* (2009) 'Mass Spectrometry Based Targeted Protein Quantification: Methods and Applications', *Journal of Proteome Research*, 8(2), pp. 787–797. doi: 10.1021/pr800538n.
- Patel, V. J. *et al.* (2009) 'A Comparison of Labeling and Label-Free Mass Spectrometry-Based Proteomics Approaches', *Journal of Proteome Research*, 8(7), pp. 3752–3759. doi: 10.1021/pr900080y.
- Paul, A. and Paul, S. (2014) 'The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers', *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, 19(21), pp. 605–6018.
- PAVELEK, Z. *et al.* (2016) 'Proteomic analysis of cerebrospinal fluid for relapsing-remitting multiple sclerosis and clinically isolated syndrome', *Biomedical Reports*, 5(1), pp. 35–40. doi: 10.3892/br.2016.668.
- Perkins, G. *et al.* (2010) 'Additional value of EGFR downstream signaling phosphoprotein expression to KRAS status for response to anti-EGFR antibodies in colorectal cancer', *International Journal of Cancer*, 127(6), pp. 1321–1331. doi: 10.1002/ijc.25152.
- Phillip, A. *et al.* (2017) 'Production and application of high quality stable isotope-labeled human immunoglobulin G1 for mass spectrometry analysis', *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 60(3), pp. 160–167. doi: 10.1002/jlcr.3486.
- Picard, G. *et al.* (2012) 'PSAQ™ standards for accurate MS-based quantification of proteins: from the concept to biomedical applications', *Journal of Mass Spectrometry*, 47(10), pp. 1353–1363. doi: 10.1002/jms.3106.
- Picotti, P. and Aebersold, R. (2012) 'Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions', *Nature Methods*, 9(6), pp. 555–566. doi: 10.1038/nmeth.2015.
- Prabhakar, U., Eirikis, E. and Davis, H. M. (2002) 'Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP™ assay', *Journal of Immunological Methods*, 260(1–2), pp. 207–218.

doi: 10.1016/S0022-1759(01)00543-9.

Rollins, M. *et al.* (2017) 'Lysine acetyltransferase NuA4 and acetyl-CoA regulate glucose-deprived stress granule formation in *Saccharomyces cerevisiae*', *PLOS Genetics*. Edited by A. Caudy, 13(2), pp. 1–27. doi: 10.1371/journal.pgen.1006626.

Rose, K. *et al.* (1983) 'A new mass-spectrometric C-terminal sequencing technique finds a similarity between γ -interferon and $\alpha 2$ -interferon and identifies a proteolytically clipped γ -interferon that retains full antiviral activity', *Biochemical Journal*, 215, pp. 273–277.

Ross, P. L. *et al.* (2004) 'Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents', *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(12), pp. 1154–1169. doi: 10.1074/mcp.M400129-MCP200.

Rossi, O. *et al.* (2015) 'Comparison of Colorimetric Assays with Quantitative Amino Acid Analysis for Protein Quantification of Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA)', *Molecular Biotechnology*, 57(1), pp. 84–93. doi: 10.1007/s12033-014-9804-7.

Röst, H. L. *et al.* (2014) 'OpenSWATH enables automated, targeted analysis of data-independent acquisition MS data', *Nature Biotechnology*, 32(3), pp. 219–223. doi: 10.1038/nbt.2841.

Rouquette, A.-M., Desgruelles, C. and Laroche, P. (2003) 'Evaluation of the New Multiplexed Immunoassay, FIDIS, for Simultaneous Quantitative Determination of Antinuclear Antibodies and Comparison With Conventional Methods', *American Journal of Clinical Pathology*, 120(5), pp. 676–681. doi: 10.1309/GJHK0D24YDDXW0NF.

Rutherford, S. M. and Dunn, B. M. (2011) 'Quantitative Amino Acid Analysis', in *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 3.2.1–3.2.6. doi: 10.1002/0471140864.ps0302s63.

Sadowski, P. G. *et al.* (2006) 'Quantitative proteomic approach to study subcellular localization of membrane proteins', *Nature Protocols*, 1(4), pp. 1778–1789. doi: 10.1038/nprot.2006.254.

Saita, T. *et al.* (2015) 'Quantification of Sorafenib in Human Serum by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay', *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 38(11), pp. 1788–1793. doi: 10.1248/bpb.b15-00484.

Saita, T., Fujito, H. and Mori, M. (2005) 'A Specific and Sensitive Assay for Gefitinib Using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Human Serum', *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(10), pp. 1833–1837. doi: 10.1248/bpb.28.1833.

Saita, T., Shin, M. and Fujito, H. (2013) 'Development of a Specific and Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Quantification of

- Imatinib', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(12), pp. 1964–1968. doi: 10.1248/bpb.b13-00597.
- Scheltens, P. *et al.* (2016) 'Alzheimer's disease', *Lancet*. Elsevier Ltd, 1(15), pp. 1–13. doi: 10.1038/nrdp.2015.56.
- Schilling, B. *et al.* (2015) 'Multiplexed, Scheduled, High-Resolution Parallel Reaction Monitoring on a Full Scan QqTOF Instrument with Integrated Data-Dependent and Targeted Mass Spectrometric Workflows', *Analytical Chemistry*, 87(20), pp. 10222–10229. doi: 10.1021/acs.analchem.5b02983.
- Shafiee, H. *et al.* (2015) 'Emerging Technologies for Point-of-Care Management of HIV Infection', *Annual Review of Medicine*, 66(1), pp. 387–405. doi: 10.1146/annurev-med-092112-143017.
- Shariatgorji, M. *et al.* (2014) 'Direct Targeted Quantitative Molecular Imaging of Neurotransmitters in Brain Tissue Sections', *Neuron*, 84(4), pp. 697–707. doi: 10.1016/j.neuron.2014.10.011.
- Shariatgorji, M. *et al.* (2016) 'Direct imaging of elemental distributions in tissue sections by laser ablation mass spectrometry', *Methods*, 104, pp. 86–92. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.05.021.
- Shi, T. *et al.* (2012) 'Advancing the sensitivity of selected reaction monitoring-based targeted quantitative proteomics', *PROTEOMICS*, 12(8), pp. 1074–1092. doi: 10.1002/pmic.201100436.
- Shi, T. *et al.* (2016) 'Advances in targeted proteomics and applications to biomedical research', *PROTEOMICS*, 16(15–16), pp. 2160–2182. doi: 10.1002/pmic.201500449.
- Simon, R. *et al.* (2014) 'Hydrophilic interaction liquid chromatography as second dimension in multidimensional chromatography with an anionic trapping strategy: Application to prostate-specific antigen quantification', *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V., 1354, pp. 75–84. doi: 10.1016/j.chroma.2014.05.063.
- Simpson, D. M. and Beynon, R. J. (2012) 'QconCATs: design and expression of concatenated protein standards for multiplexed protein quantification', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(4), pp. 977–989. doi: 10.1007/s00216-012-6230-1.
- Singh, S. *et al.* (2009) 'FLEXIQuant: A Novel Tool for the Absolute Quantification of Proteins, and the Simultaneous Identification and Quantification of Potentially Modified Peptides', *Journal of Proteome Research*, 8(5), pp. 2201–2210. doi: 10.1021/pr800654s.
- Slimani, A. *et al.* (2018) 'Learning Analytics Through Serious Games: Data Mining Algorithms for Performance Measurement and Improvement Purposes', *International Journal of Emerging Technologies in Learning (iJET)*, 13(01), p. 46. doi: 10.3991/ijet.v13i01.7518.
- Smith, P. K. *et al.* (1985) 'Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid',

Analytical Biochemistry, 150, pp. 76–85.

Stackhouse, N., Miller, A. K. and Gadgil, H. S. (2011) 'A High-Throughput UPLC Method for the Characterization of Chemical Modifications in Monoclonal Antibody Molecules', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(12), pp. 5115–5125. doi: 10.1002/jps.22710.

Stauber, J. *et al.* (2009) 'Polymerase Chain Reaction and Immunoassay–Matrix Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry Using Tag-Mass Technology: New Tools to Break Down Quantification Limits and Multiplexes', *Analytical Chemistry*, 81(22), pp. 9512–9521. doi: 10.1021/ac901416s.

Strassberger, V. *et al.* (2014) 'A comprehensive surface proteome analysis of myeloid leukemia cell lines for therapeutic antibody development', *Journal of Proteomics*. Elsevier B.V., 99, pp. 138–151. doi: 10.1016/j.jprot.2014.01.022.

Strimbu, K. and Tavel, J. A. (2010) 'What are biomarkers?', *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), pp. 463–466. doi: 10.1097/COH.0b013e32833ed177.

Swales, J. G. *et al.* (2019) 'Mass spectrometry imaging and its application in pharmaceutical research and development: A concise review', *International Journal of Mass Spectrometry*, 437, pp. 99–112. doi: 10.1016/j.ijms.2018.02.007.

Syrový, I. and Hodný, Z. (1991) 'Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis', *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 569(1–2), pp. 175–196. doi: 10.1016/0378-4347(91)80229-6.

Taylor, S. C. *et al.* (2013) 'A defined methodology for reliable quantification of western blot data', *Molecular Biotechnology*, 55, pp. 217–226. doi: 10.1007/s12033-013-9672-6.

Taylor, S. C. and Posch, A. (2014) 'The Design of a Quantitative Western Blot Experiment, The Design of a Quantitative Western Blot Experiment', *BioMed Research International*, 2014, 2014, pp. 1–8. doi: 10.1155/2014/361590, 10.1155/2014/361590.

Tichý, M. *et al.* (2009) 'Interference of IgM- λ paraprotein with biuret-type assay for total serum protein quantification', *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47(2), pp. 235–236. doi: 10.1515/CCLM.2009.050.

Tighe, P. J. *et al.* (2015) 'ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls', *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 9(3–4), pp. 406–422. doi: 10.1002/prca.201400130.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), pp. 4350–4. doi: 10.1002/bies.950190612.

Trenchevska, O. *et al.* (2016) 'Development of quantitative mass spectrometric

immunoassay for serum amyloid A', *Biomarkers*, 21(8), pp. 743–751. doi: 10.1080/1354750X.2016.1201533.

Trenchevska, O., Nelson, R. W. and Nedelkov, D. (2016) 'Mass spectrometric immunoassays for discovery, screening and quantification of clinically relevant proteoforms', *Bioanalysis*, 8(15), pp. 1623–1633. doi: 10.4155/bio-2016-0060.

van Tricht, E. *et al.* (2015) 'New capillary gel electrophoresis method for fast and accurate identification and quantification of multiple viral proteins in influenza vaccines', *Talanta*, 144, pp. 1030–1035. doi: 10.1016/j.talanta.2015.07.047.

van Tricht, E. *et al.* (2018) 'Fast, selective and quantitative protein profiling of adenovirus-vector based vaccines by ultra-performance liquid chromatography', *Journal of Chromatography A*, 1581–1582, pp. 25–32. doi: 10.1016/j.chroma.2018.10.045.

Vidova, V. and Spacil, Z. (2017) 'A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition', *Analytica Chimica Acta*. Elsevier Ltd, 964, pp. 7–23. doi: 10.1016/j.aca.2017.01.059.

Vignali, D. A. A. (2000) 'Multiplexed particle-based flow cytometric assays', *Journal of Immunological Methods*, 243(1–2), pp. 243–255. doi: 10.1016/S0022-1759(00)00238-6.

Vinklarkova, B. *et al.* (2015) 'The Kjeldahl Method as a Primary Reference Procedure for Total Protein in Certified Reference Materials Used in Clinical Chemistry. II. Selection of Direct Kjeldahl Analysis and Its Preliminary Performance Parameters', *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45, pp. 112–118. doi: Doi 10.1080/10408347.2014.892821.

Visser, N. F. C. and Heck, A. J. R. (2008) 'Surface plasmon resonance mass spectrometry in proteomics', *Expert Review of Proteomics*, 5(3), pp. 425–433. doi: 10.1586/14789450.5.3.425.

Wagner-Rousset, E. *et al.* (2014) 'Antibody-drug conjugate model fast characterization by LC-MS following IdeS proteolytic digestion', *mAbs*, 6(February), pp. 173–184. doi: 10.4161/mabs.26773.

Weiss, W., Weiland, F. and Görg, A. (2009) 'Protein Detection and Quantitation Technologies for Gel-Based Proteome Analysis', in Reinders, J. and Sickmann, A. (eds) *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in Molecular Biology™), pp. 59–82. doi: 10.1007/978-1-60761-157-8_4.

Wikipedia. Rélectron. [En ligne]. Disponible sur : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Rélectron> (page consultée le 11/04/2019).

Wong, A. and Ma, B. B. Y. (2014) 'Personalizing therapy for colorectal cancer', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. Elsevier, Inc, 12(1), pp. 139–144. doi: 10.1016/j.cgh.2013.08.040.

Xu, K. *et al.* (2014) 'A multiplexed hybrid LC–MS/MS pharmacokinetic assay to measure two co-administered monoclonal antibodies in a clinical study', *Bioanalysis*, 6(13), pp. 1781–1794. doi: 10.4155/bio.14.142.

Yu, H. *et al.* (2019) 'Labeling nitrogen species with the stable isotope ^{15}N for their measurement by separative methods coupled with mass spectrometry: A review', *Talanta*. Elsevier B.V., 191(September 2018), pp. 491–503. doi: 10.1016/j.talanta.2018.09.011.



Zhang, H. *et al.* (2017) 'Immunoaffinity LC–MS/MS for quantitative determination of a free and total protein target as a target engagement biomarker', *Bioanalysis*, 9(20), pp. 1573–1588. doi: 10.4155/bio-2017-0152.

Zhang, Q. *et al.* (2014) 'Generic Automated Method for Liquid Chromatography–Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry Based Monoclonal Antibody Quantitation for Preclinical Pharmacokinetic Studies', *Analytical Chemistry*, 86(17), pp. 8776–8784. doi: 10.1021/ac5019827.

Zhao, Y.-Y. and Lin, R.-C. (2014) 'UPLC–MSE application in disease biomarker discovery: The discoveries in proteomics to metabolomics', *Chemico-Biological Interactions*. Elsevier Ireland Ltd, 215(1), pp. 7–16. doi: 10.1016/j.cbi.2014.02.014.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : mardi 25 juin 2019, 14h

<p>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Maud FUMEX</p> <p>Sujet : Les différentes méthodes d'analyse quantitative des protéines dans le domaine pharmaceutique : description, comparaison et nouvelles perspectives</p> <p><u>Jury :</u> Président : M. Igor CLAROT, Professeur des Universités Directeur : M. Olivier HEUDI, Docteur Juges : M. Jean-Louis MERLIN, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier Mme Isabelle PETRY, Pharmacien biologiste</p>	<p>Vu, Nancy, le 23 mai 2019</p> <p>Le Président du Jury Directeur de Thèse M. CLAROT M. Olivier Heudi Heudi Co-directeur Igor Clarot</p>
<p>Vu et approuve, Nancy, le 27.05.2019</p> <p>Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine.</p> 	<p>Vu, Nancy, le 6 JUIN 2019</p> <p>Le Président de l'Université de Lorraine.</p>  <p>Pierre MUTZENHARDT</p> <p>N° d'enregistrement : 10742</p>

N° d'identification :

TITRE

Les différentes méthodes d'analyse quantitative des protéines dans le domaine pharmaceutique : description, comparaison et nouvelles perspectives

Thèse soutenue le mardi 25 juin 2019

Par Maud FUMEX

RESUME :

La protéomique correspond à l'étude d'un ensemble de protéines. Qu'il s'agisse de protéines endogènes ou thérapeutiques, leur quantification est indispensable. Elle permet à la fois de diagnostiquer une maladie et d'orienter un traitement en fonction de la réponse du patient. De plus, elle intervient à chacune des étapes du cycle des médicaments d'origine protéique. Ce manuscrit a pour objectif de mettre en lumière les principales méthodes utilisées pour quantifier les protéines, dans le milieu pharmaceutique et médical.

Ces méthodes ont beaucoup évolué depuis un siècle. Des dosages basés sur des réactions chimiques avec les liaisons peptidiques ont d'abord permis la quantification non spécifique de l'ensemble des protéines contenues dans un échantillon. Il est également possible d'effectuer un dosage à partir de méthodes séparatives, telles que l'électrophorèse sur gel ou capillaire, ou différents types de chromatographies. La méthode phare pour quantifier les protéines est l'immuno-dosage. Basée sur la réaction antigène-anticorps, cette technique est hautement spécifique et aisée à mettre en œuvre. Cependant, depuis quelques années, la spectrométrie de masse (MS) apparaît comme une méthode de pointe permettant de répondre à toutes les problématiques de la quantification des protéines. Des appareils à haute résolution permettent d'offrir une grande précision de mesure. Des résultats très sensibles et spécifiques sont obtenus, grâce à des étapes de préparation d'échantillons préalables aux analyses MS. De plus, il est possible de quantifier les protéines de manière relative, avec ou sans marquage isotopique ; mais aussi de manière absolue, grâce à l'ajout d'étalons internes marqués isotopiquement à différentes étapes de la préparation d'échantillons. Le coût très élevé de cette technique et sa difficulté d'utilisation limitent néanmoins sa large diffusion.

Finalement, chacune des méthodes décrites peut être utilisée pour différentes applications, allant de la recherche exploratoire à la caractérisation fine d'une protéine complexe.

MOTS CLES : Protéines, protéomique quantitative, méthodes séparatives, immuno-dosage, spectrométrie de masse, biomarqueurs, biotechnologies

Directeurs de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mr Olivier HEUDI	Laboratoire DMPK/Bioanalytics, Novartis Institutes for Biomedical Research	Expérimentale <input type="checkbox"/>
Mr Igor CLAROT	Laboratoire CITHEFOR EA 3452, Faculté de Pharmacie de Nancy	Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème 1

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle