

THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE  
L'ÉCOLE NATIONALE SUPERIEURE DE CHIMIE DE MONTPELLIER

En Ingénierie Biomoléculaire

École doctorale ED 459 Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) – UMR  
5247

# Profilage de métalloprotéases par spectrométrie de masse MALDI via l'utilisation de nouvelles sondes moléculaires (ABP)

Présentée par **Mylene SEJALON-CIPOLLA**

Le 10 Novembre 2022

Sous la direction de Sonia CANTEL

Devant le jury composé de

Fabienne BURLINA, Directrice de recherche, LBM, Paris  
Dominique BONNET, Directeur de recherche, LIT, Strasbourg  
Danièle NOEL, Directrice de recherche, IRMB, Montpellier  
Laurent DEVEL, Directeur de recherche, CEA, Saclay  
Nicolas INGUIMBERT, Professeur, CRIOBE, Perpignan  
Gilles SUBRA, Professeur, IBMM, Montpellier  
Sonia CANTEL, Maître de conférences, IBMM, Montpellier

Rapportrice  
Rapporteur  
Examinatrice  
Examineur  
Président  
Co-encadrant de thèse  
Directrice de thèse



UNIVERSITÉ DE  
MONTPELLIER









**A mon grand-père et à notre dernière  
promesse...**



## REMERCIEMENTS

Avant d'amorcer la présentation de mes travaux de thèse, je tenais tout d'abord à remercier les personnes que j'ai eu la chance de côtoyer et qui m'ont accompagné tout au long de ce projet.

Je souhaite remercier Madame le Docteur Fabienne BURLINA et Monsieur le Docteur Dominique Bonnet pour avoir accepté de juger l'ensemble de ces travaux. Je remercie également Monsieur le Docteur Laurent DEVEL, Madame le Docteur Danièle NOEL et Monsieur le Professeur Nicolas Inguibert pour avoir accepté de siéger au sein de ce jury en tant qu'examineurs.

Je souhaite exprimer mes profonds remerciements à Madame le Docteur Muriel Amblard pour son accueil au sein de l'IBMM et plus particulièrement au sein de l'équipe F9. Je remercie particulièrement Monsieur le Docteur Jean-Alain FEHRENTZ et Monsieur le Docteur Guillaume LACONDE pour leur temps, leur disponibilité et l'aide qu'ils m'ont apportée au quotidien, en termes de formation et de sciences. Je remercie Monsieur Pierre SANCHEZ pour son travail d'analyse et la formation prodiguée sur la LC-MS. Je remercie également Monsieur le Docteur Yannick BESSIN pour sa disponibilité et son aide concernant les tests d'activité enzymatique. Je n'oublie pas tous les membres permanents de l'équipe F9, avec qui j'ai pu travailler tout au long de ces années de thèse et qui ont contribué à faire de ces moments une expérience enrichissante, que ce soit sur le plan professionnel ou personnel.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur Gilles SUBRA pour sa bienveillance et nos échanges scientifiques fructueux tout au long de ce projet.

Je souhaite remercier toute l'équipe du SIMOPRO du CEA de Saclay, et plus particulièrement Madame Carole MARLGORN, Monsieur le Docteur Pierrick BRUYAT, Madame le Docteur Sarah BREGANT et Monsieur le Docteur Laurent DEVEL, pour avoir pris le temps de m'accueillir dans leurs locaux et de m'accompagner tout au long de ce projet et des problématiques rencontrées.

Je souhaite également remercier toute l'équipe du LMP pour m'avoir accueillie au sein de leurs locaux. Ces remerciements vont tout particulièrement à Monsieur Gilles VALETTE, pour la formation dispensée sur le MALDI et sa patience face aux nombreux problèmes rencontrés, ainsi qu'à Monsieur Guillaume CAZALS, pour ses conseils avisés.

Je remercie particulièrement mes deux stagiaires, Romain CLAUDE et Pierre LUDOVIC-DE-LYS, pour le travail fourni, leur bonne humeur et leur investissement au quotidien. J'ai probablement gagné plus d'une vie lors de la rédaction grâce à leur travail et à leur sérieux.

Tous mes remerciements vont ensuite à mes camarades doctorants et non permanents, Jules, Fabien, Matthieu, Titouan, Anna, Améni, Pauline, Aïcha, Sébastien et Anthony sans qui ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes, merci pour votre soutien et surtout, merci pour tous ces fous rires et les bons souvenirs qu'il en reste.

Je tiens à remercier profondément Madame le Docteur Sonia CANTEL, tout d'abord pour son encadrement et les nombreuses formations dispensées, principalement concernant le MALDI et la spectrométrie masse,

mais surtout pour sa patience, sa bienveillance et le soutien sans faille apporté tout au long de ces années. Elle a activement contribué à faire de ces années de thèse une période inoubliable, qui m'aura fait grandir, tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel. Je n'aurais pas assez de pages pour lui exprimer ma reconnaissance et ma gratitude et j'espère sincèrement que ce manuscrit ne signe qu'un au revoir.

Je souhaiterais également présenter mes plus sincères remerciements à celles et ceux qui ont été de véritables piliers tout au long de ces années, Marine, Mathilde, Blandine, Elodie, Aline, Laurianne et Bénédicte, sans oublier les amis de longue date, Max, Ju, Romain et Jo. J'aurais toujours une reconnaissance immense pour votre présence et votre soutien, dans les bons moments comme dans les périodes difficiles et j'espère que nous aurons encore devant nous de belles années d'amitié.

Enfin, je souhaiterais remercier très chaleureusement ma famille et plus particulièrement mes parents, mon frère et ma sœur, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Vous avez ma reconnaissance et ma gratitude éternelle pour votre soutien indéfectible et inébranlable tout au long de ces (longues) années, pour avoir continué à croire en moi, même quand moi je n'y croyais plus et pour avoir toujours répondu présents en toutes circonstances. Une partie de cette thèse vous revient parce que cette réussite aujourd'hui c'est aussi un peu la vôtre.

Il m'est impossible de finir ces remerciements sans te mentionner. Cette thèse c'est une promesse faite il y a longtemps et bien que tu ne puisses pas en voir l'aboutissement, c'est ton nom que je signe avec le mien. Je te l'ai dit, je te l'ai promis, j'ai réussi...

# PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

## **Publications :**

*Targeting out of range biomolecules : Chemical labelling strategies for qualitative and quantitative MALDI-MS based detection*, M. Sejalon-Cipolla, P. Bruyat, S. Bregant, C. Malgorn, L. Devel, G. Subra, S. Cantel, TrAC - Trends Anal. Chem., **2021**, DOI : [10.1016/j.trac.2021.116399](https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116399)

## **Communications orales :**

1. Synthèse de nouvelles sondes chimiques pour l'imagerie : Stratégie de diagnostic précoce de l'athérosclérose, M. Sejalon-Cipolla, G. Subra, S. Cantel, 9<sup>ème</sup> congrès des doctorants Occitanie, 6 Novembre 2020, Montpellier.
2. Synthèse et utilisation de nouvelles sondes moléculaires – ABP- pour le profilage de métalloprotéases par spectrométrie MALDI, M. Sejalon-Cipolla, G. Subra, S. Cantel, Forum des labo, 5-7 Novembre 2021, Paris.
3. Synthesis of new molecular probes – ABP – for metalloprotease activity profiling using MALDI-MS, M. Sejalon-Cipolla, G. Subra, S. Cantel, 22nd GFPP, 29 Mai-3 Juin 2022, Leucate.

## **Communication par poster :**

1. Improving signal intensity and sensitivity of MALDI mass spectrometry by specific peptide derivatization, M. Sejalon-Cipolla, P. Bruyat, S. Bregant, C. Malgorn, L. Devel, G. Subra, S. Cantel, RECOB 2018. [Congrès annulé pour cause de COVID]
2. Synthesis of new molecular probes – ABP – for metalloprotease activity profiling using MALDI-MS, M. Sejalon-Cipolla, P. Bruyat, S. Bregant, C. Malgorn, L. Devel, G. Subra, S. Cantel, 22nd GFPP, 29 Mai-3 Juin 2022, Leucate.
3. Metalloprotease activity profiling through ABP labelling using MALDI-MS and MALDI Imaging, M. Sejalon-Cipolla, P. Bruyat, S. Bregant, C. Malgorn, L. Devel, G. Subra, S. Cantel, EPS, 28 Août-2 Septembre 2022, Sitges



# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	7
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....	9
SOMMAIRE.....	11
TABLE DES FIGURES .....	19
INDEX DES TABLEAUX .....	27
LISTE DES ABREVIATIONS.....	29
AVANT-PROPOS.....	33
PARTIE A : CONTEXTUALISATION BIBLIOGRAPHIQUE .....	37
CHAPITRE 1 : LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI.....	39
I. CONTEXTUALISATION HISTORIQUE.....	39
II. LE SPECTROMETRE MALDI.....	40
a. Le système d'introduction de l'échantillon .....	40
b. La source d'ion .....	40
c. L'analyseur TOF .....	43
d. Le détecteur .....	44
III. PREPARATION DES ANALYTES .....	44
a. Choix de la matrice et préparation de l'échantillon.....	44
b. Les différents types de dépôt .....	46
IV. LES DIFFERENTS PROCESSUS D'IONISATION MALDI ET LEURS MODELES ASSOCIES.....	48
a. Le modèle des clusters ou « Lucky survivor model ».....	48
b. Le modèle CPCD et la fusion énergétique .....	50
c. Limites des modèles.....	52
1. La dilution énergétique .....	53
2. Effet de suppression de matrice .....	54
3. Effet de suppression d'analyte (ESA) .....	55
V. CARACTERISATION DES ANALYTES .....	56
a. La fragmentation peptidique .....	57
b. La quantification en spectrométrie de masse .....	59

<b>VI. L'IMAGERIE MALDI</b> .....	62
<i>a. Contextualisation historique</i> .....	62
<i>b. Préparation des échantillons d'analyse</i> .....	64
<b>VII. LIMITES DE LA TECHNOLOGIE : INTRODUCTION AU MARQUAGE</b> .....	67
<b>CHAPITRE 2 : LE MARQUAGE EN SPECTROMETRIE DE MASSE – DETECTION ET QUANTIFICATION DES BIOMOLECULES</b> .....	<b>71</b>
<b>I. MARQUAGE PERMETTANT LA STABILISATION DE L'ANALYTE</b> .....	71
<i>a. Marquage des résidus sialylés</i> .....	71
<i>b. Marquage des sulfoprotéines</i> .....	72
<b>II. AMELIORATION DU POTENTIEL D'IONISATION DE L'ANALYTE</b> .....	73
<i>a. Marquage des molécules à faible potentiel d'ionisation</i> .....	74
<i>b. Problématiques liées au marquage des carbohydrates</i> .....	75
<i>c. Les protéines phosphorylées</i> .....	77
<b>III. MARQUAGE DES PETITES MOLECULES ET METABOLITES</b> .....	78
<i>a. Augmentation de la masse molaire de l'analyte</i> .....	78
<i>b. Stratégies « matrix-free »</i> .....	80
<b>IV. UTILISATION DE MATRICES REACTIVES</b> .....	83
<i>a. Utilisation de composés pyridinium</i> .....	85
<i>b. Utilisation de dérivés cinnamiques</i> .....	86
<b>V. UTILISATION D'ANTICORPS</b> .....	87
<b>CHAPITRE 3 : LA TECHNOLOGIE ACTIVITY-BASED PROBE</b> .....	<b>91</b>
<b>I. GENERALITES SUR LA TECHNOLOGIE ABP</b> .....	91
<i>a. Généralités et contexte historique</i> .....	91
<i>b. Structure générale des sondes</i> .....	92
1. La tête de la sonde .....	93
2. Le linker .....	95
3. Le groupement reporter .....	96
<i>c. Principales applications des sondes ABP</i> .....	96
1. Étude de l'activité protéolytique .....	96
2. Découverte d'agents thérapeutiques .....	97
3. Outils de diagnostic.....	97



<b>II. LES ABPs COVALENTES .....</b>	<b>98</b>
<i>a. Les protéases à sérine .....</i>	<i>98</i>
<i>b. Les protéases à cystéine.....</i>	<i>102</i>
1. Les cathepsines .....	102
2. Les caspases .....	104
<b>III. LES ABPs NON COVALENTES : LE CAS DES METALLOPROTEASES .....</b>	<b>106</b>
<i>a. Les sondes photoactivables.....</i>	<i>107</i>
<i>b. Ciblage d'acides aminés nucléophiles annexes.....</i>	<i>109</i>
<i>c. Utilisation de linkers réactifs .....</i>	<i>111</i>
 <b>CHAPITRE 4 : LES METALLOPROTEASES MATRICIELLES.....</b>	 <b>115</b>
<b>I. GENERALITES .....</b>	<b>115</b>
<i>a. Contexte historique .....</i>	<i>115</i>
<i>b. Structure des MMPs.....</i>	<i>116</i>
<i>c. Mécanisme d'activation et inhibition.....</i>	<i>117</i>
<b>II. MMPs ET PATHOLOGIES ASSOCIEES .....</b>	<b>119</b>
<i>a. Les pathologies respiratoires inflammatoires.....</i>	<i>119</i>
<i>b. Les pathologies liées à l'arthrite .....</i>	<i>121</i>
 <b>PARTIE B : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	 <b>125</b>
 <b>CHAPITRE 1 : MARQUAGE DES MMPs EXOGENES ET SYNTHÈSE DES FRAGMENTS SIGNATURES .....</b>	 <b>129</b>
<b>I. CONCEPTION DES SONDES ABP CIBLANT LES MMPs.....</b>	<b>129</b>
<i>a. Structure de la tête réactive : L'inhibiteur phosphinique.....</i>	<i>130</i>
<i>b. Le connecteur.....</i>	<i>131</i>
<i>c. Spacer ligand-directed.....</i>	<i>131</i>
<i>d. Nature des linkers et des marqueurs .....</i>	<i>133</i>
<i>e. Assemblage des sondes.....</i>	<i>134</i>
<b>II. CARACTERISATION DU MARQUAGE ET IDENTIFICATION DES FRAGMENTS SIGNATURES .....</b>	<b>138</b>
<i>a. Marquage fluorescent des MMPs cibles .....</i>	<i>138</i>
<i>b. Identification des sites de marquage et des fragments peptidiques associés.....</i>	<i>140</i>
<i>c. Conception et synthèse des fragments peptidiques modèles .....</i>	<i>145</i>

<b>CHAPITRE 2 : CARACTERISATION MALDI DES FRAGMENTS SIGNATURES PUR.....</b>	<b>149</b>
<b>I. CARACTERISATION SUR PLAQUE MALDI .....</b>	<b>150</b>
<i>a. Détermination de la LOD.....</i>	<i>150</i>
<i>b. Caractérisation MS/MS.....</i>	<i>155</i>
<b>II. CARACTERISATION SUR LAME ITO POUR IMAGERIE MALDI .....</b>	<b>156</b>
<b>III. CARACTERISATION SUR COUPES DE TISSUS .....</b>	<b>158</b>
<b>IV. CARACTERISATION EN IMAGERIE MALDI.....</b>	<b>160</b>
<i>a. Optimisation des protocoles d'analyse .....</i>	<i>160</i>
1. L'enrobage des tissus.....	162
2. Le débit de spray.....	163
3. La hauteur de la buse de spray .....	164
4. Le nombre de couches de matrice.....	165
5. La résolution spatiale .....	166
<i>b. Détermination de la LOD.....</i>	<i>168</i>
<b>V. CARACTERISATION EN MILIEUX COMPLEXES .....</b>	<b>170</b>
<b>VI. QUANTIFICATION DU FRAGMENT D'INTERET .....</b>	<b>174</b>
<i>a. Détermination de la LOQ .....</i>	<i>174</i>
<i>b. Mise en place des courbes d'étalonnage .....</i>	<i>177</i>
<b>CHAPITRE 3 : MARQUAGE DE MMPS EXOGENES ET ENDOGENES.....</b>	<b>181</b>
<b>I. CARACTERISATION DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES MMPS .....</b>	<b>181</b>
<b>II. DETECTION DE MMPS EXOGENES.....</b>	<b>185</b>
<i>a. Détection de la MMP-12 murine.....</i>	<i>185</i>
1. Optimisation des conditions de digestion enzymatique .....	185
2. Marquage de la mMMP-12 catalytique .....	188
3. Détection de mMMP-12 exogène.....	190
2. Marquage de la MMP-12 murine exogène en milieu biologique complexe .....	193
<i>b. Détection de la MMP-13 humaine .....</i>	<i>195</i>
1. Marquage de l'enzyme pure .....	195
2. Marquage de la hMMP-13 exogène en milieu biologique complexe .....	198
<b>III. MARQUAGE DE MMPS ENDOGENES .....</b>	<b>199</b>
<i>a. Marquage de la mMMP-12.....</i>	<i>199</i>
<i>b. Marquage de la hMMP-13.....</i>	<i>204</i>

<b>PARTIE C : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>209</b>
<b>PARTIE D : PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>213</b>
<b>I. APPAREILLAGE.....</b>	<b>215</b>
<i>a. Spectromètres de masse .....</i>	<i>215</i>
1. Spectromètre MALDI .....	215
2. Spectromètre ESI .....	215
<i>b. Appareillage chromatographique.....</i>	<i>216</i>
1. HPLC Préparative .....	216
2. HPLC-MS.....	216
3. UPLC-MS.....	217
<i>c. Autres .....</i>	<i>218</i>
1. Thermomixeur.....	218
2. Plateforme de synthèse peptidique.....	218
3. Nébuliseur.....	218
4. Lyophilisateur.....	218
5. Spectrophotomètre UV-Visible.....	219
6. Fluorimètre .....	219
<b>II. PROCOLES MALDI.....</b>	<b>219</b>
<i>a. Préparation des matrices .....</i>	<i>219</i>
1. Solution de CHCA 10mg/mL 0.1% TFA.....	219
2. Solution de CHCE 1mg/mL 0.1% TFA .....	219
3. Solution de CHCE 0.1mg/mL 0.1% TFA .....	219
4. Solution de CHCA 10mg/mL 0.4% TFA.....	220
5. Solution de CHCE 1mg/mL 0.4% TFA .....	220
6. Solution de CHCE 0.1mg/mL 0.4% TFA .....	220
<i>b. Protocoles de dépôt .....</i>	<i>220</i>
1. Dépôt sur plaque MALDI.....	220
2. Dépôt sur plaque ITO .....	220
3. Dépôt sur coupes de tissus .....	221
4. Quantification .....	221
5. Imagerie .....	221
<i>c. Calibration .....</i>	<i>222</i>

<i>d. Protocole de délipidation des coupes de tissus.....</i>	<i>222</i>
<b>III. PROTOCOLES DE SYNTHÈSE .....</b>	<b>223</b>
<i>a. Synthèse des marqueurs CHCA .....</i>	<i>223</i>
1. Synthèse du Boc-CHCA : Molécule A .....	223
2. Synthèse du CHCA D <sub>4</sub> : Molécule B .....	224
3. JMV6747 : Molécule C .....	225
4. JMV 7790 : Molécule D .....	226
5. JMV 7468 : Molécule E .....	227
<i>b. Synthèse des fragments peptidiques .....</i>	<i>229</i>
1. Protocole général de la synthèse peptidique sur phase solide .....	229
2. Déprotection Fmoc .....	230
3. Couplage des acides aminés .....	230
3. Déprotection Alloc .....	230
4. Clivage de la résine – Déprotection Boc – Déprotection tBu .....	230
5. Synthèse des peptides non marqués .....	231
6. Synthèse des peptides marqués CHCA .....	235
7. Synthèse des peptides marqués CHCA D <sub>4</sub> .....	241
<b>IV. PROTOCOLES ENZYMATIQUES .....</b>	<b>249</b>
<i>a. Protocoles de marquage .....</i>	<i>249</i>
1. Marquage des MMPs isolées en tampon biologiques.....	249
2. Marquage des MMPs exogènes en milieux complexes.....	249
<i>b. Protocoles de digestion.....</i>	<i>249</i>
1. Digestion des MMPs isolées .....	249
2. Digestion des MMPs exogènes en milieux complexes .....	250
3. Digestion des milieux complexes non marqués .....	250
<i>c. Marquage de MMPs endogènes en milieux biologiques complexes.....</i>	<i>250</i>
<i>d. Mesure de l'activité protéolytique des MMPs .....</i>	<i>250</i>
1. Mesure de l'activité enzymatique en tampon biologique.....	250
2. Mesure de l'activité enzymatique en présence de Brij-35 .....	251
3. Mesure de l'activité enzymatique en milieu biologique complexe.....	251
<i>e. Utilisation de colonnes Zip-Tip .....</i>	<i>252</i>
<i>f. Protocoles liés à l'utilisation de la résine 2-Chlorotriptyle.....</i>	<i>252</i>

1. Préactivation de la résine .....	252
2. Insertion du premier acide aminé.....	252
3. Dosage Fmoc.....	252
4. Clivage de la résine .....	253

<b>INDEX BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>255</b>
------------------------------------	------------



## TABLE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Chronologie d'apparition des premières matrices MALDI .....	39
<b>Figure 2</b> : Exemple de support Brüker couramment utilisé pour l'analyse MALDI .....	40
<b>Figure 3</b> : Schéma de principe de la source d'ions .....	41
<b>Figure 4</b> : Présentation des différents types de laser .....	42
<b>Figure 5</b> : Clichés à haute vitesse du nuage de particules généré en UV-MALDI avec un laser Nd:YAG à 266nm avec une impulsion laser de 8ns .....	42
<b>Figure 6</b> : Modélisation du "Plumeau" et de son expansion en fonction du temps .....	43
<b>Figure 7</b> : a. Schéma de principe de l'analyseur TOF – b. Schéma de principe du réflectron .....	44
<b>Figure 8</b> : Structures des principales matrices MALDI utilisées.....	45
<b>Figure 9</b> : Exemples de cristallisation d'un peptide dans CHCA et dans CHCE .....	46
<b>Figure 10</b> : Schéma de principe des différents types de dépôt utilisés.....	47
<b>Figure 11</b> : Schéma de principe du dépôt sandwich.....	48
<b>Figure 12</b> : Résultats obtenus à la suite des travaux du Pr Karas et de son équipe .....	49
<b>Figure 13</b> : Schéma des processus impliqués dans le modèle des clusters où A représente les molécules d'analyte, m les molécules de matrice et R un contre-ion. Seul le modèle avec un excès de charge positive est présenté. ....	50
<b>Figure 14</b> : Schéma général des processus de désexcitation par collision parasites au sein du plumeau.....	53
<b>Figure 15</b> : Exemple de l'effet de suppression de matrice lors d'une analyse UV-MALDI dans le DHB.....	54
<b>Figure 16</b> : Nomenclature de Roepstorff pour la fragmentation d'un tripeptide exemple .....	57
<b>Figure 17</b> : Obtention des ions y et b par formation d'un cycle oxazolone .....	58
<b>Figure 18</b> : Obtention des ions y par perte d'un cycle dicétopipérazine.....	58
<b>Figure 19</b> : Structure générale d'un marqueur isobarique utilisé pour le marquage des amines primaires et ses dérivés présentés dans le 4-plex.....	61
<b>Figure 20</b> : Schéma de principe de la quantification relative iTRAQ.....	61
<b>Figure 21</b> : Principe du marquage isotopique .....	62
<b>Figure 22</b> : Schéma de principe de l'imagerie MALDI.....	63
<b>Figure 23</b> : Analyse MALDI d'un peptide sur coupes d'aorte murines enrobées dans l'OCT .....	65
<b>Figure 24</b> : Analyse MALDI du même peptide sur coupes d'aorte murines dans différents enrobages.....	65
<b>Figure 25</b> : Réactifs chimiques utilisés pour la dérivatisation des principales fonctions organiques des biomolécules.....	69
<b>Figure 26</b> : Marquage des résidus sialylés – Modifier l'amidation.....	72

<b>Figure 27</b> : Exemple de dérivation de la Kanamycine avec le tris(2,6-dimethoxy-phenyl)méthyl carbenium .....	74
<b>Figure 28</b> : Procédure générale du marquage de l'extrémité réductrice des résidus glycanes .....	76
<b>Figure 29</b> : a. Exemple de dérivation de phosphosérine par le 2-phenylethanthiol via une addition de Michael - b. Exemple de formation d'un phosphoramide sur la phosphosérine .....	78
<b>Figure 30</b> : Schéma de dérivation d'une amine primaire par un fullerène.....	79
<b>Figure 31</b> : Structure du cucurbituril [6] .....	79
<b>Figure 32</b> : Structures générales des principales molécules de haut poids moléculaire utilisées .....	80
<b>Figure 33</b> : Principe de la spectrométrie SALDI .....	82
<b>Figure 34</b> : Structures des ligands utilisés et les matrices usuelles correspondantes.....	83
<b>Figure 35</b> : Structures des principales molécules utilisées initialement comme matrices réactives .....	84
<b>Figure 36</b> : a. Processus de dérivation général des carbonyles par la tryptamine – b. Dérivation de la sérotonine via utilisation d'un sel de pyrylium.....	85
<b>Figure 37</b> : a. Procédure générale pour le marquage de la sérotonine via l'utilisation d'un composé fluorométhylpyridinium - b. Procédure générale pour le marquage des catécholamines via l'utilisation de dérivés pyridinium borés .....	86
<b>Figure 38</b> : Réaction générale de dérivation des glycanes par PAPAN .....	87
<b>Figure 39</b> : Procédure d'analyse TAMSIM via l'utilisation de carbocations trityle .....	88
<b>Figure 40</b> : Exemple d'utilisation d'anticorps couplés à des nanoparticules d'or .....	89
<b>Figure 41</b> : Schéma de principe comparant le mécanisme des sondes fluorescentes "Substrate-based" et "Activity-based" via l'exemple d'un motif acyloxyméthylcétone.....	92
<b>Figure 42</b> : Structure générale des sondes ABP.....	93
<b>Figure 43</b> : Structure chimique des différents motifs électrophiles utilisés.....	94
<b>Figure 44</b> : Schéma général des deux types d'ABP .....	95
<b>Figure 45</b> : Exemple de structure et mécanisme d'une sonde fluorophosphonate pour le marquage des sérines hydrolases via la présence d'un dendrimère comme marqueur de détection.....	99
<b>Figure 46</b> : Structure des derniers dérivés carbamate et urée utilisés pour le ciblage de sérines hydrolases .....	100
<b>Figure 47</b> : Mécanisme d'action des composés dérivés de la 4-chloro isocoumarine .....	100
<b>Figure 48</b> : Structure chimique de la sonde utilisée par Garland et al. basée sur un dérivé 4-chloroisocoumarine .....	101
<b>Figure 49</b> : Mécanisme réactionnel associé au groupement AOMK - [146].....	102
<b>Figure 50</b> : Structure de la sonde ABP auto-quenchée utilisée par Blum et al. pour l'imagerie de Cathepsines en milieux biologiques .....	103



<b>Figure 51</b> : Structure de la sonde ABP époxyde utilisée par Paulick et al. ....	104
<b>Figure 52</b> : Structure de la sonde ABP développé par Edington et al. ....	105
<b>Figure 53</b> : Structure des différents groupements chimiques utilisés pour le ciblage de l'atome de zinc des métalloprotéases .....	106
<b>Figure 54</b> : Schéma de principe des sondes photoactivables.....	107
<b>Figure 55</b> : Structure des principaux groupements photoactivables utilisés.....	108
<b>Figure 56</b> : Structures des différentes sondes ABP photoactivables utilisées pour le marquage de métalloprotéases .....	108
<b>Figure 57</b> : Schéma de principe des sondes ABP basées sur l'activation d'un motif quinolimine .....	109
<b>Figure 58</b> : Schéma de principe des sondes ABP basées sur l'utilisation d'un motif thiirane.....	110
<b>Figure 59</b> : Schéma de principe de l'utilisation de sonde ABP via l'introduction d'un résidu cystéine.....	111
<b>Figure 60</b> : Structure chimique des différents spacers réactifs développés par Hamachi et al.....	112
<b>Figure 61</b> : Schéma de principe de la chimie "Tosyl-Directed" via l'application à l'étude de l'interaction entre l'enzyme FKBP12, mTOR et la rapamycine .....	112
<b>Figure 62</b> : Schéma de principe de la chimie "Ligand-Directed Imidazole".....	113
<b>Figure 63</b> : Schéma de principe de la chimie "Ligand-Directed Dibromophényl Benzoate" .....	113
<b>Figure 64</b> : Schéma de principe de la chimie "Ligand-Directed Sulfonyl Pyridone" .....	114
<b>Figure 65</b> : Schéma de principe de la chimie "Ligand-Directed NASA" .....	114
<b>Figure 66</b> : Nomenclature associée aux protéases où S représente les sites d'interaction au sein de l'enzyme et P les zones correspondantes sur la séquence substrat.....	116
<b>Figure 67</b> : Schéma général de la structure du domaine catalytique des protéases metzincines - [189].....	116
<b>Figure 68</b> : Structure générale des MMPs au sein de la famille des protéases metzincines - [190].....	117
<b>Figure 69</b> : Activation de MMPs par "Cystein Switch".....	118
<b>Figure 70</b> : Exemple d'interaction entre la partie N-terminale du TIMP-1 et le site actif de la MMP-3.....	119
<b>Figure 71</b> : Représentation des symptômes physiques liés aux pathologies obstructives chroniques de type emphysème et bronchite.....	120
<b>Figure 72</b> : Représentation des symptômes physiques liés aux pathologies de type arthrite.....	121
<b>Figure 73</b> : Description générale du projet.....	127
<b>Figure 74</b> : Structure générale des ABP .....	129
<b>Figure 75</b> : Localisation des domaines S3 et S3' (illustration sur la hMMP-12) .....	130
<b>Figure 76</b> : Modélisation de l'interaction entre l'inhibiteur RXP470.1 et la MMP-12 humaine et prédiction des liaisons non covalentes impliquant les résidus de proximité.....	131
<b>Figure 77</b> : Mécanismes et structures associées aux différents spacers. La sphère verte modélise la tête réactive et la sphère rouge le bloc [linker + marqueur] transféré sur l'enzyme.....	132

<b>Figure 78</b> : Structure des différents linkers et marqueurs utilisés .....	133
<b>Figure 79</b> : Voies de synthèse des différents blocs linkers avec le marqueur CHCA.....	134
<b>Figure 80</b> : Synthèse totale de la sonde RXP500-K-NASA-CH-CHCA.....	135
<b>Figure 81</b> : Résumé des modifications structurales effectuées sur les sondes S <sub>3</sub> ' .....	136
<b>Figure 82</b> : Résumé des modifications structurales effectuées sur les sondes S <sub>3</sub> .....	136
<b>Figure 83</b> : Résultats obtenus pour le marquage des MMPs d'intérêt.....	139
<b>Figure 84</b> : Spectre ESI obtenu après marquage de la hMMP-12 par la sonde 12. Les MW de la MMP-12 native et marquée, ainsi que les ions multichargés correspondants, sont respectivement indiquées en noir et en rouge. ....	140
<b>Figure 85</b> : Identification du fragment issu du marquage de la hMMP-12 par la sonde RXP500-K-Im-Cy3 (Sonde 22).....	141
<b>Figure 86</b> : Synthèse du fragment 12mS <sub>3</sub> CHCHCA (2-D) – Les autres fragments ont été synthétisés de manière analogue.....	147
<b>Figure 87</b> : Résumé des propriétés MALDI liées aux conditions d'analyse discriminantes développées .....	149
<b>Figure 88</b> : Spectres obtenus à leur LOD pour les fragments 1-A (a), 1-B (b), 1-D (c), 2-A (d), 2-D (e), 3-A (f), 3-B (g), 4-A (h), 4-D (i), 5-A (j), 5-D (k), 6-A (l), 6-D (m), 7-A (n) et 7-D (o) dans les matrices CHCE et CHCA ...	153
<b>Figure 89</b> : Spectres associés à la détection du mélange des fragments 3-B (m/z = 963.45), 4-D (m/z = 1264.64), 5-D (m/z = 1013.45) et 6-D (m/z = 1202.62) à leur LOD dans les matrices CHCA (a) et CHCE (b)	154
<b>Figure 90</b> : Spectre obtenu pour l'analyse MS/MS par ESI du fragment 1-B (m/z = 951.41) à 100 μM .....	155
<b>Figure 91</b> : Identification de l'ion acylium associé au marquage Bn-CHCA du peptide 12mS <sub>3</sub> BnCHCA (2-B) (m/z = 923.41) .....	156
<b>Figure 92</b> : Spectres sur lame ITO, dans la matrice CHCE, des fragments 1-D (a) et 1-B (b), issus du marquage S <sub>3</sub> ' de la MMP-12 murine .....	157
<b>Figure 93</b> : Coupes d'aorte et poumons murins sur lame ITO.....	158
<b>Figure 94</b> : Visualisation des différents types de cristallisation dans H <sub>2</sub> O/ACN 50/50 0.1% TFA en fonction des matrices utilisées et de leurs concentrations .....	159
<b>Figure 95</b> : LODs obtenues pour la détection du fragment 1-D sur coupes de poumons (spectres du bas) et d'aortes murine (spectres du haut) dans les matrices CHCE et CHCA .....	159
<b>Figure 96</b> : Mesures d'une coupe longitudinale d'aorte murine .....	160
<b>Figure 97</b> : Présentation des différents paramètres influençant l'analyse par imagerie MALDI .....	161
<b>Figure 98</b> : Structures des composés chimiques de bases entrant dans la composition de l'OCT .....	162
<b>Figure 99</b> : Comparaison des différents enrobages considérés dans la matrice CHCE .....	163
<b>Figure 100</b> : Mesure des dépôts goutte sèche sur plaque ITO dans CHCA et dans CHCE.....	164

<b>Figure 101</b> : Spectres et images du fragment 12mS <sub>3</sub> BnCHCA (m/z =924.41) obtenus en fonction de la hauteur de la buse de spray, dans la matrice CHCE 1mg/mL ACN/H <sub>2</sub> O 50/50 0.1% TFA. Les zones impaires correspondent à un dépôt à 10 <sup>-5</sup> M, les zones paires à un dépôt à 10 <sup>-7</sup> M .....	165
<b>Figure 102</b> : Spectres et images obtenus du 12mS <sub>3</sub> BnCHCA (m/z =924.41) en fonction du nombre de couches de matrice déposées, dans la matrice CHCE 1mg/mL ACN/H <sub>2</sub> O 50/50 0.1% TFA.....	166
<b>Figure 103</b> : Résolution spatiale .....	167
<b>Figure 104</b> : Résumé des spectres et images obtenus à la suite de la variation de la valeur de la résolution spatiale.....	167
<b>Figure 105</b> : Image MALDI des fragments issus du marquage de la MMP-12 murine (1-B m/z = 951.41, 1-D m/z = 931.44, 2-D m/z = 904.44) sur coupes de poumons murins, dans la matrice CHCE .....	168
<b>Figure 106</b> : Spectres associés à la digestion des surnageants de chondrocytes (spectres du haut) et de celles dendritiques (spectres du bas) à la chymotrypsine dans les matrices CHCE et CHCA. Les fragments caractéristiques sont indiqués par une flèche rouge .....	171
<b>Figure 107</b> : Spectres associés aux surnageant de cellules dendritiques (spectres du haut) et de chondrocytes (spectres du bas) non digérés, à 1mg/mL dans les matrices CHCA et CHCE.....	172
<b>Figure 108</b> : Spectres obtenus pour les fragments 5-D (a) et 6-D (b) dans le surnageant de chondrocytes digéré à 0.1mg/mL, , dans la matrice CHCE à leur LOD .....	173
<b>Figure 109</b> : Spectres obtenus pour les fragments 1-B (b) et 1-D (a) dans le surnageant de cellules dendritiques digéré à 0.1mg/mL, dans la matrice CHCE à leur LOD .....	173
<b>Figure 110</b> : Spectres expérimentaux obtenus pour les fragments 6-D (a), 7-D (b), 5-D (c), 2-D (d), 4-D (e), 3-B (f), 1-D (g) et 1-B (h), à leur LOQ, dans la matrice CHCE 0.1mg/mL. Le fragment CHCA est indiqué par un cadre bleu, le fragment D4 par un cadre vert .....	176
<b>Figure 111</b> : Spectres obtenus pour la quantification du fragment 12mS <sub>3</sub> 'CHCHCA (1-D) à une concentration de standard interne de 10 <sup>-7</sup> M, dans la matrice CHCE. Le massif isotopique associé à l'analyte est indiqué dans le cadre bleu, celui correspondant au standard dans le cadre vert.....	178
<b>Figure 112</b> : Exemple de courbe étalon obtenue pour la quantification du fragment 1-D à une concentration de standard interne de 10 <sup>-7</sup> M.....	178
<b>Figure 113</b> : Structure du substrat Mca-MAT .....	181
<b>Figure 114</b> : Suivi de l'émission de fluorescence induite par l'hydrolyse du Mca-MAT par la MMP-12 réduite à son domaine catalytique.....	182
<b>Figure 115</b> : Suivi de l'émission de fluorescence induite par l'hydrolyse du Mca-MAT par le domaine catalytique de la MMP-12, dans le tampon et le broyat pulmonaire .....	183

<b>Figure 116</b> : Suivi de l'émission de fluorescence induite par l'hydrolyse du Mca-MAT par le domaine catalytique de la MMP-12 en tampon et dans le broyat pulmonaire, en présence et en l'absence de sonde RXP500-K-BB-Bn-CHCA (Sonde 12) .....	184
<b>Figure 117</b> : Suivi de l'émission de fluorescence induite par l'hydrolyse du Mca-MAT par la MMP-12 entière .....	185
<b>Figure 118</b> : Spectres expérimentaux issus de la digestion du domaine catalytique de la MMP-12 murine par la chymotrypsine (spectre du haut) et la trypsine (spectre du bas), dans la matrice CHCA, après 24 heures d'incubation. Les peptides caractéristiques sont indiqués par une flèche rouge .....	186
<b>Figure 119</b> : Recouvrement de séquence pour la digestion du domaine catalytique de la MMP-12 murine par la trypsine et la chymotrypsine, dans les conditions les plus favorables. Les fragments détectés sont indiqués en rouge .....	187
<b>Figure 120</b> : Marquage du domaine catalytique de la mMMP-12, en tampon biologique, par les sondes 14 (spectres c et d) , 15 (spectres a et b) (fragment associé m/z = 931.44) et 12 (spectres e et f) (fragment associé m/z = 951.41), dans les matrices CHCA et CHCE. Les massifs isotopiques des fragments signatures sont indiqués dans un cadre rouge.....	188
<b>Figure 121</b> : Quantification approximative du marquage du domaine catalytique de la mMMP-12 (100nM) par la sonde 15 (fragment associé m/z = 931.44). Le fragment CHCA est indiqué dans un cadre bleu, le fragment D4 dans un cadre vert.....	189
<b>Figure 122</b> : Spectres expérimentaux associé au digestat de MMP-12 murine dans les matrices CHCA, CHCE 1mg/mL et CHCE 0.1mg/mL.....	190
<b>Figure 123</b> : Recouvrement de séquence pour la digestion de la MMP-12 murine entière activée par la chymotrypsine. Les fragments détectés sont indiqués en rouge et le domaine catalytique est indiqué en gras .....	191
<b>Figure 124</b> : Marquage, en tampon biologique, de la MMP-12 murine entière activée par les sondes 12 (fragment associé m/z = 951.41) (spectres b et d, zoom dans la zone d'intérêt) et 14 (fragment associé m/z = 931.44) (spectres a et b, zoom dans la zone d'intérêt). Les fragments caractéristiques validant la digestion sont indiqués par une flèche rouge et les fragments signatures du marquage sont encadrés en rouge.....	192
<b>Figure 125</b> : Quantification approximative du marquage, en tampon biologique, de la mMMP-12 entière activée par les sondes 12 (spectres de droite) (fragment associé m/z = 951.41) et 14 (spectres de gauche) (fragment associé m/z = 931.44). Le fragment CHCA est indiqué dans un cadre bleu, le fragment D <sub>4</sub> dans un cadre vert .....	192
<b>Figure 126</b> : Marquage de la mMMP-12 entière (100nM), dans le surnageant de cellules dendritiques à 0.1mg/mL, par la sonde 14 (fragment associé m/z = 931.44), dans les matrices CHCA (a), CHCHE 1mg/mL (b) et CHCE 0.1mg/mL (c) . Le fragment signature est indiqué dans un cadre rouge.....	194

<b>Figure 127</b> : Quantification approximative du marquage de la mMMP-12 entière (100nM), dans le surnageant de cellules dendritiques à 0.1mg/mL, par la sonde 14 (fragment associé m/z = 934.44). Le fragment CHCA est indiqué dans un cadre bleu, le standard D <sub>4</sub> dans un cadre vert à la concentration de 10 <sup>-7</sup> M (spectre haut) et 10 <sup>-8</sup> (spectre bas).....	195
<b>Figure 128</b> : Analyse du digestat de la h-MMP-13 (100nM) entière, non marqué, dans les matrices CHCA (spectre de gauche) et CHCE (spectre de droite). Les fragments caractéristiques sont indiqués par une flèche rouge.....	196
<b>Figure 129</b> : Recouvrement de séquence pour la digestion du domaine catalytique de la MMP-13 humaine par la chymotrypsine. Les fragments détectés sont indiqués en rouge et le domaine catalytique est indiqué en gras.....	196
<b>Figure 130</b> : Structure de l'APMA .....	197
<b>Figure 131</b> : Marquage de la hMMP-13 entière (100nM), dans le tampon biologique, par la sonde 15 (fragment associé 5-D m/z = 1013.45), dans les matrices CHCA (spectre du haut) et CHCE (spectre du bas). Le fragment signature est indiqué dans un cadre rouge. Les peptides caractéristiques associés à la digestion sont indiqués par une flèche rouge .....	197
<b>Figure 132</b> : Marquage de la hMMP-13 entière (100nM), dans le surnageant de chondrocytes à 1mg/mL, par la sonde 15 (fragment associé m/z = 1013.45), dans les matrices CHCA (spectres a et b) et CHCE (spectres c et d). Les peptides caractéristiques de la digestion sont indiqués par une flèche rouge .....	198
<b>Figure 133</b> : Digestats des broyats pulmonaires, non marqués, J5 (spectres du haut) et J14 (spectres du bas), à la chymotrypsine, dans la matrice CHCA. Les fragments caractéristiques sont indiqués par une flèche rouge .....	200
<b>Figure 134</b> : Digestats des broyats pulmonaires, non marqués, J5 (spectre du haut) et J14 (spectre du bas), Lot 2, à la chymotrypsine, dans la matrice CHCE.....	201
<b>Figure 135</b> : Digestats du surnageant de cellules dendritiques marqué, par la sonde 14 (Fragment associé m/z = 931.44), dans les matrices CHCA (spectre du haut) et CHCE (spectre du bas).....	201
<b>Figure 136</b> : Digestats des échantillons J5 (spectres a, b et c) et J14 (spectre d, e, f et g) de broyats pulmonaires marqués par la sonde 14 (fragment associé m/z = 931.44), dans la matrice CHCA. Les fragments caractéristiques associés à la digestion du milieu sont indiqués en rouge .....	202
<b>Figure 137</b> : Digestats des échantillons J5 (spectres a, b et c) et J14 (spectres d, e, f et g) de broyats pulmonaires marqués par la sonde 14 (fragment associé m/z = 931.44), dans la matrice CHCE.....	203
<b>Figure 138</b> : Digestats, par la chymotrypsine, des différents lots de surnageants de chondrocyte, traités (spectres c, d, g et h) et non traités (spectres a, b, e et f) aux interleukines, non marqués, dans les matrices CHCA (spectres a, c, e et g) et CHCE (spectres b, d, f et h) .....	204

**Figure 139** : Digestats des surnageants de chondrocytes marqués, traités (spectres c,d, g et h) et non traités (spectres a, b, e et f) aux interleukines, par la sonde 15 (fragment associé  $m/z = 1013.45$ ), dans les matrices CHCA (spectres a, c, e et g) et CHCE (spectres b, d, f et h) .....205

**Figure 140** : Image MALDI du dépôt de digestat associé au marquage du Lot 1 de chondrocytes traités, dans la matrice CHCE.....206

## INDEX DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Valeur de l'affinité protonique des principales matrices MALDI en comparaison de la valeur de l'affinité protonique de deux analytes.....	51
<b>Tableau 2</b> : Valeurs des affinités cationiques des matrices usuellement utilisée pour le transfert de cations .....	52
<b>Tableau 3</b> : Résumé des différentes têtes réactives utilisées pour le ciblage de sérines hydrolases.....	101
<b>Tableau 4</b> : Résumé des différentes têtes réactives utilisées pour le ciblage des protéases à cystéine .....	105
<b>Tableau 5</b> : Résumé des sondes ABP synthétisées .....	137
<b>Tableau 6</b> : Gels d'électrophorèse obtenus après marquage de différentes MMPs en fonction des sondes utilisées. Les rendements de marquage sont exprimés en pourcentage.....	138
<b>Tableau 7</b> : Séquences des fragments peptidiques obtenus après marquage et digestion des MMPs cibles. Le résidu portant le marqueur est indiqué en gras et en rouge. Les séquences sont modélisées en rouge pour un marquage S <sub>3</sub> et en vert pour un marquage S <sub>3</sub> ' .....	142
<b>Tableau 8</b> : Tableau de référence des différents fragments peptidiques synthétisés. Numérotation : 1-12mS <sub>3</sub> ' – 2-12mS <sub>3</sub> – 3-12hS <sub>3</sub> ' – 4-12hS <sub>3</sub> – 5-13hS <sub>3</sub> ' – 6-3hS <sub>3</sub> – 7-9hS <sub>3</sub> '. Lettre associée : A-Fragment natif, B-Spacer Bn, C-Bn D <sub>4</sub> ; D-Spacer CH, E-CH D <sub>4</sub> .....	146
<b>Tableau 9</b> : Résumé des conditions de préparation d'échantillon d'analyse MALDI testées .....	150
<b>Tableau 10</b> : Résumé des LODs et conditions analytiques optimales obtenues à la suite de la caractérisation des différents fragments sur plaque MALDI.....	151
<b>Tableau 11</b> : Résumé des LODs obtenus pour les fragments associés au marquage S <sub>3</sub> de la MMP-12 murine, soit 2-A et 2-D, et au marquage S <sub>3</sub> ', soit 1-A, 1-B et 1-D, sur plaque MALDI et sur lame ITO.....	157
<b>Tableau 12</b> : Résumé des LODs obtenues pour le fragment 1-D sur les différents supports considérés, dans la matrice CHCE.....	160
<b>Tableau 13</b> : Caractéristiques spectrales obtenues pour les deux enrobages.....	163
<b>Tableau 14</b> : Récapitulatif des fragments utilisés pour la détermination de la LOD sur coupes de poumons murins .....	169
<b>Tableau 15</b> : Résumé des LODs obtenues par imagerie pour les fragments associés à la mMMP-12 sur coupes de tissus murins .....	169
<b>Tableau 16</b> : Fragments peptidiques caractéristiques identifiés dans les digestats de surnageants de cellules dendritiques et de chondrocytes.....	171
<b>Tableau 17</b> : Résumé des LODs obtenues pour les fragments 1-B, 1-D, 2-D, et 6-D, dans la matrice CHCE, sur plaque MALDI et en milieu biologique complexe.....	173

<b>Tableau 18</b> : Rappel des LODs sur plaque MALDI et résumé des LOQs de chacun des fragments d'intérêt, dans la matrice CHCE 0.1mg/mL.....	175
<b>Tableau 19</b> : Résumé des coefficients de linéarité obtenues pour chacun des fragments. Les R <sup>2</sup> conservés sont indiqués en vert .....	179
<b>Tableau 20</b> : Pourcentage de recouvrement obtenu pour chacun des digestats du domaine catalytique de la MMP-12 murine.....	186
<b>Tableau 21</b> : Fragments caractéristiques obtenus à la suite de la digestion du domaine catalytique de la MMP-12 murine par la trypsine.....	187
<b>Tableau 22</b> : Fragments caractéristiques obtenus à la suite de la digestion du domaine catalytique de la MMP-12 murine par la chymotrypsine.....	187
<b>Tableau 23</b> : Fragments caractéristiques obtenus à la suite de la digestion de la MMP-12 murine entière activée par la chymotrypsine.....	191
<b>Tableau 24</b> : Fragments caractéristiques obtenus à la suite de la digestion de la MMP-13 humaine entière, non marquée, par la chymotrypsine.....	196



## LISTE DES ABREVIATIONS

ABP : Activity-Based Probe  
Ac : Anticorps  
ACN : Acétonitrile  
AgNI : Silver Nanoisland  
Ala : Alanine  
AnCCA : Acide (2E)-3-(anthracen-9-yl)-2-cyanoprop-2-énoïque  
APMA : Acétate p-aminophényl mercurique  
AOMK : Acyloxyméthylcétone  
Arg : Arginine  
ASC : Adipose-Derived Stem Cell  
Asn : Asparagine  
Asp : Acide aspartique  
ATT : 6-aza-2-thiothymine  
AVC : Accident vasculaire cérébral  
Boc : tert-Butoxycarbonyle  
BODIPY : Bore-Dipyrrométhène  
BOP : Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium  
Bpa : Benzoylphénylalanine  
CEA : Commissariat à l'énergie atomique  
CID : Collision-Induced Dissociation  
CCM : Carboxyl Containing Metabolite  
CHCA : Acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique  
CHCE :  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate de méthyle  
COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease  
CPCD : Coupled Physical and Chemical Dynamics  
Cys : Cystéine  
CuAAC : Copper catalyzed alkyne-azide cycloaddition  
DCM : 4-(dicyanométhylène)-2-méthyl-6-(4-diméthylaminostryl)-4H-pyrane  
DESI : Desorption Ionization Electrospray  
DHAP : Dihydroxyacétone Phosphate  
DHB : Acide 2,3-dihydroxybenzoïque  
DIT : Dithranol

DMAP : 4-Diméthylaminopyridine  
DMBAH : 4-(diméthylamino)benzohydrazone  
DNPH : 2, 4-dinitrophénylhydrazine  
DSC : N, N-Disuccinimidyl carbonate  
EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide  
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay  
ESA : Effet de suppression d'analyte  
ESI : Electrospray Ionization  
ESM : Effet de suppression de matrice  
Et : Ethyl-  
FAAH : Fatty acid amide hydrolase  
FFPE : Formalin Fixed and Paraffin Embedded  
Fmoc : Fluorénylméthoxycarbone  
FRET : Fluorescence resonance energy transfer  
FSPPS : Fast Solid Phase Peptide Synthesis  
FT-ICR : Fourier-Transform Ion-Cyclotron-Resonance  
GalNAc : N-Acétalgalactosamine  
GlcNAc : N-Acétalglucosamine  
Gln : Glutamine  
Glu : Acide glutamique  
Gly : Glycine  
HABA : Acide 2-(4-hydroxyphénylazo)-benzoïque  
HATU : Hexafluorophosphate de-N, N-diméthylméthanaminium  
HCG : Hormone Chorionique Gonadotrope  
His : Histidine  
hMMP : Human Matrix Metalloprotease  
HPA : Acide 3-hydroxypicolinique  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
HTMBA : 4-(hydrazinocarbonyl)-N,N,N-triméthylbenzaminium  
IAA : Acide trans-3-indoleacrylique  
IHC : Immunohistochimie  
Ile : Isoleucine  
ISD : In-Source Decay  
ITO : Indium Tin Oxide

iTRAQ : Isobaric Tags for Relative And Absolute Quantification  
LDAI : Ligand-directed acylimidazole  
LDBB : Ligand-directed dibromophenyl benzoate  
LDNASA : Ligand-directed N-acyl-N-alkyl sulfonamide  
LDSP : Ligand-directed sulfonyl pyridone  
LDT : Ligand-directed tosyl  
Leu : Leucine  
LID : Laser-Induced Dissociation  
LOD : Limit of Detection  
LOQ : Limit of quantification  
Lys : Lysine  
MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization  
MALDI-MSI : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging  
MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight  
Me : Méthyl-  
Met : Méthionine  
MMP : Matrix Metalloprotease  
mMMP : murine Matrix Metalloprotease  
MOF : Metallic Organic Framework  
MS : Mass Spectrometry  
NASA : N-acyl-N-alkyl sulfonamide  
NBD : Nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole  
Nd:YAG : Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet  
NHS : N-Hydroxysuccinimide  
NP : Nanoparticule  
NpCCA : Acide (E)-2-cyano-3-(naphthalen-2-yl)acrylique  
OCT : Optimal Cutting Temperature  
PAL : Photoaffinity Labeling  
PAPAN : 2-phényl-3-(p-aminophényl)-acrylonitrile  
PBS : Phosphate Buffered Saline  
PEG : Polyéthylène Glycol  
Phe : Phénylalanine  
Pip : Pipéridine  
Pmg : Pyrèneméthylguanidinium

PNDI(T2) : Poly[naphtalène-diimide-bithiophène]  
Pro : Proline  
PSA : Prostate specific antigen  
PSD : Post-Source Decay  
PVH : Papillomavirus Humain  
P3DTT : Poly[3-dodecylthiophène]  
QAC : Quaternary ammonium compound  
Rpm : Rotation par minute  
Ru : Ruthénium  
SA : Acide sinapique  
SALDI-MS : Surface-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry  
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
Ser : Serine  
SID : Stable Isotopic Dilution  
SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry  
SM : Spectrométrie de masse  
TAMSIM : Targeting Multiplex Mass Spectrometry Imaging  
tBu : Tertbutyl  
THAP : 2, 4, 6-trihydroxyacétophénone  
Thr : Thréonine  
TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloprotease  
TIS : Triisopropylsilane  
TMPA : N, N, N-triméthyl-2-(piperazin-1-yl)éthan-1-aminium  
TOF : Time-of-Flight  
Trp : Tryptophane  
Tyr : Tyrosine  
UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography  
UV : Ultra-violet  
Val : Valine  
WALDI : Water Assited Laser Desorption Ionization  
YAG : Yttrium Aluminium Garnet  
2-AA : Acide 2-aminobenzoïque  
3-AQ : 3-Aminoquinoline  
9-NA : 9-nitroanthracène

## AVANT-PROPOS

La spectrométrie de masse doit faire face à de nombreux défis pour permettre la compréhension des systèmes biologiques dans leur complexité dynamique. Cette technologie s'est notamment avérée être un outil puissant pour la découverte de biomarqueurs, ouvrant ainsi la voie à une compréhension inédite des processus pathologiques et facilitant leur diagnostic. Ces méthodes se heurtent cependant à de nombreux problèmes dont la faible abondance des analytes, une structure ou une localisation biologique incompatible avec la spectrométrie de masse ou encore un manque de spécificité vis-à-vis de la cible. Toutes ces problématiques sont liées à la nécessité d'analyser directement des échantillons biologiques complexes, en évitant au maximum toute étape de traitement, de dénaturation ou de lavage. Il est essentiel, pour permettre la détection de métabolites et biomarqueurs dans les milieux complexes, d'atteindre des seuils de sensibilité compatibles avec les faibles concentrations endogènes de ces molécules cibles, si possible avec une grande spécificité pour l'analyte afin d'éviter tout signal interférent. De plus, dans une optique de diagnostic ou afin d'étudier plus finement les processus physio-pathologiques, il est important de pouvoir quantifier l'analyte dans son milieu, d'identifier les potentiels partenaires en interaction, mais également de localiser l'analyte au sein d'un système biologique fluide ou solide.

Dans ce contexte, la spectrométrie de masse MALDI s'impose comme une réponse prometteuse à ces problématiques, autant en termes de sensibilité que de compatibilité biologique. Parmi l'ensemble des techniques d'ionisation douce, normalement adaptées à l'analyse des biomolécules, la technologie MALDI apparaît comme la seule capable de faire face à l'analyse de grosse biomolécules intactes, tout en étant la plus sensible et la plus tolérante à la présence de sels ou de détergents. L'imagerie MALDI permet de représenter des images via l'acquisition de multiples spectres sur toute la surface d'un tissu, localisant simultanément plusieurs analytes et représentant leur densité de présence au sein de ce tissu. Cependant, il est encore nécessaire de développer de nouvelles stratégies d'analyse, plus spécifiques et surtout compatibles avec l'imagerie. Beaucoup d'entre elles reposent sur le marquage chimique des analytes. Celui-ci peut permettre d'améliorer la sensibilité de détection ou encore de faciliter la quantification ou la localisation. Ainsi, de nouveaux réactifs ont été développés pour le marquage de biomolécules endogènes, facilitant l'analyse MALDI de nombreux biomarqueurs directement dans leur milieu naturel. Ces réactifs induisent souvent des liaisons covalentes avec l'analyte grâce à des réactions de bioconjugaison, souvent chimio-spécifiques, utilisables en conditions physiologiques, telles que les additions de Michael ou encore les cycloadditions dont les réactions de Diels-Alder et la cycloaddition de Huisgen. À côté de ce jeu de réactions classiques, de nouvelles voies sont explorées afin d'accroître la sélectivité du processus de marquage, dont l'introduction avec le marqueur de molécules spécifiques telles que les anticorps ou des ligands très affins pour la cible. C'est le cas des affinity-based probes ou ABP. Ces entités sont des analogues de ligands, de substrats ou d'inhibiteurs des composés ciblés et permettent un marquage sélectif, sans effet sur l'activité biologique de la cible. L'interaction ABP/biomolécule se fait via le mécanisme de reconnaissance naturel de la cible, conférant à ces objets une sélectivité pour les formes actives des biomolécules.

La nature du marqueur joue un rôle important puisque celui-ci doit permettre une détection facile à des concentrations souvent de l'ordre du sub-nanomolaire. Idéalement, il doit également pouvoir être décliné en différents analogues pour la quantification et la détection simultanée de plusieurs analytes au sein d'un même échantillon tout en limitant les problématiques de discrimination ionique. On parle alors de multiplexage. Aujourd'hui, le développement de stratégies basées sur l'utilisation de différents isotopes d'un

marqueur unique a permis d'ouvrir la voie de la quantification absolue d'analytes en milieux biologiques complexes.

Les métalloprotéases sont des marqueurs dont la surexpression est liée au développement de nombreuses pathologies. Leur marquage est délicat, du fait de leur taille et leur très faible concentration, mais surtout par l'absence, dans le site actif, de résidu nucléophile impliqué dans le mécanisme catalytique sur lequel pourrait reposer le marquage. Des sondes présentant des groupements photoactivables ont été développées pour pallier l'absence de résidu réactif mais cette stratégie est étroitement liée à une importante irradiation UV, ce qui rend impossible son utilisation *in-vivo*.

Mon projet de recherche s'inscrit donc dans ce contexte de détection, de quantification et d'imagerie des métalloprotéases matricielles par spectrométrie de masse MALDI. Nous avons ainsi développé une stratégie de marquage innovante reposant sur l'utilisation de sondes ABP pour lesquelles le groupement photoactivable a été remplacé par une entité électrophile. Une fois la sonde insérée dans la poche catalytique de l'enzyme, ces réactifs sont alors capables de créer une liaison covalente au sein du domaine catalytique avec un résidu nucléophile de proximité. Cette stratégie offre donc l'avantage d'un marquage covalent spécifique, sans effet sur l'activité enzymatique et compatible avec un marquage *in-vivo*. En parallèle, des conditions discriminantes d'analyse MALDI ont été mises au point afin de promouvoir la détection et la quantification spécifiques des composés marqués. Ces conditions reposent sur le transfert d'un marqueur acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique sur l'enzyme. Après digestion, l'analyse des fragments marqués dans la matrice  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate de méthyle permet l'extinction des signaux associés à tous résidus non marqués alors que le marqueur CHCA permet l'ionisation sélective des composés marqués. En combinant ces deux aspects, cette stratégie offre donc une sensibilité très importante en termes de détection et de quantification.

Nous avons dans un premier temps procédé à la synthèse des sondes. Il nous fallait obtenir des molécules spécifiques des différentes MMPs, tout en étant suffisamment réactives pour permettre le marquage endogène à de faibles concentrations. Une fois ces objets mis au point, les protocoles de marquage ont été optimisés pour permettre l'identification de l'acide aminé marqué sur chacune des MMP cibles. En parallèle, les séquences peptidiques modèles contenant ces résidus ont été synthétisées en laboratoire afin de déterminer les conditions analytiques idéales de ces composés. Nous avons testé les conditions les plus prometteuses en imagerie. Le développement de protocole d'analyse de tissus par imagerie MALDI s'est d'ailleurs avéré délicat. En effet, la complexité de la structure physique et de la composition chimique des tissus, notamment l'abondance de lipides, freine considérablement l'ionisation efficace des analytes. Enfin, nous avons développé une stratégie de quantification de ces composés marqués, via l'utilisation d'un analogue deutéré du marqueur CHCA, afin de promouvoir le profilage de l'expression des MMPs cibles au sein de différents échantillons biologiques fluides.

Ce manuscrit s'articule en trois parties. La première partie A est une introduction bibliographique qui détaille les quatre thèmes suivants :

- La présentation de la technologie MALDI
- Le marquage chimique pour l'amplification du signal
- La technologie ABP
- Les métalloprotéases et leurs pathologies associées

La seconde partie présente les travaux de recherche menés dans le cadre de ce projet. Celle-ci s'articule autour de cinq grands axes :

- L'assemblages des sondes ABP et la caractérisation du marquage exogène des MMPs cibles

- La synthèse des fragments peptidiques signatures et leur caractérisation en MALDI-MS
- La mise en place des stratégies de quantification pour l'analyse de MMPs
- Le développement et l'optimisation de la détection et la quantification de MMPs au sein d'échantillons biologiques complexes, fluides et solides
- Le développement de protocoles d'imagerie pour l'analyse de MMPs au sein de coupes de tissu

La dernière partie de ce manuscrit présente les protocoles expérimentaux associés aux travaux de recherche menés au cours de ces années de thèse.

Ce projet a fait l'objet d'une collaboration entre trois parties que sont :

- L'institut Joliot/SIMOPRO du CEA de Paris-Saclay représenté par le Dr DEVEL Laurent, la Dr BREGANT Sarah et Mme MALGORN Carole.
- L'IBMM à Montpellier représenté par la Dr CANTEL Sonia et le Pr SUBRA Gilles.
- L'IRBM à Montpellier représenté par la Pr NOEL Danièle.

L'équipe du CEA, pilotée par le Dr Laurent DEVEL, a assuré la synthèse des différentes sondes ABP ainsi que l'étude de l'influence de la structure chimique de ces sondes sur l'efficacité de marquage. Ils ont également identifié les différents fragments signatures de chaque MMP marquée ainsi que la ou les sondes à privilégier dépendamment de la cible visée. Particulièrement, MALGORN Carole a, quant à elle, permis l'approvisionnement en échantillons biologiques, dont elle a préalablement assuré la caractérisation par divers procédés. Nous avons, au sein de l'IBMM, synthétisé les fragments peptidiques modifiés d'intérêt, mais aussi participé à la synthèse des sondes ABP via la synthèse du bloc marqueur à greffer directement sur la structure mère. Nous avons assuré l'optimisation des méthodes d'analyse, que ce soit en spectrométrie MALDI ou en imagerie, afin de déterminer les conditions d'analyse préférentielles pour chaque fragment d'intérêt. De plus, nous avons également pris en charge l'élaboration d'un protocole pour la gestion des échantillons complexes sur site, qu'ils soient fluides ou solides, via l'optimisation des protocoles de digestions ou ceux de marquage enzymatique. Finalement, nous avons mise en place les différentes voies de quantification des fragments cibles, que ce soit purs ou en milieux complexes. Le Pr. NOEL Danièle nous a permis d'accéder à d'autres échantillons biologiques de grand intérêt, notamment des surnageants de culture de chondrocytes et d'ASC, nous permettant ainsi d'étendre notre gamme de tests et surtout de diversifier nos cibles d'intérêt et les pathologies visées.





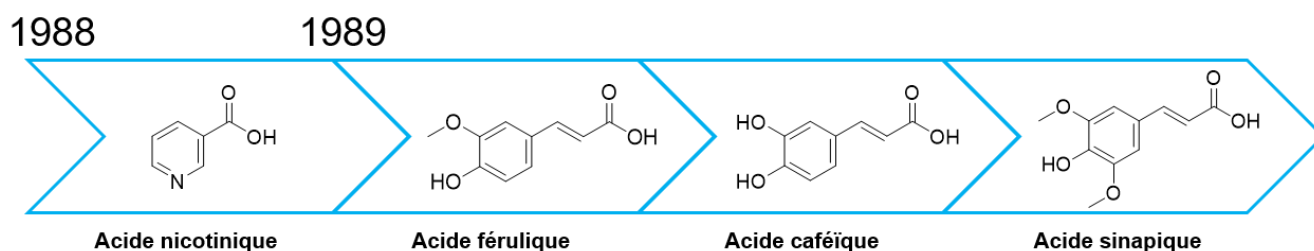
**PARTIE A : CONTEXTUALISATION  
BIBLIOGRAPHIQUE**



# CHAPITRE 1 : La spectrométrie de masse MALDI

## I. Contextualisation historique

La spectrométrie de masse MALDI, ou Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation, fut introduite pour la première fois par Tanaka et al.[1] puis par Karas, Bachmann et Hillenkamp[2] entre 1985 et 1988. Koichi Tanaka est ainsi le premier à décrire l'utilisation de méthodes d'ionisation assistée par faisceau laser pour la détection de macromolécules, travaux pour lesquels il obtient le prix Nobel en 2022. Le développement de cette technologie fait suite à l'observation, par ces chercheurs, que certains acides aminés, tels que l'alanine, se détectaient plus facilement en présence de tryptophane à une certaine longueur d'onde. Le tryptophane, contrairement à l'alanine, présente un noyau aromatique sur sa chaîne latérale lui permettant de bien mieux absorber l'énergie du laser, assistant ainsi l'ionisation de l'alanine, alors incapable d'absorber efficacement l'énergie laser. Suite aux résultats obtenus avec l'alanine, l'utilisation du tryptophane a été généralisée à l'ionisation de petits peptides d'environ 2500 Da, tel que la mélittine.[3] Dans les années suivantes, il devint possible d'ioniser des molécules de plus en plus larges, comme l'albumine bovine (67kDa).[4] Le tryptophane fut alors peu à peu remplacé par de nouveaux composés qui s'imposent aujourd'hui comme matrices de références MALDI.[5] (Fig. 1)



*Figure 1 : Chronologie d'apparition des premières matrices MALDI*

Depuis ses premiers pas, la technologie MALDI s'est illustrée dans de nombreux domaines comme la médecine, la chimie organique, la biochimie ou encore la chimie des polymères. Parmi certaines de ces applications, elle s'est souvent imposée comme une méthode d'analyse incontournable et indispensable, notamment dans le cas de l'analyse de macromolécules excédant les 100 000 Da ou encore en microbiologie, pour l'étude de micro-organismes bactériens ou fongiques.[6][7]

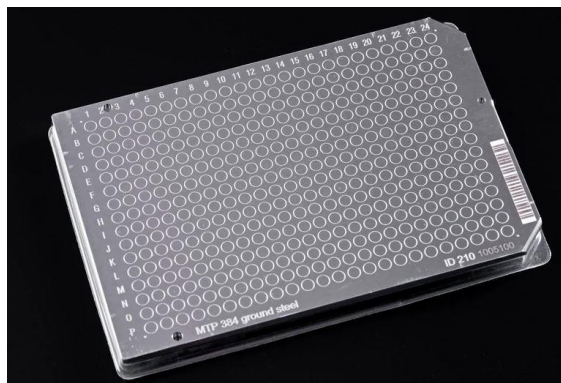
Comparée à d'autres techniques d'ionisation douce comme l'électrospray (ESI), la spectrométrie MALDI est actuellement décrite comme la méthode d'ionisation douce la plus sensible.[8] Elle est, de plus, la seule qui permet une analyse directe d'échantillons biologiques du fait de sa grande tolérance à la présence de sels ou de détergents. De ce fait, elle est présentée comme une technique d'analyse spécifique, rapide et facile d'utilisation ou d'automatisation. Elle s'est ainsi rapidement imposée, notamment en immunologie ou en biochimie, sur les techniques d'analyse initialement utilisées, grâce à des résultats plus rapides, précis, bon marché et facilement reproductibles.

## **II. Le spectromètre MALDI**

Cette technologie est basée sur la génération d'espèces chargées via l'accélération de photons issus d'un faisceau laser. Le MALDI s'articule autour de quatre composants principaux : le système d'introduction de l'échantillon, la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur.

### **a. Le système d'introduction de l'échantillon**

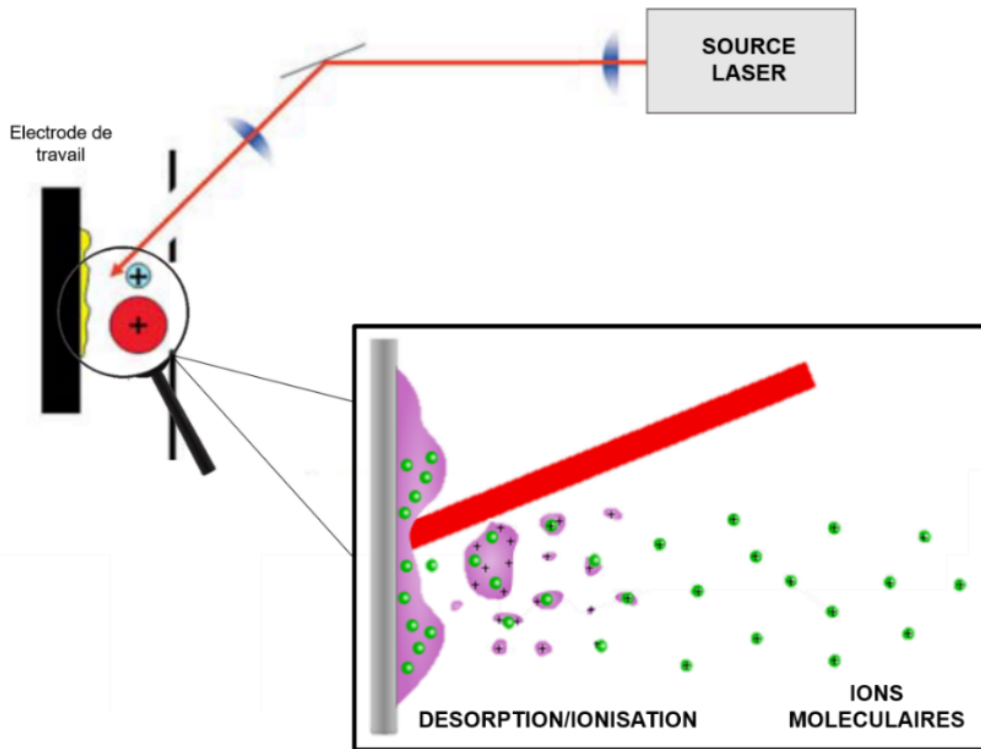
L'échantillon MALDI se prépare via le dépôt, sur un support adapté, d'une solution saturée de matrice et d'une solution d'analyte, généralement de l'ordre du micromolaire. Après séchage et évaporation du solvant, le dépôt solide obtenu après sublimation, formé d'un système cristallin composé de molécules de matrice et d'analyte, est caractéristique du dépôt MALDI. Ce dépôt peut être réalisé sur différents supports mais tous doivent répondre à deux règles fondamentales : une bonne conduction électronique et une planéité parfaite de la surface. Ce sont généralement des plaques en acier. De nombreux projets ont eu pour but le développement de nouvelles surfaces pour l'analyse MALDI, avec l'objectif d'améliorer la phase de préparation de l'échantillon ou de promouvoir une meilleure assistance à l'ionisation de l'analyte. Bruker a ainsi récemment proposé un nouveau type de plaque, appelé AnchorShip™, qui présente un coating hydrophobe sur toute la surface de plaque et de petits coating hydrophile centrés sur les zones de dépôts. (Fig. 2) Ceci permet notamment d'éviter la diffusion du dépôt liquide sur la plaque et l'augmentation de la tension de surface pour les dépôts effectués dans des solvants organiques volatiles.[9]



*Figure 2 : Exemple de support Bruker couramment utilisé pour l'analyse MALDI*

### **b. La source d'ion**

Lors du bombardement laser, l'énergie émise est absorbée par les molécules de matrice puis transférée par la suite aux molécules d'analyte : c'est le principe de base de la spectrométrie MALDI. (Fig. 3)

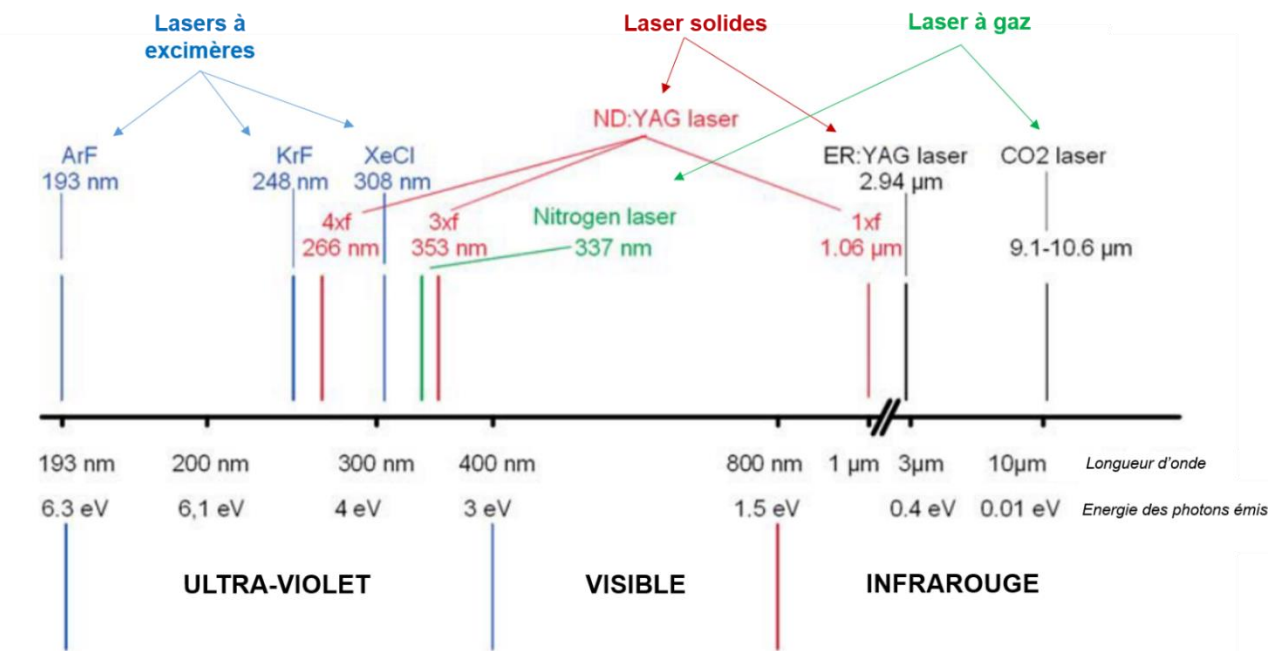


*Figure 3 : Schéma de principe de la source d'ions*

Ainsi, parmi les différentes propriétés du laser, la fluence (H) est la plus importante puisqu'elle est directement liée à la densité d'énergie absorbée, soit l'énergie absorbée par unité de volume par les molécules de matrice. On parle communément de la puissance laser. Cette grandeur étant directement proportionnelle au coefficient d'extinction molaire du composé, lui-même dépendant de la longueur d'onde, le choix de la matrice se fait donc dans l'objectif de maximiser la quantité d'énergie absorbée par ces composés à la longueur d'onde de travail du laser. Ainsi : [9]

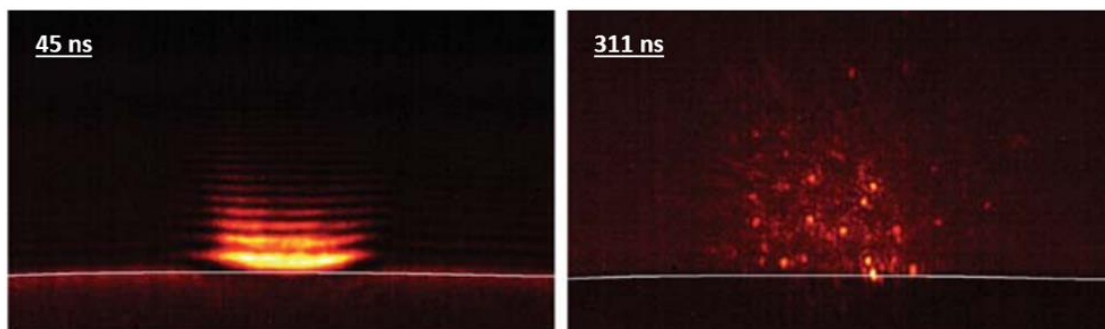
- Plus la fluence du laser est importante, plus la quantité d'énergie absorbée sera importante.
- Plus on s'enfonce en profondeur dans l'échantillon, plus la fluence du laser sera faible et moins la matrice absorbera d'énergie.

En prenant en compte la longueur d'onde de travail, la fluence ou encore l'énergie propre des photons émis, on obtient de nombreux types de lasers différents. Ceux-ci sont caractérisés selon différents paramètres intrinsèques tels que la longueur d'onde, l'énergie et la fréquence du pulse émis ainsi que le diamètre du faisceau ou encore sa divergence. Les plus utilisés en MALDI sont les lasers UV-visible de type Nd:YAG et les lasers à azote. Pour le MALDI, seuls les lasers pulsés peuvent être utilisés car l'énergie nécessaire à l'amorce du processus d'ionisation doit être transmise à l'échantillon sur un temps très court. Les lasers à infrarouge sont, quant à eux, beaucoup plus utilisés en biologie puisqu'ils permettent la production de photons de plus basse énergie et donc l'ionisation la plus douce. (Fig. 4) [9]



*Figure 4 : Présentation des différents types de laser*

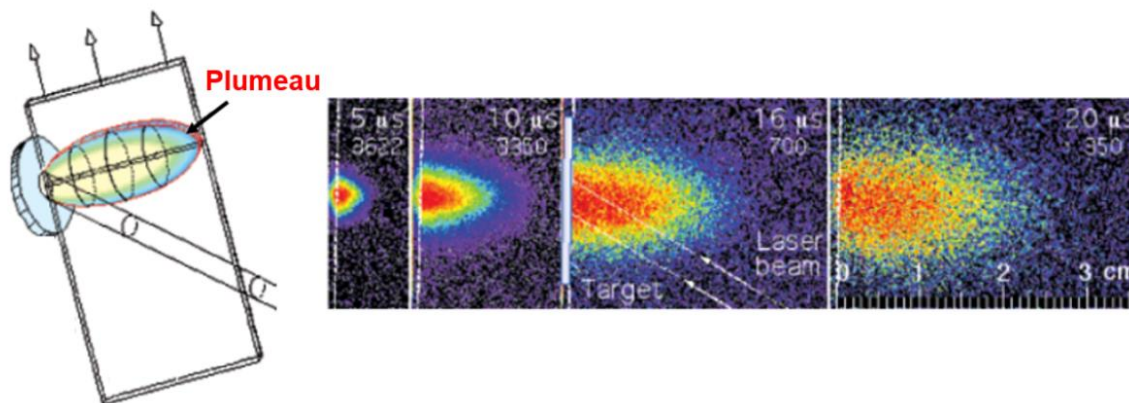
Concernant le processus de désorption[10], il s'agit d'un des phénomènes principaux de l'analyse MALDI puisqu'il est à l'origine du passage en phase gazeuse des molécules d'analyte et de matrice, initialement à la surface de l'électrode de dépôt. Durant ce processus d'une durée de quelques nanosecondes, plusieurs couches d'échantillon, de l'ordre de quelques micromètres, sont arrachées au dépôt initial à chaque impulsion laser. Ainsi, plusieurs expériences ont montré qu'après quelques centaines de nanosecondes d'exposition au laser, l'échantillon est complètement ablaté. (Fig. 5)



*Figure 5 : Clichés à haute vitesse du nuage de particules généré en UV-MALDI avec un laser Nd:YAG à 266nm avec une impulsion laser de 8ns*

La fluence du laser joue encore ici un rôle important puisqu'elle est principalement responsable du choix d'un des deux régimes fondamentaux d'ionisation possible. En effet, on parlera d'ablation et non de désorption lorsque la fluence du laser est très importante. Cependant, d'autres facteurs environnementaux tels que la préparation des échantillons, l'homogénéité ou le type de dépôt peuvent également influencer la nature du phénomène d'extraction de la matière. Bien que d'autres phénomènes physiques interviennent également dans le processus de dissociation de l'énergie, il est à noter que, quel que soit le mode

d'extraction, la majeure partie de l'énergie générée est transférée à l'échantillon solide. L'ensemble des particules éjectées composant le nuage en expansion est appelé « Plumeau » et c'est dans celui-ci que vont se dérouler les différents processus conduisant à l'ionisation des molécules d'analyte. (Fig. 6) Ces processus sont séparés en deux phases : L'ionisation primaire, caractérisée par une densité de charge importante, et l'ionisation secondaire qui modélise les interactions entre les ions primaires et les molécules neutres du nuage.



*Figure 6 : Modélisation du "Plumeau" et de son expansion en fonction du temps*

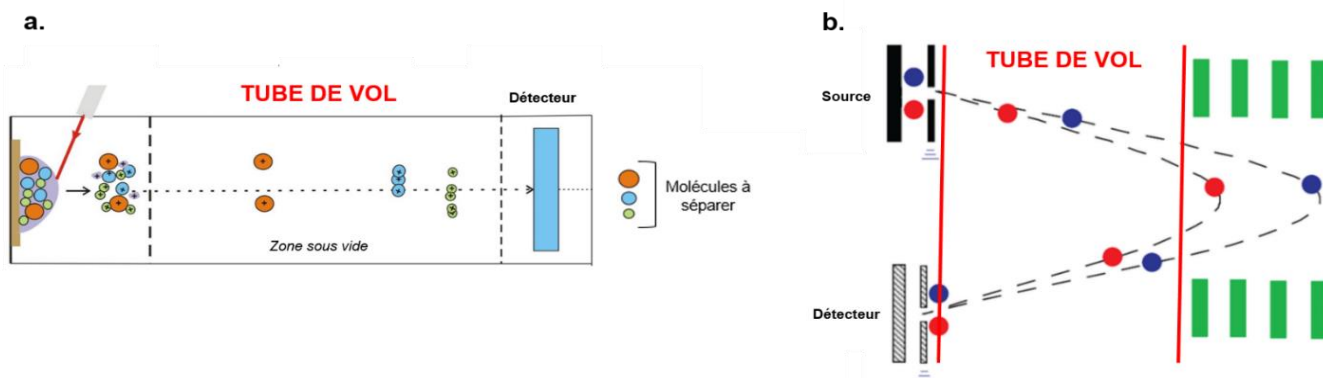
### c. L'analyseur TOF

Celui-ci autorise l'utilisation d'une source d'énergie pulsée et la séparation d'ions de très haute énergie avec une haute résolution, sans pour autant être limité en termes de valeur de  $m/z$ . En effet, cet analyseur permet la détection d'une très large gamme de molécules allant de la centaine à la dizaine de milliers de Dalton. De plus, il permet également d'obtenir des spectres de masse très rapidement puisque chaque tir génère un nouveau spectre, soit quelques millisecondes pour l'obtention d'un spectre.[11]

Le principe de fonctionnement de cet analyseur, breveté en 1952, est simple. Il s'agit d'une zone sous vide que les ions doivent parcourir pour atteindre le détecteur. (Fig. 7a.) Ils sont ainsi caractérisés par le temps qui leur est nécessaire pour parcourir ce tube, lui-même directement lié au rapport intrinsèque  $m/z$  de chaque ion. En effet, les ions générés sont accélérés à l'entrée du tube de vol afin d'acquérir une certaine énergie cinétique qui est directement proportionnelle à leur état de charge. Cette énergie acquise est alors liée à une vitesse dépendant de la masse intrinsèque de l'ion. Une mise en relation simple de toutes ses grandeurs permet alors de lier finalement le rapport masse/charge de l'ion et le temps qu'il lui faut pour atteindre le détecteur.

L'introduction du réflectron (Fig. 7b), permettant de renvoyer les ions vers le détecteur tout en augmentant la distance que les ions doivent parcourir avant de l'atteindre, a ainsi permis une forte amélioration de la résolution, notamment via l'augmentation de la distance de vol. De plus, il est également à l'origine d'une correction des erreurs de mesure éventuelles, induites par le décalage qu'il peut exister entre deux ions de même rapport  $m/z$ , du fait de leur différence de vitesse ou d'énergie cinétique initiale. Cette différence peut être induite par le fait que les ions n'ont pas strictement la même position initiale sur le dépôt, la surface n'étant pas parfaitement plane, ce qui peut induire des vitesses différentes après accélération.[12] De plus, l'utilisation du réflectron devient essentielle pour maintenir à la fois une bonne résolution et une bonne

sensibilité. En effet, de nombreux dispositifs filtrants existent déjà pour corriger ces différences de vitesse initiale, mais leur utilisation induit cependant une forte perte de sensibilité dans l'analyse.



*Figure 7 : a. Schéma de principe de l'analyseur TOF – b. Schéma de principe du réflectron*

#### **d. Le détecteur**

Le détecteur est principalement composé de microcanaux capables de détecter les ions entrants. Le courant électrique résultant est alors concentré sur l'anode puis digitalisé pour permettre son traitement informatique. La présence d'un réflectron induit nécessairement la présence d'un second détecteur. Le phénomène de détection est donc basé sur la conversion d'un ion en un ou préférentiellement plusieurs électrons. Ainsi, l'efficacité de ce processus dépend directement de la vitesse avec laquelle l'ion entre dans le détecteur et vient percuter les plaques. De ce fait, les molécules les plus grosses induisent un signal beaucoup plus faible car elles arrivent moins vite au détecteur. L'ensemble de l'appareillage est généralement maintenu sous vide à une pression moyenne de  $10^{-5}$  bars ou moins.[13]

### **III. Préparation des analytes**

#### **a. Choix de la matrice et préparation de l'échantillon**

La préparation de l'échantillon est une étape cruciale de l'analyse MALDI. Une solution d'analyte et une solution de matrice en très large excès, sont ainsi déposées sur un support adapté à la technologie et à l'instrument (Fig. 2) afin de permettre une co-cristallisation, la plus homogène possible, des deux composés. Il est important de préciser que l'analyte et la matrice doivent être solubles dans les solvants de travail, afin d'éviter toute précipitation d'un composé qui pourrait mener à des résultats de très mauvaise qualité.[14] Cette étape de cristallisation est particulièrement importante car une cristallisation inhomogène aboutit à un signal de mauvaise qualité et des résultats non reproductibles, impliquant un choix pertinent des solvants utilisés. Il est cependant évident qu'une cristallisation totalement homogène est inaccessible[15][16], de par la nature même du phénomène de cristallisation, qui se produit très rapidement de l'extérieur vers le cœur de l'échantillon déposé.

Les matrices MALDI sont généralement de petites molécules organiques, de faible poids moléculaire, capables d'absorber les longueurs d'ondes UV émises par le laser, et de transférer cette énergie, notamment

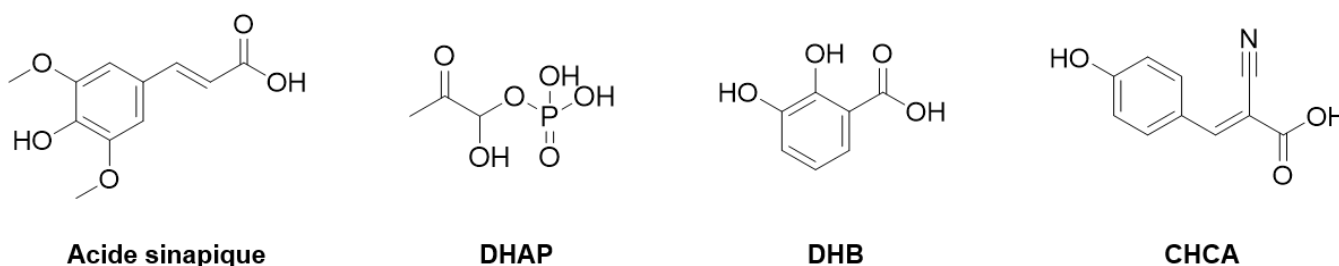


via la présence de motifs aromatiques ou de groupements donneurs/accepteurs d'électrons. La présence, dans la plupart des cas, d'une fonction acide sur la molécule, et donc d'un proton acidolabile, leurs permet de facilement transmettre un proton aux molécules neutres d'analyte afin de promouvoir l'espèce ionique. Une bonne matrice MALDI doit répondre à cinq critères principaux :

- SOLUBILITE : La matrice doit être soluble dans tout solvant permettant la solubilisation de l'analyte.
- ABSORPTION : La matrice doit être capable d'absorber l'énergie de l'impulsion laser et doit posséder, de ce fait, un fort coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde de travail.
- REACTIVITE : La matrice doit être chimiquement inerte vis-à-vis de l'analyte. Elle doit également servir d'agent de protonation ou de déprotonation.
- VOLATILITE : La matrice doit posséder des propriétés d'évaporation telles que la vaporisation dans la source sous vide soit fortement limitée tout en se sublimant facilement sous le laser.
- DESORPTION : La matrice doit grandement faciliter la désorption d'énergie vers l'analyte.

En MALDI, la préparation de l'échantillon d'analyse requiert une grande précision étant donné l'influence que peut avoir cette étape sur la qualité du signal obtenu. En effet, elle est directement liée au rendement de l'étape de co-cristallisation, c'est pourquoi une attention particulière doit être portée aux méthodes choisies pour la préparation de l'échantillon, le solvant utilisé, le support choisi ou encore les méthodes de séchage du système matrice/analyte.[13][17][18]

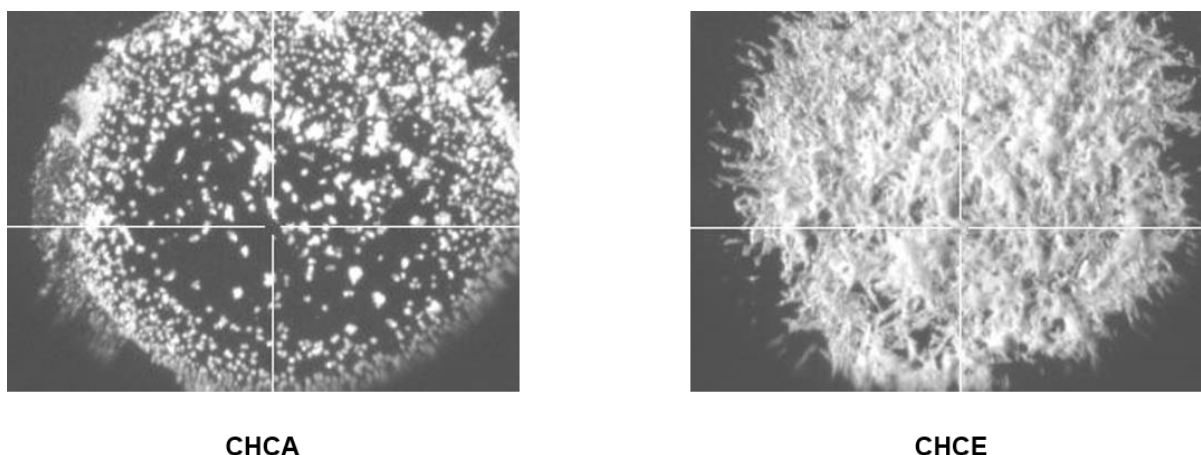
Parmi les principales matrices utilisées (Fig. 8), l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)[19], la Dihydroxyacetone phosphate (DHAP), l'acide sinapique[19] ou encore l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque (DHB)[20] sont les plus utilisées à ce jour pour la détection de peptides et protéines.[18] Toutes ces matrices induisent un type de cristallisation particulier, induisant une forte possibilité de variation dans l'acquisition des spectres.[20] Pour réduire au maximum cette incertitude, il est parfois nécessaire d'ajouter plusieurs spectres acquis sur plusieurs positions aléatoires sur le même échantillon. Le choix de la matrice peut également être induit par le type de fragmentation souhaitée en terme de caractérisation finale de l'analyte. En effet, certaines matrices, qualifiée de matrices chaudes, comme CHCA, sont capables de fournir une grande quantité d'énergie, aboutissant à la génération d'ions possédant une très grande énergie interne. Au contraire, les matrices dites froides, comme le DHB, mènent à l'obtention d'ions pauvres en énergie. Cette notion de matrice froide ou chaude est à lier avec l'énergie transmise aux molécules d'analyte par la matrice dans le nuage en expansion. En effet, ce nuage est plus dense dans le cas des matrices chaudes, et est donc le théâtre d'interactions analyte/matrice beaucoup plus nombreuses. Cependant, malgré de nombreuses études cherchant à caractériser la « température » des différentes matrices, beaucoup des résultats obtenus sont totalement contradictoires et il semblerait alors que d'autres phénomènes, liés au transfert d'énergie de la matrice vers l'analyte, soit également à prendre en compte dans cette caractérisation.[21][22]



*Figure 8 : Structures des principales matrices MALDI utilisées*

CHCA reste, cependant, la matrice la plus couramment utilisée pour l'analyse de peptides ayant une masse molaire relativement faible, soit inférieure à 4000Da. Cette matrice induit une cristallisation faite de petits cristaux, plutôt homogènes, mais disparates. Il est à noter que l'homogénéité des cristaux obtenus peut être favorisée par l'utilisation d'un solvant s'évaporant très rapidement.[14]

Le DHB, quant à lui, est utilisé pour l'analyse d'ions pouvant être relativement fragiles comme les ions issus de peptides phosphorylés ou glycosylés. C'est également une matrice plus tolérante que CHCA en ce qui concerne la présence de sels ou de détergents.[20] L'analyse des protéines de haute masse molaire requiert généralement l'utilisation de l'acide sinapique. Cependant, l'utilisation de cette matrice est, quoi qu'il arrive, fortement déconseillée pour l'analyse d'échantillons de faible poids moléculaire à cause de l'obtention de spectres présentant un bruit de fond très intense aux bas m/z.[19] Dernièrement, l' $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate de méthyle ou CHCE, correspondant à la forme ester méthylique de CHCA, est une matrice particulière, peu utilisée dans des conditions d'analyse de routine, car elle ne favorise que très peu l'ionisation des analytes peptidiques, principalement à cause de la disparition de la fonction acide carboxylique. Cependant, c'est autour de l'utilisation préférentielle de cette matrice que s'articulera notre travail.



*Figure 9 : Exemples de cristallisation d'un peptide dans CHCA et dans CHCE*

### **b. Les différents types de dépôt**

Comme dit précédemment, la préparation de l'échantillon d'analyse doit être rigoureuse et un soin particulier doit y être apporté de part l'influence de l'étape de cristallisation sur la qualité du signal. Ainsi, plusieurs types de dépôt ont été référencés et leur choix dépend principalement de la matrice de travail, du support MALDI utilisé et de l'analyte en lui-même. Le dépôt goutte séchée est le plus fréquemment utilisé. Il s'agit de déposer une goutte, dont le volume est généralement inférieur au  $\mu\text{L}$ , de solution saturée de matrice sur le support MALDI, généralement une plaque en acier qui peut présenter ou non un coating spécifique permettant de concentrer l'échantillon lors du dépôt, puis de déposer une goutte de solution d'échantillon. Le mélange sèche à l'air libre ou sous vide, permettant aux deux composés de co-cristalliser. Ce type de dépôt a pour principal avantage d'autoriser l'emploi de solvants organiques tout en facilitant la manipulation de matrices insolubles ou faiblement solubles dans l'eau. Il présente également une bonne tolérance quant à la présence de sels ou aux tampons. Le dépôt prémix, très similaire, implique la préparation d'une solution matrice/analyte avant de déposer une goutte du mélange sur la cible MALDI. (Fig. 10)

Le dépôt couche mince est, quant à lui, principalement utilisé pour le travail dans des solvants organiques plus volatiles tels que le méthanol ou l'acétone. Ces solvants présentent une très faible tension de surface et s'évaporent quasi-instantanément lors du dépôt, les rendant moins adaptés aux types de dépôts cités précédemment. Il s'agit ici, contrairement au dépôt goutte sèche ou prémix, de déposer une goutte de solution de matrice puis de déposer la solution d'analyte en surface uniquement après séchage total de la matrice. Le principal désavantage de cette technique est la possibilité de rediluer la matrice lors du dépôt de la solution d'analyte. De ce fait, il est préférable d'utiliser, avec cette méthode, des matrices insolubles dans l'eau. Cependant, cette méthode de dépôt favorise la formation de petits cristaux, très homogènes, induisant des spectres beaucoup plus résolus qu'avec d'autres méthodes de dépôt. Il faut, en revanche, noter le nombre limité de tirs qu'il est possible de réaliser sur un tel dépôt. En effet, le dépôt étant relativement fin et fragile, il est très rapidement détruit lors du tir laser.

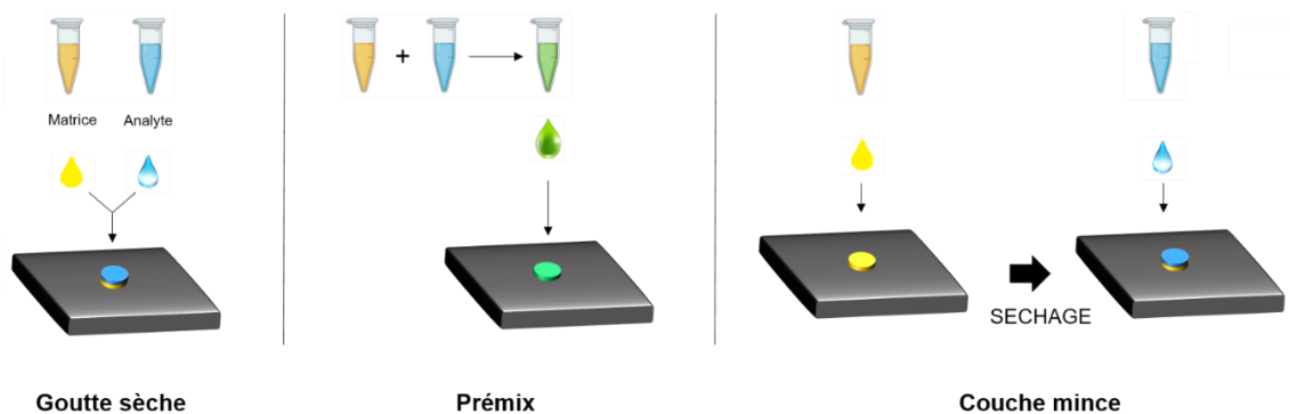
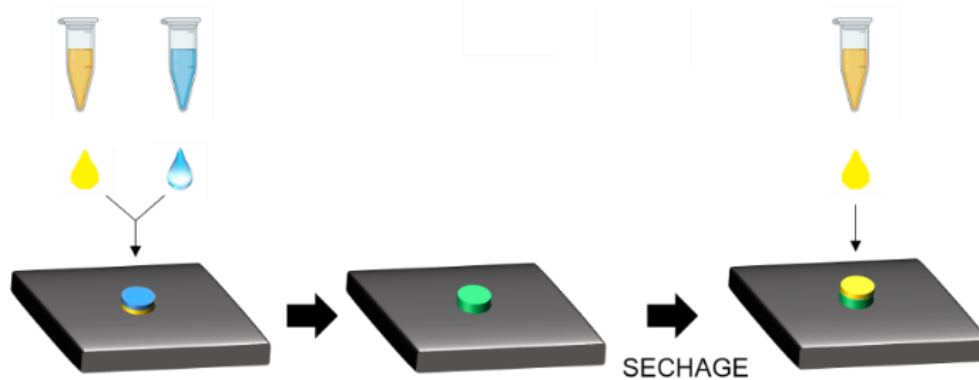


Figure 10 : Schéma de principe des différents types de dépôt utilisés

Enfin, le dépôt sandwich (Fig. 11) permet l'analyse des molécules de haute masse molaire et l'acide sinapique reste la matrice de choix. En effet, par l'emprisonnement de la couche d'analyte entre deux couches de matrice, l'ionisation de l'échantillon est grandement favorisée. Il s'agit donc, ici, de faire un dépôt goutte sèche puis de redéposer une goutte de solution de matrice après séchage complet du premier dépôt.

On obtient alors un dépôt dont la cristallisation est particulièrement homogène par la présence de deux couches de matrice. Ce dépôt présente alors tous les avantages du dépôt couche mince tout en permettant un plus grand nombre de tirs sur l'échantillon, sans pour autant atteindre la résistance d'un dépôt goutte séchée.



*Figure 11 : Schéma de principe du dépôt sandwich*

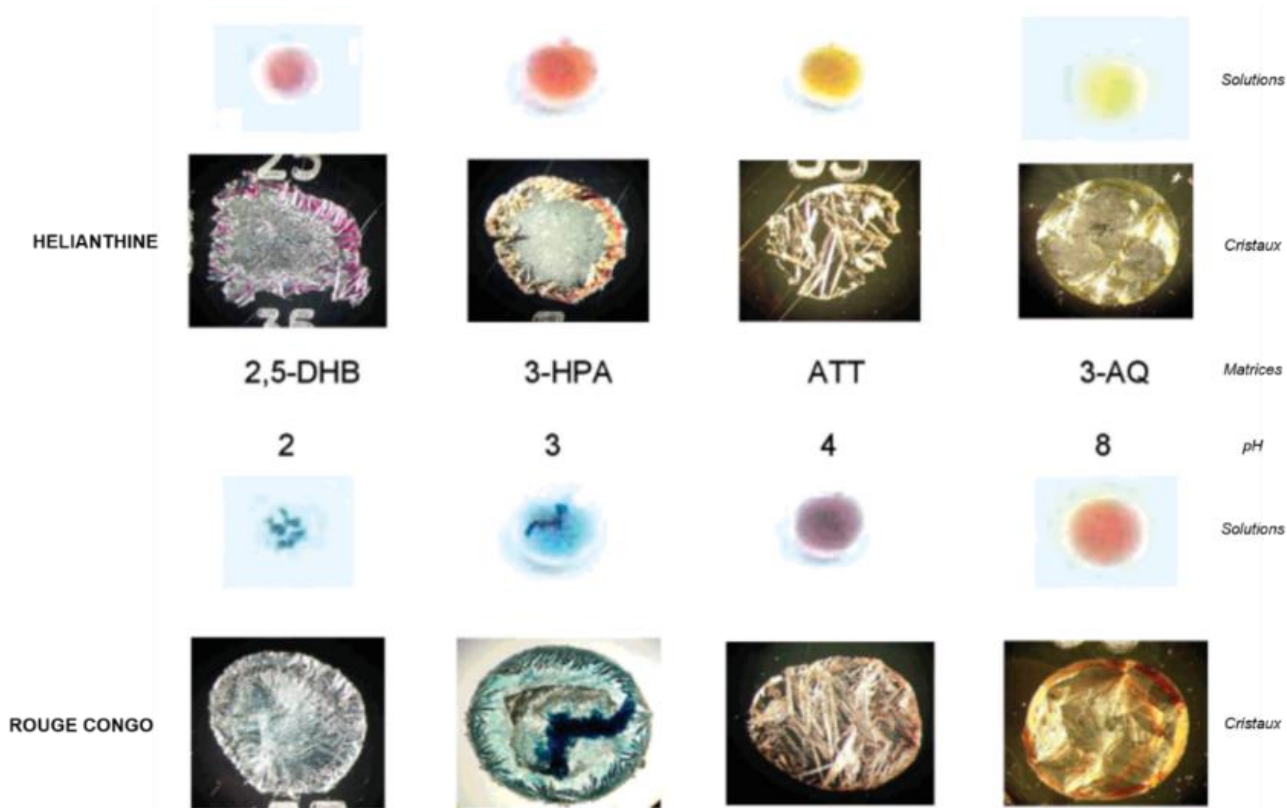
#### **IV. Les différents processus d'ionisation MALDI et leurs modèles associés**

Après séchage total du dépôt, le mélange analyte/matrice est ionisé par bombardement laser, principalement UV ou Infrarouge, induisant des réactions photochimiques à l'origine de la désorption rapide des espèces irradiées de la phase solide à la phase gazeuse.[13] Les phénomènes précis impliqués dans cette étape de désorption sont encore discutés mais deux grands modèles se démarquent suite aux travaux du Pr Karas d'un côté et du Dr Knochenmuss de l'autre, chacun défendant respectivement le modèle des clusters ou celui de la fusion énergétique ou modèle CPCD pour « Coupled Physical and Chemical Dynamics ».[23]

##### **a. Le modèle des clusters ou « Lucky survivor model »**

Ce modèle est basé sur l'hypothèse fondamentale que les molécules d'analyte sont déposées sous forme déjà chargée et que cette charge est conservée lors de la mise en solution avec la matrice et surtout lors de la cristallisation. Cette hypothèse a été validée par les travaux du Pr Karas et al. en 2001,[24] où il a été montré que les indicateurs pH-métriques utilisés ne subissaient aucune modification en terme de coloration ou d'état de charge entre la mise en solution de l'analyte et la co-cristallisation de celui-ci avec des matrices acides, basiques ou neutres. L'expérience a été menée avec deux indicateurs colorés différents : (Fig. 12)

- L'hélianthine, dont la gamme de pH va de rose-rouge en milieu acide vers jaune-orange en milieu basique, avec un pKa de 3
- Le rouge Congo, dont la gamme de pH va de bleu en milieu acide vers rouge-orange en milieu basique, avec un pKa autour de 4



*Figure 12 : Résultats obtenus à la suite des travaux du Pr Karas et de son équipe*

Ainsi, dans le cas de l'utilisation d'une matrice acide, les molécules d'analyte présenteront un excès de charge positive qui pourra être compensé par la présence de contre-ions. Cependant, ce modèle étant basé sur la conservation de l'excès de charge, celui-ci se trouve alors être en faveur d'une incorporation des molécules d'analyte dans les cristaux de matrice et défend une cristallisation rapide. En effet, lors d'une croissance rapide des cristaux, induite par un séchage rapide du dépôt, peuvent alors être incorporées des molécules de solvant. Celles-ci sont porteuses de molécules d'analyte qui se trouvent être à minima partiellement solvatées puisqu'il est indispensable de maintenir séparées les molécules d'analyte chargées positivement et celles des contre-ions. Ces molécules d'analyte peuvent ensuite être incorporées dans les cristaux en croissance. Dans un second temps, le modèle prévoit l'ablation, sous l'impact laser, de la matrice cristalline en petits clusters matrice/analyte lors de la phase de désorption. Statistiquement, ces clusters peuvent alors être composés d'ions analyte seuls mais peuvent également présenter un excès de charge positive ou négative, ou encore un excès de contre-ions. Lors de la phase de désolvatation, ces clusters conduisent à la libération de molécules neutre de matrice, de solvant ou de contre-ions sous la forme d'acide ou de base libres et ce phénomène de neutralisation est induit par un transfert de protons à l'origine de l'ionisation des molécules d'analyte, certaines présentant une charge unique, d'autre un excès de charge. Ces molécules portant une charge unique sont appelées les « lucky survivors » du processus de neutralisation. Il est cependant indispensable, pour la validation de ce modèle, de poser comme postulat de départ que les clusters n'ont pas assez d'énergie interne pour induire l'évaporation des dérivés neutres. [9] (Fig. 13)

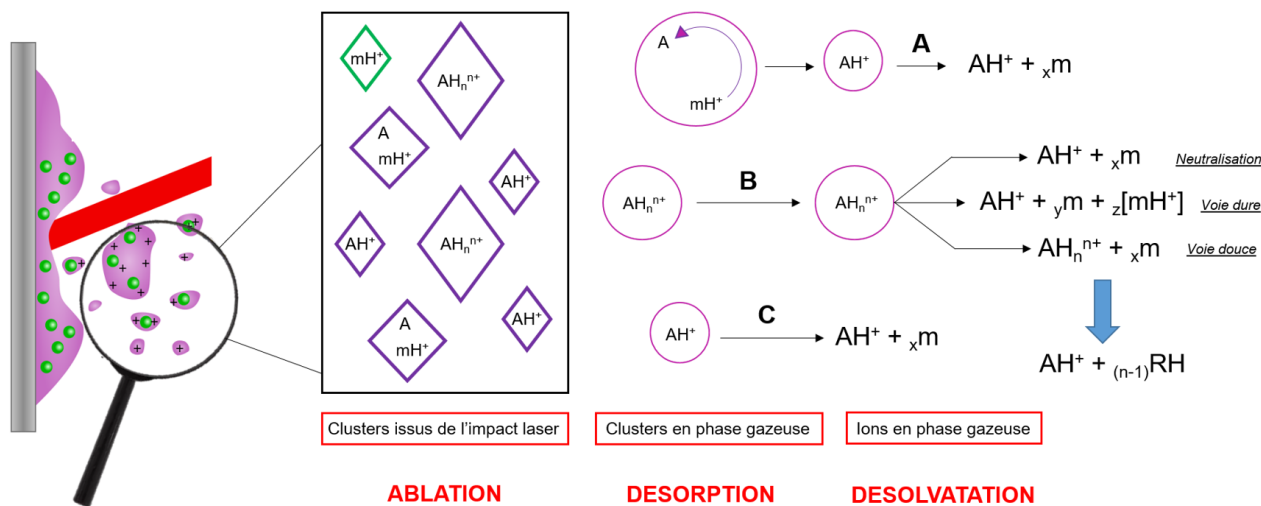


Figure 13 : Schéma des processus impliqués dans le modèle des clusters où A représente les molécules d'analyte, m les molécules de matrice et R un contre-ion. Seul le modèle avec une excès de charge positive est présenté.

La grande force de ce modèle est donc sa capacité à prédire la naissance de la totalité des ions qui peuvent être obtenus en MALDI, que ce soient des cations, des anions ou des ions multichargés.

### **b. Le modèle CPCD et la fusion énergétique**

Ce modèle a premièrement été développé par le Dr Knochenmuss sous le nom de « Two-step ionization model » au vu des deux mécanismes d'ionisation au cœur de ce processus.[25] Cependant, les premières observations du Dr Knochenmuss ont ensuite été modifiées et complétées pour faire évoluer ce modèle vers ce qu'il est aujourd'hui, le modèle CPCD ou « Coupled Physical and Chemical Dynamics ».[26] Ces différents mécanismes ont été établis après observation des résultats obtenus en faisant varier les différents paramètres liés à l'analyse MALDI, soit la matrice, la fluence laser, la longueur d'onde, l'analyte ou encore sa concentration. De même que le modèle des clusters précédemment défini, les conclusions à l'origine du modèle CPCD ont pour but de décrire explicitement tous les phénomènes physiques et chimiques, incluant les différentes propriétés de la matrice, à l'origine de l'obtention des ions détectés en MALDI. Les travaux du Dr Knochenmuss et son équipe [27] sont en faveur d'une ionisation en deux temps avec une première phase d'ionisation primaire, durant laquelle se forment les ions matrices, suivi d'une phase d'ionisation secondaire, durant laquelle se forment les ions d'analyte via une interaction entre les ions matrice et les molécules d'analyte.[28]

Le processus d'ionisation primaire permet ainsi aux molécules de matrice d'atteindre un état ionisé, sans pour autant augmenter la quantité d'énergie absorbée via l'absorption des photons émis par le pulse laser. Celui-ci permet également d'expliquer la diversité des ions matrices, qui peuvent alors être présents sous la forme d'ions ( $[M+H]^+$  ou  $[M-H]^-$ ), de radicaux ( $M^{\cdot+}$  ou  $M^{\cdot-}$ ), de fragments ou encore d'adduits cationisés ou anionisés ( $[M+Na]^+$ ,  $[M+Cl]^-$ , ...) alors que les ions analytes, quant à eux, se trouvent quasiment exclusivement sous la forme d'ions protonés ou déprotonés ou sous la forme d'adduits. Dernièrement, il n'est pas exclu que quelques molécules d'analyte s'ionisent durant cette phase d'ionisation primaire, surtout si celui-ci

comporte des groupements chromophores, mais la matrice étant présente en très large excès, son ionisation demeure la plus probable.

Contrairement au processus d'ionisation primaire, qui lui est très rapide, le processus d'ionisation des analytes ou ionisation secondaire est un processus long qui survient dans le plumeau en expansion. Ces ions secondaires sont formés principalement à partir de collisions intermoléculaires entre les ions matrices précédemment formés et les molécules neutres d'analyte. Ces collisions sont favorisées par une expansion lente du nuage, induisant une forte densité particulière au sein du nuage sur une période significative au regard de la formation des ions. Ces collisions intermoléculaires sont gouvernées par les lois de l'équilibre thermique local et toutes les réactions intervenant tendent vers cet équilibre. Ceci implique que les ions analyte formés et détectés en MALDI sont les plus favorable thermiquement et donc les plus stables.

Trois mécanismes principaux ont été décrits pour la formation des ions secondaires : [23]

- Le transfert de proton :  $[M+H]^+ = [A+H]^+ + M$
- Le transfert de radical :  $M^{\bullet} + A = A^{\bullet} + M$
- Le transfert d'anions ou de cations, à l'origine des adduits salins :  $[M+Na]^+ + A = [A+Na]^+ + M$

Parmi les trois mécanismes proposés, le transfert de proton est probablement le plus fréquent. En effet, de nombreuses molécules, tels que les protéines ou les peptides, sont généralement détectées en MALDI sous la forme d'espèces protonées. Ce mécanisme est gouverné par l'affinité protonique des composés mis en jeu, soit l'enthalpie ou potentiel thermodynamique associé au transfert d'un proton d'une molécule à une autre. De ce fait, les propriétés intrinsèques d'acidité et de basicité de l'analyte sont des facteurs d'influence majeurs sur l'ionisation de celui-ci. En effet, il a été démontré que les analytes basiques se détectaient plus facilement en MALDI et, par conséquent, s'ionisaient plus facilement. Les biomolécules, telles que les peptides ou les protéines, ont d'ailleurs généralement une affinité protonique plus importante, avec un minima de 900kJ/mol, supérieure à celles des matrices usuellement utilisées, qui se trouve bornée entre 850 et 900kJ/mol.[29] (Tab. 1)

Composé	Structure	Affinité protonique (kJ/mol)
CHCA		840
2, 5-DHB		855
Acide sinapique		890
THAP		890
Arginine		> 1015
Bradykinine	H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH	> 1025

**Tableau 1 : Valeur de l'affinité protonique des principales matrices MALDI en comparaison de la valeur de l'affinité protonique de deux analytes**

Dans le cas d'analytes ayant une faible affinité protonique, l'ionisation du composé se fait préférentiellement via un transfert de cation. En effet, les molécules d'analyte sont en compétition, au sein du plumeau, avec les molécules de matrices neutres vis-à-vis des protons disponibles. Ainsi, une molécule d'analyte ne peut être directement protonée qu'à condition d'avoir une affinité protonique supérieure à celle de la matrice utilisée. De plus, expérimentalement, l'affinité cationique de la plupart des matrices MALDI est très inférieure à leur affinité protonique, soit entre 150 et 170kJ/mol pour le sodium et environ 50kJ/mol pour le potassium. (Tab. 2) Ainsi, lorsque l'affinité protonique d'un composé n'est pas suffisamment haute, l'ionisation par transfert de cation devient la voie salvatrice. Ces adduits sont particulièrement utiles dans le cas, par exemple, de l'analyse de polymères synthétiques.[29] En pratique, l'ajout d'agents cationisants peut également être un moyen d'augmenter l'affinité cationique du mélange dans le but de promouvoir son ionisation. Cependant les réactions de transfert de cation étant très faiblement exothermiques, voir endothermiques dans la plupart des cas, elles aboutissent généralement à l'obtention de massifs isotopique de faible intensité.

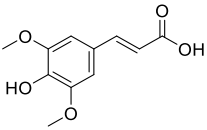
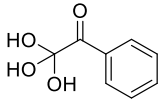
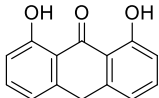
Composé	Structure	Affinité cationique pour Na <sup>+</sup> (kJ/mol)	Affinité cationique pour K <sup>+</sup> (kJ/mol)
Acide sinapique		159	104
THAP		154	97
Dithranol		150	94

Tableau 2 : Valeurs des affinités cationiques des matrices usuellement utilisée pour le transfert de cations

### c. Limites des modèles

Dans un article publié en 2002, le Dr Knochenmuss propose une modélisation quantitative du modèle CPCD et met ainsi en lumière plusieurs limites du modèle ainsi que sa dépendance à certaines propriétés majeures de l'analyse MALDI.[30] Ces résultats confirment et développent ceux précédemment introduit par Karas et al. en 1995.[31]

Il démontre ainsi que la fluence laser, la longueur d'onde ou encore la taille de dépôt s'avèrent être des facteurs limitant de l'ionisation d'un composé. En effet, il a été observé qu'une trop faible fluence laser ne permettait pas d'amorcer le processus d'ionisation tout en induisant une ablation sélective de la surface du dépôt. Cette observation souligne alors l'existence d'un seuil de fluence minimal pour l'obtention d'un spectre de qualité, avec un rendement ionique augmentant de manière exponentielle en fonction de la fluence laser.

Concernant la longueur d'onde, il est évident que le succès d'une analyse MALDI repose sur le choix d'une matrice ayant le meilleur coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde de travail. De ce fait, plus haut est le coefficient d'absorption de la matrice, meilleure sera l'absorption de l'impulsion lumineuse, induisant un nombre plus important de molécules de matrice excitées, donc une densité plus importante



dans un volume donné et un plus grand nombre de molécules pouvant prendre part au processus d'ionisation. En conséquence, il en résulte un meilleur rendement en termes d'ionisation de l'analyte. Enfin, la taille du dépôt joue un rôle majeur dans le processus d'ionisation. En effet, un dépôt ayant une taille trop faible va induire une quantité d'ions moins importante et donc un rendement ionique plus faible. En revanche, un dépôt trop important n'est pas la solution car un dépôt large induit un plumeau plus important, donc une densité moins importante au sein du nuage, diminuant donc les probabilités de collisions intermoléculaires à l'origine de l'ionisation secondaire. De plus, l'expansion du plumeau étant significativement plus lente dans le cas d'un dépôt de grande taille, cela défavorise la survie des ions primaires qui ont alors plus de chance de retourner à l'état fondamental à la suite de leur désexcitation. Ces travaux ont également permis de modéliser trois grands processus limitant l'ionisation des analytes, décrits par le modèle CPCD que sont :

- La dilution énergétique
- Les effets de suppression de matrice
- Les effets de suppression d'analyte

### 1. La dilution énergétique

On parle de dilution énergétique pour désigner les différents processus qui aboutissent à la désexcitation des molécules de matrice en parallèle de la formation des ions secondaires d'analyte. La principale conséquence de ce phénomène est la limitation du rendement ionique puisque les molécules revenues à l'état fondamental ne peuvent alors plus être engagées dans le processus d'ionisation secondaire. (Fig. 14) Pour éviter ce phénomène, il est indispensable d'optimiser les paramètres d'analyse, tel que la taille du dépôt ou la fluence laser, pour obtenir une expansion du nuage la plus rapide possible, afin de limiter les collisions parasites, tout en évitant une densité de particules excitées trop importante.

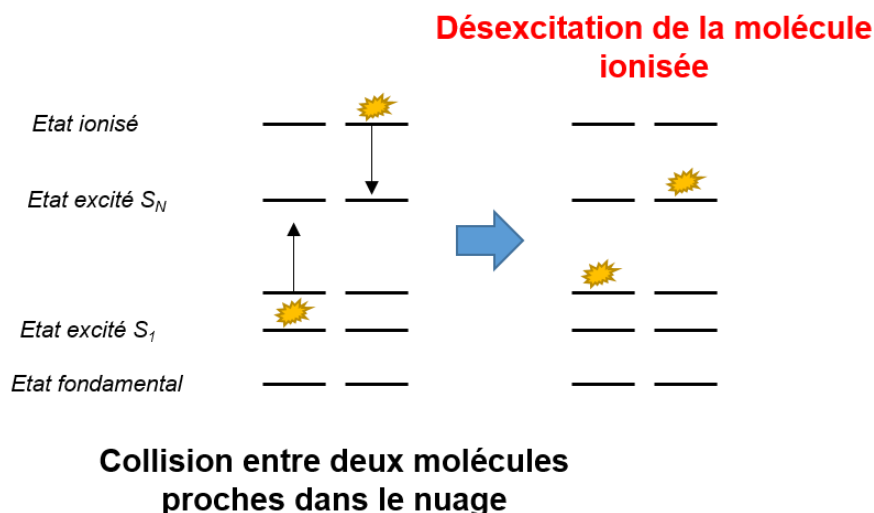


Figure 14 : Schéma général des processus de désexcitation par collision parasites au sein du plumeau

## 2. Effet de suppression de matrice

Un des effets majeurs concernant l'analyse MALDI est l'effet de suppression de matrice. Celui-ci a plusieurs fois été expérimentalement observé mais l'importance de ses conséquences n'a été véritablement comprise que lorsque ce phénomène a été replacé dans le contexte du modèle CPCD. En effet, c'est un processus qui ne peut être expliqué que par le modèle CPCD, le modèle des clusters ne prévoyant pas ce type de réactions, bien qu'il inclût des réactions intermoléculaires intra-clusters. Il s'agit d'un phénomène de suppression des ions associés à la matrice par les ions analytes, lorsque ceux-ci sont présents à une concentration appropriée.[23] (Fig. 15) Les réactions d'ionisation secondaire entre la matrice et l'analyte sont entièrement gouvernées par les lois de l'équilibre thermodynamique. Ainsi, le ratio entre les concentrations de matrice et d'analyte définissent celui des deux composés désignés comme réactif limitant, lorsque la réaction est thermodynamiquement favorable. Lorsque l'analyte est présent en quantité trop faible, il est réactif limitant et de nombreux ions matrices demeurent donc en excès, sans possibilité de poursuivre la réaction, alors que lorsqu'il est présent en quantité plus importante, ce sont les ions matrice qui limitent la réaction et les ions associés à l'analyte deviennent ainsi le seul produit de la réaction. Cet effet induit donc l'obtention d'un spectre dit « idéal » où seuls sont visibles les ions associés à l'analyte, sans interférences. Cependant, il indique également la présence d'un seuil concernant la concentration de l'analyte au-delà duquel l'ajout d'analyte n'aura plus d'effet sur l'équilibre de la réaction.[29] Cet effet de suppression de matrice est également lié à la polarité des composés. En effet, les analytes basiques auront tendance à supprimer les ions matrices protonées et inversement pour les analytes acides.

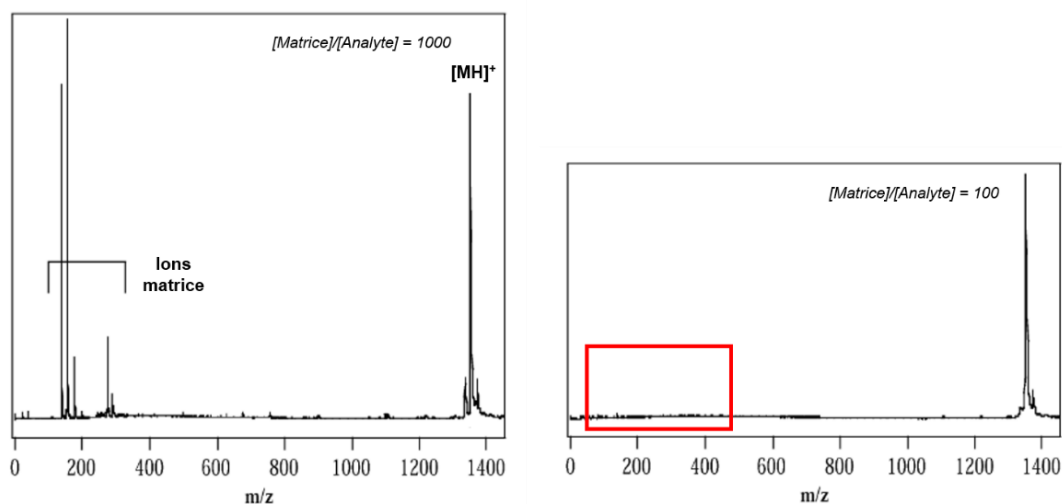


Figure 15 : Exemple de l'effet de suppression de matrice lors d'une analyse UV-MALDI dans le DHB

En pratique, cet effet de suppression s'est avéré être un grand avantage dans le cas de l'analyse MALDI de petites molécules, dont les signaux associés sont généralement « noyés » au milieu des massifs isotopiques associés à la matrice. Plusieurs expériences ont alors été menées, notamment par le Dr Knochenmuss, pour définir les conditions optimales d'analyse et les ratios matrice/analyte nécessaires à l'apparition du phénomène de suppression de matrice. Il a alors été montré que pour la plupart des petites molécules, la provocation de ce phénomène était possible, avec une excellente réponse de l'analyte sur le spectre. En revanche, cela restait compliqué voire impossible pour les analytes ayant une affinité cationique, notamment pour le sodium, supérieure à leur affinité protonique ou pour ceux présentant une fragmentation en source excessive. Il a ainsi été conclu qu'un ratio molaire minimal analyte/matrice de 1:5

était nécessaire pour une fluence laser moyenne, tout en démontrant une forte dépendance à l'homogénéité du dépôt MALDI et au processus de cristallisation.[32]

### **3. Effet de suppression d'analyte (ESA)**

De manière analogue au processus de suppression de matrice, le modèle thermodynamique prévoit également que les ions analytes soient capables de se supprimer entre-eux. Cet effet s'illustre particulièrement lors de l'analyse de peptides issus de digestion trypsique. En effet, l'analyse isolée de chaque peptide ne pose aucun problème, or, lors de l'analyse du digestat, certains peptides ne sont pas visibles sur le spectre. C'est un phénomène de suppression peptide-peptide, qui se trouve être étroitement corrélé aux propriétés de basicité en phase gazeuse des composés. Bien que l'ESA soit comparé au phénomène de suppression de matrice, le mécanisme qui lui est associé est plus complexe. À ce jour, quelques hypothèses ont été établies concernant les mécanismes possibles : [29]

- Premièrement, l'origine de ce phénomène pourrait être une compétition entre différentes molécules d'analyte pour un même ion matrice. Cela peut se produire en cas de présence de plusieurs analytes différents, dont l'un d'entre-eux réagit de manière plus favorable avec les ions matrices
- Deuxièmement, il peut être dû à des réactions parallèles entre les ions d'analyte dans le cas d'une forte concentration en analyte.

Des travaux préliminaires, présentés par le Pr Karas, ont cependant montré que la première hypothèse semble plus probable et plus cohérente.[23]

Dans certains cas, il est possible d'éviter ce phénomène indésirable en modifiant le mode de dépôt utilisé. En effet, l'ESA est principalement basé sur le fait que l'intensité du signal obtenu par un ion est particulièrement influencée par la présence d'autres composés au sein d'un mélange. De plus, ce phénomène est grandement dépendant de plusieurs facteurs tels que le choix de la matrice, les propriétés physico-chimiques de l'analyte, la méthode de préparation des échantillons ou encore la méthode de dépôt. De ce fait, ont alors été développées différentes méthodes de dépôt permettant de séparer le mélange en différentes fractions ne contenant qu'une seule classe d'analyte, via l'utilisation d'une méthode de séparation chromatographique ou électrophorétique avant le passage en MALDI. Il devient ainsi possible de diminuer le phénomène de compétition entre les différents analytes vis-à-vis des ions matrice. Lou et al. [33] ont présenté une version modifiée du dépôt couche mince dans laquelle le solvant choisi pour le dépôt d'analyte est un solvant dans lequel la matrice précédemment déposée n'est absolument pas soluble, évitant ainsi la re-dilution de la matrice par la solution d'analyte. Ils sont ainsi parvenus à effacer l'effet de suppression ionique lors de l'analyse d'un mélange angiotensine/enképhaline dans lequel il était précédemment impossible de détecter l'enképhaline. D'autre part, Stensballe et al. [34] ont récemment prouvé que l'utilisation d'additifs parallèlement aux matrices MALDI usuelles permettait notamment de réduire la formation d'adduits et donc de limiter les effets de suppression ionique. Ils ont ainsi démontré l'efficacité de l'ajout d'acide phosphorique en complément d'un mélange DHB/Acide 2-hydroxy-5-methoxybenzoïque pour l'imagerie MALDI de coupes de cerveaux. Il est à noter que l'ESA augmente proportionnellement avec la complexité du mélange, ce qui en fait un enjeu majeur lors de l'analyse d'échantillons biologiques bruts.

## **V. Caractérisation des analytes**

L'information principale apportée par un spectre de masse est la masse monoisotopique de l'analyte, via la détermination du massif isotopique de l'ion moléculaire. Cependant, dans le cas d'analyte inconnu, la seule masse de l'échantillon n'est pas une information suffisante pour déterminer avec certitude sa structure et l'identifier sans équivoque, même à haute résolution. Ainsi, il devient nécessaire de faire appel à la fragmentation (CID en ce qui nous concerne), permettant d'obtenir des ions fragments de l'ion moléculaire et donc d'obtenir des informations sur la structure de la molécule analysée. Ces expériences de fragmentation sont appelées spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). En effet, elles font appel à un processus en deux étapes : la première a pour rôle la sélection de l'ion parent que l'on souhaite fragmenter alors que la seconde est dédiée à l'analyse des ions issus de la fragmentation de l'ion moléculaire.

Expérimentalement, la fragmentation requiert de briser des liaisons covalentes et n'est viable que si l'ion moléculaire possède une énergie interne suffisamment élevée. Il devient alors possible de classer les ions en fonction de leur stabilité :

- Un ion est dit stable si sa durée de vie lui permet d'aller de la source au détecteur.
- Un ion est dit instable si son énergie interne est trop élevée, induisant alors une fragmentation quasi-instantanée dans la source, ce qui l'empêche d'atteindre l'analyseur. On parle ici de fragmentation en source ou ISD.
- Un ion est dit métastable si sa durée de vie lui permet d'atteindre l'analyseur, mais pas le détecteur. On parle ici de fragmentation après la source ou Post Source Decay fragmentation (PSD).

En MALDI, seuls les ions métastables sont pris en compte et cette fragmentation survient dans la zone vide de champ du tube de vol. Les ions ainsi générés, ayant une masse plus légère que leurs ions parents, ne possèdent pas la même énergie cinétique et sont donc déviés différemment par le réflectron, ce qui permet leur détection et leur analyse.[35] Malgré leur temps de vie trop court pour atteindre le détecteur, ces ions métastables demeurent, maintenant, exploitables dans une analyse de fragmentation. En effet, de nouvelles évolutions dans l'instrumentation, notamment l'apparition de cellules LIFT chez Brüker, agissant comme source secondaire d'énergie, ont permis la mise au point de méthodes permettant de rehausser l'énergie interne de ces ions.[36] Les ions métastables générés via ce genre de méthode le sont selon deux procédés : Le LID ou « Laser Induced Dissociation », qui fait appel à l'utilisation d'une énergie laser beaucoup plus importante que celle nécessaire à la simple ionisation, et le CID ou « Collision Induced Dissociation », qui utilise les chocs entre les atomes d'argon ou d'azote et les ions accélérés pour augmenter leur énergie.

Globalement, il existe deux grandes voies de fragmentation : Une voie vibrationnelle et une voie électronique. La première se fonde sur l'absorption d'énergie vibrationnelle, modélisée par un ou plusieurs photons, aboutissant à la dissociation de l'ion moléculaire, on parlera alors de photo-dissociation. La seconde illustre une dissociation induite par des réaction ion-électron ou ion-ion. Les électrons peuvent être introduits directement dans l'appareil ou générés in situ par des transferts entre espèces anioniques et cationiques. Ces deux voies induisent deux types de fragmentation différents, le choix se fonde alors sur le type de fragmentation souhaitée et le type d'appareillage disponible. En MALDI, toutes les fragmentations étudiées sont issues d'une voie vibrationnelle puisqu'elles sont issues du plumeau généré par l'impact laser. Cette fragmentation est due à la succession de trois procédés : [9]

- Premièrement, les ions sont excités via des collisions avec les ions matrices, eux-mêmes excités par l'absorption de l'énergie laser
- Deuxièmement, un champ électrique appliqué dans la source permet d'accélérer les ions. Cette accélération participe à l'augmentation des collisions entre les particules
- Dernièrement, les réactions de protonation intervenant au sein du plumeau sont des réactions exothermiques et induisent ainsi un apport d'énergie supplémentaire aux ions présents, permettant de passer la barrière énergétique associée à la rupture d'une liaison. Cet apport d'énergie interne est la cause principale de la rupture de nombreuses liaisons intramoléculaires liées à des groupements labiles tels que les groupements phospho ou sulfo.

### a. La fragmentation peptidique

Nous nous concentrerons ici sur la fragmentation de peptides et l'analyse des fragments issus. Dans ce cas, les deux types de fragmentation sont accessibles mais différents ions sont obtenus. En effet, les voies vibrationnelles favorisent la génération d'ions b ou y via des coupures hétérolytiques de la liaison peptidique quand les voies électroniques induisent plutôt des ruptures homolytiques et favorisent donc la génération d'ions c et z en plus des ions de base b et y, qui sont les plus abondants. Il est cependant important de noter que seules les voies électroniques permettent de conserver les modifications post-traductionnelles, comme les O-glycosylations[37] ou les O-phosphorylations[38], mais elles ne sont malheureusement compatibles qu'avec un nombre très limité d'appareils. Il est donc indispensable de connaître le mécanisme de fragmentation en phase gazeuse afin de pouvoir correctement interpréter le spectre résultant et ainsi établir la structure primaire du peptide étudié. Ce phénomène de fragmentation est, ici, principalement lié à la fragilité de la liaison C-N protonée en phase gazeuse.

On retrouvera deux types de fragmentation, indépendamment de la voie choisie : les fragmentations de basse énergie et les fragmentations de haute énergie, les fragmentations de basse énergie étant les plus répandues.

Historiquement, c'est en 1984 que Roepstorff[39] propose la première nomenclature des ions fragments, celle-ci sera complétée plus tard par Biemann[40] qui étendra la nomenclature établie à la fragmentation des chaînes latérales. (Fig. 16)

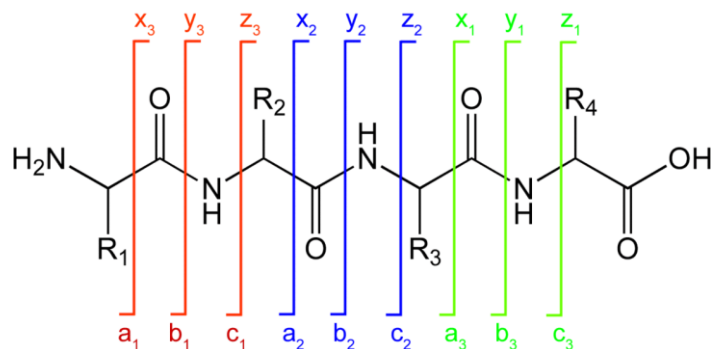


Figure 16 : Nomenclature de Roepstorff pour la fragmentation d'un tripeptide exemple

Ces ions, générés par la fragmentation de la chaîne principale du squelette peptidique, sont principalement liés à des fragmentations de basse énergie :

- Les ions a, b et c correspondent aux fragments portant la charge sur la partie N-terminale.

- Les ions x,y et z correspondent aux fragments portant la charge sur la partie C-terminale.

Les ions ne rentrant pas dans ces catégories (d,v et w) sont exclusivement issus de fragmentations des chaînes latérales et correspondent à des fragmentations de haute énergie. D'autres ions peuvent également être obtenus à partir de ces ions principaux, résultant de la perte de petites molécules organiques telles que NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O ou encore CO.

Plusieurs modèles permettent d'expliquer le phénomène de fragmentation mais le plus utilisé reste le modèle dit du « Proton Mobile »[41] qui permet d'expliquer la formation de la majorité des ions. Celui-ci s'explique simplement par plusieurs transferts intramoléculaires successifs du proton induit sur le peptide via les différents processus d'ionisation. Les ions b et y étant les ions les plus abondants, du fait de la faible énergie nécessaire pour les générer, plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer en détail leur formation. Parmi eux, on compte principalement le passage par un cycle oxazolone (Fig. 17) ou par la perte d'un cycle dicétopipérazine (Fig. 18), la formation de ces ions étant toujours accompagnée de la génération d'un résidu neutre.[42] Cependant, il a été démontré, tout d'abord, que la présence de résidus basiques, tel que l'arginine, favorisait la formation de dicétopipérazine mais également que l'ordre des acides aminés dans la séquence peptidique avait son importance dans le choix de l'un ou l'autre des mécanismes.[43]

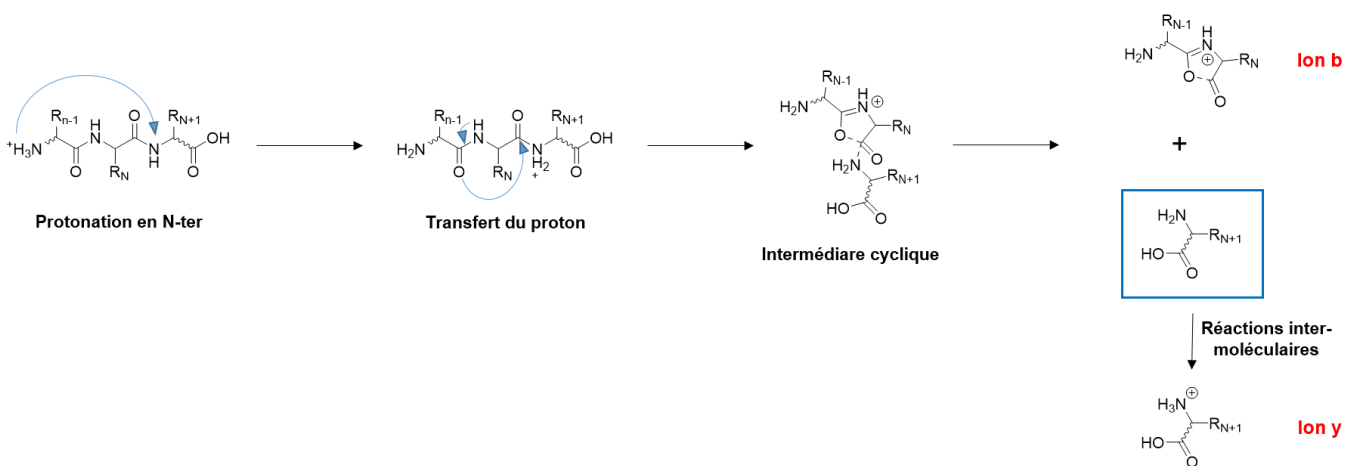


Figure 17 : Obtention des ions y et b par formation d'un cycle oxazolone

La réouverture du cycle oxazolone, relativement instable, présent sur l'ion b, peut ensuite mener à l'obtention d'un ion a via la perte de monoxyde de carbone.[42][43] Tous ces mécanismes de fragmentation, ainsi que le modèle du proton mobile, à l'origine des ions formés, ont d'ailleurs fait l'objet d'une revue complète par Paizs et Suhai, publié en 2005.[44]

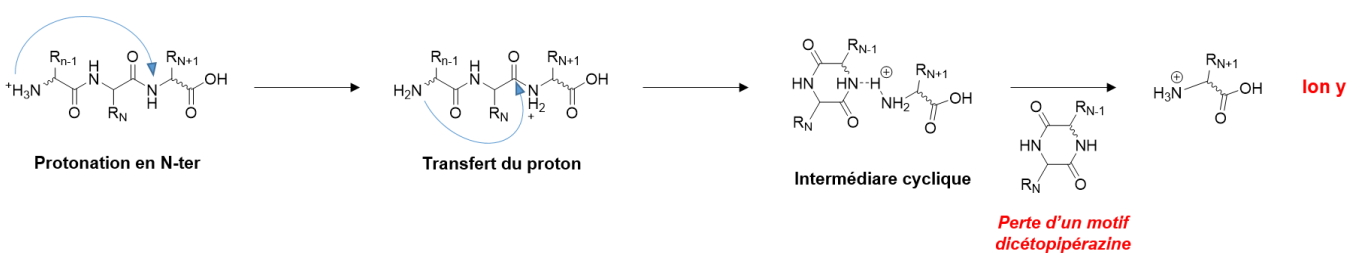


Figure 18 : Obtention des ions y par perte d'un cycle dicétopipérazine

Dans le cas particulier de la proline, on note une forte abondance des ions a,b et y issus du clivage sur l'extrémité N-terminale, abondance d'autant plus importante si on retrouve sur l'extrémité N-terminale de la proline un résidu histidine, asparagine, valine, isoleucine ou leucine. Ceci suggère une potentielle participation des chaînes latérales, notamment des résidus asparagine ou histidine, dans la stabilisation des espèces intermédiaires générées lors de la formation de ces ions.[45] Cependant, à l'inverse, les fragmentations en C-terminal de la proline sont peut courantes car fortement défavorisées par la difficulté de formation du système bicyclique lors de la formation de l'oxazolone.[46] On parle ici d'Effet Proline.

Dernièrement, le modèle dit du « Proton mobile » étant exclusivement dirigé par la localisation de la charge, il ne permet pas de prédire les fragmentations issues des pertes de  $\text{NH}_3$  ou celles non dirigées par la charge, d'autant plus importantes que la charge peut être retenue par les résidus basiques. Ce modèle est d'ailleurs utilisé par la plupart des logiciels permettant de prédire les fragmentations du squelette peptidique, tels que SEQUEST ou MASCOT, qui sont principalement développés, pour ne prendre en compte que les fragmentations de basse énergie. Ainsi, on peut alors observer des erreurs d'attribution qui peuvent être expliquées par la présence de fragmentations non prédites par ce modèle comme les fragmentations internes ou les pertes neutres telles que  $\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{NH}_3$ . [47][48] Les ions b peuvent également être une source d'erreur. En effet, une attaque nucléophile de l'azote N-terminal sur l'oxazolone protonée peut aboutir à la formation d'un macrocycle qui peut s'ouvrir spontanément, aboutissant à une nouvelle fragmentation complètement imprévisible. La formation de ce cycle s'illustre souvent par l'absence des ions a ou y lié à l'ion b à l'origine du macrocycle. On parle alors de « scrambling de séquence » puisque l'ordre initial des acides aminés s'en trouve modifié. Au contraire, la cyclisation des ions a, bien que pouvant mener à de fausses conclusions sur la structure du peptide, aboutit lors de la réouverture du cycle à une régénération de la séquence initiale.[48]

## **b. La quantification en spectrométrie de masse**

Malgré la puissance, la grande sensibilité et les nombreuses informations structurales qui peuvent être fournies par la spectrométrie de masse, une limite majeure de cette technologie reste la quantification des analytes. En effet, cette méthode d'analyse n'est pas décrite comme quantitative, principalement du fait de l'impossibilité de lier la quantité d'analyte et l'intensité ou l'aire des signaux obtenus. L'inexistence de cette relation linéaire en MALDI est probablement principalement due à l'inhomogénéité des dépôts. En effet, le phénomène de cristallisation via le séchage rapide du dépôt, l'inhomogénéité du processus lui-même ou encore la préparation des échantillons induisent une localisation préférentielle des molécules d'échantillon au sein du dépôt, ce qui rend l'intensité du signal obtenu totalement dépendante de la localisation du tir laser sur la zone de dépôt.[15][16] De plus, la spectrométrie de masse est principalement décrite comme une méthode d'analyse relative de par le phénomène de normalisation de l'intensité des pics proportionnellement au potentiel d'ionisation des composés. En effet, le composé possédant le potentiel d'ionisation le plus important sera lié au pic d'intensité majoritaire et lorsque l'écart entre les potentiels d'ionisation des différents composés est trop élevé, les pics minoritaires se retrouvent absorbés par le bruit de fond.

Différentes stratégies ont déjà été mise en place pour promouvoir la protéomique quantitative, les plus connues étant le Western Blot ou encore les tests immuno-enzymatiques tels que le test ELISA. Cependant, ces méthodes présentent encore aujourd'hui des limitations majeures :

- Elles sont totalement dépendantes de l'utilisation d'anticorps, impliquant la disponibilité d'anticorps adaptés.
- Elles sont chronophages et particulièrement gourmandes en échantillons.
- Elles sont souvent limitées à la quantification d'un seul analyte par expérience.
- Elles possèdent une sensibilité limitée en termes de détection d'analyte et ce, tout particulièrement lorsque le milieu d'analyse est complexe.

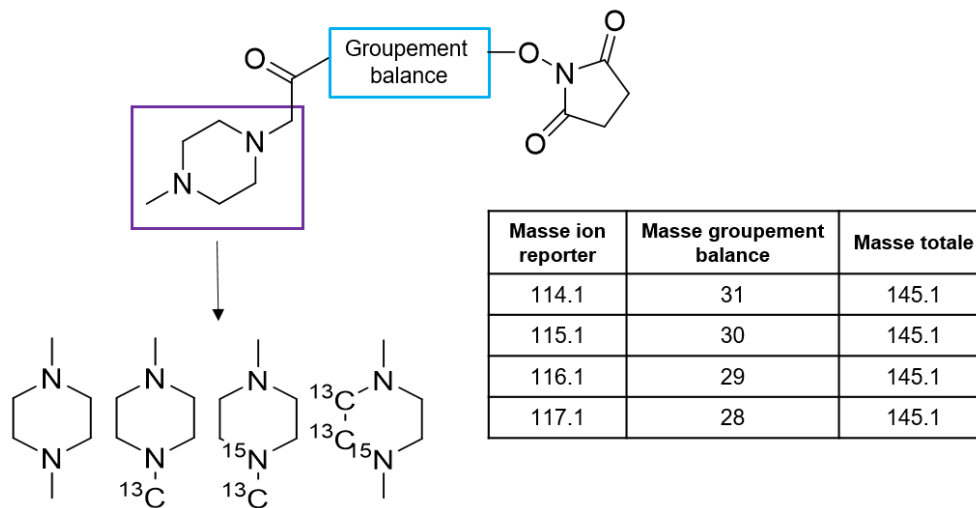
La spectrométrie de masse s'impose alors aujourd'hui comme une réponse aux différentes problématiques posées par la protéomique quantitative puisqu'elle ne nécessite aucun anticorps, est rapide et peu gourmande en matière première et surtout elle est caractérisée par une sensibilité importante tout en permettant l'analyse simultanée de différents analytes au sein du même échantillon. Ainsi, deux voies de quantification ont été développées, dépendamment de l'analyte étudié et du milieu de travail : la quantification relative et la quantification absolue.

Décrite comme une des premières stratégies de quantification, le marquage iTRAQ est principalement utilisé en biologie. Il s'agit de comparer les intensités obtenues pour un même analyte dans différentes conditions d'expérimentation, via la détection d'ions reporters. Cette méthode, appelée iTRAQ, permet de comparer le ratio d'une protéine dans divers échantillons et sous différentes conditions (e.g. échantillons sains et échantillons malades) mais ne permet pas d'accéder à l'information d'une quantité précise. Expérimentalement, cette stratégie repose sur l'incorporation de marqueurs chimiques, dits « isobariques », sur l'extrémité N-terminale ou sur la chaîne latérale d'une lysine, en vue d'une analyse MS/MS. Ces marqueurs sont composés de trois blocs : [49]

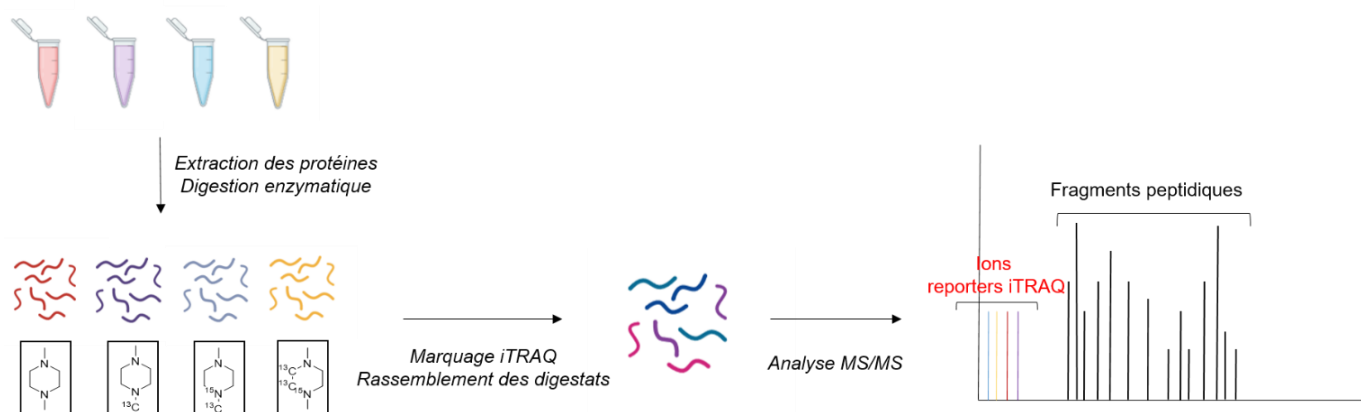
- Un exhausteur d'ionisation dérivé de la pipérazine, pouvant présenter un ou plusieurs  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$
- Un normalisateur de masse possédant généralement un motif carboxyle, présent pour équilibrer la masse du marqueur
- Un motif réactif permettant le greffage (e.g. maléimide, succinimide,...)

Une fois le marquage des peptides issus de la digestion protéolytique des différents échantillons effectuée, une analyse MS/MS des digestats rassemblés permet la quantification relative par comparaison des intensités obtenues pour les différents ions correspondant aux marqueurs et issus des exhausteurs d'ionisation. Les peptides sont, quant à eux, identifiés grâce aux ions de séquence générés. Cette méthode offre deux principaux avantages qui sont la qualité des spectres, par l'absence de bruit de fond en MS/MS, et une forte intensité pour les signaux correspondants aux analytes marqués. En effet, les différents marqueurs ayant une masse identique, tous les signaux correspondant à l'analyte marqué se retrouvent être sommés, illustrant ainsi la contribution en analyte de tous les échantillons étudiés.[50] Aujourd'hui, ces marqueurs sont commercialement disponibles, pré-fonctionnalisés, en pack de quatre ou huit molécules différentes, sous le nom de 4-plex et 8-plex. (Fig. 19) (Fig. 20)





**Figure 19 : Structure générale d'un marqueur isobarique utilisé pour le marquage des amines primaires et ses dérivés présentés dans le 4-plex**

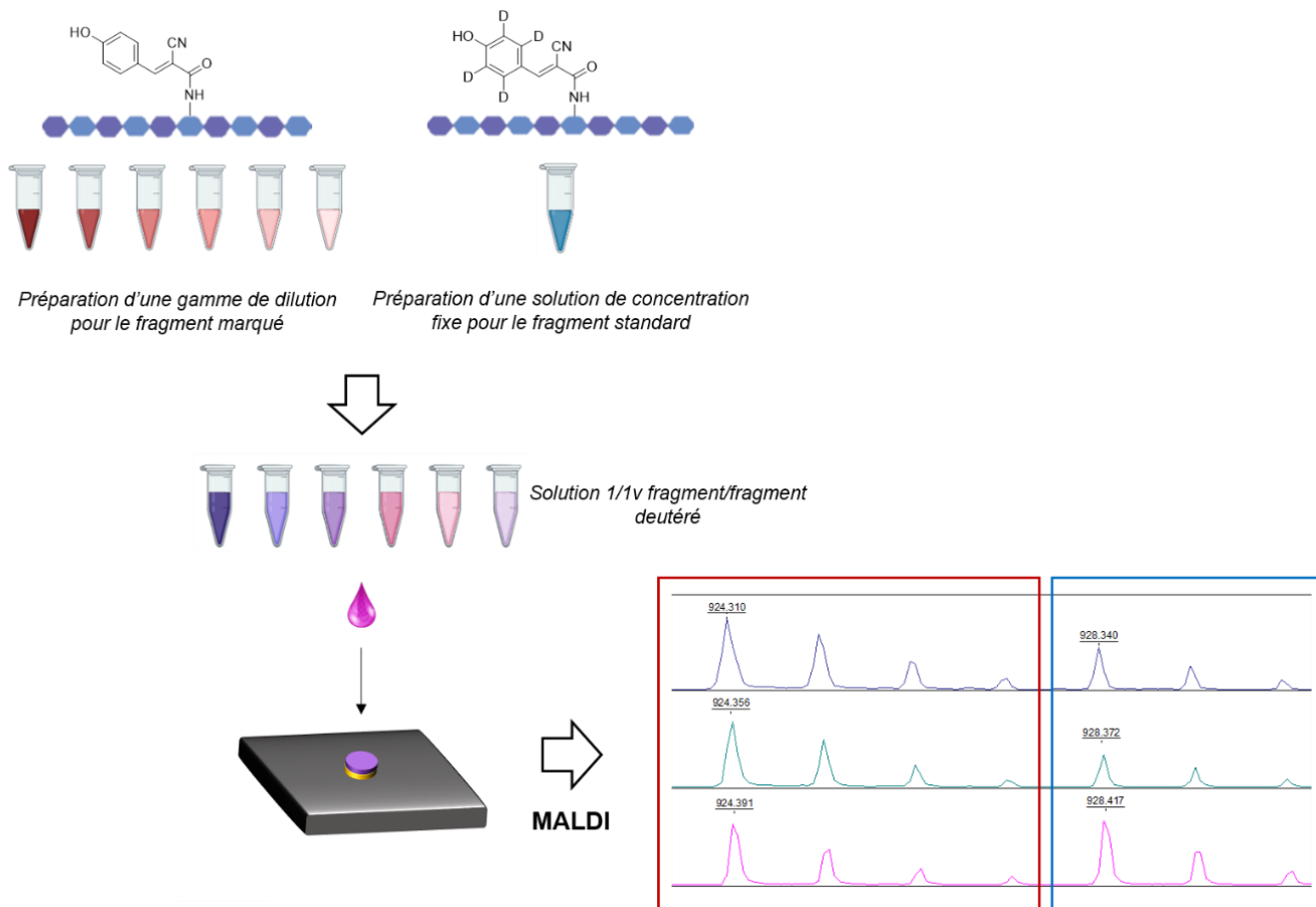


**Figure 20 : Schéma de principe de la quantification relative iTRAQ**

Développé en 1996 par Barr et Al[51], la stratégie SID ou « Stable Isotopic dilution » permet de définir précisément la quantité d'analyte dans un échantillon via l'utilisation d'un étalon, généralement un analogue deutéré, utilisé comme standard interne. Cette stratégie repose donc sur un marquage isotopique stable avec un ou plusieurs noyaux isotopiquement stables tels que le D,  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ . Il est à noter que le marquage avec des noyaux carbone et/ou azote, tel qu'utilisé en iTRAQ, est beaucoup plus onéreux et fastidieux.

Pour ce faire, il est tout d'abord nécessaire d'établir une courbe d'étalonnage qui permettra par la suite de déterminer la concentration de l'analyte étudié dans un échantillon inconnu. Il s'agira donc de relever les intensités obtenues pour les signaux correspondant à l'analyte et à son isotope lourd co-déposé, lors de l'analyse de solutions préparées à partir d'une gamme de dilution de l'analyte pur et d'une solution de concentration fixe de l'isotope lourd. On obtient alors, en traçant le rapport des aires en fonction du rapport des concentrations, une courbe d'étalonnage liant de façon linéaire l'intensité ou l'aire des signaux MALDI et la concentration de l'analyte. Ainsi, le choix de l'espèce moléculaire prise comme étalon interne doit respecter certaines règles fondamentales. En effet, il est nécessaire de pouvoir distinguer, sur le spectre MALDI, l'espèce étalon et l'analyte étudié mais ces deux molécules doivent avoir des propriétés physico-chimiques très similaires de manière à avoir le même comportement lors des différentes étapes du processus d'analyse MALDI et minimiser ainsi le problème de discrimination ionique.[52][53][54] Il faut,

cependant, rester vigilant quant à la masse de la molécule. En effet, plus celle-ci sera élevée, plus il sera nécessaire d'incorporer des éléments lourds dans sa structure afin de pouvoir différencier sans équivoque le massif isotopique de l'analyte et celui de son analogue lourd. Expérimentalement, il suffira par la suite de co-déposer la solution de concentration inconnue et la solution précédemment utilisée d'analogue lourd puis de reporter le rapport des aires sur la courbe étalon afin d'obtenir la concentration de l'analyte au sein de l'échantillon. (Fig. 21)



*Figure 21 : Principe du marquage isotopique*

Une fois la quantification rendue possible en spectrométrie de masse, celle-ci s'est rapidement imposée comme une alternative de choix face aux techniques initialement utilisées.

## VI. L'imagerie MALDI

### a. Contextualisation historique

L'imagerie par spectrométrie de masse (Fig. 22) n'est pas une technique récente en soi puisqu'elle voit le jour dans les années 1960 avec le développement de la spectrométrie de masse SIMS pour l'imagerie de cations dérivés d'aluminium, de magnésium ou de silicium dans des échantillons solides.[55] Quelques années plus tard, l'utilisation de cette technologie permet, pour la première fois, l'imagerie de petits métabolites et de petites molécules organiques, tels que les lipides ou certains composés thérapeutiques, directement sur échantillons biologiques. La spectrométrie de masse MALDI n'est alors toujours utilisée que

pour la détection d'une vaste gamme de biomolécules, sans objectif particulier de distribution spatiale au sein d'un échantillon. Il faut attendre encore quelques années pour que la technologie MALDI soit adaptée à l'imagerie. Ainsi Caprioli et al[56] réussissent à cartographier la densité spatiale de certains peptides et protéines, tels que l'insuline, au sein de coupes de glandes pituitaires murines et d'échantillons de tissus pancréatiques murins.[57] Il devient alors possible, via l'utilisation de la spectrométrie MALDI, d'obtenir la distribution spatiale et l'abondance relative de composés d'intérêt au sein d'un échantillon de tissu biologique. Cette technologie s'est particulièrement révélée dans le domaine de la cancérologie où elle a permis de grandes avancées dans les processus de diagnostic et de pronostic ou encore dans la compréhension des mécanismes cancéreux via la classification des pathologies, la découverte de biomarqueurs ou encore une étude approfondie de l'environnement tumoral.

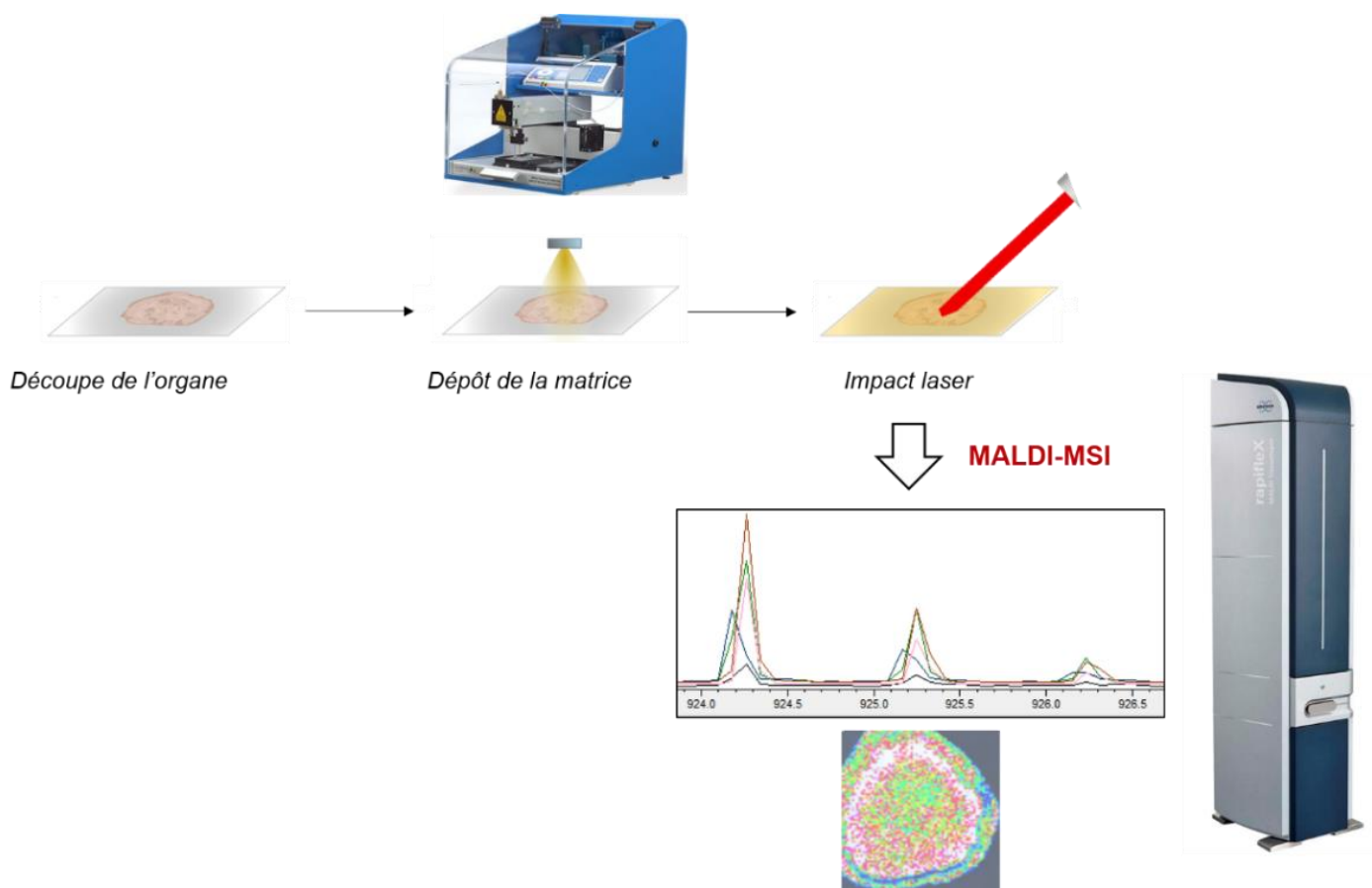


Figure 22 : Schéma de principe de l'imagerie MALDI

Comparée aux autres techniques utilisées actuellement pour ce genre d'analyse, telles que l'immunohistochimie ou le marquage fluorescent, la spectrométrie MALDI offre divers avantages comme une grande spécificité moléculaire, la possibilité de travailler directement sur tissus biologiques, sans traitement ou ajout d'agents externes comme les anticorps et sans aucune modification structurale de l'analyte, mais également la possibilité de détecter simultanément un grand nombre d'analytes à partir du même échantillon.[55] D'autres technologies de spectrométrie de masse permettent également de réaliser des expérimentations d'imagerie, telles que la spectrométrie DESI ou « Desorption Electrospray Ionization ». Celle-ci est fondée sur l'utilisation de microgouttelettes chargées de solvant pour la désorption et l'ionisation des analytes. Contrairement à la technologie MALDI, la spectrométrie DESI est une des rares techniques

d'analyse accessible à pression atmosphérique et elle est particulièrement indiquée dans le cas de l'analyse de petites molécules, pour lesquelles la présence d'ions matrice sur le spectre rend la détection MALDI fastidieuse. Cependant, cette technologie souffre principalement d'une faible résolution spatiale et d'une faible sensibilité, tout en étant restreinte en termes de poids moléculaire.[58]

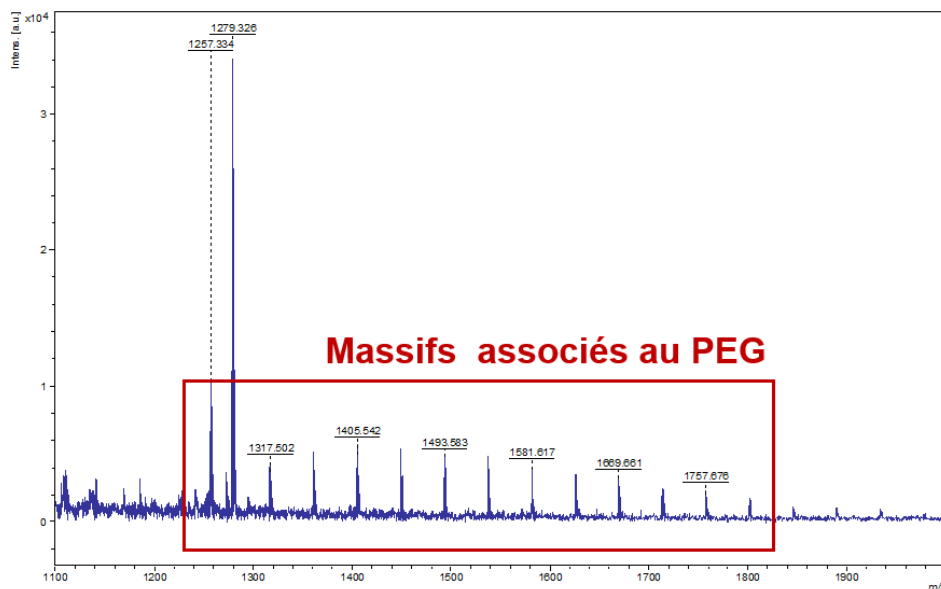
À ce jour, il devient possible de réaliser des expériences d'imagerie par spectrométrie de masse *in-vivo*, en temps réel, à température ambiante et sans ajout de matrice organique, principalement pour le diagnostic pré- ou post-opératoire. Cette technologie, qui s'impose comme l'évolution la plus récente dans le domaine, est appelée WALDI et fait appel au système SpiderMass. Elle se base sur l'utilisation d'un laser infra-rouge capable d'exciter la bande vibrationnelle la plus intense de l'eau, naturellement présente à environ 80% dans les tissus biologiques, qui agit alors comme matrice endogène au système afin de promouvoir l'ionisation d'analytes tels que les lipides ou les protéines. Les ions générés sont ainsi aspirés et directement dirigés vers le spectromètre de masse permettant l'analyse en temps réel.[59] Fournier et al. ont d'ailleurs démontré l'utilité de cette technologie pour l'analyse de lipides au sein de tissus canins et humains, sans aucune étape de traitement ou de lavage des échantillons. Des centaines de lipides différents ont ainsi pu être détectés, promouvant une classification des différents types de sarcomes humains.[60]

### **b. Préparation des échantillons d'analyse**

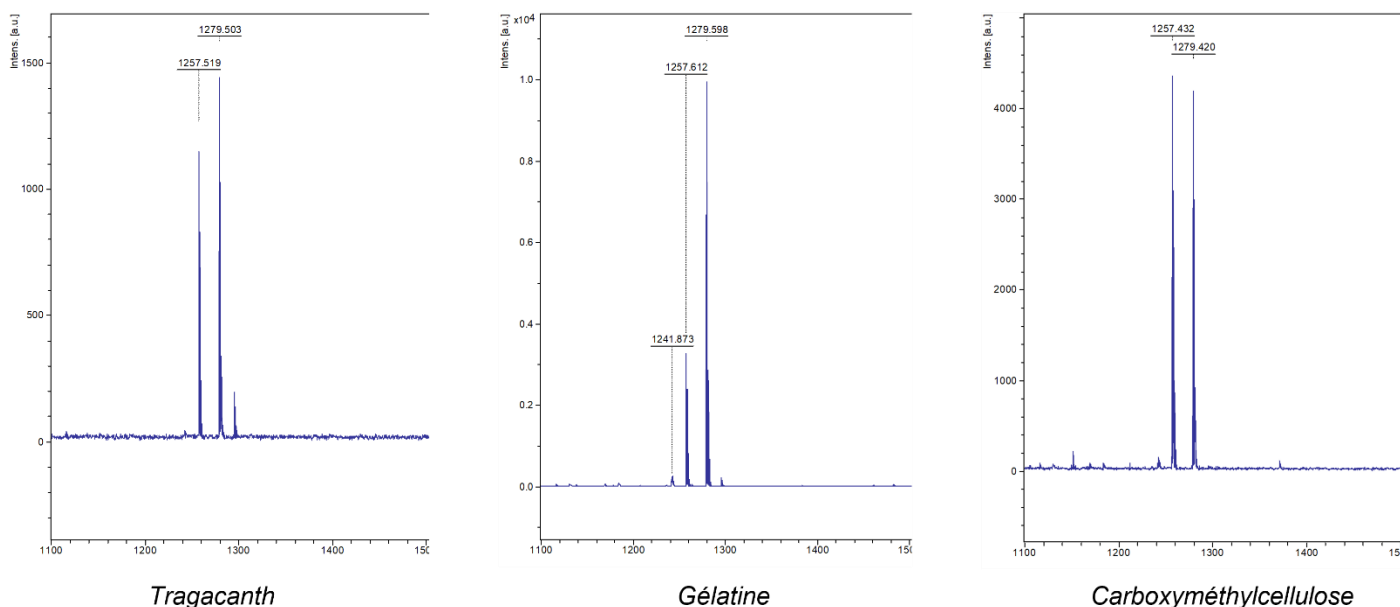
Usuellement, des coupes de tissus biologiques, d'une dizaine de micromètres, sont générées, le plus souvent grâce à un cryomicrostat, à partir d'organes frais, congelés et enrobés dans un composé qui permettra son maintien lors de la découpe. Les coupes sont ensuite directement déposées sur un support compatible avec la technologie MALDI comme les plaques de verre ITO ou celles présentant un coating poly-lysine. Ces supports peuvent être multiples mais doivent impérativement répondre à deux conditions majeures : ils doivent être de bons conducteurs électroniques et présenter une surface de dépôt parfaitement plane.

Concernant les composés d'enrobage, l'OCT ou Optimal Cutting Temperature compound est le plus utilisé. Cependant, composé principalement d'alcool vinylique et de polyéthylène glycol (PEG), son utilisation génère de nombreuses interférences sur le spectre de masse, ce qui peut perturber l'analyse et la bonne détection des composés ciblés. Il est, bien sûr, toujours possible, comme avec l'utilisation d'enrobage FFPE, d'ajouter des étapes de nettoyage du tissu avant analyse afin de retirer toutes traces de ces composés sur le tissu, mais ces étapes de nettoyage font souvent appel à des composés chimiques agressifs tels que le xylène qui peuvent alors dénaturer le tissu.[61] De plus, bien que l'enrobage FFPE soit aujourd'hui l'alternative à l'OCT la plus utilisée, celui-ci pose certains problèmes de réactivité vis-à-vis de l'analyte puisque le paraformaldéhyde réagit avec les amines libres pour former des bases de Schiff et peut ainsi générer des liaisons covalentes parasites.

Ainsi, différentes alternatives ont été développées dans l'optique de faciliter autant que possible la découpe de l'organe tout en garantissant l'obtention de spectres propres. Ces différentes méthodes ne nécessitent aucune étape de lavage ou un quelconque traitement du tissu. Parmi elles, on retrouve l'utilisation de solutions de gélatine à différentes concentrations ou sous différentes formes[62][63][64], l'utilisation de solutions de Tragacathe[65], l'utilisation de solutions de carboxyméthylcellulose ou encore l'utilisation de certains polymères comme le Poly[N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide][66], la plupart de ces composés étant commercialement disponibles et très simples d'utilisation. (Fig. 23) (Fig. 24)



**Figure 23 : Analyse MALDI d'un peptide sur coupes d'aorte murines enrobées dans l'OCT**



**Figure 24 : Analyse MALDI du même peptide sur coupes d'aorte murines dans différents enrobages**

Les coupes de tissu sont ensuite enduites de matrice afin d'optimiser le phénomène de désorption à l'intérieur même du tissu. Le dépôt de la matrice peut se faire de plusieurs façons mais le dépôt par spray [67] reste le choix de prédilection puisqu'il permet facilement et rapidement un dépôt homogène de la matrice sur toute la surface de l'échantillon. La technologie et l'appareillage associé au dépôt par spray offre, de plus, la possibilité de dériver ou de digérer directement sur tissu, permettant l'analyse de molécules jusqu'à 30kDa. Il s'agit donc ici de vaporiser une solution liquide et limpide de matrice via l'utilisation d'un appareillage couplé à un compresseur, tel que le SunCollect™ (SunChrom®), permettant le dépôt de fines gouttes de solution sur la surface de l'échantillon. Il est impératif que la matrice soit vaporisée à l'état liquide, afin de permettre l'extraction des analytes du cœur du tissu vers sa surface et ainsi promouvoir leur ionisation et leur détection, mais elle doit également sécher de manière quasi-instantanée, de manière à ne pas provoquer de phénomène de dilution de surface des analytes déjà présents dans le tissu.[58] De plus,

l'utilisation du sprayeur limite donc le choix des solvants de travail puisqu'il est impératif d'éviter les solvants organiques trop volatiles tels que l'acétone ou le méthanol tout en travaillant avec un solvant qui s'évapore efficacement. Il s'agit la plupart du temps de mélanges eau/acétonitrile.

Le dépôt de la matrice est une étape cruciale et surtout critique, tout autant dans l'analyse de dépôts classique que pour l'imagerie MALDI. En effet, en plus des effets précédemment cités, il est directement lié à la sensibilité et à la résolution spatiale qu'il sera possible d'obtenir lors de l'acquisition des images, via la nature et la structure des cristaux matrice/analyte formés lors de la préparation de l'échantillon. Il est important, avant tout, de définir précisément la notion de résolution spatiale, il s'agit dans ce cas précis de la dimension du plus petit détail observable. De ce fait, un soin tout particulier doit être apporté à de nombreux paramètres tels que la vitesse de spray, le débit de spray ou encore la distance entre la buse et l'échantillon afin d'éviter toute délocalisation, dilution ou dégradation des analytes tout en garantissant au maximum la reproductibilité de ces conditions.[68] Ainsi l'utilisation d'un grand volume de solvant induit une forte sensibilité mais défavorise grandement la résolution alors que l'utilisation d'un solvant très volatil, en faibles quantités, couplé à un débit lent induit une bien meilleure résolution spatiale.[69] Cependant, celle-ci se trouve tout de même être limitée par la taille du laser, typiquement 100 $\mu$ m ou moins, avec un minimum actuellement atteint autour de 1 $\mu$ m.[70][71]

Par la suite, grâce à plusieurs centaines de tirs laser sur toute la surface de l'échantillon, il est alors possible de collecter plusieurs spectres correspondant à différentes coordonnées sur une surface d'échantillon recouverte de matrice. Finalement, ces données spectrales sont ensuite sommées ou moyennées pour obtenir un spectre final illustrant une cartographie de la densité ionique des espèces présentes sur l'échantillon, permettant la localisation précise des espèces moléculaires d'intérêt, via la sélection d'un pic précis sur le spectre de masse.[72][70] Cette méthode permet donc l'analyse et la localisation de plusieurs analytes au sein du même échantillon lors d'une seule expérience. On obtient ainsi, en plus de l'information présente de certains analytes, un accès à l'état d'homogénéité des tissus biologiques de travail, information qui peut s'avérer capitale dans le cas de l'étude de tumeurs cancéreuses notamment.

Enfin, malgré de nombreux avantages présentés par rapport aux différentes techniques d'imagerie, l'imagerie MALDI fait encore face à un défi majeur : celui de la quantification, qu'elle soit absolue ou relative. En effet, bien que la localisation de nombreuses biomolécules soit capitale pour la compréhension des processus physiologiques et pathologiques qui leurs sont associés, il est impératif de les quantifier en milieu biologique dans le but de tracer les flux et changements métaboliques au cours du temps, ceux-ci se trouvant généralement liés à la rupture de l'homéostasie tissulaire à l'origine de l'amorce du processus pathologique. Dans le cas l'imagerie, les limitations induites par la technologie MALDI se trouvent être encore plus vraies. En effet, aux problèmes d'inhomogénéité dus au phénomène de cristallisation, s'ajoutent ceux dus au dépôt quasi-solide de la matrice et ceux liés à l'hétérogénéité du tissu en lui-même qui peut entraîner des problèmes d'extraction d'analytes ou des effets de suppression des signaux au vu de la complexité du milieu d'analyse.

C'est le procédé de marquage isotopique qui, le premier, a permis de répondre à ces problématiques.[73] Il s'agit d'incorporer dans le milieu un analogue deutéré de l'analyte, que ce soit par un sprayage externe de cet étalon ou par injection interne directement dans le milieu, le traitement des données étant alors similaire au protocole de quantification en solution. Cette technologie a d'ailleurs été utilisée par Barry et al. pour le

suivi de la Clozapine et de son métabolite primaire, la Norclozapine, dans des coupes de foie murins. Via l'utilisation d'un standard de la Clozapine présentant huit deutériums, une quantification de ces deux analytes sur une échelle allant jusqu'à la centaine de  $\mu\text{g/g}$  a pu être réalisée.[74] Cependant, cette stratégie offre une faible possibilité de reproductibilité, principalement via l'aspect non reproductible de la formation des cristaux matrice/analyte. Ainsi, Tanaka et al. ont récemment proposé de remplacer l'analogue lourd par un fluorophore, directement introduit dans la solution de matrice sprayée. Celui-ci, tout en jouant le rôle de standard interne, offre la possibilité de contrôler visuellement l'homogénéité du dépôt de la matrice et des cristaux matrice/analyte via un contrôle de l'intensité de fluorescence. Grâce à l'utilisation d'un dérivé de la rhodamine, il leur a alors été possible de quantifier la Nifédipine entre 0.5 et 40  $\text{pmol/mm}^2$  et l'acide férulique entre 3.5 et 0.2  $\mu\text{mol/g}$  de tissu dans des coupes de reins murins.[75]

## **VII. Limites de la technologie : Introduction au marquage**

Malgré les progrès en termes de détection, liés au développement de la spectrométrie de masse MALDI, certaines espèces moléculaires demeurent encore inaccessibles à la détection en spectrométrie de masse. Parmi ces espèces, on retrouve principalement les protéines membranaires ou transmembranaires, très hydrophobes, les protéines présentes en très faibles quantités ou encore celles ayant une très faible ou très forte masse molaire.[76] De plus, la détection et l'identification de nombreuses biomolécules, tout comme le séquençage des protéines, demeurent toujours d'une importance capitale pour améliorer la compréhension de nombreux mécanismes biologiques.[77] Ainsi, par exemple, l'analyse d'analytes de faible masse molaire représente un challenge majeur à cause de la présence de plusieurs ions matrices dans cette gamme de masse induisant un signal de faible qualité avec un bruit de fond important. Plusieurs techniques ont alors été mises au point dans l'objectif de résoudre ces problématiques de détection et d'inaccessibilité, telles que l'utilisation de matrices inorganiques, la mise en place de conditions matrix-free ou encore l'utilisation d'éléments de marquage permettant d'assister voire de remplacer la matrice dans certains cas.[8] Ces marqueurs doivent cependant suivre certaines règles. En effet, la réaction de marquage doit être rapide et facilement reproductible, tout en présentant un bon rendement et sans produit secondaire, les marqueurs doivent être stables sous les conditions d'analyse MALDI et surtout, ne pas modifier la nature ou l'activité naturelle de la biomolécule cible. Ces méthodes de marquage ont pour but de créer des conditions discriminantes dans le but de promouvoir la détection de la molécule cible en maximisant le signal obtenu pour cet analyte, comparé aux molécules non marquées.[78]





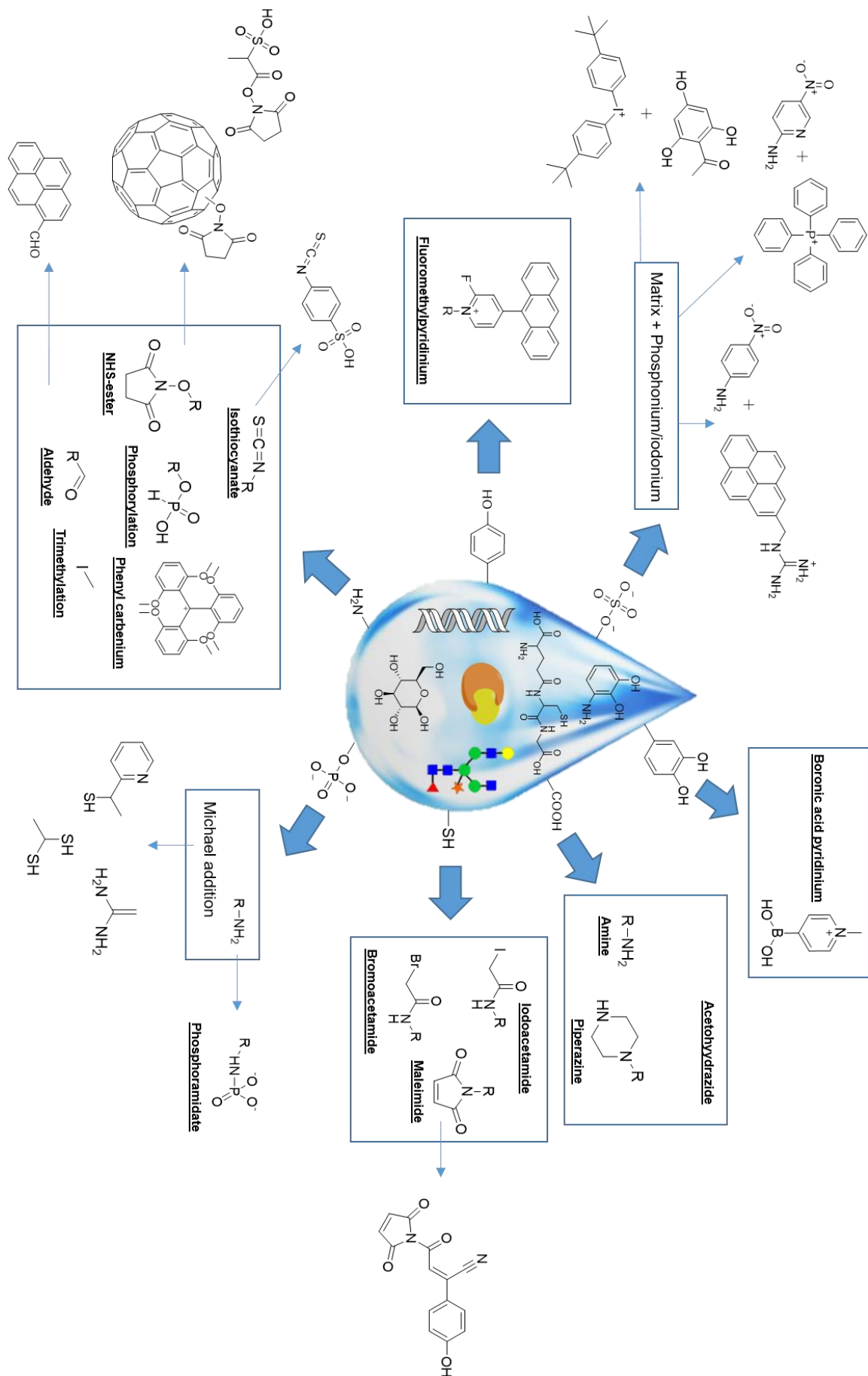


Figure 25 : Réactifs chimiques utilisés pour la dérivatisation des principales fonctions organiques des biomolécules



## **CHAPITRE 2 : Le marquage en spectrométrie de masse – Détection et quantification des biomolécules**

### **I. Marquage permettant la stabilisation de l'analyte**

La conservation de l'intégrité d'une molécule durant la phase d'ionisation est l'un des enjeux majeurs auxquels doit faire face la spectrométrie MALDI. En effet, de nombreuses fragmentations peuvent survenir, lors de l'analyse de fonctions organiques « fragiles » notamment les fonctions sulfo- ou phospho-, mettant en péril la détection de ces composés et l'obtention de données MALDI reproductibles. De nombreuses stratégies ont alors été développées pour surmonter ces problématiques.

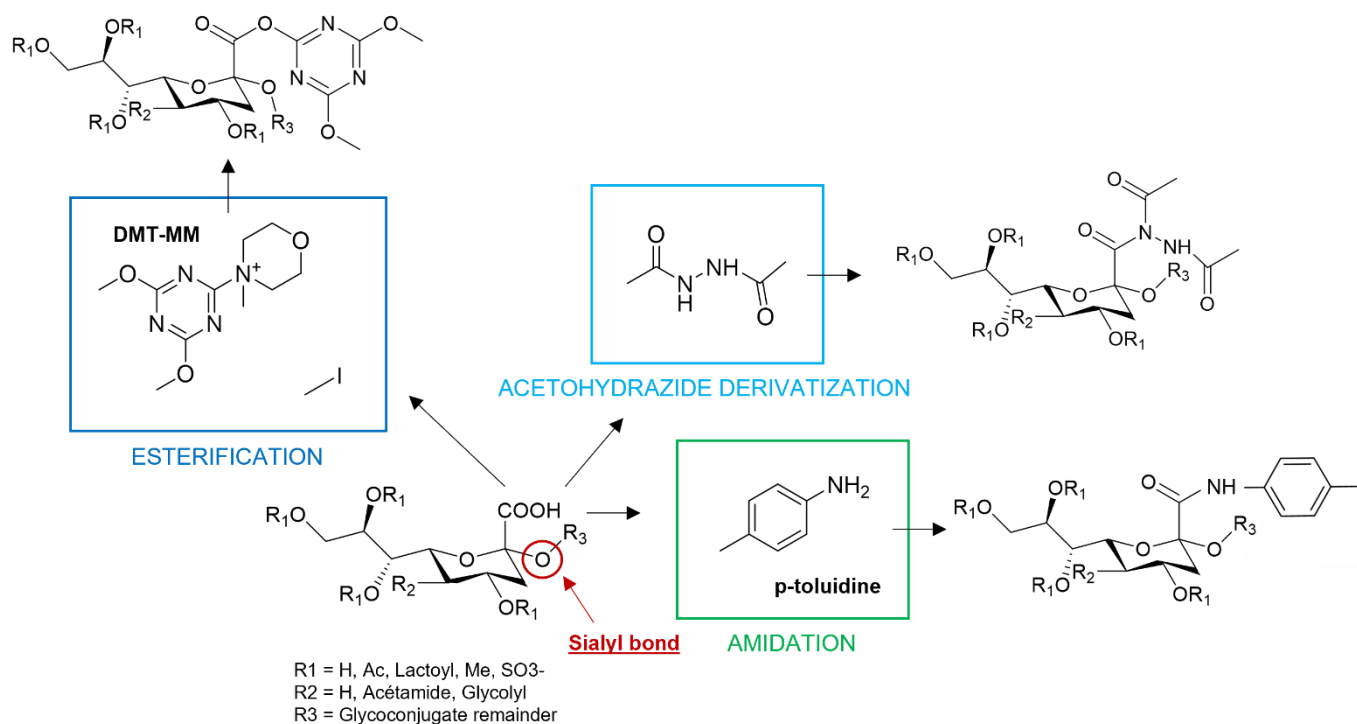
#### **a. Marquage des résidus sialylés**

La glycosylation des protéines est une des modifications post-traductionnelles la plus courante. En effet, plus de 50% des protéines secrétées dans le milieu intra- ou extra-cellulaire présentent des motifs de glycosylation. Les glycoprotéines sont d'importance majeure dans de nombreux processus biologiques, tels que la structuration des protéines, leur stabilité ou encore les interactions protéine-ligand. Elles sont également impliquées dans la reconnaissance et la prolifération cellulaire et sont étroitement liées au développement de nombreuses pathologies qui, souvent, induisent une surexpression de protéines mal structurées ou glycosylées de manière aberrante. De ce fait, la détection et la quantification de ces résidus glycosylés peut être un moyen de promouvoir des stratégies de diagnostic précoce en utilisant ces composés comme biomarqueurs permettant de suivre la progression de la maladie.[79] Cependant, l'analyse des glycoprotéines via spectrométrie MALDI demeure difficile pour plusieurs raisons. La grande variabilité des résidus glycosylés associée à leur fragilité structurale induit un faible potentiel d'ionisation couplé à une perte de l'intégrité moléculaire durant l'analyse MS. De plus, la complexité de leur structure est liée à l'existence de plusieurs isomères qu'il est difficile de séparer sans un marquage spécifique permettant de les distinguer. Finalement, parmi toutes les liaisons glycosidiques, les liaisons avec des résidus sialylés sont les moins stables. En effet, leur analyse conduit la plupart du temps à la perte du motif acide sialique directement dans la source d'ionisation tout en induisant une rétention de charge négative particulièrement importante sur l'acide carboxylique.[80]

Dans le but de promouvoir l'analyse MALDI des espèces sialylées intactes, plusieurs stratégies de dérivatisation chimique ciblant le groupement carbonyle ont été développées. Celles-ci offrent l'avantage de stabiliser les résidus sialylés par neutralisation des composés chargés négativement. De plus, la plupart des agents de dérivatisation présentent des groupements aromatiques dans leur structure, ceux-ci permettant d'augmenter l'hydrophobicité des molécules cibles et d'assister ainsi leur désorption en phase gazeuse. Différentes méthodes d'acylation ont alors été mises en place telles que l'estérification ou l'utilisation de réactifs acétohydrazide. Cependant, ces stratégies présentent des désavantages majeurs ; notamment une hydrolyse facile de l'ester en carboxylate, en milieu alcalin, ou encore la présence de nombreux sous-produits générés par le processus de dérivatisation lui-même. Par-dessus tout, elles ne permettent pas la distinction des différents isomères des composés sialylés, chacun impliqué dans des processus biologiques distincts. Ainsi, mise en place afin de pallier cette problématique de séparation,

l'amidation s'est imposée comme une technique de choix du fait, principalement, de la complète stabilité des amides en milieu alcalin.[81]

Du fait des différents schémas de dérivatisation présentés par les composés sialylés  $\alpha$ -2,3 et  $\alpha$ -2,6, différents réactifs nucléophiles, contenant des amines primaires, ont été développés afin de permettre une distinction claire des différents isomères. Ces méthodes sont appelées « linkage-specific ». Il a été observé que les composés  $\alpha$ -2,3 forment spontanément des lactones intramoléculaires sous l'attaque d'un nucléophile alors que les composés  $\alpha$ -2,6 sont complètement et directement acylés. Dans une dernière étape de traitement, appelée « aminolyse de la lactone », le cycle lactone peut être ouvert en utilisant un nucléophile différent, permettant le marquage spécifique de chaque isomère.[82] Expérimentalement, Wang et al. sont parvenus à analyser des glycanes sialylés issus de fêtuine bovine, une glycoprotéine issue de sérum fœtal bovin, en utilisant différents isotopes dérivés de la méthylamine. Ce marquage isotopique a notamment permis la discrimination des résidus neutres et sialylés tout en indiquant le nombre de résidus acide sialique présents sur la molécule. La quantification de ces composés a mené à la caractérisation des altérations du glycome dans du sérum issu de patients sains et atteints de cancer de l'estomac.[83]



*Figure 26 : Marquage des résidus sialylés*

## **b. Marquage des sulfoprotéines**

Découvert dans les années 1950 par Bettelheim dans un fibrinopeptide bovin, la sulfatation est une autre modification post-traductionnelle commune, survenant principalement sur les tyrosines. De plus, l'O-sulfatation est un modulateur clé des interactions protéine-protéine, mettant en lumière son utilisation comme biomarqueur potentiel pour le suivi de nombreuses pathologies et processus inflammatoires. En conséquence, la détection des sulfoprotéines et l'identification des sites de sulfatation sont d'une importance cruciale afin d'identifier leur rôle dans les processus biologiques. Cependant, face au caractère extrêmement labile de la fonction sulfoester, l'analyse de ces molécules conduit généralement à la perte du

groupement sulfate lors de l'ionisation, entraînant une perte d'information structurale pour la molécule. De plus, il faut savoir que la sulfatation des tyrosines n'intervient pas uniquement sur les protéines solubles mais également sur les protéines transmembranaires, ce qui rend la détection de tel composés toujours plus compliquée.[84]

Bien que la fonction sulfoester puisse être dans certains cas stabilisée en intramoléculaire par la proximité de résidus basiques, il reste nécessaire de les stabiliser afin de promouvoir l'analyse MALDI de sulfoprotéines intactes. Les ammoniums quaternaires, initialement utilisés pour l'enrichissement de matrices via un marquage non covalent, ont prouvé leur efficacité pour la stabilisation des groupements sulfates en mode négatif. Cependant, il a été montré que leur utilisation ne permettait pas d'éviter complètement le phénomène de désulfatation. Ainsi, des dérivés phosphonium et iodonium ont démontré une meilleure efficacité concernant l'amélioration du signal et la stabilisation des espèces sulfatées. En effet, un système matriciel binaire composé d'une combinaison de 2-amino-5-nitropyridine et de bromure de tetraphénylphosphonium a été utilisé pour la détection de l'héparine disaccharide, contenant trois groupements sulfate, aboutissant à la suppression presque totale du phénomène de désulfatation. De plus, ces composés, présentant une charge positive permanente, forment facilement des liaisons ioniques avec les composés sulfatés, chargés négativement, aboutissant à l'obtention de signaux de qualité, présentant une forte intensité.

En suivant le même principe, Yamaguchi et al. ont démontré que l'utilisation de 2,4,6-Trihydroxyacétophénone combinée à l'iodure de bis(4-tert-butyl)phényliodonium hexafluorophosphate permettait de lutter efficacement contre la désulfatation tout en évitant la formation de sels sur le groupement carbonyle lors de l'analyse d'un dérivé peptidique de la cholécystokinine. Une LOD de 20 fmol a alors été atteinte.[85]

La dernière stratégie développée à ce jour décrit la stabilisation des groupements sulfates via l'utilisation de sels de pyrènemethylguanidinium.[86] Ainsi, un tel composé permet une protection non covalente robuste de la fonction sulfoester tout en facilitant la détection de molécules intactes en mode réflectron positif. De plus, l'utilisation de tels sels permet également l'obtention de fragments spécifiques lors de l'analyse MALDI correspondant à des pertes caractéristiques de groupements  $\text{SO}_3\text{-pmg}$ . Enfin, il a été possible de déterminer le degré de sulfatation de la molécule ainsi que celle de sa masse monoisotopique lors d'une seule analyse de la cholecystoskinine-33 humaine.

## **II. Amélioration du potentiel d'ionisation de l'analyte**

Le succès d'une analyse MALDI se base non seulement sur la préservation de l'intégrité structurale de la molécule mais également sur une ionisation efficace. Ce processus d'ionisation dépend de trois paramètres principaux :

- L'affinité protonique de la molécule
- L'interaction du composé avec la matrice
- Les propriétés d'absorption laser de l'analyte

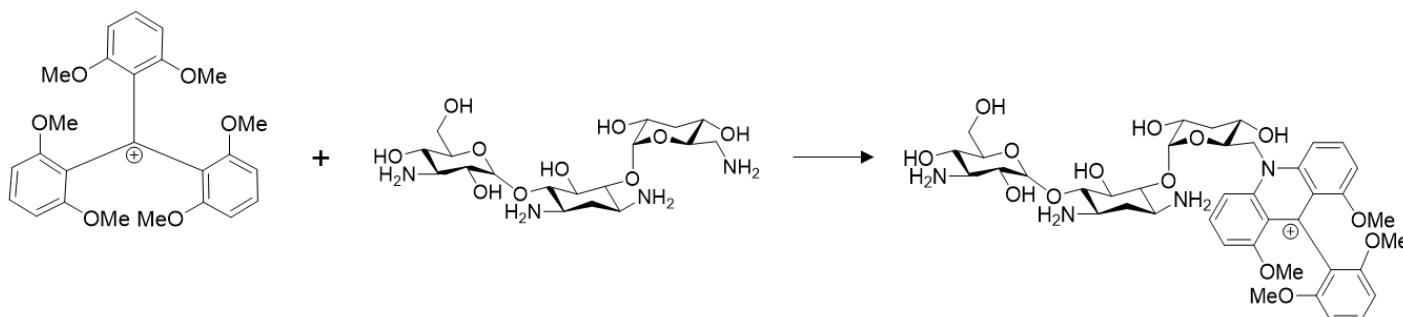
Dans le but d'améliorer l'ionisation de composés ayant un faible potentiel d'ionisation, plusieurs molécules ont été étudiées dans le but de promouvoir le marquage chimique, ayant pour caractéristiques principales :

- La présence d'une charge permanente dans leur structure
- Une hydrophobie importante favorisant l'insertion de l'analyte au sein des cristaux de matrice
- Une forte capacité d'absorption UV

Parmi les principales molécules ayant un faible potentiel d'ionisation, on retrouve principalement les peptides pauvres en acide aminés basiques ou comportant des modifications post-traductionnelles, tels que les phospho-peptides, ou encore les carbohydrates et protéines glycosylées. Les principales stratégies de dérivatisation et marquage chimique développées ont donc eu pour but de cibler de manière spécifique les fonctions organiques caractéristiques de ces entités.

### **a. Marquage des molécules à faible potentiel d'ionisation**

La phosphorylation[87] ou la triméthylation comptent parmi les stratégies de marquage de l'extrémité N-terminale les plus courantes. Plus particulièrement, la triméthylation convertit les amines primaires en amines tertiaires, via l'utilisation d'iodure de méthyle, afin d'induire une meilleure affinité protonique de la molécule. La quantification absolue des biomolécules est possible via l'utilisation d'iodure de méthyle marqué au carbone 13 ou présentant un ou plusieurs deutérium.[88] L'utilisation de fonctions organiques spécifiques, telles que l'isothiocyanate ou les esters N-hydroxysuccinimide, ont permis les premières incorporations covalentes de charges permanentes sur le squelette de la molécule cible, démontrant ainsi l'efficacité de l'addition de charge pour l'amélioration du potentiel d'ionisation de la molécule cible. Ainsi, divers réactifs furent développés, tels que le tris(2,6-diméthoxy-phenyl)méthyl carbenium (Fig. 27) qui réagit avec des amines primaires via la substitution nucléophile de l'un des groupements méthoxy présents sur le cycle aromatique. Cette réaction conduit à la formation de dérivés acridine cationisés. Ces composés ont tout d'abord été testés pour l'analyse de dérivés antibiotiques de la n-propylamine, atteignant une LOD de 25 fmol, avant d'être utilisés pour la détection d'aminoglycosides, purs et en milieu complexe. Utilisés pour le traitement des infections sévères, leur suivi dans les fluides biologiques est capital. En effet, les thérapies impliquant l'utilisation d'aminoglycosides vont souvent de pair avec une importante ototoxicité et une forte néphrotoxicité. Dans ce contexte la Kanamycine a pu être détectée jusqu'à la nanomole, parmi quatre autres aminoglycosides dans un tampon carbonate.[89]



**Figure 27 : Exemple de dérivatisation de la Kanamycine avec le tris(2,6-diméthoxy-phenyl)méthyl carbenium**

## **b. Problématiques liées au marquage des carbohydrates**

Les carbohydrates se sont avérés être des composés particulièrement difficiles à ioniser du fait de leur structure complexe et l'absence de résidus aromatiques au sein de celle-ci. De plus, la présence de nombreux groupements hydroxyles ou d'amines libres, capables de former de nombreuses liaisons hydrogènes, complique la formation de l'ion moléculaire durant la phase de désorption.[89] Afin de surmonter ces problématiques, la perméthylation s'est imposée comme une stratégie de choix. Elle consiste en la conversion des groupements hydroxyles en éthers méthyliques, ce qui induit une augmentation de la sensibilité face à l'analyse MALDI.[90] Cependant, en présence d'un acide carboxylique, la formation d'ester méthylique apparaît comme un sous-produit important de la réaction, mettant en évidence le besoin de nouveaux motifs réactifs ciblant d'autres fonctions organiques. Dans ce contexte, des dérivés de l'arginine ont été synthétisés pour l'amination réductrice des fonctions cétone ou aldéhyde présentes sur les glycanes. Une telle stratégie a permis une augmentation de l'intensité des signaux associés à ces molécules de près de 50 fois lors de l'analyse du N-glycome dans le sérum humain et le lait bovin.[91] Cependant, l'utilisation de réactifs contenant des amines primaires requiert la présence d'une grande quantité d'agent réducteur et la nécessité de passer par diverses étapes de traitement.

Aujourd'hui, les méthodes basées sur les chimies des oximes et des hydrazides apparaissent comme des stratégies beaucoup plus prometteuses pour le marquage des carbohydrates. Les dérivés d'hydrazide cationiques, tels que les réactifs de Girard T et P, offrent l'avantage d'une réactivité importante dans des conditions douces ainsi que la présence d'un ammonium quaternaire qui permet d'améliorer l'ionisation MALDI via l'addition d'une charge permanente.[92]

Le dernier exemple est l'utilisation de 4-(hydrazinecarbonyl)-N,N,N-triméthylbenzenaminium, développé par Zhang et al. Ce composé a permis une amélioration de l'intensité des signaux de près de 19 fois tout en évitant la formation d'adduits alcalins lors de l'analyse de maltoheptaose marquée. Ces résultats sont à comparer avec ceux obtenus en utilisant l'analogue neutre, le 4-(diméthylamino)benzohydrazide.[93] D'un autre côté, Song et al. ont développés des dérivés d'hydroxylamine pour le marquage de stéroïdes via la formation d'oxime, améliorant l'affinité protonique de la molécule grâce à la présence d'un marqueur facilement ionisable. La quantification de stéroïdes via cette méthode s'est avérée possible jusqu'à la nanomole.[94]

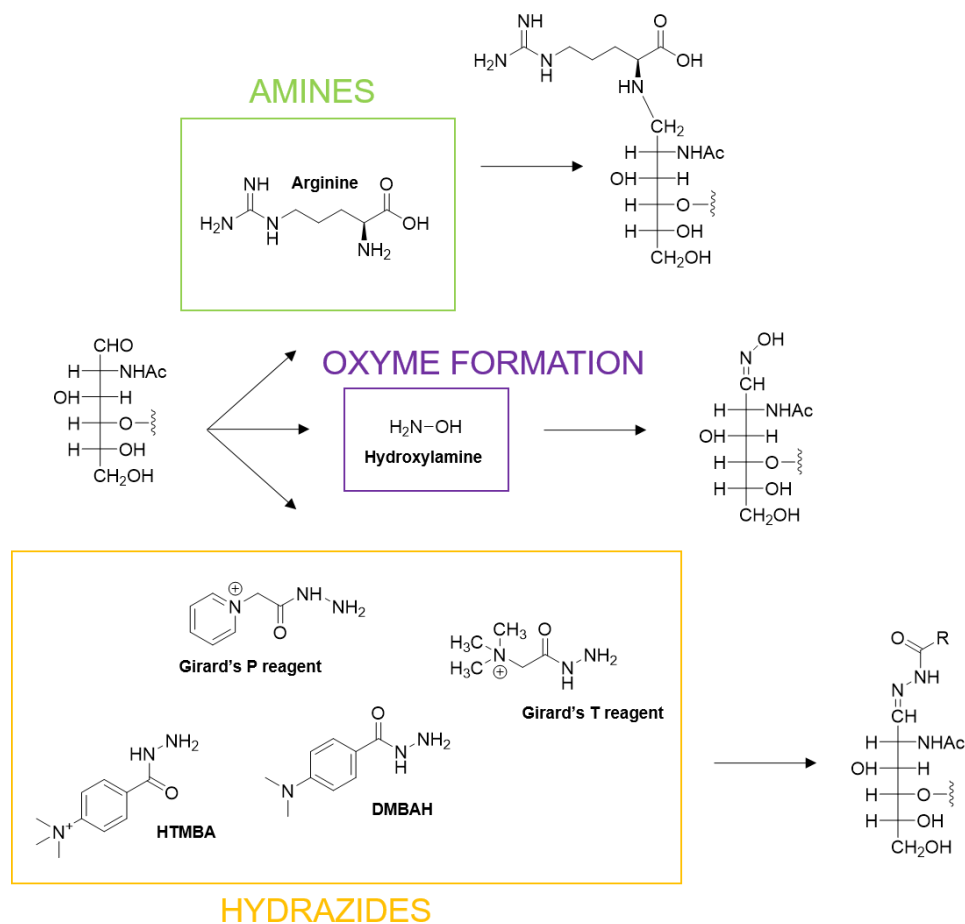


Figure 28 : Procédure générale du marquage de l'extrémité réductrice des résidus glycanes

De manière générale, la plupart des stratégies de dérivatisation mises en place actuellement se basent sur l'utilisation de réactifs ciblant les amines primaires, ce qui restreint grandement leur utilisation. De plus, ces réactifs sont souvent sensibles à d'autres nucléophiles tels que le méthanol ou l'eau, ce qui peut désactiver la molécule utilisée pour le marquage. Ceci met particulièrement en évidence le besoin de nouveaux composés de marquage présentant différentes fonctions organiques réactives afin de cibler une plus grande variété de biomolécules. Ainsi, les esters-NHS et les dérivés isothiocyanates sont encore aujourd'hui les motifs préférentiels pour cibler les amines primaires. Par exemple, différents tags de masse, fonctionnalisés grâce à des esters NHS, ont été utilisés par Ito et al. pour la quantification de l'acide gamma-aminobutyrique dans des coupes de cerveaux murins.[95]

Par la suite, d'autres dérivés tels que les cinnamaldéhydes ont vu le jour. En effet, le 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde a été développé pour la dérivatisation sur tissus d'acides aminés, de la dopamine ou encore de divers dipeptides issus de coupes de cerveaux murins, améliorant l'intensité du signal entre 20 et 235 fois.[96] Les motifs hydrazine et pipérazine sont, quant à eux, utilisés pour le marquage des groupements carbonyles. Ainsi, l'iodure de N, N, N-triméthyl-2-(pipérazin-1-yl)ethan-1-aminium a été développé par Sun et al. pour l'imagerie de divers métabolites présentant des groupements carbonyle, les « Carboxyl containing metabolites », des intermédiaires tricarboxylés principalement impliqués dans la production d'énergie cellulaire et le développement tumoral. Le TMPA induit une amélioration du signal via la présence d'un ammonium quaternaire et a permis la détection de 28 CCMs différents dans des coupes de cerveaux murin.[97]



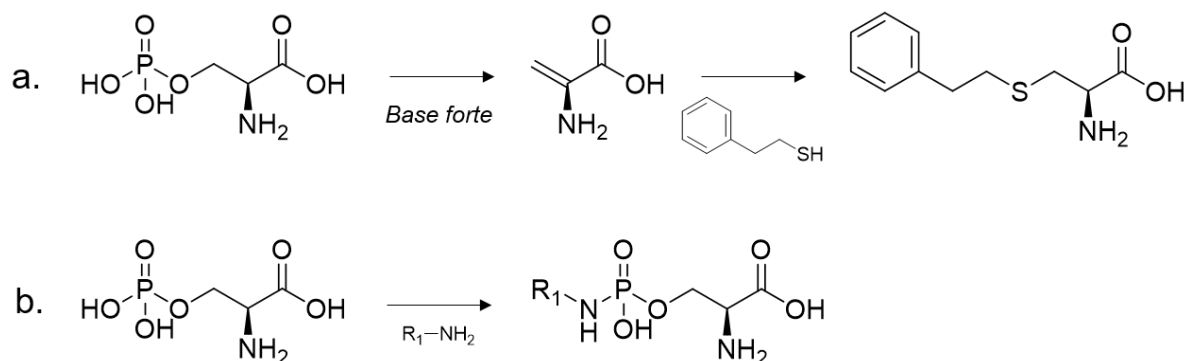
Dernièrement, en ce qui concerne le marquage des molécules présentant une ou plusieurs fonctions thiol, ce sont les dérivés maléïmides, iodoacétamides et bromoacétamides qui sont le plus couramment utilisés.[98] Zhou et al. ainsi que Harkin et al. ont complété ces résultats via la description de l'utilisation de ces différents motifs de marquage pour l'imagerie.[99][100] Ces différents motifs réactionnels sont illustrés sur la figure 40.

Pour finir, après le travail effectué sur les différents motifs réactifs développés pour le marquage de fonctions organiques spécifiques, ce sont les marqueurs de masse eux-mêmes qui ont été améliorés, induisant le développement de nouveaux tags. De façon générale, ces molécules partagent la plupart des temps de nombreuses caractéristiques structurales avec les diverses matrices MALDI et possèdent généralement des groupements aromatiques ou une forte conjugaison. Les coumarines ou encore les dérivés cyanine en sont de parfaits exemples. Ainsi, l'équipe de Kameyama est parvenue à détecter différents N-glycanes issus d'ovalbumine de poulet à l'aide de dérivés cyanine fonctionnalisés par des motifs hydrazides. Une LOD de 200 amol a été atteinte, illustrant une amélioration de l'intensité des signaux cibles de près de 500 fois.[101] Dernièrement, l'équipe de Watanabe a prouvé l'efficacité de tags pyrènes présentant des esters-NHS pour l'étude de l'interaction entre l'avidine et la biotine dans le PBS. Ils ont ainsi pu identifier le site de liaison de la biotine à la surface de la carboxylase.[102]

### **c. Les protéines phosphorylées**

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle réversible impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que l'homéostasie cellulaire, la signalisation ou encore la régulation translationnelle et transcriptionnelle. Différents types de phosphorylation sont décrits pour le protéome des cellules eucaryotes : l'O-phosphorylation intervenant sur les résidus serine, thréonine et tyrosine, les N- et S-phosphorylation intervenant sur les résidus histidine, lysine, cystéine, acide aspartique et acide glutamique. Cependant, les protéines phosphorylées sont particulièrement difficiles à analyser par spectrométrie de masse, principalement à cause de leur faible abondance dans les milieux biologiques, comparé à la forme non phosphorylée, mais également à cause de leur très faible potentiel d'ionisation couplé à une hydrolyse rapide du groupement phosphate en conditions acides.[103] Bien que de nombreuses méthodes d'enrichissement aient été développées, l'extraction des espèces phosphorylées ne permet pas, à elle seule, d'améliorer l'analyse MALDI de ces composés ou de stabiliser le groupement phosphate. De ce fait, la principale stratégie de marquage des composés phosphorylés se présente en deux étapes. Premièrement, les résidus phosphoserine ou phosphothréonine sont respectivement convertis en déhydroalanine et acide déhydrobutyrique grâce à l'utilisation de bases fortes, via un mécanisme de  $\beta$ -élimination. Ensuite, ces composés réagissent comme accepteurs de Michael impliqués dans une addition de Michael utilisant des S- ou N-nucléophiles tels que l'éthanedithiol, l'éthylènediamine ou encore la mercaptoéthylpyridine. (Fig. 29a) Ces nucléophiles peuvent être liés à des résidus trityles ou des groupements aromatiques qui auront pour rôle l'amélioration du signal MALDI et l'augmentation du potentiel d'ionisation de la molécule cible. Cependant, cette stratégie présente des désavantages majeurs dont la non spécificité de la  $\beta$ -élimination, d'autres résidus biologiques pouvant prendre part à une telle réaction tels que les cystéines ou les protéines O-glycosylées, ou encore l'incapacité des tyrosines phosphorylées à entreprendre la  $\beta$ -élimination.[103] Plus récemment, d'autres stratégies ont été développées, impliquant la génération de phosphoramides via l'utilisation de réactifs contenant des amines primaires. (Fig. 29b) Ces composés peuvent présenter différents marquages utiles à l'analyse MALDI tels que

des groupements polyaromatiques, guanidine ou encore des ammoniums quaternaires. Cependant, malgré l'aspect particulièrement versatile de cette stratégie, elle requiert la protection de tous les groupements carbonyles afin de prévenir leur acétylation.[104]



**Figure 29 : a.** Exemple de dérivatisation de phosphosérine par le 2-phénylethanthiol via une addition de Michael - **b.** Exemple de formation d'un phosphoramidate sur la phosphosérine

### III. Marquage des petites molécules et métabolites

Le marquage des métabolites ayant une faible masse molaire est un des défis majeurs de l'analyse MALDI. En effet, pour toutes masses inférieures à 1000 Da, de nombreux ions issus de la matrice sont générés dans cette zone, ce qui perturbe grandement le signal. De ce fait, de nombreuses molécules ayant un faible poids moléculaire tels que les acides aminés ou divers métabolites demeurent indétectables via spectrométrie MALDI. Pour faire face à cette problématique, il fut tout d'abord évident de chercher à augmenter la masse molaire de l'analyte, via l'utilisation de tags ayant un poids moléculaire important, afin de l'extraire de cette zone critique.[105] Cependant, ce n'est parfois pas suffisant pour promouvoir une détection de qualité de ces composés. Dans ce cas, il est souvent plus simple de directement supprimer la matrice et de se tourner vers de nouveaux supports, qu'ils soient organiques ou inorganiques, qui auront pour rôle d'assister l'ionisation de l'analyte. C'est ainsi que naissent les diverses stratégies « matrix-free ».

#### a. Augmentation de la masse molaire de l'analyte

Augmenter la masse molaire de l'analyte est un des meilleurs moyens de l'extraire de la gamme de masse critique des ions matrices. Ainsi, différents tags de masse ayant une haute masse molaire ont été développés, les dérivés fullerènes étant les plus couramment utilisés. Ces « supermolécules », contenant entre 60 et 80 carbones, permettent une augmentation de la masse molaire de l'analyte d'environ 900Da et donc sa détection hors de la zone saturée en ions matrices. De plus, les fullerènes possèdent d'excellentes propriétés d'absorption UV, ce qui favorise l'ionisation de l'analyte sans besoin nécessaire d'une matrice externe.[106] Des LODs atteignant jusqu'à 70 fmol ont été atteints pour la détection d'acides aminés dans de l'urine, du sérum, du plasma ou encore du fluide cérébrospinal, via l'utilisation de fullerènes fonctionnalisés NHS pour le marquage des amines primaires. Finalement, une quantification des analytes est possible en utilisant une version acide, non fonctionnalisée, des tags fullerènes comme standard interne. L'utilisation d'un tel étalon, possédant un comportement analogue face à l'analyse MALDI et une cristallisation similaire, permet de limiter les problèmes de discrimination ionique.[107] (Fig. 30)

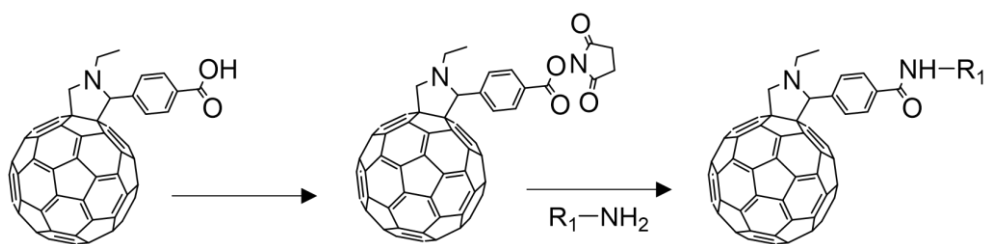


Figure 30 : Schéma de dérivatisation d'une amine primaire par un fullerène

Expérimentalement, de telles stratégies ont permis la quantification de polyamines dans des cellules et des excréments murins jusqu'à 0.68 pmol en utilisant l'1,7-heptanediamine ou la N,N'-bis(2-aminoethyl)-1,3-propanediamine comme standard interne.[106] Une autre famille de supermolécules a pu être utilisée pour le marquage de petits métabolites contenant des ammoniums quaternaires, les cucurbiturils. (Fig. 31) Ces composés, formés par plusieurs unités glycouril assemblées par des liaisons méthylène, sont capables de former des complexes non covalents et différentes liaisons de Van Der Waals avec les ammoniums quaternaires, assistant leur intégration au sein de la structure cyclique. On parle alors de chimie hôte-invité. Les QACs, ou « Quaternary Ammonium Compound », tels que la neurine, la choline ou encore la phosphocholine, sont des métabolites de grande importance impliqués dans le métabolisme lipidique et la neurotransmission. Ainsi, il apparaît comme capital de pouvoir les détecter de manière efficace et de suivre leur métabolisation dans différents fluides biologiques. Les cucurbiturils ont donc été utilisés par Chen et al. afin d'extraire les analytes hors de la zone saturée par les ions matrices, afin de promouvoir la dérivatisation sur tissus et l'imagerie MALDI de diverses polyamines dans des coupes de cerveau murins, permettant leur détection jusqu'au picomolaire.[108]

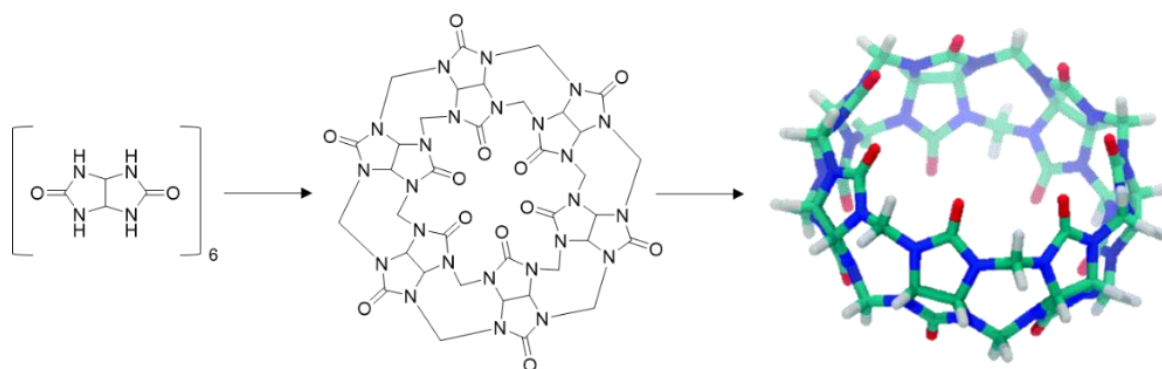
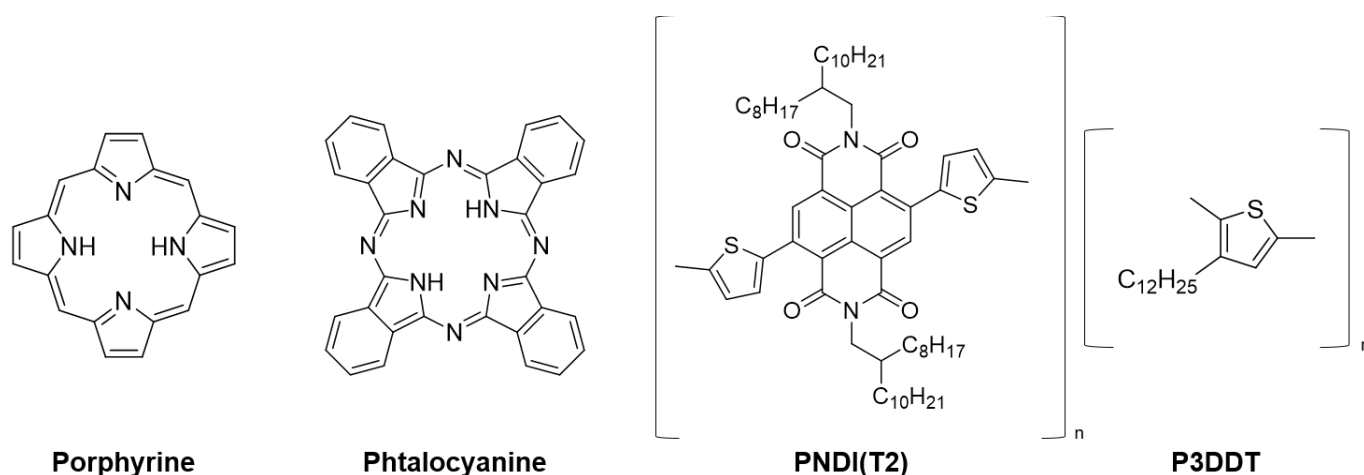


Figure 31 : Structure du cucurbituril [6]

En suivant une approche similaire, des peptides ont été utilisés comme marqueur pour augmenter la masse molaire de l'analyte cible tout en améliorant la qualité des signaux MALDI obtenus. Cette stratégie est appelée « peptidylation ». Parmi les peptides utilisés, on retrouve généralement des peptides riches en résidus arginine ou phénylalanine, résidus qui permettent d'augmenter l'affinité protonique du composé cible et ses propriétés d'absorption. Appliquée à la détection de nombreux métabolites « légers », tels que les cystéines ou le glutathion, la peptidylation a permis une amélioration de leur LOD de 1 nmol à 10 fmol

dans des échantillons d'urine humaine. En utilisant un isotope « lourd » du peptide marqueur, la concentration en cystéine a pu être quantifiée de manière absolue dans des échantillons d'urine de patients atteints de cancer du poumon, démontrant une concentration moyenne de 12 mmol par mole de créatinine. Cette valeur a été vérifiée via l'analyse d'échantillons d'urine de patients sains où la concentration basale a été estimée à 10.8 mmol par mol de créatinine, démontrant la reproductibilité de la mesure.[109]

Finalement, d'autres composés de haut poids moléculaire ont été étudiés pour le marquage non covalent de petits métabolites afin de jouer le rôle de matrice. (Fig. 32) Principalement développés via l'utilisation de porphyrines ou de phtalocyanines, ces composés permettent l'addition d'environ 500Da à la masse initiale de l'analyte cible. De plus, la présence récurrente d'azote endocyclique dans leur structure permet une substitution facile de ces molécules, principalement avec des groupements aromatiques qui pourront maximiser les propriétés d'absorption intrinsèques du composé cible. Dernièrement, des oligomères hétéroaromatiques ont démontré une grande stabilité sous vide tout en promouvant une analyse MALDI dépourvue de toutes interférences. De plus, leur structure polymérique est facilement fonctionnalisable. Cependant, malgré les résultats prometteurs obtenus avec des dérivés thiophène ou vinylène, leur utilisation semble être restreinte au marquage d'amine primaire.[106] Expérimentalement, Horatz et al. ont exploré le potentiel de cinq dérivés thiophène présentant des propriétés semi-conductrices pour la détection de divers petits métabolites, autant pur qu'en milieu complexe. Le Poly[naphtalène-diimide-bithiophène] a permis la détection de la réserpine pure jusqu'à 16 pmol alors que le Poly[3-dodecylthiophène] a été utilisé pour l'imagerie de coupes de cerveaux murins.[110]



*Figure 32 : Structures générales des principales molécules de haut poids moléculaire utilisées*

### **b. Stratégies « matrix-free »**

Retirer définitivement la matrice peut s'avérer être la solution ultime pour faire face aux problèmes d'interférences dans la zone des faibles masses molaires. Cependant, cela peut également s'avérer critique concernant l'ionisation de nombreuses biomolécules. Ainsi, différents matériaux ont été développés comme nouveaux supports LDI dans le but de jouer le rôle de la matrice et d'assister l'ionisation de l'analyte cible. Ce fut la naissance de la technologie SALDI-MS : Surface-Assister Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry.[111] (Fig. 33)

Ces surfaces sont généralement composées d'au moins une couche inorganique, dépendamment des propriétés finales souhaitées pour le matériau. Elles peuvent également présenter un coating organique hydrophobe en surface afin d'assister la désorption de l'analyte en phase gazeuse, principalement via des montées en température très rapides et localisées de la surface.[8] Les premiers matériaux étudiés étaient composés de silicone poreux et n'étaient simplement capables que de transférer l'énergie UV absorbée. Aujourd'hui, d'autres matériaux ont été étudiés tels que le carbone, le graphène, ou encore de nombreux métaux comme l'or, l'argent ou différents oxydes métalliques. De plus, de nombreuses structurations différentes sont à ce jour disponibles tels que les micro- ou nanoparticules ou encore les nanotubes, offrant un vaste choix de surface de dépôt qui se font toujours plus spécifiques de l'analyte cible.

Expérimentalement, l'oxyde de graphène s'avère être un des matériaux les plus facilement fonctionnalisable tout en offrant l'avantage d'un faible coût de fabrication. De plus, la présence de nombreux groupements hydroxyles permet le greffage annexe de nanoparticules, promouvant le couplage de plusieurs matériaux pour le marquage de différentes biomolécules tels que les thiols, les composés phosphorylés ou encore les composés aromatiques. Par exemple, utilisé pour la détection de la benzo[d]ibenzo-p-dioxine, un polluant majeur, et de divers flavonoïdes, de telles surfaces ont permis l'obtention de LOD allant jusqu'à 1 pmol.[112] Dans la même veine, la graphdiyne est décrit comme le dérivé du carbone le plus stable. Elle est composée d'une structure en couche formée par de nombreux cycles benzéniques liés entre eux par des liaisons triples carbone-carbone. Ce matériau a permis la découverte de plusieurs biomarqueurs, retenus pour le diagnostic du cancer du foie, lors de l'analyse d'échantillons de sérum humain.[113]

Cependant, certaines de ces structures inorganiques nécessitent un coating supplémentaire afin d'atteindre leur performance maximale. Cela consiste en la conversion de la surface en un matériau dit « plasmonique », menant à l'obtention de meilleures propriétés pour la spectrométrie LDI. Un des exemples le plus courant est l'utilisation d'un mélange  $\text{AgNO}_3$ /pyrogallol, un composé trihydroxybenzenique. Ce coating, appliqué sur des feuilles de nitrure de bore, a permis une augmentation de l'intensité des signaux associés au composé cible de près de 10 fois lors de l'étude des dommages induits par une ischémie cérébrale via la détection ex-vivo de petits métabolites, incluant les sulfatides. Appliqué sur une surface de polystyrène, un tel coating a permis la détection de l'acide N-acétyl-aspartique jusqu'au nanomolaire, concentration qu'il était impossible de détecter avec le polymère natif.[114]

Bien que toutes ces structures induisent une meilleure réponse LDI en termes de résolution et de sensibilité, il est possible d'obtenir de meilleurs résultats en greffant à la surface de ces matériaux des ligands ou des fonctions organiques spécifiques. De ce fait, il devient possible de promouvoir une ionisation sélective de certains analytes.[111] Ainsi, la fonctionnalisation spécifique de ces surfaces avec des nanoparticules a été décrite comme une excellente fonctionnalisation permettant de coupler les avantages des deux matériaux tout en protégeant la surface de toutes dégradations. Le dernier exemple en date est le greffage de nanoparticules d'or sur des surfaces de silicone ou des films de  $\text{TiO}_2$  poreux. Une telle stratégie a été utilisée pour l'imagerie de tissus animaliers (reins et cerveaux murins) et d'empreintes digitales humaines. Premièrement validée avec la détection du glucose, une augmentation des signaux LDI de près de 45 fois a été induite par cette fonctionnalisation comparé à l'utilisation de surfaces de silicone classiques. De plus, une modification supplémentaire de la surface fonctionnalisée avec des groupements hydrophiles ou hydrophobes permet une interaction spécifique entre la surface et l'analyte cible, induisant ainsi son ionisation spécifique. Testée en imagerie LDI, de telles modifications ont permis l'identification et la

localisation de divers métabolites, issus des glandes sébacées et de la sueur, dans les empreintes digitales humaines.[115] D'un autre côté, l'addition de nanoparticules d'or sur les films de  $\text{TiO}_2$  a été démontrée par Wang et al. pour l'imagerie de petites molécules, telles que les acides aminés, les alcaloïdes ou encore la dopamine, en mode d'ionisation positif et négatif. Une amélioration de la sensibilité et donc de la LOD de ces molécules a pu être démontrée jusqu'à l'ordre du picomolaire. Les meilleures LODs obtenues ont été atteintes pour l'oxymatine à 0.2 amol et une LOQ de 0.4 amol. De plus, cette stratégie a également permis la quantification absolue du niveau de glucose chez le rat entre 0.5 et 9 mM.[116]

À ce jour, le dioxyde de titane est principalement utilisé pour les métabolites insolubles dans l'eau, le graphène est, quant à lui, plus particulièrement utile pour la détection de composés non polaires alors que l'or ou l'argent s'avèrent être des matériaux de choix pour l'analyse de composés soufrés via la formation de nombreuses liaisons d'affinité métal-soufre.[111] De plus, les nanoparticules d'or ou d'argent comptent parmi les supports les plus faciles à préparer et offrent à la fois une grande stabilité et d'excellentes propriétés d'absorption via un fort caractère plasmonique intrinsèque au matériau. Kratochvil et al. ont d'ailleurs utilisé des nanoparticules d'argent greffées à la surface de lames ITO pour la détection de la riboflavine, atteignant une LOD de  $3 \cdot 10^{-8}$  g/L. De plus, l'argent possédant 2 isotopes naturels, la détection des ions argent est facilitée, même en milieu biologique complexe, par la présence d'un massif isotopique caractéristique.[117]

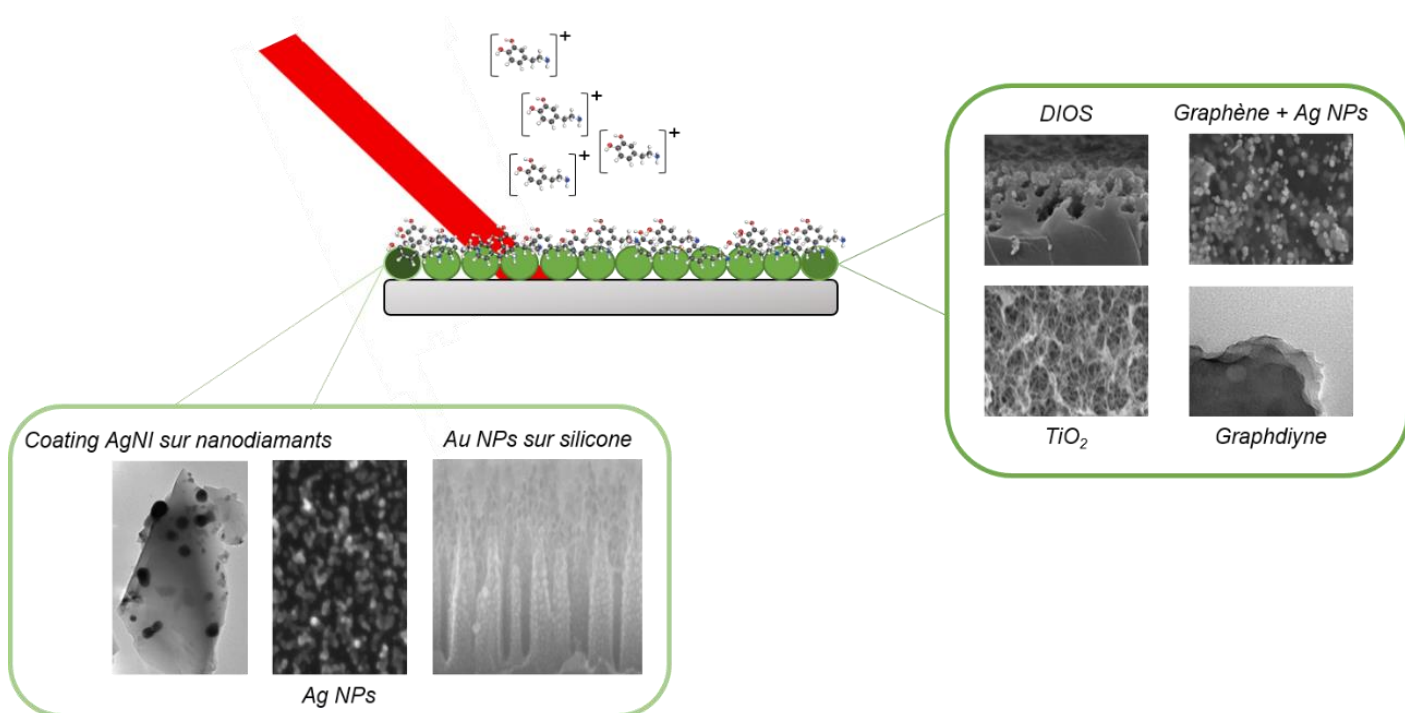
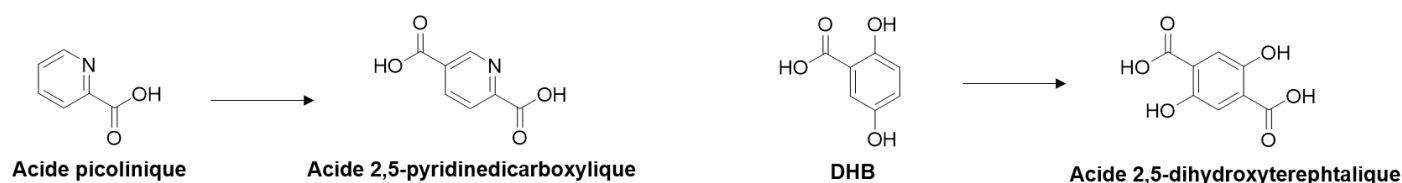


Figure 33 : Principe de la spectrométrie SALDI

Récemment, des structures hybrides formées par des complexes métalliques, appelées MOF ou « Metallic Organic Framework », ont été développées pour promouvoir une meilleure amélioration des signaux MALDI obtenus lors de l'analyse de petites molécules. Composés de plusieurs ions métalliques maintenus en structure complexe par des ligands organiques, ces matériaux émergents sont fortement poreux, induisant une importante versatilité structurale, et présentent de fortes propriétés d'absorption permettant

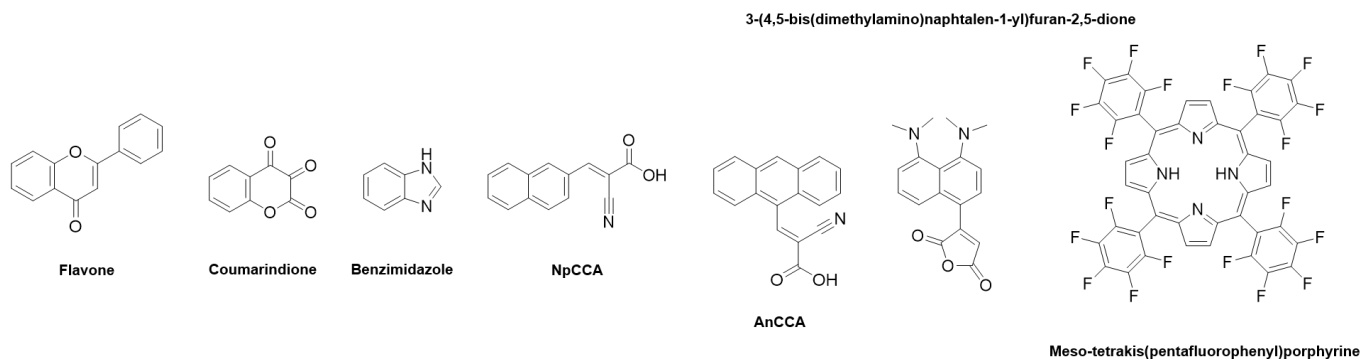
d'accroître l'affinité protonique de l'analyte cible.[118] De plus, l'utilisation de ligands possédant des similarités structurales avec les molécules usuelles utilisées comme matrices MALDI, tels que l'acide 2,5-pyridinedicarboxylique ou l'acide 2,5-dihydroxyterephthalique permet d'accroître de manière exponentielle les propriétés d'absorption et de désorption du matériau. (Fig. 34) Ainsi, Chen et al. ont développé des structures à base de zirconium pour la détection de saccharides, d'acides aminés et de nucléosides, obtenant une très bonne résolution et des spectres avec très peu d'interférences. Une LOD de 1 pmol a d'ailleurs été atteinte lors de l'analyse du glutathionne, du maltose et du raffinose alors que la carbamazépine et l'atropine ont été détectées respectivement à 5 et 3 pmol.[119]



*Figure 34 : Structures des ligands utilisés et les matrices usuelles correspondantes*

#### **IV. Utilisation de matrices réactives**

Premièrement, plusieurs composés aromatiques, n'induisant pas de marquage covalent avec l'analyte cible, ont été étudiés afin de remplacer les molécules usuellement utilisées comme matrices MALDI. Dans la liste, on retrouve les dérivés flavone, coumarindione, benzimidazole ou encore porphyrine. Ces composés ont la capacité de facilement former des adduits matrice/analyte, sans produire aucune interférence parasite.[120] Différentes stratégies ont ainsi été développées, à commencer par l'utilisation de dérivés porphyrine permettant de cibler les alkylphénol éthoxylates, puis par la suite, avec l'utilisation de dérivés cinnamiques inclus dans des macrocycles aromatiques tels que l'anthracène ou le naphthalène. Porta et al. ont ainsi synthétisé deux composés, l'acide (E)-2-cyano-3-(naphthalen-2-yl)acrylique et l'acide (2E)-3-(anthracen-9-yl)-2-cyanoprop-2-énoïque, qui ont permis une amélioration du signal de près de 30% en ce qui concerne le rapport signal/bruit lors de l'analyse de différents pharmaceutiques. En ce qui concerne le travail sur les composés porphyrine, la meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrine a pu être utilisée comme matrice pour l'analyse d'acide ascorbique ou citrique, atteignant une LOD de 0.3% massique. Dû à la présence de plusieurs groupements aromatiques, les porphyrines se sont avérées présenter une grande capacité d'absorption mais également une forte affinité protonique. Finalement, divers dérivés du naphthalène ont été synthétisés pour jouer le rôle « d'éponge protonique » et ainsi favoriser l'ionisation de l'analyte en mode négatif. Ces systèmes sont en réalité des bases alcalines fortes ayant la capacité de facilement déprotoner l'analyte cible en absorbant un proton. Par exemple, la 3-(4,5-bis(diméthylamino)naphthalen-1-yl)furan-2,5-dione a été utilisée afin d'obtenir la cartographie de la densité ionique du lactate et du glutarate dans des coupes de tumeurs cérébrales.[121]



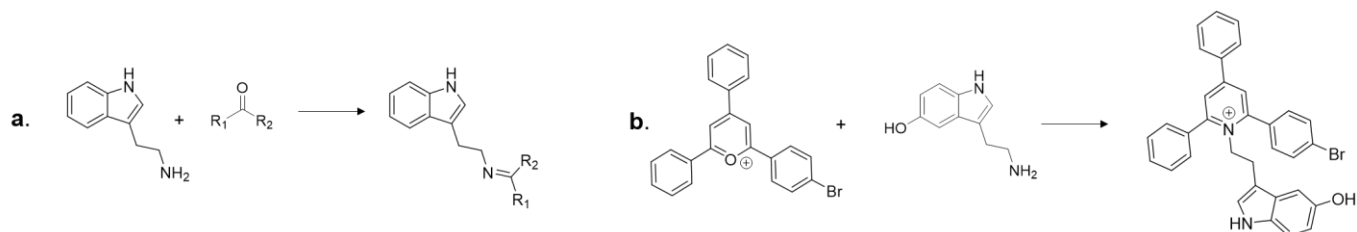
**Figure 35 : Structures des principales molécules utilisées initialement comme matrices réactives**

Dernièrement, de nouveaux composés ont été mis au point afin de marquer la molécule cible via l'induction d'une liaison covalente, permettant ainsi une ionisation beaucoup plus sélective de l'analyte. Dans ce cas, un même composé joue le rôle du marqueur de masse, permettant d'améliorer le signal issu de l'analyse MALDI, et celui de la matrice, assistant l'ionisation de l'analyte via la désorption de l'énergie laser.[105] Par exemple, Hronowki et al. ont montré l'efficacité de l'acide 2-aminobenzoïque pour la dérivatisation de l'extrémité réductrice de glycanes via un mécanisme d'amination non réductrice. Une telle stratégie permet également l'amélioration du signal en mode négatif via la présence d'un équilibre, formé par la réaction d'amination, entre le cycle glucosamine fermé et un intermédiaire ouvert qui possède une meilleure sensibilité en mode d'ionisation négatif.

Comparé à l'acide dihydroxybenzoïque, utilisé usuellement pour ce type d'analyse, le 2-AA induit une augmentation de l'intensité des signaux de près de 300 fois, atteignant une LOD de 40 ng au lieu de 125, tout en réduisant le nombre d'adduits salins formés.[122]

Dans la même veine, plusieurs molécules contenant des amines primaires ont été testées pour une utilisation en tant que matrices réactives grâce à de fortes capacités d'absorption/désorption tout en étant facile d'utilisation en tant que marqueur grâce au caractère nucléophile des amines et leur grande réactivité. Testées pour le marquage de composés carbonyle via imination, la tryptamine s'est imposée comme le meilleur composé, induisant des signaux de haute intensité et bien résolus.[123] (Fig. 36a) Ce type de marquage in-situ est particulièrement utile en imagerie MALDI car il ne nécessite aucune étape de traitement avant l'analyse et permet de travailler directement sur le tissu biologique. En effet, Shariatgorji et al. ont démontré l'efficacité de sels de triphényl-pyrylium bromés pour le marquage, directement sur tissus, de catécholamines endogènes et de la sérotonine, plusieurs neurotransmetteurs bien connus. (Fig. 36b) Lors de l'analyse de coupes de cerveaux murins, ce composé a permis une amélioration du signal tout en induisant un massif isotopique caractéristique, de par la présence de l'atome de brome, permettant une identification claire et sans équivoque du composé cible.[124] L'utilisation de matrices réactives a été particulièrement salvatrice dans le cas de l'identification et la quantification de peptides et métabolites dans des échantillons biologiques complexes. Par exemple, la 2, 4-dinitrophenylhydrazine a été utilisée pour l'analyse MALDI de divers aldéhydes via leur conversion en hydrazones, permettant ainsi la détection de produits issus de l'oxydation des lipides. Le DNPH a permis la détection de l'octanal jusqu'à 130 pmol.[121] De plus, Hauser et al. ont développé des tags issus de dérivés pyréniques pour le marquage in-situ et la détection du lactose dans le lait de vache, en utilisant 3 motifs chimiques spécifiques pour la création de liaisons covalentes : hydroxylamine, hydrazide et benzamide. Tout d'abord optimisé via l'analyse du lactose pur, ces composés ont permis une détection entre 1 et 10 pmol dans le lait entier.[125]



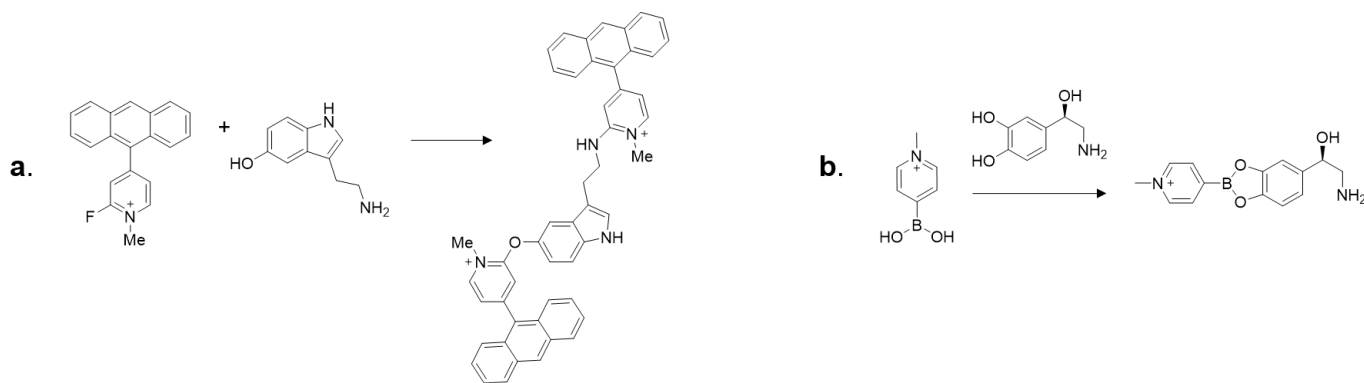


**Figure 36 : a. Processus de dérivation général des carbonyles par la tryptamine – b. Dérivation de la sérotonine via utilisation d'un sel de pyrylium**

Actuellement, malgré les résultats prometteurs obtenus avec de tels composés, ces matrices réactives souffrent souvent d'un schéma synthétique compliqué. Ainsi, de nouvelles approches ont été mises au point, impliquant des molécules plus facilement accessibles, principalement concentrées sur l'utilisation de dérivés cinnamiques et pyridiniums, dont les précurseurs sont commercialement disponibles et utilisés usuellement comme matrices MALDI.

### **a. Utilisation de composés pyridinium**

Les neurotransmetteurs sont de petites molécules de signalisation impliquées dans le développement de nombreuses pathologies nerveuses et psychiatriques. Considérés comme des biomarqueurs de choix, plusieurs techniques d'imagerie, telles que l'immunohistochimie ou la tomographie par émission de positons, ont été utilisées pour étudier leur abondance et leur localisation au sein des tissus. Cependant, ces techniques se sont avérées incapables de discriminer les différents métabolites d'une même famille (e.g. les catécholamines). De plus, elles souffrent également d'une faible résolution spatiale et nécessitent une quantité importante de tissus. Ainsi, afin de promouvoir le travail direct sur tissu, sans aucune étape de traitement, les matrices fluorométhylpyridinium ont été mises au point pour le marquage des phénols ou des amines primaires, via la substitution de l'atome de fluor. (Fig. 37a) Dans le cas de composés présentant plusieurs de ces fonctions organiques, tels que les catécholamines, plusieurs molécules de matrice peuvent alors s'attacher sur une seule molécule d'analyte. Ces composés sont le parfait exemple d'une molécule rassemblant les propriétés d'absorption, via les groupements aromatiques, d'une matrice MALDI et la présence d'une charge permanente, via la présence de l'ammonium quaternaire, essentiel pour l'amélioration du signal MALDI. Ces matrices ont d'ailleurs été testées pour l'imagerie de neurotransmetteurs, dont diverses catécholamines ainsi que la sérotonine ainsi que leur métabolites liés, directement sur coupes de cerveaux.[126] D'autres dérivés pyridinium ont similairement été développés, dont l'acide 4-(N-méthyl)pyridinium boronique, utilisé pour le marquage in-situ de catécholamines, via la formation d'un ester boronique. (Fig. 37b) De tels composés induisent également un massif isotopique très caractéristique à travers la présence de l'atome de bore. Ceci a d'ailleurs permis la détection spécifique de dérivés de l'épinéphrine et de la dopamine dans des coupes de glande surrénale porcine.[127]

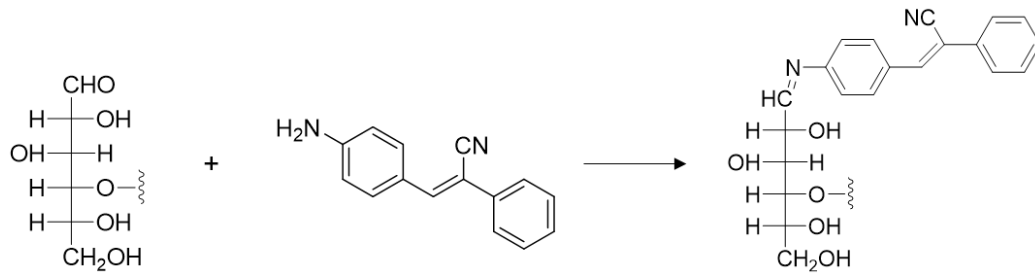


**Figure 37 : a. Procédure générale pour le marquage de la sérotonine via l'utilisation d'un composé fluorométhylpyridinium - b. Procédure générale pour le marquage des catécholamines via l'utilisation de dérivés pyridinium borés**

### **b. Utilisation de dérivés cinnamiques**

L'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique, en tant que matrice MALDI usuelle, a rapidement été étudié comme potentielle matrice réactive. Par exemple, l'équipe de Fülöp a pu démontrer le marquage des thiols libres du glutathionne ou de l'insuline réduite, via l'utilisation de CHCA fonctionnalisé par un motif maléimide. Cela a permis l'imagerie, sur tissus murins et porcins, sans besoin d'ajout d'une matrice externe.[98] Cependant, une bien meilleure sensibilité peut être obtenue en couplant le marquage CHCA avec l'utilisation de l'ester  $\alpha$ -cyano-4-hydroxyméthylcinnamique comme matrice.[128] En effet, CHCE ne peut pas être considéré comme une « bonne matrice » du fait de sa faible affinité protonique, conduisant la plupart du temps à une faible ionisation des analytes et à des spectres de mauvaise qualité. En revanche, cette matrice permet, de ce fait, la création de conditions discriminantes via l'ionisation sélective et spécifique des seuls analytes possédant un marqueur CHCA et l'extinction des signaux correspondant aux molécules non marquées. De plus, l'utilisation simultanée d'un analogue deutéré de CHCA comme standard interne permet une quantification absolue de l'analyte cible, sans aucune nécessité de passer par une étape d'enrichissement.[129] L'application de cette technologie à la recherche pharmaceutique a permis d'identifier des ligands du récepteur V1A et de décrire leurs interactions via des mesures d'affinité à l'ordre du nanomolaire par la méthode des ligands compétitifs.[130]

Plus récemment, un autre dérivé a pu être développé, le 2-phenyl-3-(p-aminophényl)-acrylonitrile, pour la détection spécifique de glycanes, via un marquage sur l'aldéhyde terminale. Il faut noter qu'en plus de ses propriétés d'absorption, dues à la présence du cœur cinnamique, PAPAN permet également l'extinction des signaux liés aux peptides, via la suppression de leur ionisation. Ainsi, il a permis la détection sélective de différents N-glycanes issus de la digestion trypsique de glycoprotéines, sans aucune étape de purification. Comparé au DHB, usuellement utilisé comme matrice, PAPAN a permis une augmentation de l'intensité des signaux de près de 100 fois, atteignant une LOD de 5 fmol lors de l'analyse du maltohexaose pur. De plus, lors de l'analyse du digestat trypsique de l'ovalbumine, 19 N-glycanes ont pu être identifiés, sans présence notable de peptides, en utilisant PAPAN comme matrice quand aucun n'a pu être détecté avec le DHB. Finalement, des résultats similaires ont pu être observés lors de l'analyse d'échantillons de sérum humain où PAPAN a permis l'identification de 37 N-glycanes sans aucune interférence alors que 9 seulement étaient détectés en utilisant le DHB.[131] (Fig. 38)



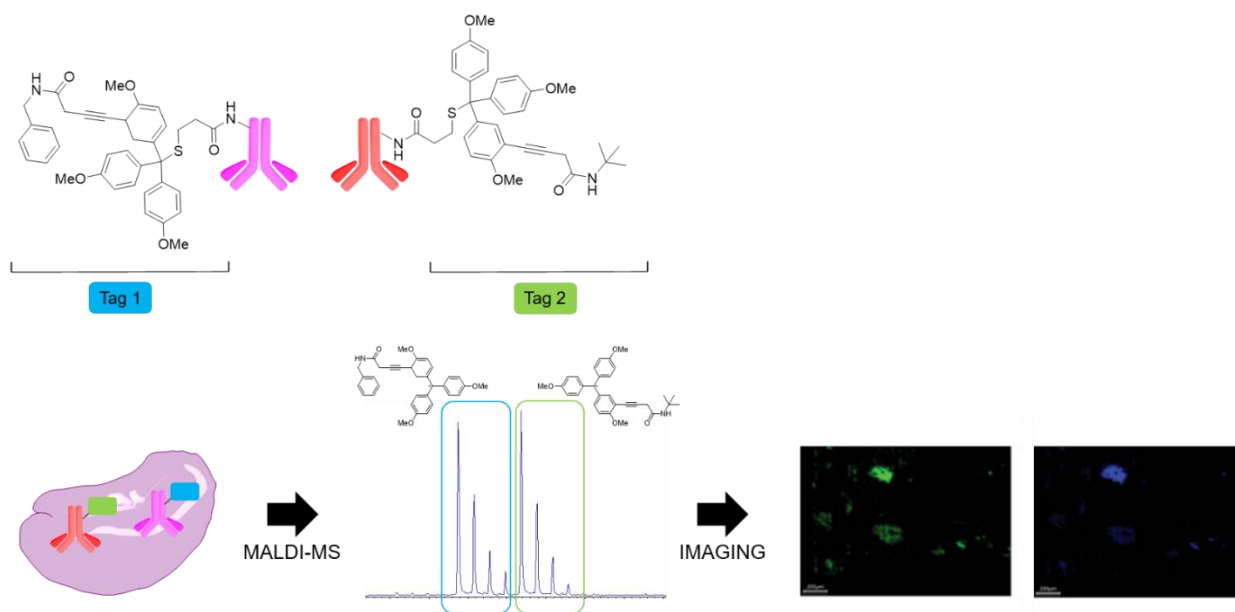
*Figure 38 : Réaction générale de dérivatisation des glycanes par PAPAN*

## V. Utilisation d'anticorps

Largement utilisés par la plupart des techniques actuelles d'analyse biochimique, les anticorps ont particulièrement permis le développement de l'immunohistochimie. Ils présentent une sélectivité et une spécificité unique pour leur cible, propriété intrinsèque qui les rend naturellement attractif pour le développement de nouvelles méthodes de marquage en spectrométrie de masse. Ils permettent ainsi le développement de nouvelles stratégies de marquage versatiles et faciles d'utilisation tout en tirant profit de la sensibilité et des possibilités de multiplexage offertes par la spectrométrie de masse. De ce fait, des protéomes entiers ont pu ainsi être étudiés en une seule analyse, améliorant grandement les capacités de diagnostic pour de nombreuses pathologies humaines. De plus, avec le développement de l'imagerie MALDI, de nombreuses biomolécules, complexes protéiques, petites molécules ou métabolites, oligonucléotides ou encore sucres ont pu être détectés et localisés alors que c'était initialement impossible via les techniques d'immunohistochimie, impliquant le plus souvent l'utilisation d'un fluorophore et le gaspillage d'une grande quantité de tissus tout en ne permettant pas l'analyse d'un grand nombre de biomolécules.[132]

L'analyse par spectrométrie de masse via l'utilisation d'anticorps requiert la synthèse d'anticorps couplés à des tag de masse, le plus souvent via un spacer photo-clivable, principalement sur la chaîne latérale d'une lysine. Après formation du complexe immun entre le complexe anticorps et sa cible, un pulse laser induit la rupture du spacer, généralement un groupement thioéther ou ortho-nitrobenzyl, permettant la libération d'un ion correspondant au tag de masse. Il s'agit le plus souvent de groupement trityle ou d'analogues car les carbocations ainsi générés sont très stables et se détectent aisément en MALDI.[133] Ainsi, des anticorps biotinylés ont été utilisés par Lorey et al. pour détecter et capturer, dans du plasma humain, des protéines considérées comme biomarqueurs clefs du développement du cancer de la prostate. Après clivage d'une liaison thioéther et libération des différents carbocations triphénylméthyltrityl, une LOD de 6pM a été atteinte, soit une quantité de 60 amol de Prostate Specific Antigen.[134] La synthèse d'une variété de tags différents, avec des masses molaires facilement identifiables, a ouvert la voie des analyses en multiplexage, permettant ainsi la détection de plusieurs antigènes en une seule expérience. Cette technologie, intitulée Targeting Multiplex Mass Spectrometry Imaging ou TAMSIM (Fig. 39), a largement démontré son efficacité pour la détection de biomolécules initialement inaccessibles, souvent difficilement ionisables, tels que de nombreux agents thérapeutiques ou de nombreuses biomolécules ayant un poids moléculaire trop élevé pour l'analyse MALDI. Cette stratégie s'est avérée particulièrement intéressante dans le cas des biomolécules de plus de 50kDa, uniquement détectable en MALDI via le passage obligatoire par une étape de digestion protéique avant analyse. Ainsi, la localisation intracellulaire de plusieurs biomarqueurs comme

la synaptophysine, la calcitonine, l'insuline ou encore la somatostatine a pu être obtenue, sans ajout de matrice externe, au sein des cellules neuroendocrines des îlots de Langerhans, issus de coupes de pancréas humain.[135]

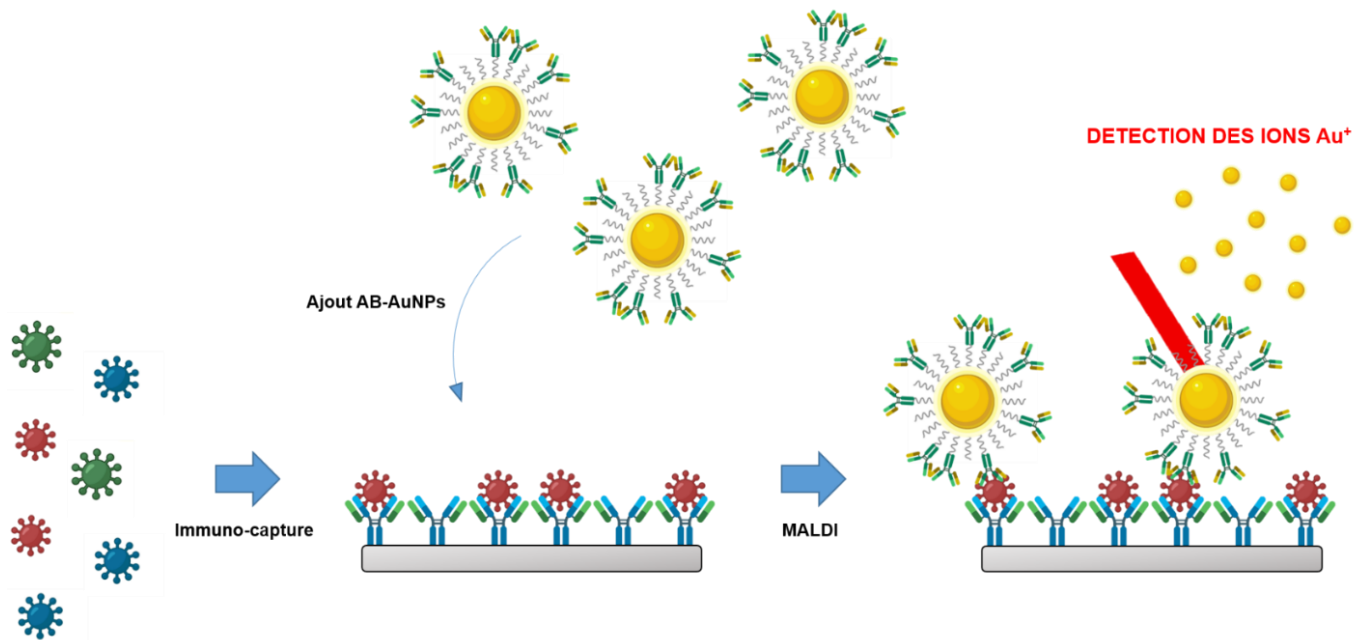


*Figure 39 : Procédure d'analyse TAMSIM via l'utilisation de carbocations trityle*

Une des dernières stratégies développées dans ce domaine est la conjugaison d'anticorps avec différentes nanoparticules, permettant une amélioration significative du signal ainsi qu'une détection claire. (Fig. 40) Initialement, les premiers complexes synthétisés ont mis en jeu des nanoparticules d'or et d'argent, jouant le rôle de réservoir d'ions pour l'amplification du signal. En effet, grâce à leurs fortes propriétés plasmoniques induisant une grande capacité d'absorption énergétique, ces nanoparticules génèrent facilement et en abondance, sous irradiation laser, des ions caractéristiques ( $\text{Au}^+$  et  $\text{Ag}^+$ ) qui fournissent d'excellents signaux en spectrométrie de masse.[136] De tels complexes ont été utilisés pour détecter l'hormone HCG dans des échantillons d'urine. Une LOD de 5 amol a été atteinte via l'utilisation de nanoparticules d'or, démontrant une amplification du signal MALDI de  $7.10^4$ . Des expériences d'imagerie ont également été conduites pour la détection de mégaline et de podocine dans des coupes de reins murins. Ces résultats ont pu démontrer le potentiel de la méthode tout en illustrant le lien étroit entre taille des nanoparticules et amplification du signal.[137]

Pour l'analyse d'échantillons biologiques complexes, la surface des nanoparticules d'or peut être fonctionnalisée via différents motifs chimiques afin de réduire le marquage non spécifique tout en améliorant la solubilité des nanoparticules dans les tampons biologiques. Tam et al. ont ainsi synthétisé des nanoparticules d'or présentant à leur surface des motifs PEG carboxylés dans le but d'analyser des biomarqueurs spécifiques du cancer du col de l'utérus, dont la protéine E7 qui joue un rôle prépondérant dans la formation de tumeur maligne. Le cancer du col de l'utérus, provoqué par le Papillomavirus humain, est l'un des cancers les plus mortels car le diagnostic de l'infection au HPV est particulièrement difficile. En effet, les tests ADN initialement utilisés ne présentent qu'une fiabilité de 70% sur les tests positifs et sont incapables de différencier les différentes classes d'agressivité de ce cancer. Dans ce cas, l'utilisation de nanoparticules d'or comme tags de masse a permis une amélioration significative des signaux liés à la

protéine E7 tout en minimisant le marquage non spécifique. Une LOD inférieure à 35 amol a été atteinte lors de la détection de protéines recombinantes issue du HPV en tampon biologique, démontrant une amplification du signal par 100. Une LOD de 2 zmol/cellule a été atteinte lors de la détection de ces mêmes protéines dans du lysat cellulaire issus de la culture de cellules HeLa.[138]



*Figure 40 : Exemple d'utilisation d'anticorps couplés à des nanoparticules d'or*

Wang et al. ont développé des nanoparticules d'or pour l'imagerie d'exosomes. Ces vésicules extracellulaires sont des biomarqueurs prometteurs pour le diagnostic précoce de différents cancers puisqu'ils présentent différentes protéines clés impliquées dans le développement tumoral, la communication intercellulaire ou encore l'altération des cellules et de leurs fonctions. Comme les exosomes sont des biomolécules ayant un poids moléculaire important, leur détection, via la spectrométrie de masse MALDI, est rapidement limitée et souffre d'une très faible sensibilité. Afin de surmonter ces problématiques, des nanoparticules d'or ont été utilisées comme réservoirs d'ions tout en utilisant des oligomères organiques présents à leur surface pour l'amplification du signal. De telles particules ont permis l'imagerie quantitative de CD9 et CD44 à la surface des exosomes. Lorsque ces particules ont été testées sur des exosomes issus de différentes lignées de cancer du sein, CD9 et CD44 ont également pu être correctement identifiés et quantifiés lors de l'imagerie d'une cinquantaine d'exosomes.[139]

Enfin, la conjugaison de nanoparticules de silice a également été étudiée pour promouvoir l'amplification du signal MALDI. Wang et al. ont utilisé de tels complexes pour la détection d'insuline immunocapturée, permettant l'enrichissement et une meilleure ionisation des biomolécules simultanément. La quantification de l'insuline a ainsi été possible jusqu'à 0.1nM, ce qui s'avère largement surpasser les LOQ jamais atteintes par les techniques de biochimie classiques.[140]



## **CHAPITRE 3 : La technologie Activity-Based Probe**

### **I. Généralités sur la technologie ABP**

#### **a. Généralités et contexte historique**

Plusieurs centaines d'enzymes, environ 2% du génome humain, possèdent une activité protéolytique. Ces enzymes, appelées protéases, sont regroupées, chez l'Homme, en sept familles, dépendamment de leur mécanisme catalytique :

- Les protéases aspartiques
- Les protéases à glutamate
- Les protéases à cystéine
- Les protéases à sérine
- Les métalloprotéases
- Les protéases à thréonine

Ces enzymes, chargées de l'hydrolyse des liaisons peptidiques, peuvent être regroupées en deux catégories distinctes. D'une part, les protéases à sérine, à cystéine et à thréonine, dont l'activité catalytique repose sur la présence d'un résidu nucléophile au sein du site actif, alors responsable de l'hydrolyse de la liaison amide. D'autre part, les métalloprotéases et les protéases à glutamate et les protéases aspartiques, dont le mécanisme catalytique repose sur l'activation d'une molécule d'eau par déprotonation, molécule d'eau alors à l'origine de l'amorce de l'hydrolyse. Les protéases sont le pilier central de nombreux processus biologiques tels que la prolifération et la différenciation cellulaire ou encore la réponse immunitaire. De plus, une dérégulation de leur activité ou de leur expression est souvent associée à plusieurs processus pathologiques tels que les cancers, l'arthrite, l'athérosclérose ou encore diverses maladies inflammatoires ou neurodégénératives dont Alzheimer.[141] De ce fait, il est primordial, afin d'avoir une compréhension précise des différents processus biologiques, de développer des stratégies efficaces permettant une mesure dynamique de l'activité des protéases en milieux biologiques complexes. En effet, ces enzymes étant souvent naturellement régulées par divers mécanismes post-traductionnels, il est impossible de simplement associer leur abondance naturelle et leur activité. Usuellement, la mesure de l'activité protéolytique se fait par suivi de l'hydrolyse d'un substrat de l'enzyme cible. Cependant, il faut alors préalablement isoler de leur environnement natif les fragments peptidiques issus de l'hydrolyse afin de pouvoir les analyser et surtout les quantifier. L'autre alternative est l'utilisation de sonde appelées « Substrate-based », capables de quantifier l'hydrolyse du substrat via libération d'un groupement fluorescent lors de l'hydrolyse de la sonde par l'enzyme cible. Ces sondes, dont l'interaction avec l'enzyme est basée sur la reconnaissance d'une séquence spécifique, ne sont pas dépendantes d'une étape de digestion mais elles n'induisent, en revanche, pas de liaison covalente avec la cible.[142] De ce fait, cette technologie atteint sa limite en milieu biologique complexe où ces molécules permettent simplement de mettre en évidence une activité protéolytique mais pas son origine. Face à ces différentes problématiques et à la nécessité de caractériser l'activité de nombreuses biomolécules, la technologie Activity-Based Probe apparaît alors comme une réponse évidente.[143] (Fig. 41)

Développées dans les années 1990, les sondes ABP ont permis le marquage spécifique et exclusif de la forme active de ces enzymes, et ainsi la caractérisation de leurs fonctions et de leurs rôles biologiques. Ce marquage est rendu possible par la création d'une liaison entre la sonde et sa cible, dont l'aspect covalent est une des spécificités majeures de cette technologie. Cette liaison se fait généralement entre un groupement électrophile présent sur la sonde et le nucléophile catalytique de la protéase, entraînant ainsi l'inhibition irréversible de l'enzyme. Cette technologie repose donc sur le transfert covalent et dirigée d'un marqueur spécifique facilitant l'isolation, la purification et l'identification de la protéase cible et de ses partenaires.

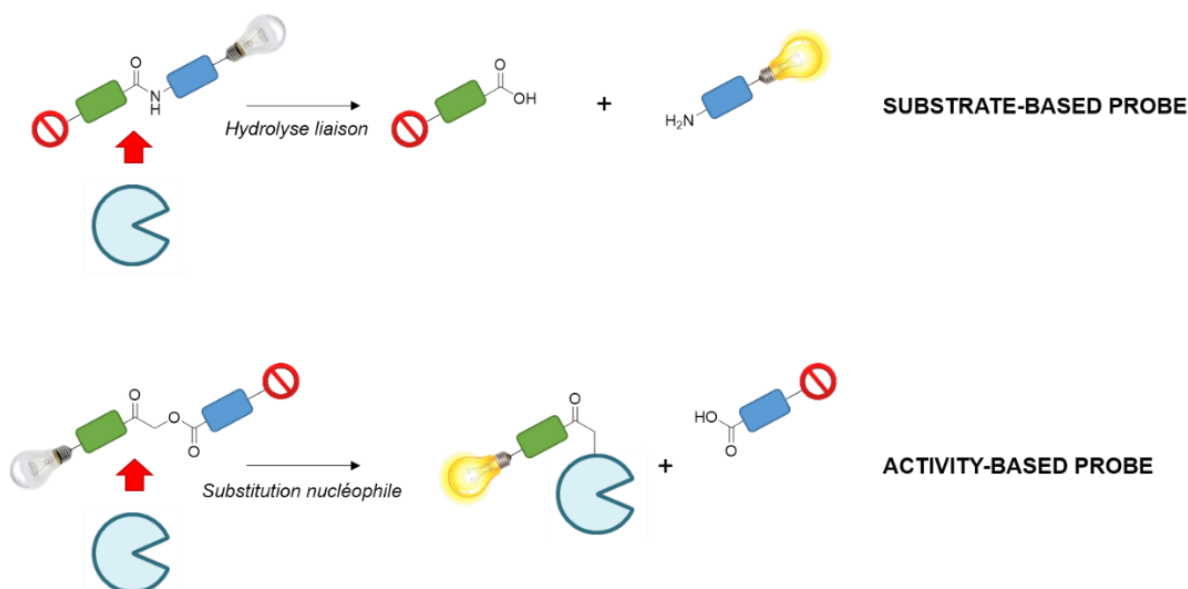


Figure 41 : Schéma de principe comparant le mécanisme des sondes fluorescentes "Substrate-based" et "Activity-based" via l'exemple d'un motif acyloxyméthylcétone

Bien que les protéases restent encore la cible préférentielle de cette technologie, de telles sondes ont maintenant été développées pour de nombreuses autres familles enzymatiques telles que les kinases, les phosphatases, les ubiquitinasés ou encore les glycosidasés. Nous nous focaliserons ici sur le marquage des protéases et plus particulièrement sur le cas des protéases à cystéine et à sérine, comme exemple de sondes covalentes, et sur le cas des métalloprotéases, comme exemple de sondes non covalentes. Ces trois types de protéases demeurent encore aujourd'hui les cibles principales de cette technologie.

### **b. Structure générale des sondes**

Les sondes ABPs sont généralement de petites molécules fonctionnalisées formées de trois composants principaux : (Fig. 42)

- Une tête, souvent construite autour d'un groupement électrophile, qui permet l'interaction avec l'enzyme cible tout en conférant à la sonde sa spécificité vis-à-vis d'une classe de biomolécules.
- Un linker, ou une séquence peptidique de reconnaissance spécifique afin de maximiser la spécificité de la sonde pour sa cible via la génération de diverses liaisons non covalentes. Il est généralement



non réactif mais peut tout de même présenter des groupements fonctionnels dans le cas où la liaison covalente entre l'enzyme et la tête réactive n'est pas possible.

- Un groupement reporter qui permet la détection, la purification ou la capture de l'enzyme cible. [144]

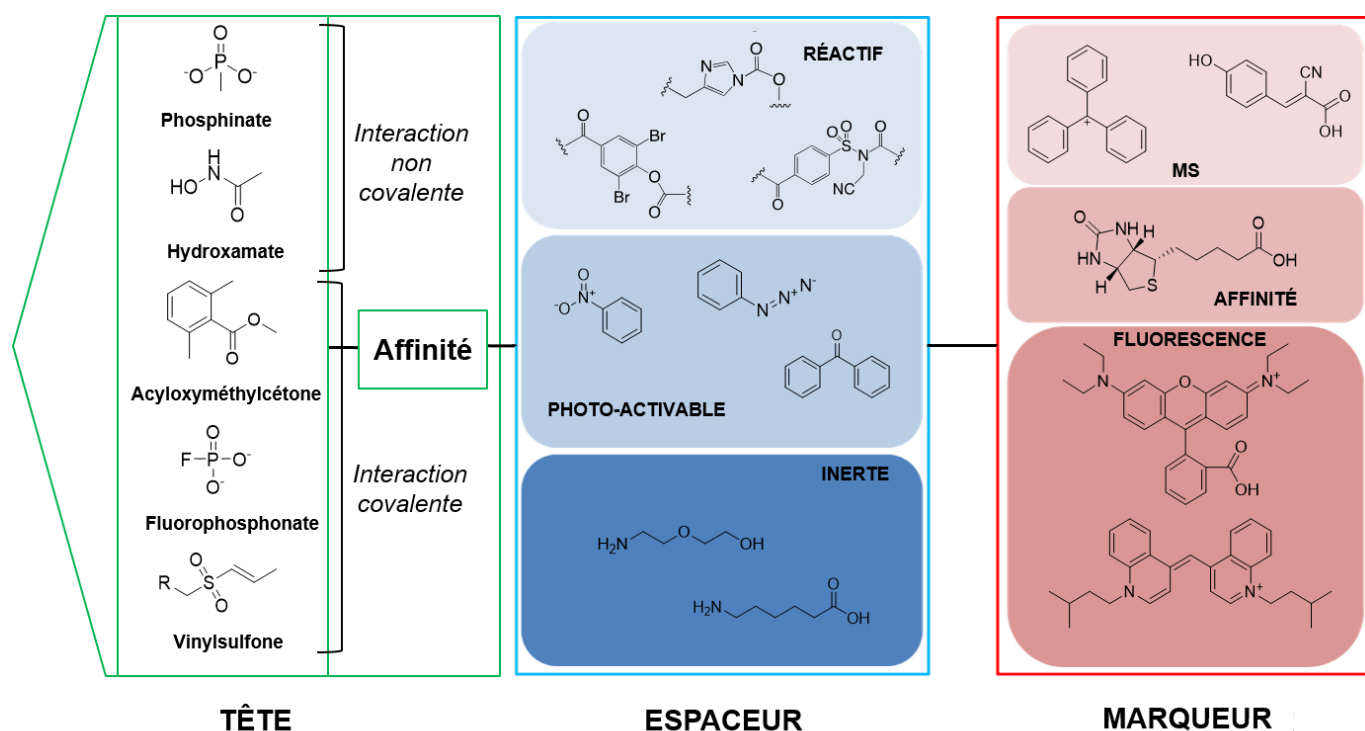
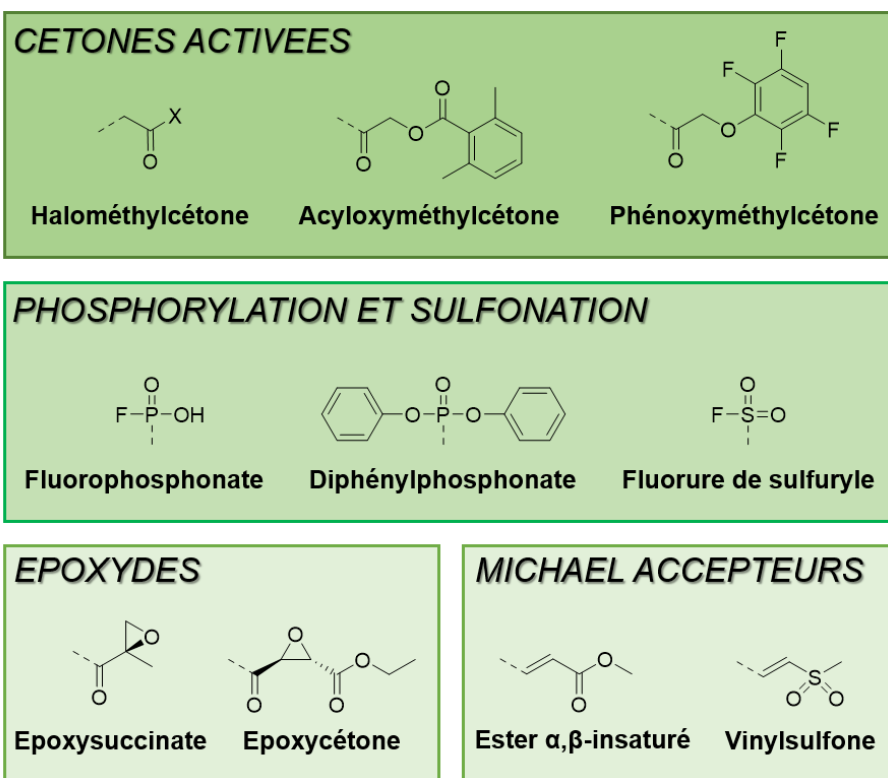


Figure 42 : Structure générale des sondes ABP

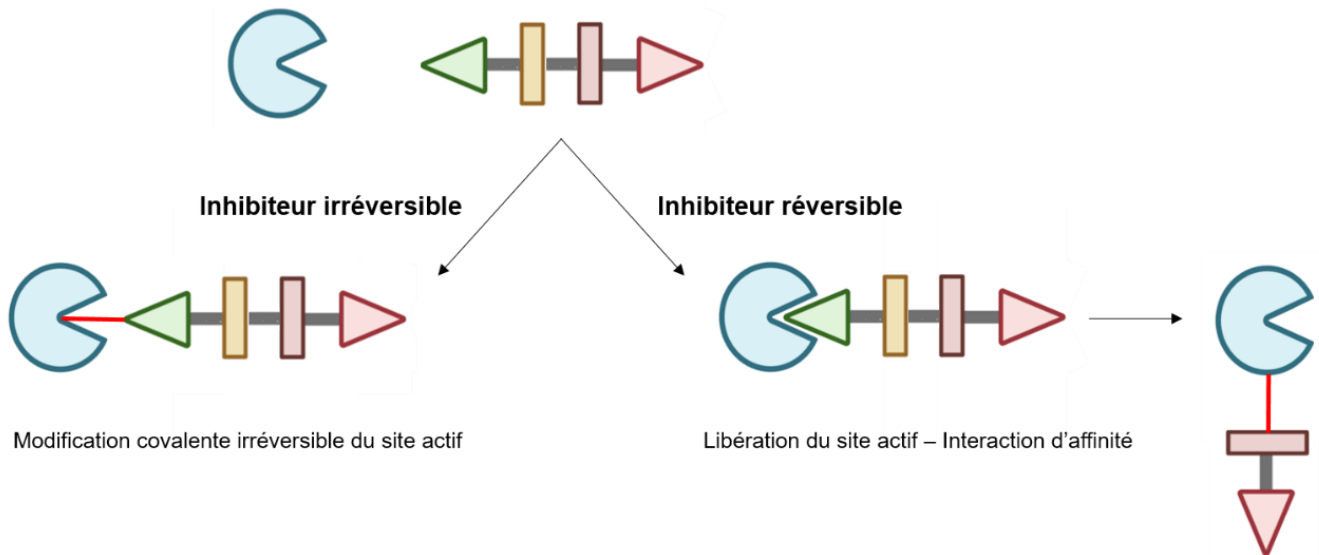
### 1. La tête de la sonde

Son rôle est d'assurer, lorsque c'est possible, la liaison covalente avec la sonde. Dans ce cas, il s'agit, notamment pour les protéases à sérine, à thréonine ou à cystéine, d'un groupement électrophile réactif. Ceux-ci sont choisis dépendamment de la réactivité du nucléophile cible. En effet, la fonction thiol est un nucléophile plus polarisable et plus mou que le groupement hydroxyle qui s'avère plutôt être un nucléophile dur. Ainsi, les ABPs ciblant les protéases à cystéine, par exemple, sont construites autour d'un centre électrophile plutôt mou en comparaison des sondes ciblant les protéases à sérine ou à thréonine. Ces électrophiles sont également sélectionnés selon leur aisance de synthèse et leur biocompatibilité. (Fig. 43) Le groupement électrophile choisi est alors intégré à un squelette organique conçu sur le modèle de la structure d'un substrat de l'enzyme cible afin d'interagir avec celle-ci en respectant son mécanisme catalytique naturel. Il est à noter que cet « enrobage » organique doit permettre l'insertion de l'électrophile directement dans le site actif de l'enzyme. L'interaction entre la sonde ABP et la protéase est un processus en deux temps. La première étape, réversible, est une interaction non covalente entre la sonde et sa cible, gouvernée par la seule affinité de la sonde pour l'enzyme. Cette étape repose principalement sur le squelette global de la tête réactive, souvent peptidique ou pseudo-peptidique. La création de la liaison covalente entre l'électrophile et le nucléophile catalytique vient dans un second temps, étape gouvernée par la réactivité intrinsèque du groupement électrophile. On parle alors ici d'inhibiteur irréversible. [143] La figure 43 présente un résumé des différents groupes réactifs majoritairement utilisés pour le ciblage des diverses protéases.



*Figure 43 : Structure chimique des différents motifs électrophiles utilisés*

Dans le cas des protéases qui ne possèdent pas de nucléophile catalytique, telles que les métalloprotéases, il s'agit alors d'un groupement d'affinité capable d'interagir de manière non covalente avec le site actif de l'enzyme. En effet, le mécanisme catalytique de ces entités repose sur l'activation d'une molécule d'eau par un centre métallique ou un résidu aspartate, molécule d'eau alors responsable de l'hydrolyse de la liaison amide. Il s'agira donc ici de groupements capables de chélater l'ion métallique ou d'interagir avec le groupement aspartate. On parle alors d'inhibition réversible puisqu'il n'y a pas de greffage covalent de la sonde dans le site actif de l'enzyme.[143] (Fig. 44) La sélection du motif réactif, qu'il soit covalent ou simplement chélatant, est une étape cruciale dans le design des sondes ABP. En effet, jouer sur la réactivité et l'affinité du motif chimique permet de moduler la spécificité et la sélectivité de la sonde. Un groupement peu réactif donnera plus d'importance au squelette pseudo-peptidique ou au linker, permettant ainsi d'apporter à la sonde un maximum de spécificité. Cependant, un groupement trop peu réactif ne permettra pas le marquage alors qu'un groupement trop réactif posera des problèmes de marquage non spécifique.[145] Benjamin Cravatt et son équipe publie en 2006 une revue détaillant les différents groupements chimiques pouvant être utilisés comme tête réactive ainsi que leurs enzymes cibles et mécanisme réactionnel associés.[146]



*Figure 44 : Schéma général des deux types d'ABP*

## 2. Le linker

Celui-ci a généralement pour rôle d'augmenter la spécificité de la sonde pour sa cible. Il s'agit la plupart du temps d'une séquence peptidique ou pseudo-peptidique, substrat de la protéase d'intérêt, voir un domaine protéique entier. Il permet également de maintenir une certaine distance spatiale entre la tête de la sonde et le groupement reporter, évitant ainsi que celui-ci ne perturbe la réactivité intrinsèque de la sonde.[144] Le design d'une telle séquence est un enjeu majeur du développement des sondes ABP. En effet, dans le cas du marquage de protéases endogènes, un même motif peut alors être substrat de différentes protéases, appartenant à une même famille. De ce fait, la sonde doit présenter une affinité particulière pour certaines de ces protéases, permettant ainsi leur marquage sélectif. Il est particulièrement important de développer les bibliothèques de substrats existants, notamment via l'intégration de motifs organiques ou d'acides aminés non naturels. Le linker peut également avoir pour rôle d'équilibrer les « défauts » des sondes ABP, dont, principalement, une mauvaise biodistribution due au caractère souvent très hydrophobe de la sonde, à sa charge ou à sa taille. Le linker peut alors être utilisé pour augmenter la perméabilité cellulaire de la sonde, notamment pour le marquage de protéases cytoplasmiques.

Dans le cas d'une tête non covalente, la création de la liaison avec la cible incombe alors au linker. Dans ce cas, celui-ci possède le plus souvent un groupement photoactivable formant, sous irradiations UV, des espèces hautement réactives capables de réagir facilement et rapidement avec des résidus de proximité. La création de la liaison reste tout de même tributaire de la formation du complexe d'affinité entre la protéase et sa cible. Il est alors essentiel de prêter une grande attention au site de fixation du groupement photoactivable sur le corps de la sonde. En effet, placé incorrectement, celui-ci peut perturber l'interaction entre l'enzyme et son substrat ou encore biaiser la spécificité de la sonde pour les formes enzymatiques actives en permettant le marquage des formes inactives.[143]

Dernièrement, une nouvelle génération de linkers a vu le jour, développée par Hamachi et al. Il s'agit de petites molécules électrophiles, qui, à l'instar des groupements photoactivables, peuvent réagir avec un nucléophile de proximité au sein du domaine catalytique, généralement via un mécanisme de substitution

nucléophile. Cette stratégie est aujourd'hui couramment utilisée en remplacement des groupements photoactivables dont la principale limitation est le marquage *in-vivo*.

### **3. Le groupement reporter**

Le choix du marqueur dépend principalement de la technologie utilisée par la suite pour l'analyse du marquage. Les technologies les plus couramment utilisées sont la fluorimétrie, la radioactivité, la chromatographie d'affinité ou encore la spectrométrie de masse. Il peut ainsi s'agir de fluorophores ou de noyaux radioactifs dans le cas de l'analyse par imagerie ou de marqueur d'enrichissement ou de masse, tel que la biotine ou les dérivés trityles, pour l'identification ou la caractérisation de protéines. Parmi les principaux fluorophores, on retrouve notamment le BODIPY, les dérivés de fluorescéine, de rhodamine ou de cyanine, le dansyl ou encore le NBD. Le choix du marqueur dépend majoritairement des propriétés physico-chimiques attendues et de leur coût d'utilisation. De plus, ces propriétés peuvent être modifiées selon les besoins de l'analyse, par dérivatisation chimique. En effet, par exemple, l'estérification de la fluorescéine entraîne un quenching de sa fluorescence, fluorescence qui est rétablie lors de la pénétration de la sonde dans le cytoplasme au contact d'estérases.[143]

Dans la même idée, il est possible de greffer simultanément sur le squelette de la sonde un fluorophore et un quencher, de manière à ne rendre le marqueur actif qu'une fois la sonde en contact avec l'enzyme, libérant ainsi le fluorophore du quencher. Cette stratégie offre également l'avantage de pouvoir suivre l'activité catalytique de l'enzyme. Cependant, bien que le suivi de fluorescence soit une des stratégies les plus utilisées en protéomique, les marqueurs associés sont souvent volumineux et présentent à la fois une forte rétention de charge et une faible spécificité, pouvant ainsi nuire à l'interaction entre la sonde et sa cible. De ce fait, on se tourne aujourd'hui vers des stratégies de bioconjugaison, telles que la chimie CuAAC, afin d'introduire le groupement reporter *a posteriori* sans influencer la réactivité de la sonde vis-à-vis de sa cible. C'est Cravatt qui introduit pour la première fois, en 2003, l'utilisation de stratégies « click » pour l'introduction du groupement reporter sur une sonde ABP.[147] De nombreuses études se focalisent encore aujourd'hui sur le développement de nouveaux marqueurs présentant des propriétés physico-chimiques plus compatibles avec la technologie ABP.[148]

## **c. Principales applications des sondes ABP**

### **1. Étude de l'activité protéolytique**

Les protéases sont généralement sécrétées sous la forme de résidus inactifs appelés zymogènes. Leur activation se fait alors sous l'influence de différents facteurs dont l'interaction avec un substrat, une ou plusieurs modifications post-traductionnelles, la protéolyse d'un domaine ou encore un changement de pH. Ceux-ci provoquent un changement de la structure tridimensionnelle de la protéase, libérant ainsi l'accès au site actif. Une activation anarchique des protéases étant biologiquement néfaste, l'activation des protéases est naturellement régulée par différents inhibiteurs. Ces mécanismes d'activation et de régulation sont une source d'information particulièrement importante pour comprendre le fonctionnement et le rôle des protéases.[141] Les ABPs peuvent alors être utilisées pour déterminer les conditions d'activation d'une enzyme et le mécanisme associé, via leur capacité à cibler exclusivement les protéases sous forme active. De plus, ce type de sondes permet également d'identifier les résidus catalytiques indispensables au fonctionnement de l'enzyme. En effet, l'interaction entre la sonde et sa cible ne dépend pas uniquement de

la conformation spatiale du site actif mais également de son état fonctionnel. Ainsi il est possible d'identifier toute mutation n'entraînant pas de changement conformationnel mais induisant l'inactivation de l'enzyme. Il devient également possible d'identifier toute activité transitoire de ces enzymes. En effet, certaines protéases présentent une certaine activité résiduelle, bien qu'inactives, associée à une certaine conformation spatiale. Les sondes ABPs sont à ce jour les seuls objets moléculaires capables d'identifier ce genre d'activité.[143] De plus, de telles structures moléculaires ont ouvert la voie de la protéomique quantitative en permettant une quantification ciblée de l'activité enzymatique et de la dynamique fonctionnelle associée.

## **2. Découverte d'agents thérapeutiques**

La compréhension de l'activité protéolytique et du mécanisme associé nous mène à la construction éclairée de molécules capables de moduler cette activité, via le développement de molécules agonistes ou antagonistes. À ce jour, seulement 10% du protéome humain a été suffisamment caractérisé pour donner naissance à des cibles thérapeutiques potentielles ou à des molécules capables de moduler l'activité protéolytique. En effet, sur les 30 000 gènes humains codant pour des protéines, seulement 3000 ont été associés à des processus pathologiques et seulement 500 sont actuellement utilisés comme cibles thérapeutiques. En ce qui concerne les gènes restants, beaucoup ont été déclarés thérapeutiquement inutilisables ou inaccessibles, principalement par manque d'informations sur leur rôle biologique ou sur la structure tridimensionnelle des protéines associées. Les technologies utilisées jusqu'ici pour le screening d'agent thérapeutique sont souvent fastidieuses et nécessitent un investissement financier important sans pour autant permettre un balayage complet des cibles potentielles. Dans ce contexte, la technologie ABP s'impose comme un outil puissant et plus accessible permettant un screening à grande échelle. Cette capacité à manipuler artificiellement l'activité enzymatique permet principalement d'identifier et de comprendre les processus biologiques associés à l'enzyme cible. De nombreuses pathologies sont actuellement liées à un fort dérèglement de l'activité protéolytique. L'inhibition de ces protéases apparaît alors souvent comme le seul moyen fiable de limiter le développement de la pathologie. Les sondes ABP peuvent alors être utilisées pour caractériser et valider un candidat thérapeutique. En effet, contrairement aux méthodes usuelles qui nécessitent de travailler sur enzyme isolée et purifiée, les ABPs peuvent être utilisées directement *in-vivo*, en milieux biologiques complexes, pour des tests de binding compétitifs avec la molécule candidate afin d'évaluer son efficacité, sa sélectivité et l'influence des conditions biologiques du milieu. De plus, l'utilisation de sondes dites « large spectre » permet un screening rapide de différents inhibiteurs en conditions biologiques natives afin d'évaluer simultanément leur efficacité et leur sélectivité.[148]

## **3. Outils de diagnostic**

Étant surexprimées et dérégulées dans de nombreux processus pathologiques, les protéases sont également d'excellents biomarqueurs permettant de promouvoir le diagnostic précoce de différentes pathologies, notamment les pathologies inflammatoires, la plupart des protéases étant sécrétées par des cellules associées au système immunitaire. Elles sont également particulièrement significatives dans le cas de pathologies cancéreuses puisqu'elles sont associées à la majorité des processus biologiques impliqués lors du développement cancéreux tels que l'angiogenèse ou la restructuration tissulaire souvent liées à la tumorigénèse.[143] Les sondes ABP permettant de détecter et de quantifier ces dérégulations et les

enzymes associées, il devient alors possible d'utiliser ces enzymes comme biomarqueurs afin de suivre la progression de la pathologie associée ou d'établir un premier diagnostic.

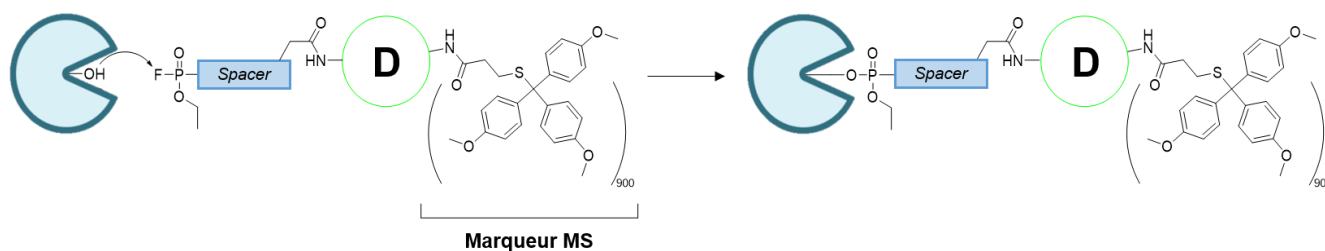
## **II. Les ABPs covalentes**

### **a. Les protéases à sérine**

Les sérine hydrolases sont une des plus importantes familles d'enzymes. Elles jouent un rôle clef dans de nombreux processus biologiques tels que le métabolisme lipidique, la signalisation cellulaire ou encore les modifications post-traductionnelles des protéines. Ces enzymes sont également des cibles thérapeutiques de choix pour de nombreuses pathologies dont divers cancers, infections virales ou encore le diabète, l'hypertension ou Alzheimer. Cependant, il subsiste toujours un grand nombre de ces enzymes pour lesquelles ni leurs substrats naturels, ni leurs fonctions biologiques n'ont été identifiés ou caractérisés. De ce fait, la technologie ABP, via l'utilisation générale d'un motif fluorophosphonate comme tête réactive, a été particulièrement utile pour la compréhension de ce type d'enzymes. Liu et al. ont présenté pour la première fois en 1999 l'utilisation d'un tel motif chimique pour le profilage des sérines hydrolases via l'utilisation de sondes ABP.[149] Initialement développé pour cibler l'enzyme FAAH, ce motif électrophile présente une réactivité importante vis-à-vis du groupement hydroxyle présent sur la chaîne latérale de la sérine et permet ainsi la liaison covalente avec l'enzyme via la substitution de l'atome de fluor.[145] Il s'est donc avéré être un substrat large spectre pour l'ensemble des protéases à sérine.

Expérimentalement, l'utilisation de sondes ABP construites autour du motif fluorophosphonate a permis la découverte et l'identification de plusieurs familles de sérines hydrolase. Ainsi, Hatzios et al. identifient en 2016 une sérine hydrolase, jamais décrite au préalable, responsable de l'inhibition de l'expression d'une protéine impliquée dans la réponse immunitaire face au choléra.[150] Sur les bases de ce travail, Lentz et al. décrivent, par la suite, en 2018, une famille de sérine hydrolases intrinsèquement liée au processus d'infection bactérienne dans *S. Aureus*. [151] Ces sondes ont également rendu possible l'identification et la caractérisation de différents inhibiteurs de sérines hydrolase, notamment via la mise en place de tests de binding compétitif. Ainsi, Chen et al. décrivent en 2019 l'association d'un inhibiteur de type carbamate à la lipase FAAH-4, inhibiteur précédemment décrit pour influencer le processus de vieillissement et l'espérance de vie dans des organismes de types *C. Elegans*. [152] L'utilisation de sondes ABP fluorophosphonate-biotine a permis ici, via l'analyse par spectrométrie de masse, d'identifier la cible de cet inhibiteur tout en décrivant son mécanisme d'action. De même, l'utilisation simultanée de sondes ABP fluorophosphonate-biotine et fluorophosphonate-rhodamine a permis le screening de divers inhibiteurs de sérines hydrolase, aboutissant à l'identification d'un composé inhibiteur de la lipase ABHD12, enzyme impliquée dans la régulation du système endocannabinoïde central, lui-même impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions neurologiques telles que la coordination et le contrôle des mouvements, la mémoire, les comportements addictifs ou encore la sensation de douleur. [153]

Enfin, de tels motifs réactifs ont été utilisés pour la synthèse *in-vivo*, par chimie click, de sondes contenant un dendrimère 8-poly(amidoamine) présentant de multiples groupements trityle à sa surface. (Fig. 45) Dans le cadre de l'imagerie MALDI, Yang et al. ont obtenu une amplification du signal de près de trois ordres de grandeur lors de la détection de sérines hydrolases directement sur coupes de cerveaux murins, sans ajout de matrice externe. [72]

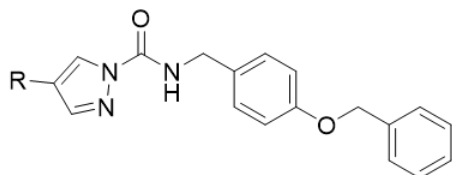


**Figure 45 : Exemple de structure et mécanisme d'une sonde fluorophosphonate pour le marquage des sérines hydrolases via la présence d'un dendrimère comme marqueur de détection**

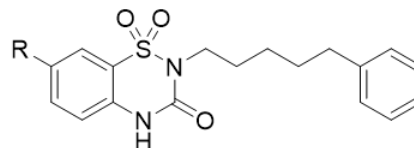
Cependant, bien que ces sondes aient largement prouvé leur utilité, elles demeurent néanmoins restreintes à certaines sérines hydrolases et souffrent souvent d'un manque de spécificité. En effet, elles sont généralement construites autour d'un cœur lipidique majoritairement hydrophobe, ce qui les rend principalement efficaces pour le ciblage d'estérases ou de lipases. De plus, le motif fluorophosphonate étant fortement électrophile, celui-ci s'est avéré capable d'interagir avec d'autres familles d'enzyme, posant des problèmes d'interactions non spécifiques.

De ce fait, d'autres motifs électrophiles ont alors été étudiés, tels que les groupements phosphonate ou chlorométhyl cétone, dans le but d'élargir le panel de sérines hydrolase accessibles. Les inhibiteurs phosphorés non fluorés ont alors démontré une très forte sélectivité pour les sérines hydrolase et plus particulièrement pour le groupement hydroxyle catalytique via une réactivité intrinsèque suffisamment forte pour cibler la sérine catalytique sans générer de réactions parasites avec d'autres groupements hydroxyles présents dans le milieu. Wang et al. ont ainsi pu identifier de manière spécifique et individuelle une soixantaine de sérines hydrolase, directement dans du lysat de cellules cérébrales murines, via l'utilisation de sondes aryl phosphonate et alkyl phosphonate couplées à une molécule de biotine afin de promouvoir l'analyse par spectrométrie de masse après digestion trypsique des complexes enzyme/sonde.[154] De plus, ces motifs électrophiles sont plus faciles à synthétiser que les fluorophosphonates et possèdent une plus forte perméabilité cellulaire tout en étant moins toxiques.[145]

Les motifs carbamates et urées offrent également une grande variété de modulations structurales possibles tout en ayant démontré une très forte spécificité pour les sérines hydrolases. Dernièrement, Otrubova et al.[155] et Kornahrens et al.[156] ont respectivement décrit l'utilisation de motifs pyrazoles issus de dérivés d'urées et de dérivés de carbamate cycliques pour l'inhibition, l'identification et la caractérisation de différentes sérines hydrolases, dont la phospholipase PNPLA4, alors très peu caractérisée à ce jour. (Fig. 46)



**N-acyl pyrazole**



**Benzoxathiazin-3-one 1, 1-Dioxyde**

Figure 46 : Structure des derniers dérivés carbamate et urée utilisés pour le ciblage de sérines hydrolases

Les dérivés isocoumarine, et plus spécifiquement les dérivés de la 4-chloro isocoumarine, sont actuellement les composés les plus prometteurs concernant l'obtention de sondes ABP particulièrement sélectives vis-à-vis des sérines hydrolases. En effet, cette spécificité réside dans leur unique mécanisme d'action en deux temps : (Fig. 47)

- Premièrement, l'attaque nucléophile du groupement hydroxyle catalytique provoque l'ouverture du cycle, rapidement suivi par l'élimination du chlore, aboutissant à un intermédiaire réactif isoquinonimide lié à l'enzyme.
- Deuxièmement, l'attaque nucléophile de cet intermédiaire réactif par une histidine à proximité de la sérine catalytique, présente dans toutes les sérines hydrolases.[145]

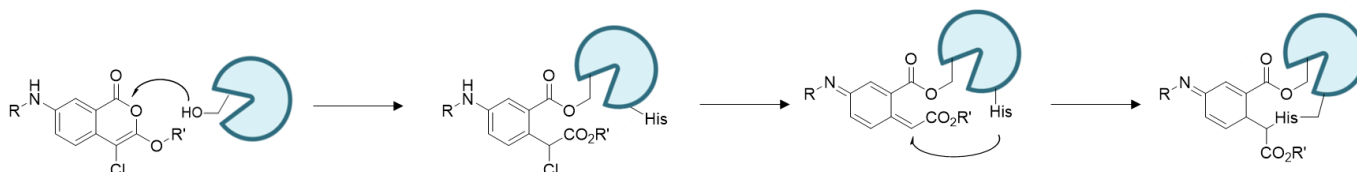
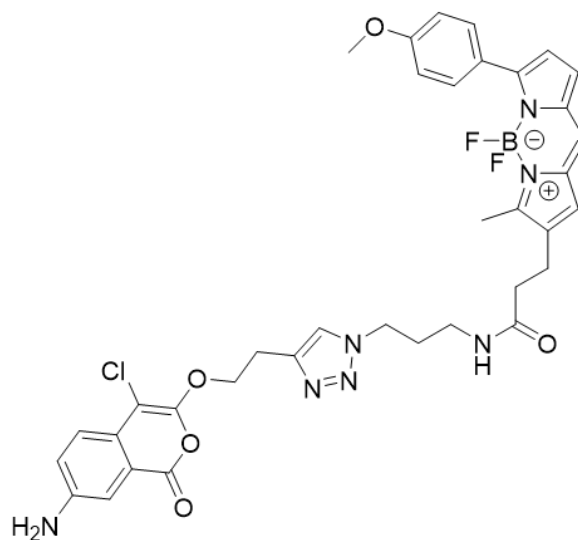


Figure 47 : Mécanisme d'action des composés dérivés de la 4-chloro isocoumarine

Ce motif a été utilisé par Garland et al. pour le développement de sondes ABP fluorescentes (Fig. 48) permettant la détection *in-cellulo* de thioestérase humaine avec une affinité de l'ordre du nanomolaire. L'activité de cette enzyme est un indicateur pour le suivi de la palmitoylation de protéines, soit une modification post-traductionnelle impliquée dans la stabilité protéique et l'interaction protéine-protéine.[157]





*Figure 48 : Structure chimique de la sonde utilisée par Garland et al. basée sur un dérivé 4-chloroisocoumarine*

Groupement réactif	Structure
Diphénylphosphonate	
Fluorophosphonate	
Isocoumarine	
Carbamate	
Lactone	
Urée hétérocyclique	
B-Lactame	
Fluorure de sulfonyl	
Chlorométhylcétone	

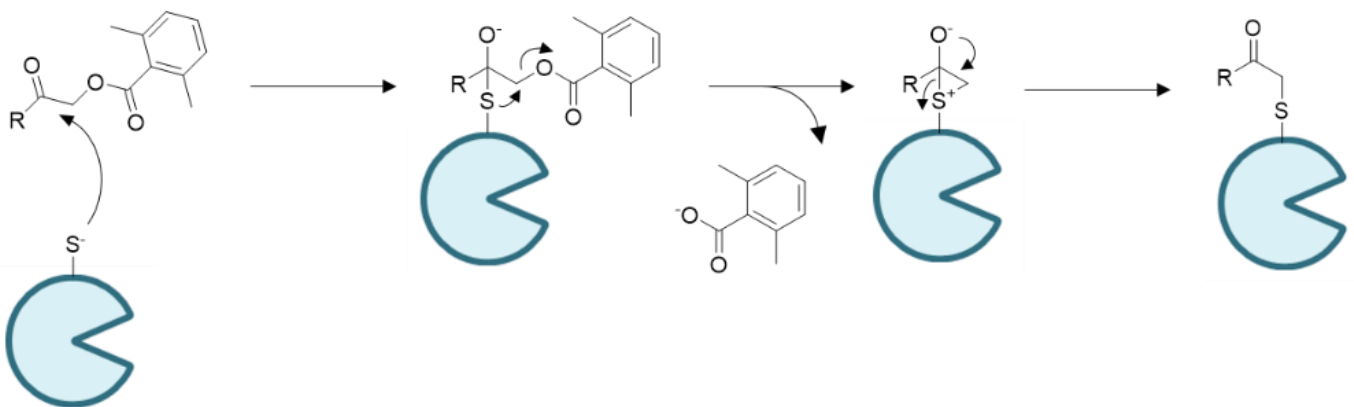
*Tableau 3 : Résumé des différentes têtes réactives utilisées pour le ciblage de sérines hydrolases*

## **b. Les protéases à cystéine**

Parmi la grande famille des protéases à cystéine, les cathepsines et les caspases sont depuis longtemps des cibles privilégiées concernant le développement de sondes ABP. Bien que cette technologie soit également utilisée aujourd'hui pour le marquage de différents types de protéases à cystéines, nous nous focaliserons, dans cette partie, sur ces deux familles enzymatiques.

### **1. Les cathepsines**

Les cathepsines sont des protéases impliquées dans de nombreux mécanismes pathologiques et plus particulièrement le développement de cancers. En effet, elles jouent un rôle majeur dans l'angiogenèse, l'apoptose ou encore la tumorigénèse et le développement métastatique. Ces protéases jouent également le rôle de modulateurs de l'inflammation lors du développement de pathologies telles que l'athérosclérose, l'arthrite ou encore l'asthme.[158] Blum et al. ont décrit pour la première fois en 2007 l'utilisation de résidus acyloxyméthylcétone pour le marquage fluorescent des cathepsines B, L et S endogènes dans du lysat de cellules souches humaines. Suite à l'observation que la réaction entre le groupement thiol catalytique et le motif acyloxyméthylcétone provoquait la libération d'un groupement acyloxy, (Fig. 49) ils présentent ainsi le concept de sondes ABP auto-quenchées incorporant un fluorophore comme groupement détecteur et un motif de quenching sur le groupement nucléofuge acyloxy.[159] (Fig. 50) Le groupement AOMK est encore à ce jour le motif de choix pour le design de sondes ABP dédiées au marquage de protéases à cystéine. Il a ainsi d'ailleurs été utilisé par Lyo et al. dans le développement de sondes ABP fluorescentes pour l'identification et l'imagerie de cathepsines endogènes dans le pancréas et la moelle épinière de souris atteinte de pancréatite.[160]



*Figure 49 : Mécanisme réactionnel associé au groupement AOMK - [146]*

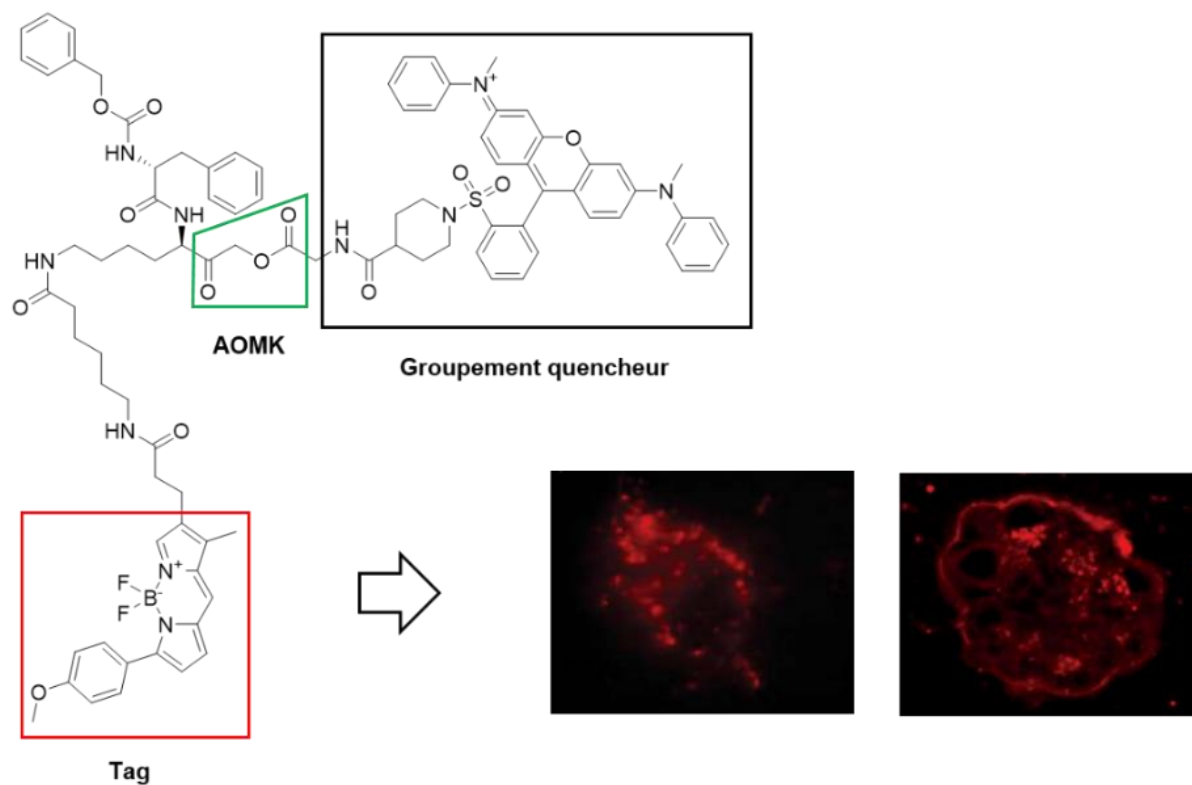
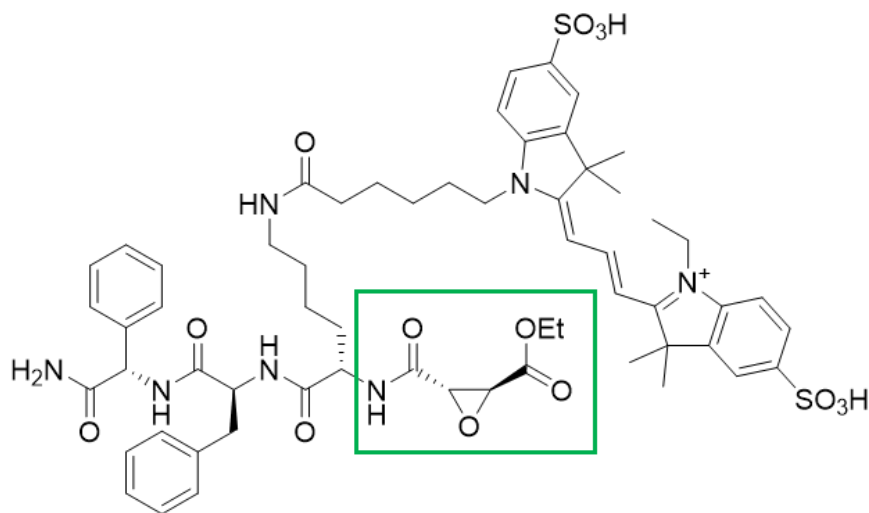


Figure 50 : Structure de la sonde ABP auto-quençhée utilisée par Blum et al. pour l'imagerie de Cathepsines en milieux biologiques

Finalement, Chowhurry et al. ont développé de nouveaux systèmes inspirés de prodrogues comme sondes chimiques pour l'étude du comportement des cathepsines B dans différents lysats cellulaires. De tels systèmes sont basés sur le design d'une tête réactive peptidique présentant un motif spécifique des cathepsines B. L'enzyme induit donc la dégradation de la tête peptidique, permettant l'activation de la sonde et la libération du tag d'analyse, qui se trouve être dans ce cas un dérivé méthylcoumarine.[161]

Les dérivés époxyde ont également été testés pour le marquage et la détection des cathepsines. Greenbaum et al. décrivent ainsi l'identification de différentes cathepsines par spectrométrie de masse dans des extraits cellulaires ainsi que le suivi et la caractérisation de leur activité enzymatique, via l'utilisation de sonde époxyde-biotine.[162] Ces résultats ont ainsi permis d'identifier la cathepsine L comme l'enzyme responsable du clivage de la pro-encéphaline, une pro-hormone à l'origine de l'encéphaline, elle-même intervenant dans les processus de régulation de la douleur en tant qu'analgésique.[163] Enfin, Paulick et al. décrivent la synthèse de sondes ABP basées sur l'utilisation de dérivés époxydes comme électrophile réactif pour le marquage et la détection *in-vivo* de la cathepsine X, une enzyme liée aux cellules de la lignée immunitaire, impliquée dans le vieillissement cellulaire et le développement de certaines maladies neurodégénératives et cancers.[164] (Fig. 51) Cependant, ces électrophiles sont globalement peu réactifs et ont démontré une possible réactivité avec d'autres acides aminés que les cystéines, illustrant ainsi un manque de sélectivité.[165]

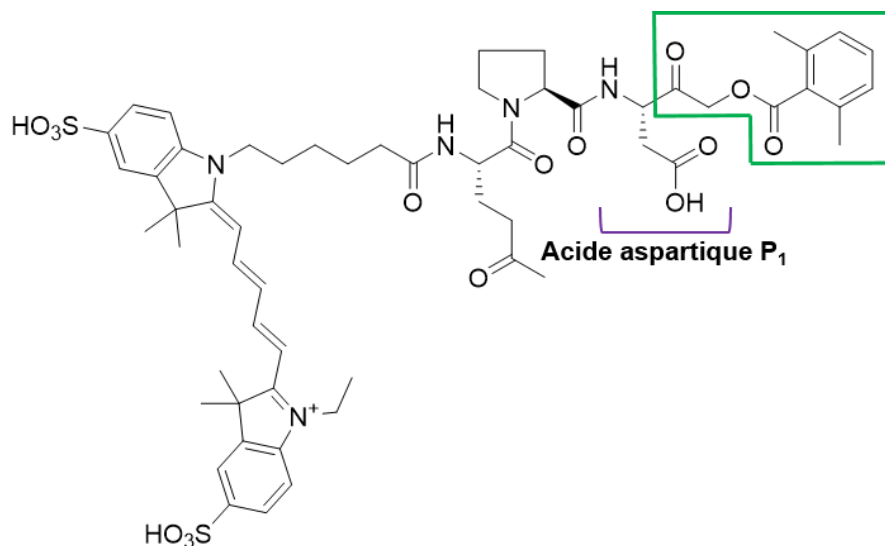


*Figure 51 : Structure de la sonde ABP époxyde utilisée par Paulick et al.*

## 2. Les caspases

Les caspases sont des médiateurs impliqués dans la cascade de signalisation à l'origine de l'apoptose, processus biologique crucial pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. De plus, ces protéases sont également impliquées dans la régulation de la pyroptose, un processus de mort cellulaire associé à la réponse inflammatoire.[166] Il est particulièrement difficile de construire des sondes qui ne soient sélectives que des caspases. En effet, la plupart des sondes disponibles souffrent d'un manque de sélectivité vis-à-vis de ces protéases puisqu'elles sont également capables d'interagir avec d'autres protéases à cystéine telles que les cathepsines. Le motif AOMK est d'ailleurs également le motif de référence pour ces enzymes. C'est d'ailleurs sur ce motif électrophile qu'a été construite la première sonde ABP pour la détection de caspase. Cette sonde a permis la détection de la caspase 1 via le transfert d'un marqueur d'enrichissement.[163]

Cependant, ce seul motif électrophile n'est pas suffisant. En effet, les sondes doivent également présenter un acide aspartique en position P<sub>1</sub> puisque les caspases ont cette particularité unique de ne reconnaître que les substrats possédant un acide aspartique en position P<sub>1</sub>. Edington et al. ont d'ailleurs décrit pour la première fois en 2009, la structure de sondes ABP fluorescentes spécifiques aux caspases pour des applications en imagerie. (Fig. 52) Ce gain de sélectivité a alors été apporté par l'ajout d'un résidu proline en position P<sub>2</sub>, limitant ainsi les interactions secondaires entre la sonde et les cathepsines.[167] D'autres acides aminés ont ainsi été testés, naturels et non-naturels, dans le but de maximiser la spécificité des sondes ABP développées. Ainsi, Berger et al. décrivent ce processus de screening et la synthèse de sondes ABP permettant de discriminer différentes caspases entre-elles, notamment la 3, la 8 et la 9, en milieux biologiques complexes. De telles sondes ont également permis la découverte d'un complexe intermédiaire impliquant la caspase 7, sélectivement activé durant le processus apoptotique. Initialement composées d'une tête réactive AOMK et d'un acide aspartique en position P<sub>1</sub>, différentes séquences peptidiques et pseudo-peptides ont été étudiées dans le but de rendre ces objets moléculaire spécifiques des caspases uniquement, sans réaction parasite avec d'autres protéases à cystéine.[168]



*Figure 52 : Structure de la sonde ABP développée par Edington et al.*

Une modification du groupement AOMK a également été envisagée, toujours dans l'objectif de maximiser la sélectivité des sondes pour les caspases. Le groupement fluorométhylcétone est alors devenu l'électrophile de choix pour le marquage de ces protéases. Cependant, celui-ci demeure toujours légèrement réactif vis-à-vis des autres protéases à cystéines.[141]

Groupement réactif	Structure
Acyloxyméthylcétone	
Cétones $\alpha,\beta$ -insaturées	
Méthylcétones	
Epoxy succinate	
Halométhylcétones	
Vinylsulfones	
Phénoxy méthylcétone	
Halogénoacétamide	

*Tableau 4 : Résumé des différentes têtes réactives utilisées pour le ciblage des protéases à cystéine*

### III. Les ABPs non covalentes : le cas des métalloprotéases

Les métalloprotéases sont une grande famille enzymatique d'environ 160 enzymes impliquées dans divers processus physiologiques et pathologiques tels que les cancers, les pathologies inflammatoires, la régénération et le remodelage des tissus ou encore la métabolisation d'hormones et de petites molécules. Bien que ces protéases soient une cible de choix pour le suivi et le diagnostic de diverses pathologies ou pour la compréhension de processus biologiques, il est particulièrement difficile de les cibler. En effet, elles sont sécrétées sous une forme inactive et ne sont spécifiquement activées qu'à des concentrations très faibles. De plus, ces formes actives sont naturellement régulées par la présence d'inhibiteurs endogènes qui maintiennent un équilibre constant entre forme active et forme inhibée. Enfin, ces enzymes ne possèdent pas de nucléophile catalytique dans le site actif. Leur mécanisme catalytique repose sur l'immobilisation d'une molécule d'eau par un ion  $Zn^{2+}$ , molécule d'eau qui sera par la suite activée par un résidu glutamate de proximité et pourra ainsi réaliser une attaque nucléophile sur la liaison peptidique.[169] Ces mécanismes seront décrits plus en détail dans le chapitre suivant.

Du fait de l'absence de nucléophile catalytique, il est alors impossible d'utiliser les sondes ABP précédemment décrites et construites autour d'une tête réactive contenant un résidu électrophile. Ainsi, dans le but de marquer ces enzymes de manière covalente, différentes stratégies ont été mises en place, basées sur le design de nouvelles têtes permettant de chélater l'ion  $Zn^{2+}$  et conférant ainsi à ces sondes leur spécificité pour les métalloprotéases.

Parmi les motifs chimiques utilisés pour le ciblage de métalloprotéases, trois groupements ont été retenus : (Fig. 53)

- Le groupement hydroxamate
- Le groupement carboxylate
- Le groupement phosphinate

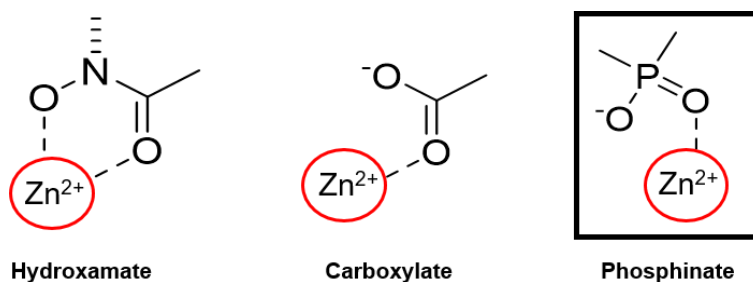


Figure 53 : Structure des différents groupements chimiques utilisés pour le ciblage de l'atome de zinc des métalloprotéases

Le groupement hydroxamate est le premier à avoir été utilisé. Bien que très efficace, ce groupement a vite démontré certains problèmes de sélectivité. En effet, c'est un groupement bidentate, avec un très fort pouvoir chélatant pour l'ion zinc, et pouvant également être impliqué dans des liaisons hydrogènes avec des résidus de proximité via le doublet non liant de l'azote. Ainsi, ce groupement est particulièrement spécifique des métalloprotéases, mais il ne permet en aucun cas de les cibler de manière individuelle. De ce fait, d'autres motifs chimiques, monodentates et possédant un pouvoir chélatant plus faible, ont été développés, permettant de rééquilibrer les propriétés de sélectivité de la sonde entre la tête réactive et le corps de la

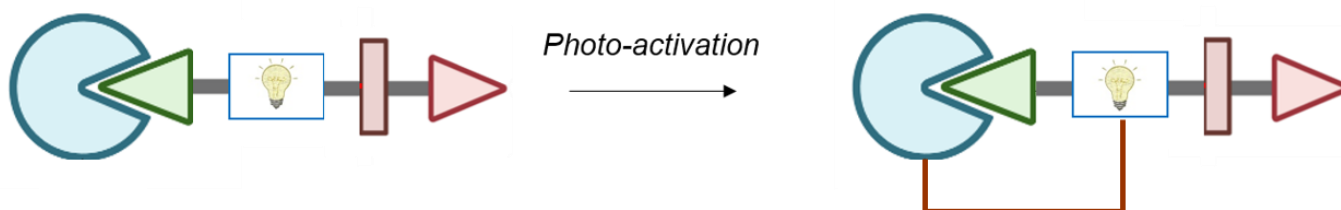
sonde et ainsi obtenir des sondes ABP capable de discriminer les métalloprotéases entre-elles. Le groupement phosphinate est alors devenu le motif de choix pour le design de ce type de sondes. Cependant, ces différents groupements ne permettant qu'une interaction d'affinité entre la sonde et l'enzyme, diverses stratégies annexes, ne reposant pas sur la réactivité de la tête de la sonde, ont donc dû être développées dans le but de promouvoir le marquage covalent de ces métalloprotéases.

### **a. Les sondes photoactivables**

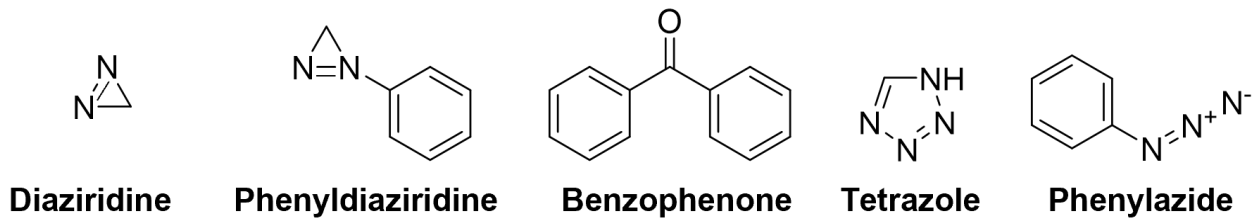
Une des avancées majeures concernant la technologie ABP est le développement de sondes photoactivables. Elles interviennent lorsque la liaison covalente avec la cible par réaction chimique avec le résidu catalytique n'est pas possible. (Fig. 54) Ces sondes présentent au niveau du linker un groupement dit photoactivable, permettant de générer sous irradiation UV des espèces hautement réactives telles que les carbènes, les nitrènes ou encore les radicaux libres, pouvant interagir avec tous résidus réactifs de proximité. (Fig. 55) Ces groupements photoactivables doivent répondre à certains critères essentiels : [170]

- Ils doivent générer, sous irradiation UV, un intermédiaire hautement réactif capable de créer une liaison covalente avec la protéine.
- Ils doivent être stables en milieu biologique et chimiquement inertes afin de prévenir toute forme de dégradation avant l'irradiation.
- La longueur d'onde d'absorption ne doit pas être préjudiciable pour la protéine cible, qui possède souvent une capacité d'absorption UV autour de 280nm, principalement due à la présence d'acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine ou la phénylalanine.
- Le temps de demi-vie des intermédiaires générés doit être suffisamment court pour ne pas endommager la protéine ou le complexe enzyme/sonde lors de la création de la liaison covalente.

La très haute réactivité et la faible stabilité de ces intermédiaires réactifs assurent que seule l'enzyme cible soit marquée. Parmi les groupements photoactivable les plus connus, on retrouve notamment les dérivés benzophénone, diaziridines ou encore aryl azides, les motifs diaziridine et benzophénone étant les plus couramment utilisés de par leur petite taille et leur réactivité très importante permettant un marquage efficace et rapide.[148] De plus, ces groupements possèdent une longueur d'onde d'excitation plus importante que les autres, ils nécessitent moins d'énergie pour être activés et leurs intermédiaires associés (carbène et radicaux) sont souvent plus réactifs. Il faut cependant être vigilant quant à l'utilisation de carbènes car leur très haute réactivité entraîne un potentiel quenching rapide par une molécule d'eau, ce qui peut entraîner une diminution du rendement de marquage vis-à-vis de la protéine cible.[170]

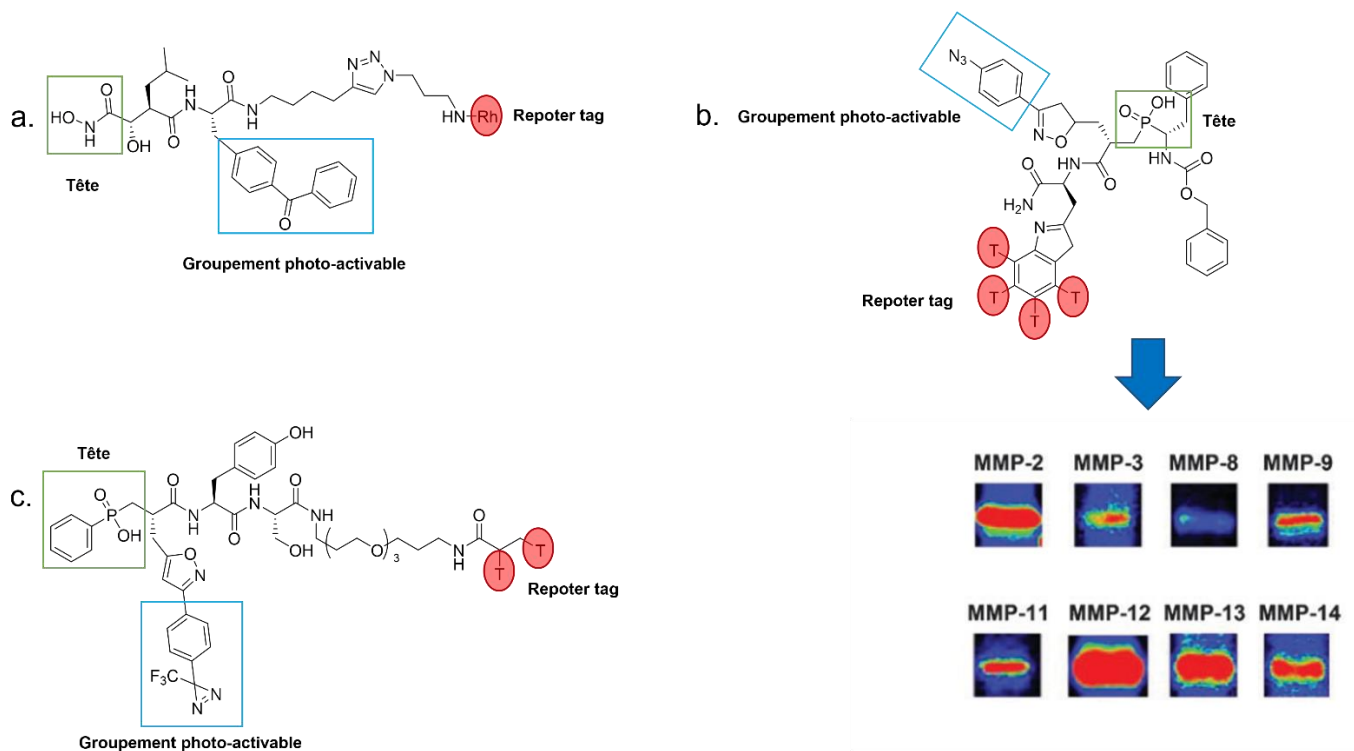


**Figure 54 : Schéma de principe des sondes photoactivables**



*Figure 55 : Structure des principaux groupements photoactivables utilisés*

Concernant le marquage de métalloprotéases, cette technologie s'est avérée salvatrice. C'est en 2004 que Benjamin Cravatt et son équipe décrivent pour la première fois une sonde ABP photoactivable pour le marquage de métalloprotéases. Cette sonde, basée sur l'utilisation d'un motif hydroxamate comme tête réactive et un groupement benzophénone pour la photoactivation a permis l'identification de plusieurs métalloprotéases surexprimées dans certains types de mélanomes invasifs, démontrant ainsi l'implication de ces enzymes dans des processus pathologiques clés tels que la tumorigénèse ou le développement métastatique.[171] (Fig. 77 a) En 2007, David et al. décrivent la première sonde ABP, dédiée au ciblage des métalloprotéases, basée sur un inhibiteur phosphinique. Cette sonde, incorporant un motif azoture de phényle comme groupement photoactivable, a permis le marquage de huit métalloprotéases matricielles exogènes pures, à une concentration de l'ordre du picomolaire.[169] (Fig. 77 b) Basés sur ces travaux, Nury et al. présentent une sonde ABP, incorporant un motif diaziridine comme groupement photoactivable, pour la détection et le marquage de quatre métalloprotéases matricielles exogènes en milieu complexes. Introduites ensemble à une concentration de 250 pmol, dans du lysat de cellules cancéreuses, leur détection a été validée par radioimagerie.[172] (Fig. 77 c)



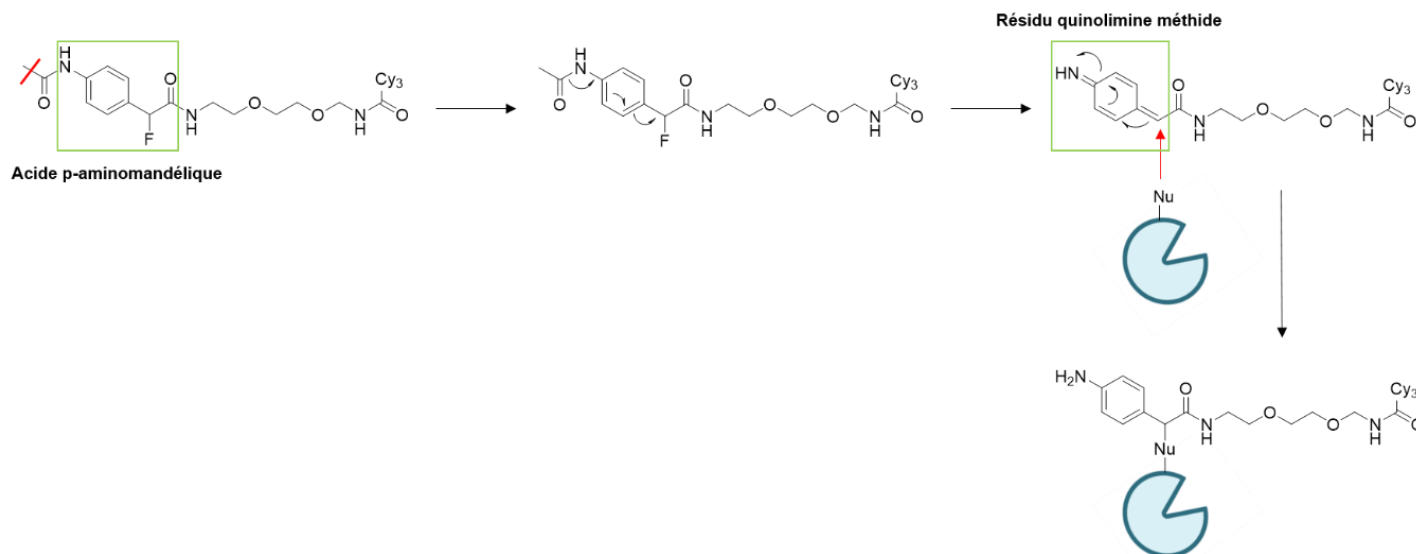
*Figure 56 : Structures des différentes sondes ABP photoactivables utilisées pour le marquage de métalloprotéases*



Cependant, malgré les résultats prometteurs obtenus grâce aux sondes photoactivables, la principale limite de cette stratégie demeure le passage à l'*in-vivo*. En effet, le marquage enzymatique étant ici tributaire d'une étape d'irradiation UV, celle-ci rend impossible tout travail *in-vivo*. Ainsi, d'autres stratégies ont dû être mises en place pour faire face à cette problématique.

### **b. Ciblage d'acides aminés nucléophiles annexes**

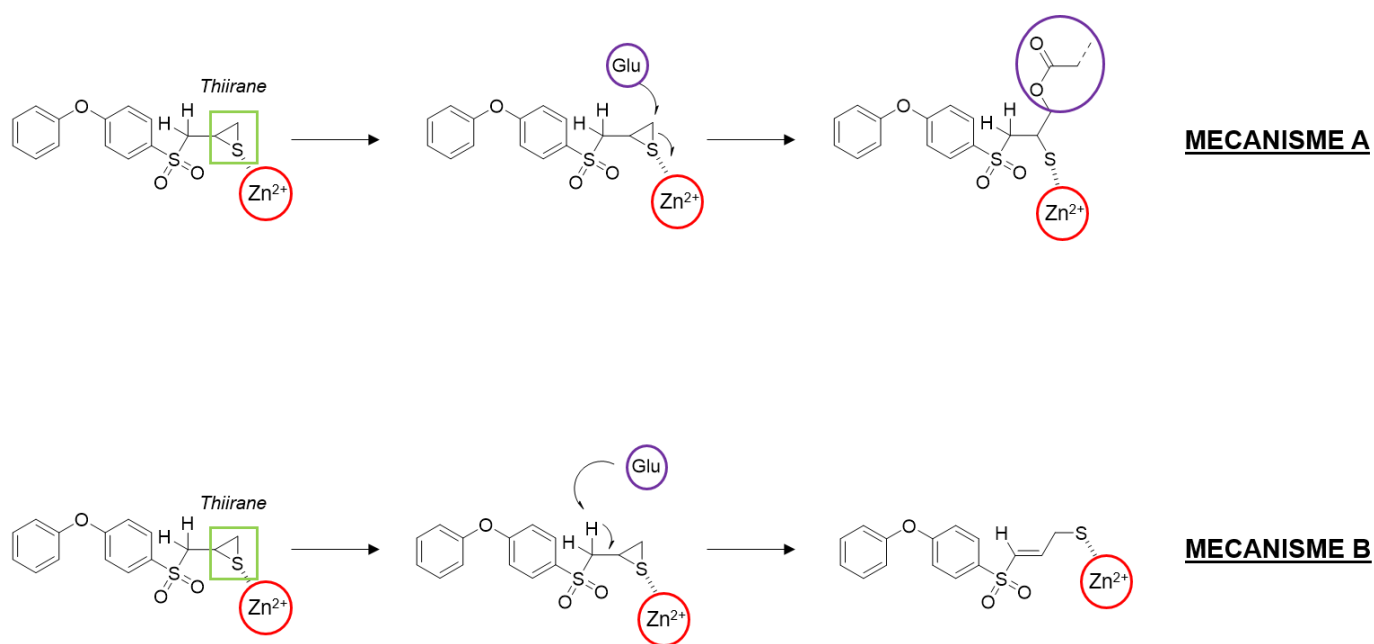
Une des stratégies les plus évidentes fut alors de tenter de trouver un compromis entre la technologie Substrate-based et la technologie Activity-based. Il fut ainsi designé des sondes ABP incorporant un motif réactif permettant la liaison covalente mais dont la tête réactive avait été remplacée par un motif substrat de l'enzyme cible. La spécificité de ces sondes repose donc sur la nature du substrat et non plus sur le mécanisme enzymatique. Expérimentalement, l'interaction entre la sonde et l'enzyme provoque l'hydrolyse de la partie substrat, libérant ainsi un intermédiaire réactif qui pourra alors réagir de manière covalente avec un résidu de proximité et ainsi marquer la protéine. Cet intermédiaire est initialement un dérivé du groupement acide p-aminomandélique, groupement qui, à la suite de l'hydrolyse de la partie substrat, pourra se réarranger afin d'aboutir à un motif quinolimine méthide, qui lui est réactif. La liaison covalente se fait donc via l'attaque d'un résidu nucléophile de proximité sur l'intermédiaire quinolimine. (Fig. 57) Il faut noter que seule l'hydrolyse contrôlée de la partie substrat provoque la libération de cet intermédiaire réactif, toute hydrolyse sur une autre partie de la sonde n'aboutirait pas à son activation. Cependant, il est difficile d'obtenir un substrat spécifique d'une seule classe d'enzymes, voire d'une seule enzyme. Ainsi, bien que prometteuse, cette stratégie n'a pas été développée pour le marquage des métalloprotéases, du fait d'un manque de sélectivité.[173]



**Figure 57 : Schéma de principe des sondes ABP basées sur l'activation d'un motif quinolimine**

La seconde stratégie proposée est l'utilisation de résidu thiirane dans le but de cibler le résidu glutamate à proximité du site actif, résidu conservé dans toutes les métalloprotéases. Le groupement thiirane a démontré de fortes propriétés d'inhibition dans le cas des métalloprotéases matricielles et plus particulièrement les gélatinases ou collagénases, avec un IC<sub>50</sub> de l'ordre du nanomolaire. Ces sondes sont donc basées sur l'ouverture du motif thiirane, qui joue également le rôle d'agent chélatant de l'ion zinc.

Cette ouverture est rendue possible par la liaison de coordination entre l'atome de soufre et  $Zn^{2+}$  qui déstabilise le cycle thiirane et provoque donc sa rupture selon deux mécanismes possibles. Ces deux mécanismes tirent profit du caractère acide de Lewis de l'ion zinc présent dans le site actif. Dans un premier cas, mécanisme A, le résidu glutamate joue le rôle de nucléophile et attaque le carbone le plus électrophile du cycle, créant ainsi la liaison covalente avec l'enzyme. Dans un second cas, le mécanisme B implique l'arrachement d'un proton à proximité du cycle thiirane par le glutamate, entraînant l'ouverture du cycle par  $\beta$ -élimination et la formation d'un allythiolate. (Fig. 58) Malheureusement, les diverses expériences menées ont démontré que dans le cas des métalloprotéases matricielles, seul le mécanisme B se produisait, rendant donc impossible tout marquage covalent de l'enzyme via cette stratégie.[174] En revanche, cette approche s'est avérée très efficace dans le cas des métallocarboxypeptidases, où les expériences menées ont démontré que, dans ce cas, seul le mécanisme A se produisait, permettant donc la création d'une liaison covalente avec l'enzyme. Testero et al. décrivent ainsi la synthèse et la structure d'un inhibiteur thiirane irréversible de la métallocarboxypeptidase A issue de pancréas humain.[175]



*Figure 58 : Schéma de principe des sondes ABP basées sur l'utilisation d'un motif thiirane*

Dernièrement, M. Bogyo et son équipe ont décrit la synthèse de sondes ABP pour le ciblage de métalloprotéases matricielles via l'interaction avec un résidu cystéine non naturel. Cette stratégie est basée sur l'introduction artificielle d'un résidu cystéine à proximité du site actif, sans modification notable de l'activité enzymatique. Les sondes utilisées présentent alors une tête hydroxamate, en tant qu'agent chélatant de l'ion zinc, afin de permettre une interaction sélective avec les métalloprotéases, et un groupement électrophile de type chloroacétamide pour la réaction sélective avec le groupement thiol. (Fig. 59) Ils ont ainsi validé le marquage de deux métalloprotéases matricielles, la MMP-12 et la MMP-14, dont la forme modifiée a été directement transfectée dans diverses lignées cellulaires. [176]

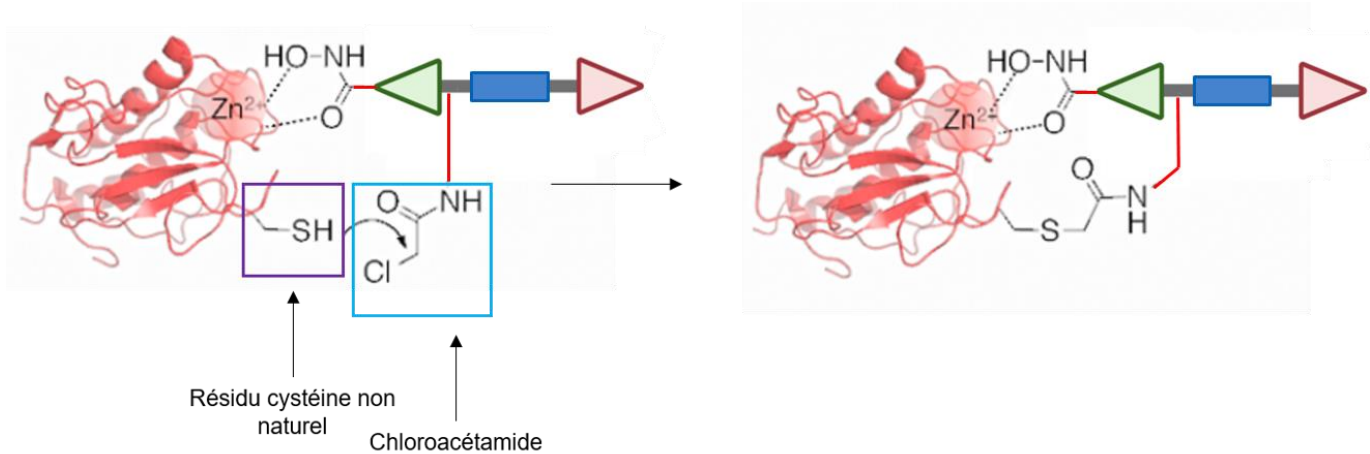


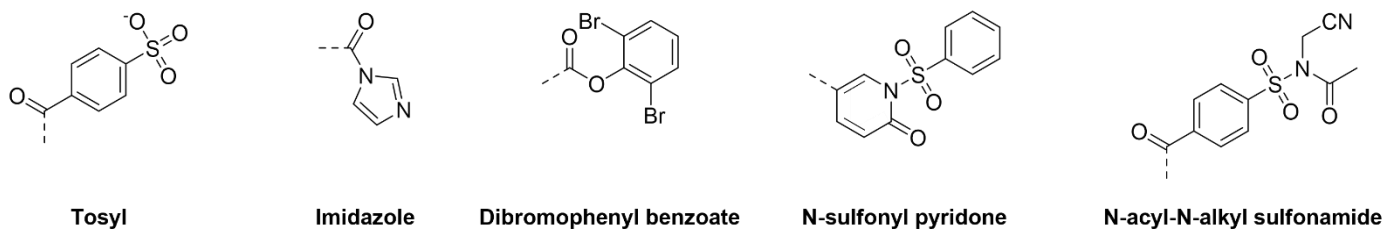
Figure 59 : Schéma de principe de l'utilisation de sonde ABP via l'introduction d'un résidu cystéine

Cependant, malgré des résultats prometteurs, cette technologie implique de manière systématique l'ingénierie génétique ex-vivo de l'enzyme, et donc une impossibilité de transférer la technologie à un marquage *in-vivo*.

### c. Utilisation de linkers réactifs

Malgré la diversité de stratégies développées pour le marquage de métalloprotéases, aucune d'entre elles n'offre aujourd'hui de solution viable aux problématiques de sélectivité ou à la limitation au marquage *ex-vivo* décrites précédemment. De ce fait, Hamachi et al. ont proposé dernièrement l'incorporation directe sur le squelette de la sonde d'un groupement électrophile inclus dans le linker, capable de réagir de manière covalente avec un résidu nucléophile de proximité une fois le complexe enzyme/sonde formé. Cette stratégie permet l'inhibition réversible de l'enzyme cible, sans modification de son activité naturelle ni interaction covalente avec le site actif, tout en promouvant le transfert dirigé et covalent du marqueur sur la chaîne latérale d'un acide aminé de proximité présent dans le domaine catalytique. Une fois le transfert du tag effectué, le site actif est libéré, permettant à l'enzyme de retrouver son activité et sa fonction naturelle. C'est à ce jour une des seules approches qui pourrait permettre le marquage et la détection de métalloprotéases endogènes en milieux biologiques complexes, sans manipulation génétique de la protéine au préalable. On parle alors de chimie « ligand-directed ».[177] Cinq motifs électrophiles ont à ce jour été décrit par l'équipe d'Hamachi, basés sur cinq groupements chimiques différents : (Fig. 60)

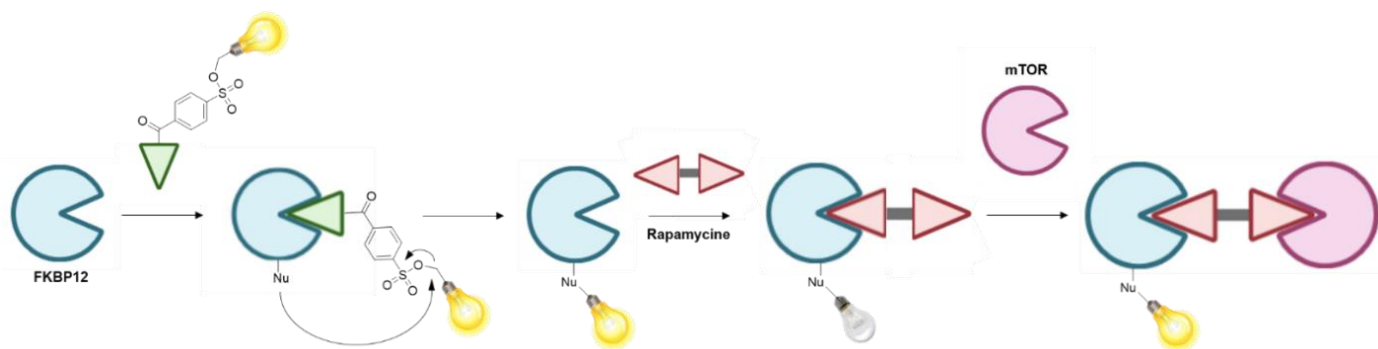
- Le groupement tosyl
- Le groupement imidazole
- Le groupement dibromophényl benzoate
- Le groupement N-sulfonyl pyridone
- Le groupement N-acyl-N-alkyl sulfonamide



**Figure 60 : Structure chimique des différents spacers réactifs développés par Hamachi et al.**

Chacun de ces groupements électrophiles réagit selon un mécanisme et une cinétique qui lui est propre, tout en présentant une sélectivité particulière pour certains acides aminés canoniques. Ainsi, le groupement tosyl réagit selon un mécanisme de type  $S_N2$  avec des acides aminés nucléophiles tels que l'histidine, la tyrosine, le glutamate, l'aspartate ou encore la cystéine. Il est à noter que les stratégies de modification spécifique des résidus aspartate et glutamate sont rares, faisant de la stratégie « Tosyl-Directed Chemistry » une opportunité unique pour la dérivatisation chimique et dirigée de groupements carboxyles. Cependant, la chimie associée au groupement tosyl souffre d'une cinétique de réaction lente et atteint ses principales limites face au marquage de protéines membranaires. D'un autre côté, les groupement imidazole et dibromophényl benzoate réagissent selon un mécanisme d'acylation et présentent des cinétiques réactionnelles plus rapides. Le groupement imidazole modifie ainsi efficacement les résidus lysine, sérine et tyrosine et a démontré son efficacité face au marquage de protéines membranaires et transmembranaires, offrant un plus large panel de cibles accessibles. Les groupements dibromophényl benzoate et N-sulfonyl pyridone, quant à eux, sont plus particulièrement utilisés pour le marquage de protéines intracellulaires et protéines membranaires présentes à la surface des cellules. Le motif N-acyl-N-alkyl sulfonamide est le dernier à avoir été développé. Il présente la meilleure cinétique réactionnelle, une excellente biocompatibilité et s'est avéré particulièrement efficace pour le marquage de tous types de protéines endogènes dont les protéines membranaires ou intracellulaires.

Expérimentalement, la chimie « Tosyl-directed » a été utilisée par Hamachi et al. pour le marquage fluorescent et la détection de l'enzyme FKBP12, une enzyme capable d'interagir avec certains antibiotiques, *in-vitro* et *in-vivo*. Ce marquage a notamment permis d'étudier l'interaction de cette enzyme avec son ligand, la rapamycine, *in-vitro*, mais également de caractériser l'aspect dynamique de la complexation endogène de la rapamycine avec FKBP12 et mTOR dans différentes lignées cellulaires, via imagerie FRET.[178] (Fig. 61)



**Figure 61 : Schéma de principe de la chimie "Tosyl-Directed" via l'application à l'étude de l'interaction entre l'enzyme FKBP12, mTOR et la rapamycine**

Le groupement imidazole a été développé par Hamachi et son équipe, principalement pour répondre à la problématique du marquage en milieu biologique complexe des protéines membranaires et transmembranaires, notamment les récepteurs couplés aux protéines G ou encore l'anhydrase carbonique 12, une métalloprotéase intracellulaire surexprimée dans les cellules tumorales. Le marquage de la métalloprotéase a été validé en présence et en absence d'inhibiteur et le site de marquage identifié par spectrométrie de masse, après digestion enzymatique. L'utilisation de sondes ABP portant cet électrophile a également permis la détermination de la demi-vie de ces protéines et l'identification de leur mécanisme de dégradation.[179] (Fig. 62)

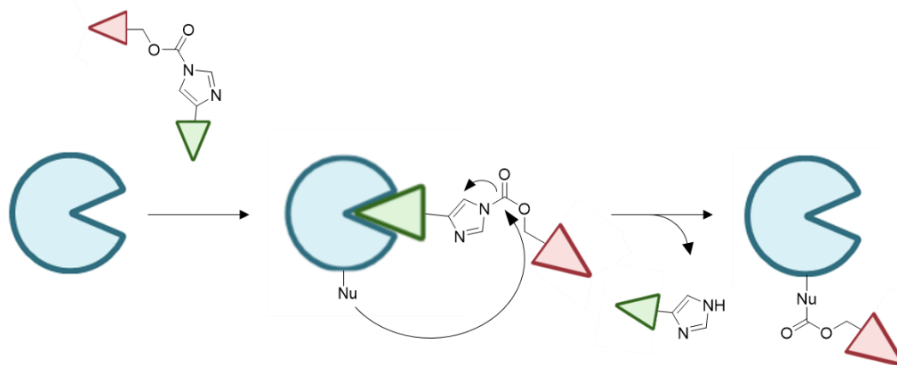


Figure 62 : Schéma de principe de la chimie "Ligand-Directed Imidazole"

Le groupement dibromophényl benzoate est le plus stable des linkers électrophiles développés avec un taux d'hydrolyse plus faible en conditions biologiques. Il a été principalement utilisé par Hamachi et al. pour le marquage des anhydrase carbonique 2 et 12 endogènes dans des lignées de cancer mammaire humaines. L'identification du site de marquage a pu démontrer une très forte affinité du groupement dibromophényl benzoate pour les résidus lysine et histidine, lui conférant une spécificité plus importante que les groupements précédemment introduits.[180] (Fig. 63)

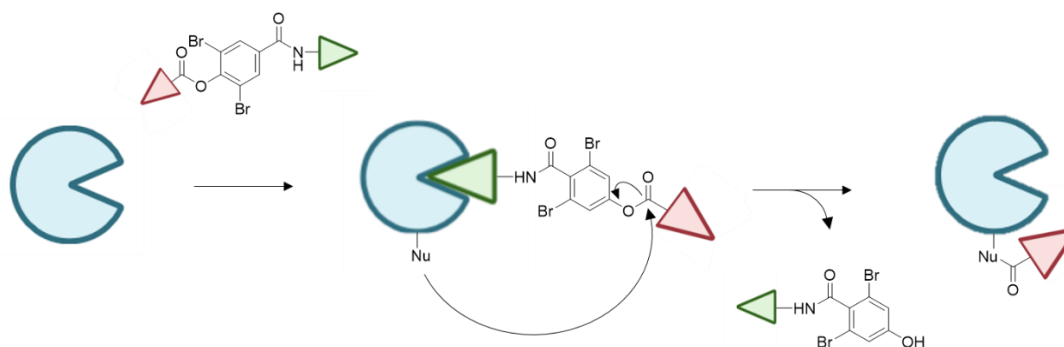


Figure 63 : Schéma de principe de la chimie "Ligand-Directed Dibromophényl Benzoate"

Le groupement N-sulfonyl pyridone, quant à lui, présente une faible réactivité intrinsèque, en comparaison des précédents groupements électrophiles. Ainsi, la réactivité de ce composé est forcée par la chimie de proximité, uniquement possible lors de la formation du complexe enzyme/sonde, réduisant ainsi considérablement les risques de marquage non spécifique. De plus, ce groupement possède une cinétique réactionnelle entre 2 et 5 fois supérieure à celle mesurée avec les groupements tosyl et imidazole. Le motif N-sulfonyl pyridone a ainsi été utilisé par Hamachi et son équipe pour le marquage des anhydrases

carboniques humaines 2 et 12 dans des lignées de cancer mammaire. Enfin, l'identification du site de marquage par spectrométrie de masse a montré une affinité particulière pour les résidus lysine et tyrosine. Il a cependant été démontré que dans le cas d'une affinité commune pour un même acide aminé entre deux groupements électrophiles, le marquage issu de ces groupements avait respectivement lieu sur deux résidus distincts, permettant ainsi d'élargir le répertoire des fragments peptidiques signatures.[181] (Fig. 64)

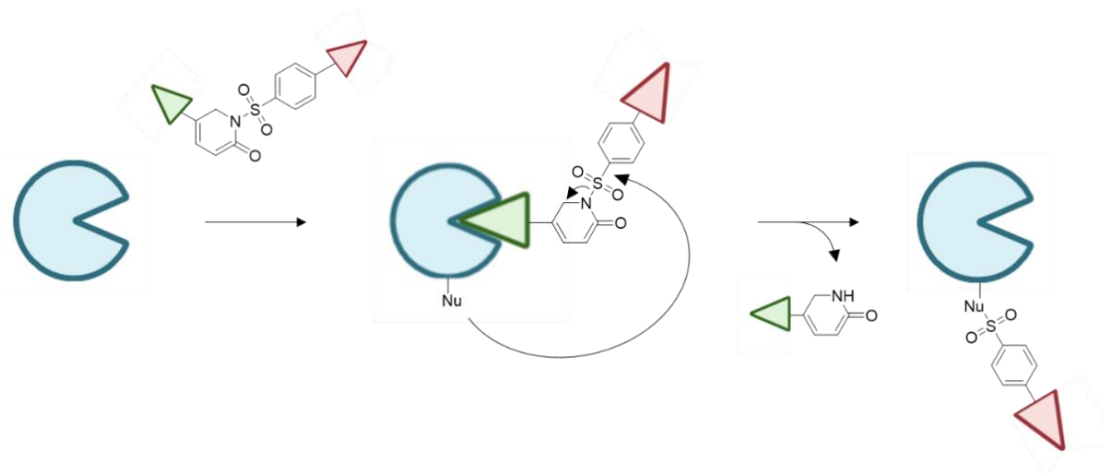


Figure 64 : Schéma de principe de la chimie "Ligand-Directed Sulfonyl Pyridone"

Dernièrement, le groupement N-acyl-N-alkyl sulfonamide est l'électrophile qui présente la cinétique de réaction la plus rapide, comparable aux réactions de bioconjugaison les plus efficaces telles que les réactions de Diels-Alder ou les cycloadditions. C'est également le groupement qui présente la réactivité intrinsèque la plus importante, lui attribuant ainsi comme désavantage majeur la problématique de marquage non spécifique. Il a été expérimentalement validé pour le marquage de la protéine exogène FKBP12 avant d'être utilisé pour des tests de binding ayant pour but le design d'un nouvel inhibiteur de la protéine chaperonne Hsp90, protéine impliquée dans les processus de tumorigénèse, d'inflammation ou encore dans le développement de pathologies neurodégénératives. Les résultats obtenus pour le marquage de cette protéine dans des lignées cancéreuses ont pu démontrer une spécificité quasi- exclusive de ce motif électrophile pour les résidus lysine.[182] (Fig. 65)

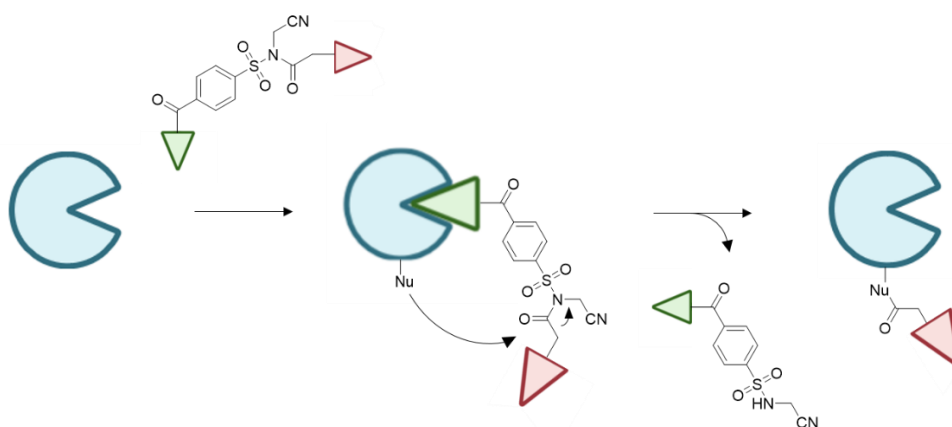


Figure 65 : Schéma de principe de la chimie "Ligand-Directed NASA"

# CHAPITRE 4 : Les métalloprotéases matricielles

## I. Généralités

### a. Contexte historique

C'est en 1962 que naît le concept de métalloprotéase matricielle. En effet, Gross et Lapierre décrivent pour la première fois l'existence d'une enzyme responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire et plus particulièrement du collagène.[183] Cette nouvelle enzyme fut la première des 23 métalloprotéases matricielles recensées chez l'Homme et elle devint la MMP-1. Il a cependant fallu attendre 1993 pour que leur mécanisme d'activation et de fonctionnement soient parfaitement décrits [184] et 1994 pour l'obtention de la première structure cristalline des MMPs.[185] Suite à ces travaux, une liste de cinq critères a été établie, définissant les conditions d'appartenance à la famille des métalloprotéases matricielles :

- Présenter des homologies de séquences ADN avec la MMP-1
- Être activé par des protéases
- Posséder un mécanisme catalytique basé sur la présence d'un ion zinc
- Hydrolyser au moins l'un des composants de la matrice extracellulaire
- Être inhibé par au moins l'un des TIMPs, inhibiteurs naturels des métalloprotéases

Dépendamment de leur séquence, leur structure ou encore leur substrat, les MMPs peuvent être réparties en six sous-groupes :

- **Les collagénases**, qui regroupe les MMPs 1, 8, et 13, soit les MMPs capables d'hydrolyser notamment le collagène de type I, II, III, VII, VIII et X, la gélatine et la fibronectine
- **Les gélatinases**, qui regroupe les MMPs 2 et 9, soit les MMPs capables d'hydrolyser notamment le collagène de type IV, V, VII, IX et la fibronectine. Ces MMPs fonctionnent de manière synergique avec les collagénases
- **Les stromélysines**, qui regroupe les MMPs 3, 10, 11, 7 et 26, soit les MMPs capables d'hydrolyser notamment le collagène membranaire, les glycoprotéines de la matrice extracellulaire, le collagène de type I et IV, la gélatine, l'élastine et la laminine
- **Les MMPs membranaires**, qui regroupe les MMPs 14, 15, 16, 17, 24 et 25. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine transmembranaire en C-terminal de la séquence
- Les MMPs qui n'appartiennent à aucun des groupes susmentionnés soit les MMPs 12, 18, 19, 21, 27 et 28

Les MMPs sont donc des protéases et plus particulièrement, des endopeptidases appartenant à la grande famille des protéases metzincines, une famille d'endopeptidases multi-domaines, zinc-dépendantes. Le terme endopeptidase désigne une protéase capable d'hydrolyser les liaisons peptidiques au milieu d'une séquence protéique. [186] (Fig. 66)

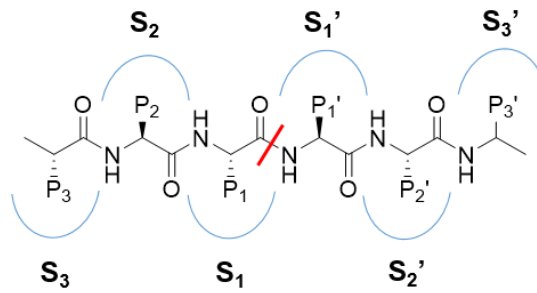


Figure 66 : Nomenclature associée aux protéases où S représente les sites d'interaction au sein de l'enzyme et P les zones correspondantes sur la séquence substrat

À ce jour, six sites d'interaction ont été recensés au sein de la structure des MMPs. On parle de « binding pocket ». (Fig. 66) Les poches  $S_1$ ,  $S_2$  et  $S_3$  sont situées vers l'extrémité N-terminale par rapport au site actif, les poches  $S_1'$ ,  $S_2'$  et  $S_3'$  vers l'extrémité C-terminale. Les molécules qui interagissent avec les MMPs sont ainsi nommées en fonction de leur site d'interaction avec l'enzyme.[187]

### **b. Structure des MMPs**

Toutes les protéases metzincines sont caractérisées par la présence d'un atome de zinc dans leur site actif et une séquence commune et conservée en C-ter du domaine catalytique : HEXXHXXGXXH. Cette séquence comporte notamment les trois résidus histidine, chélatant l'ion  $Zn^{2+}$ , un résidu glutamate impliqué dans le mécanisme catalytique et une glycine, rigoureusement conservée au sein de toutes les protéases de cette famille. De plus, toutes ces enzymes possèdent un résidu méthionine sous l'ion zinc catalytique, inclus dans une séquence appelée le « Met-Turn ».[188] Celui-ci, localisé dans la poche  $S_1$  est principalement responsable de l'arrangement tridimensionnel autour de l'ion zinc catalytique. (Fig. 67)

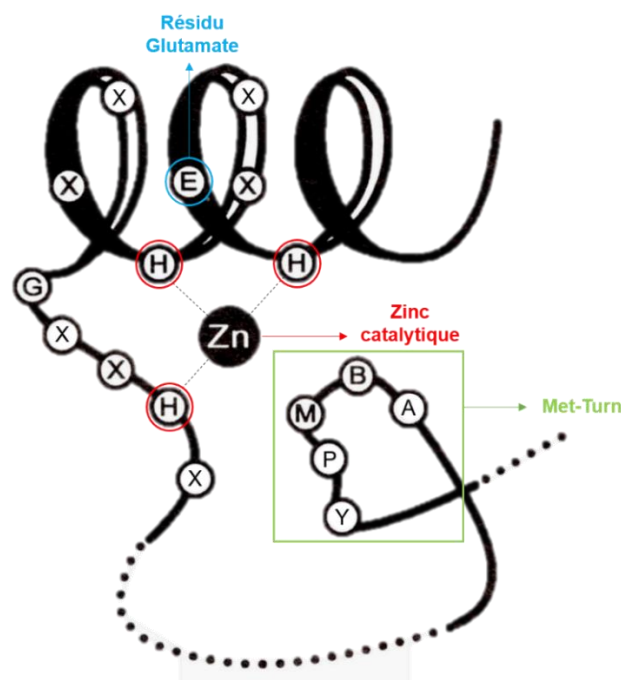


Figure 67 : Schéma général de la structure du domaine catalytique des protéases metzincines - [189]



Les métalloprotéases matricielles sont des enzymes multi-domaines et leur structure a été en grande partie conservée au cours de l'évolution et au sein des 23 enzymes. (Fig. 68) Cette structure minimale est composée du prodomaine, du peptide signal, responsable de leur sécrétion, et du domaine catalytique. Peuvent alors venir s'ajouter d'autres domaines tels que les domaines fibronectine ou hémopexine, jouant un rôle lors de l'interaction entre les MMPs et leurs substrats, ou encore un domaine transmembranaire. Le prodomaine et le domaine catalytique sont les deux domaines les plus importants au sein de la structure des MMPs. En effet, le prodomaine est une séquence d'environ 80 acides aminés présentant en C-ter une séquence conservée, PRCGVDP, contenant un résidu cystéine jouant le rôle de quatrième ligand de l'ion zinc et le maintenant ainsi indisponible à toute autre liaisons de coordination. C'est donc le prodomaine qui maintient la MMP sous forme inactive. Le domaine catalytique, quant à lui, est composé d'environ 170 acide aminés et contient notamment, deux ions zinc, un catalytique et un structural, et trois ions calcium structuraux. [190]

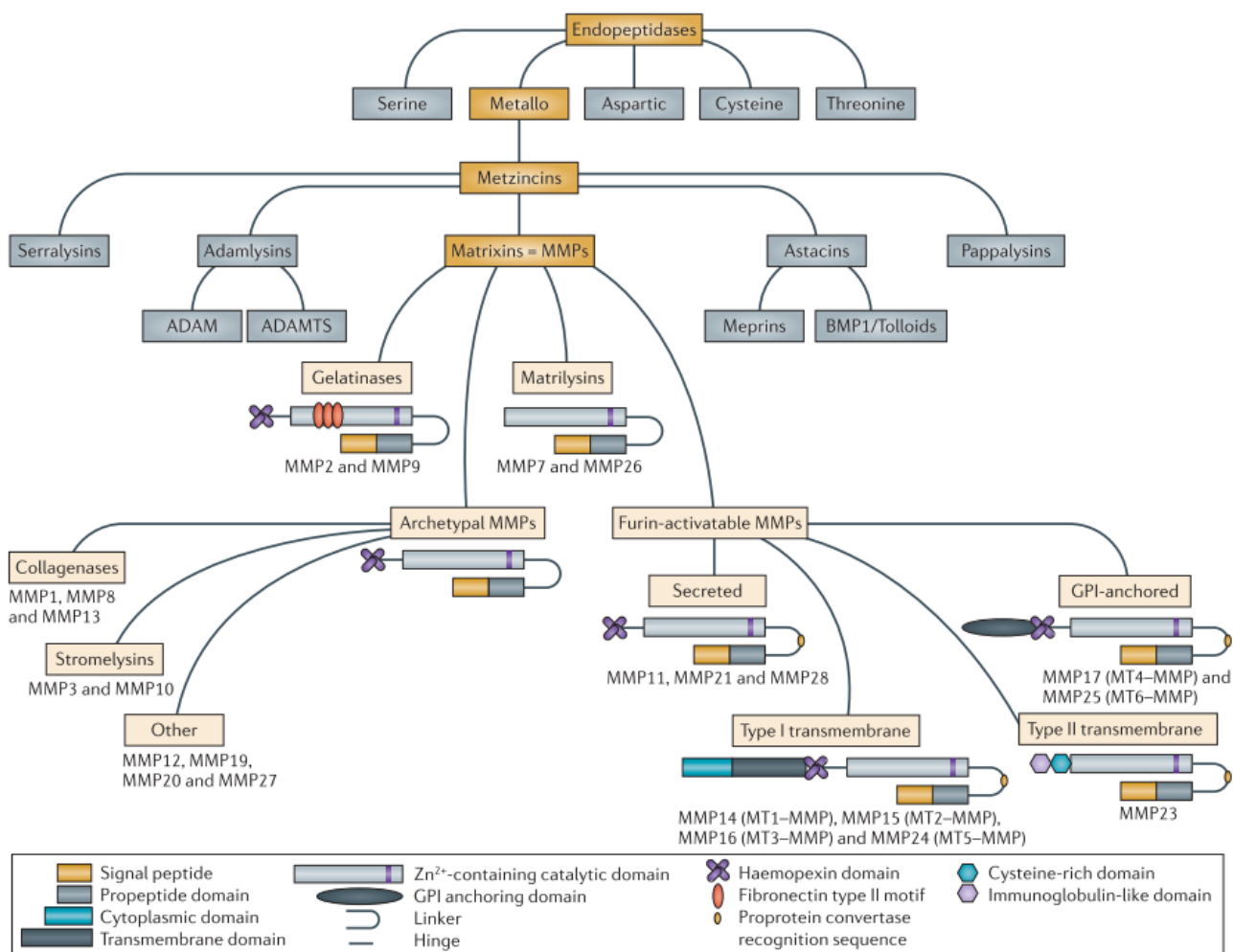
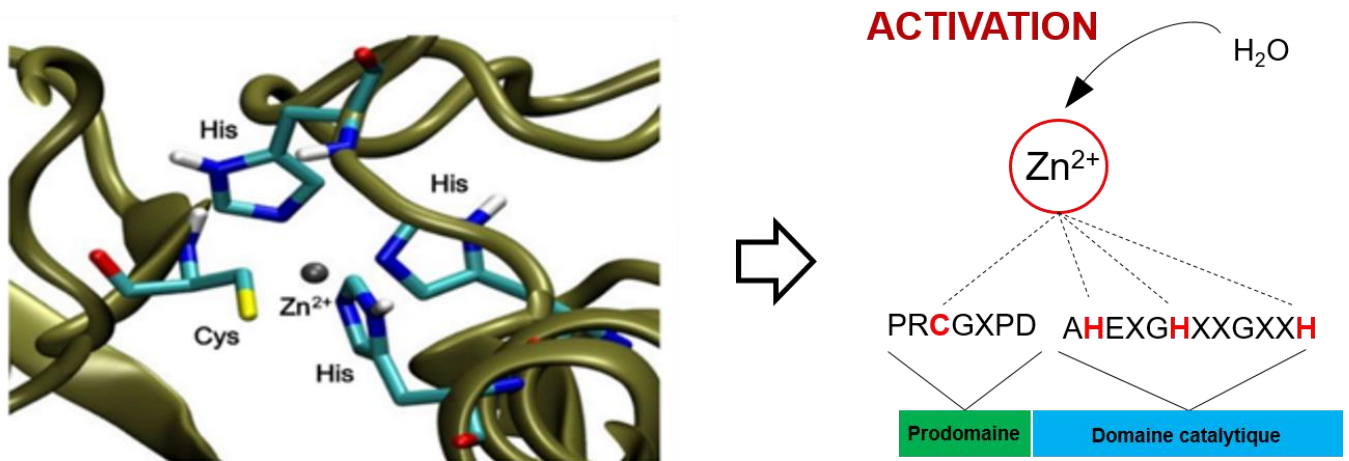


Figure 68 : Structure générale des MMPs au sein de la famille des protéases metzincines - [190]

### c. Mécanisme d'activation et inhibition

Les MMPs étant capables d'hydrolyser les composants de la matrice extracellulaire, il est primordial que leur activation et leur activité protéolytique soit rigoureusement contrôlées, afin d'éviter la destruction pure et simple des tissus. Les MMPs sont sécrétées sous la forme de zymogènes inactifs, appelé proforme, dont la transcription est principalement contrôlée par différents facteurs de croissance ou cytokines inflammatoires.

D'autres facteurs tels que la forme des cellules, un changement dans la signalétique cellulaire ou encore le stress cellulaire peuvent moduler la transcription des MMPs.[191] Ces enzymes sont activées de manière extracellulaire par clivage protéolytique du prodomaine. On parle alors de « Cystein Switch » à la suite de la disparition du résidu cystéine chélatant l'ion zinc. Celui-ci devient alors disponible pour une nouvelle liaison de coordination. Le mécanisme catalytique des MMPs est donc basé sur l'immobilisation d'une molécule d'eau par chélation avec l'ion zinc, puis après déprotonation par le résidu glutamate de proximité, l'ion hydroxyle ainsi généré attaque la liaison amide, provoquant sa rupture.[192] (Fig. 69)



*Figure 69 : Activation de MMPs par "Cystein Switch"*

La régulation de la présence et de l'activation des différentes MMPs se fait préférentiellement par l'action de leurs inhibiteurs naturels et spécifiques, les TIMPs ou « Tissue Inhibitor of Metalloprotease ». Conjointement, d'autres molécules, considérées comme des inhibiteurs large spectre, participent également à la régulation de l'activation des MMPs, tels que l' $\alpha$ -macroglobuline dans le plasma.

C'est en 1972 qu'est décrit pour la première fois un inhibiteur endogène spécifique des métalloprotéases, inhibiteur qui deviendra par la suite le TIMP-1.[193] A ce jour, les TIMPs sont une famille de quatre glycoprotéines, entre 21 et 29kDa. Les TIMPs 1, 2 et 4 sont des protéines solubles et circulantes alors que le TIMP-3 est insoluble et enchâssé dans la matrice extracellulaire.[194] Tous les TIMPs partagent une structure similaire et notamment un domaine N-terminal contenant six cystéines assemblées en trois ponts disulfures. C'est d'ailleurs cet arrangement spécifique de ponts disulfures qui interagit avec le site actif et permet donc l'inhibition de l'enzyme, à l'image du prodomaine.[195] (Fig. 70) De même que pour les MMPs, l'expression et la transcription des TIMPs est contrôlée par de nombreux facteurs dont différents facteurs de croissance, cytokines ou chemokines.[196]

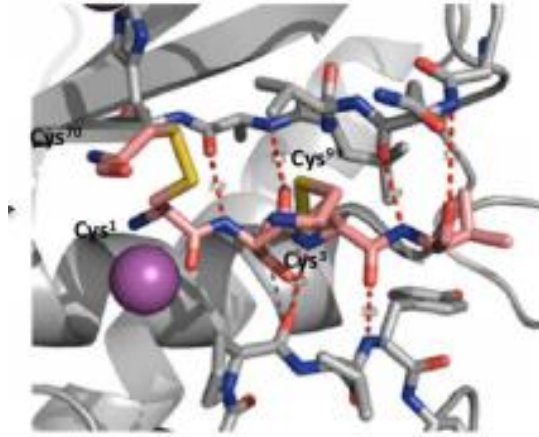


Figure 70 : Exemple d'interaction entre la partie N-terminale du TIMP-1 et le site actif de la MMP-3

## **II. MMPs et pathologies associées**

Dans les années 70, est décrit pour la première fois la surexpression de différentes MMPs pour plusieurs pathologies et cancers, et plus particulièrement dans le cas de l'arthrite rhumatoïde.[197] Depuis ces travaux, l'implication de ces enzymes dans différents processus pathologiques tels que la progression tumorale, le développement métastatique ou encore la réponse inflammatoire a été largement étudiée et documentée.[198] Ainsi, les MMPs ont été décrites comme ayant un rôle prépondérant dans la progression de nombreuses pathologies et plus particulièrement les maladies inflammatoires telles que l'emphysème pulmonaire, l'asthme, l'athérosclérose ainsi que diverse maladies cardio-vasculaires ou neurodégénératives.[199][200][201] Tous ces travaux nous ont donc mené à la conclusion que les métalloprotéases matricielles pouvaient alors servir d'indicateurs quant aux stades pathologiques mais aussi de biomarqueurs pour faciliter le diagnostic et le pronostic. Nous nous focaliserons, dans cette partie, sur le lien entre les MMP-3, 12 et 13 avec les pathologies respiratoires inflammatoires et les pathologies dérivées de l'arthrite.

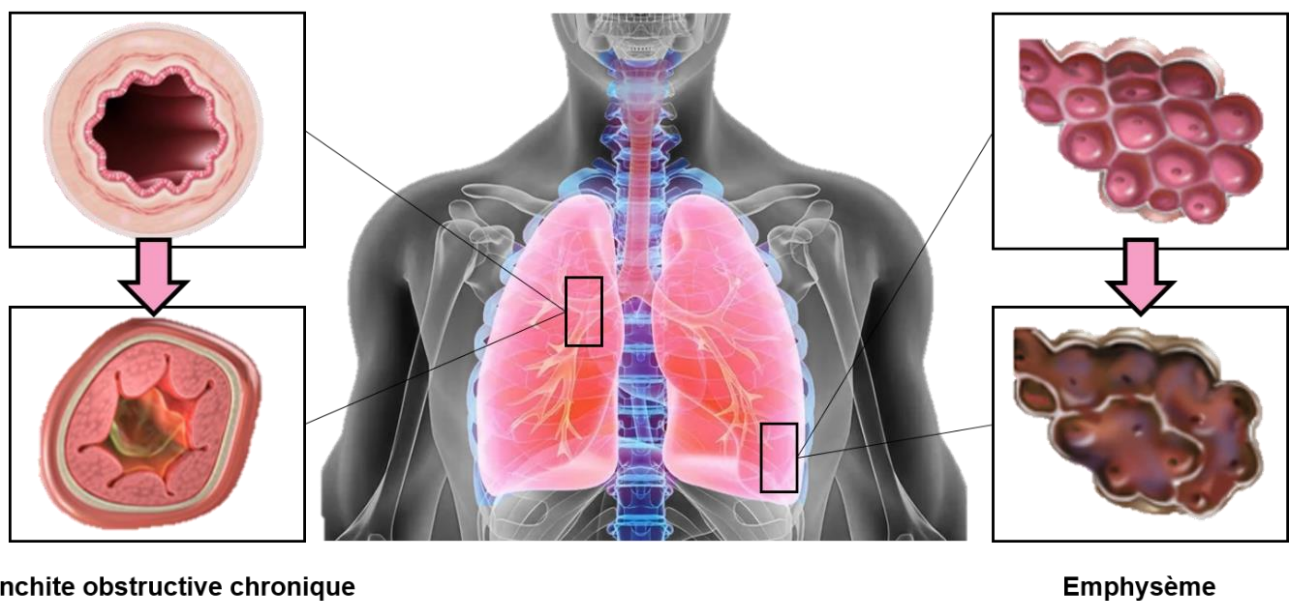
### **a. Les pathologies respiratoires inflammatoires**

Les pathologies pulmonaires obstructives chroniques ou COPD comptent parmi les causes majeures de décès dans le monde, avec environ quatre millions de décès par an, dont une majorité de personnes de plus de 40 ans. On retrouve parmi ces pathologies des formes sévères d'asthme, de bronchite ou encore d'emphysème pulmonaire qui présentent encore aujourd'hui une morbidité importante et une faible réponse aux différents traitements. Ce sont, de plus, des pathologies très favorisées et aggravées par la consommation de cigarettes. Dans un cas sain, les métalloprotéases matricielles assurent la dégradation de la matrice extracellulaire, processus normal et essentiel pour la croissance et la cicatrisation des tissus. Or, dans une dynamique pathologique, les MMPs, et tout particulièrement la MMP-12, ou macrophage élastase, sont largement surexprimées et cette dérégulation de leur activité finit par entrainer la destruction des tissus pulmonaires.[202] En effet, la MMP-12 est sécrétée par les macrophages, notamment les macrophages pulmonaires, et les processus inflammatoires, via la réponse immunitaire, vont systématiquement de pair avec une augmentation de la population de macrophages dans la zone enflammée. Ainsi, la concentration en MMP-12 est étroitement associée à la progression pathologique et donc au stade de la maladie. De plus,

certaines MMPs, dont la MMP-12, sont capables d'activer la sécrétion de cellules inflammatoires, via l'activation ou l'inhibition de différentes cytokines, telles que les interleukines, et chémokines, dont de nouveaux macrophages qui participent alors activement à l'augmentation de la sécrétion de MMP-12.[200]

Dans le cas de l'emphysème, qui se traduit par des complications respiratoires plus ou moins sévères pouvant aller jusqu'au cancer pulmonaire et au décès, cette surexpression de la MMP-12 provoque une destruction du tissu pulmonaire qui s'illustre par un effondrement des parois alvéolaires. La destruction des alvéoles pulmonaires ainsi provoquée bloque les échanges gazeux ayant initialement lieu, notamment la recharge en dioxygène et le rejet du CO<sub>2</sub>, processus assurant normalement la réoxygénation du sang. Cette absence d'échanges gazeux est également souvent à l'origine d'une augmentation du volume pulmonaire pouvant provoquer des problèmes cardio-vasculaires, notamment de l'hypertension. L'asthme, quant à lui, est caractérisé de manière similaire par une inflammation des alvéoles pulmonaires, une obstruction des voies respiratoires et une restructuration des tissus pulmonaires, bien que celle-ci soit réversible.[203]

Dans un second cas, les pathologies de type bronchite sont caractérisées par des complications respiratoires souvent accompagnées de toux et d'essoufflement. Leur caractère inflammatoire se traduit principalement par une accumulation des sécrétions dans les bronches, provoquant ainsi leur épaississement et donc leur rétrécissement. De plus, l'inflammation du tissu pulmonaire finit généralement par provoquer une destruction des alvéoles pulmonaires et donc l'emphysème, ces pathologies progressant souvent en synergie. (Fig. 71)



*Figure 71 : Représentation des symptômes physiques liés aux pathologies obstructives chroniques de type emphysème et bronchite*

## **b. Les pathologies liées à l'arthrite**

Il est tout d'abord primordial de faire la différence entre arthrose et arthrite. En effet, l'arthrose est une affection mécanique de l'articulation, caractérisée par une usure graduelle du cartilage à l'origine de son inflammation. L'arthrite, en revanche, est une maladie auto-immune, caractérisée par une inflammation anormale de l'articulation et une destruction du cartilage. On retrouve plusieurs types de pathologies arthritiques, telles que la spondylarthrite, la polyarthrite ou encore l'arthrite rhumatoïde. Ces pathologies sont généralement incurables et on ne peut, à ce jour, qu'en soulager les symptômes sans vraies actions sur la cause. Elles sont caractérisées par une infiltration des cellules immunitaires, notamment les macrophages et les neutrophiles, au cœur du cartilage et des articulations, provoquant une inflammation chronique et une destruction des tissus. Cette infiltration est associée à une sécrétion accrue d'interleukines et de cytokines, et donc, par conséquent, de MMPs, notamment les MMP-1, 3, 8, 9, 13 et 14 ayant pour rôle principal la dégradation du collagène présent dans le cartilage. Dans un cas sain, le renouvellement et la restructuration de la matrice extracellulaire au sein du cartilage assure son intégrité. En revanche, dans une dynamique pathologique, la surexpression de MMPs assure non plus un renouvellement tissulaire mais sa destruction.[204] Ces MMPs sont sécrétées par les chondrocytes, cellules composant le cartilage ou par les fibroblastes contenus dans le liquide synovial, liquide visqueux en périphérie du cartilage.[201]

En résumé, on observe donc de manière chronologique une inflammation de la membrane synoviale tapissant l'intérieur de l'articulation, celle-ci entraînant un gonflement de la membrane et une surproduction de liquide synovial dans lequel sont sécrétées les cellules immunitaires et les protéases qui vont par la suite s'attaquer au cartilage. (Fig. 72)

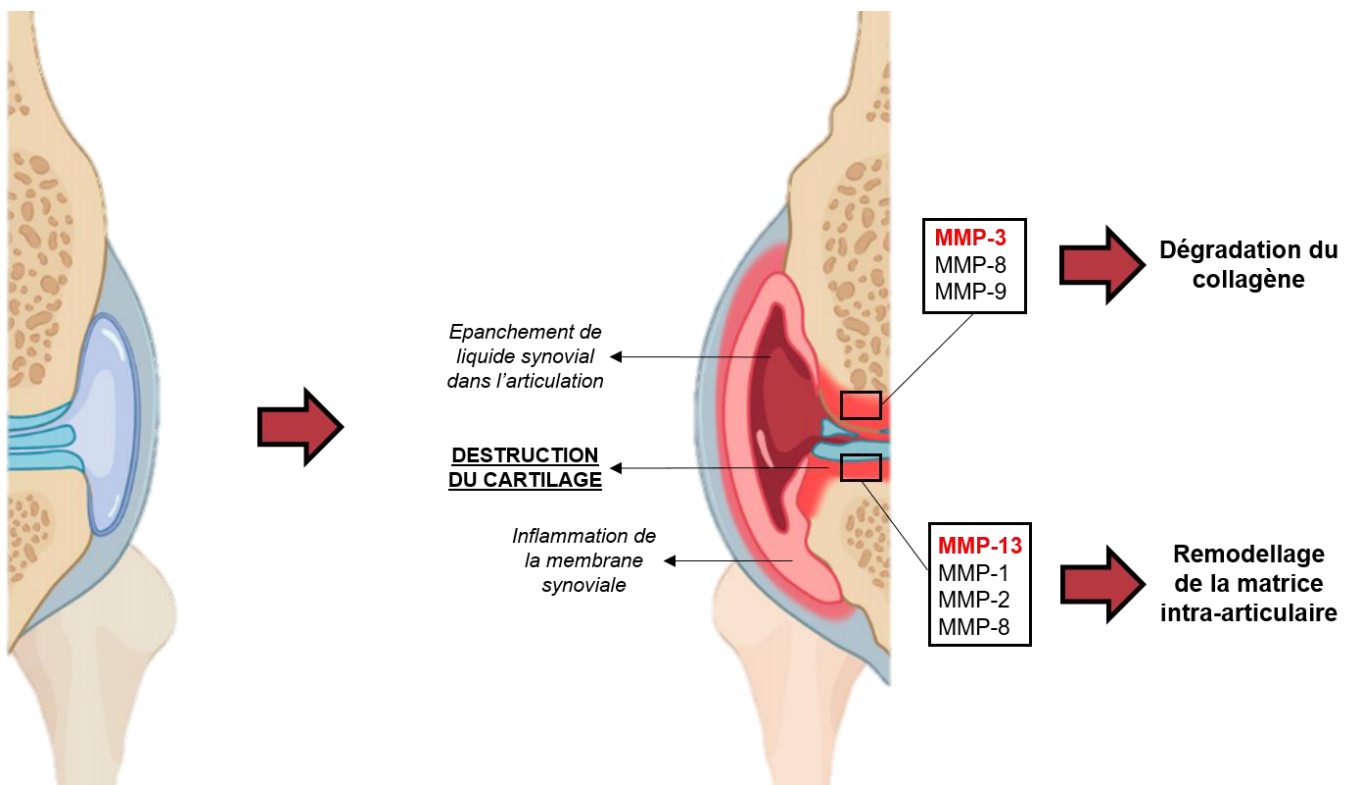


Figure 72 : Représentation des symptômes physiques liés aux pathologies de type arthrite



### **SPECTROMETRIE MALDI**

- Méthode d'ionisation douce la plus sensible et la plus adaptée à l'analyse directe d'échantillons biologiques complexes
- Cinq paramètres clefs permettant l'optimisation des protocoles d'analyse :
  - La fluence ou puissance du laser, directement liée à la quantité d'énergie transférée à l'analyte
  - La désorption des molécules d'analyte en phase gazeuse à l'origine du processus d'ionisation des composés. Cette propriété est généralement liée à la masse et à l'hydrophobie de l'analyte
  - Le type et la taille du dépôt, qui influencera la cristallisation et l'homogénéité du dépôt solide
  - L'affinité protonique, directement liée au potentiel d'ionisation de l'analyte
  - Le ratio [Matrice]/[Analyte] qui définira le seuil de sensibilité et la qualité des signaux obtenus

### **LE MARQUAGE EN SPECTROMETRIE DE MASSE**

- Possibilité de développer des marqueurs chimiques pour la dérivatisation directe de biomolécules afin de :
  - Stabiliser l'analyte ou ses fonctions labiles
  - Améliorer l'affinité protonique pour augmenter le potentiel d'ionisation
  - Augmenter l'hydrophobie de la molécule pour favoriser son insertion dans les cristaux de matrice
  - Améliorer les propriétés d'absorption UV pour faciliter le transfert énergétique
  - Augmenter la masse de l'analyte pour augmenter la résolution du spectre et la faciliter la détection des signaux cibles
  - Analyser la biomolécule dans son intégrité sans traitement ni digestion
- Utilisation du couple CHCA/CHCE pour le développement de conditions analytiques discriminantes pour le marquage enzymatique

### **STRATEGIE ACTIVITY-BASED PROBE**

- Stratégie unique permettant de cibler exclusivement les enzymes sous forme active
- Permet la caractérisation de l'activité protéolytique en milieu biologique complexe et son identification
- Détection des métalloprotéases = Limite de la technologie usuelle car pas de nucléophile catalytique
- Utilisation de sondes photoactivables pour le marquage de métalloprotéases mais impossible à transférer *in-vivo*
- Développement d'une nouvelle génération de sondes basées sur l'utilisation d'un linker réactif pour le marquage de métalloprotéases endogènes *in-vitro* et *in-vivo*





## **PARTIE B : RESULTATS ET DISCUSSIONS**



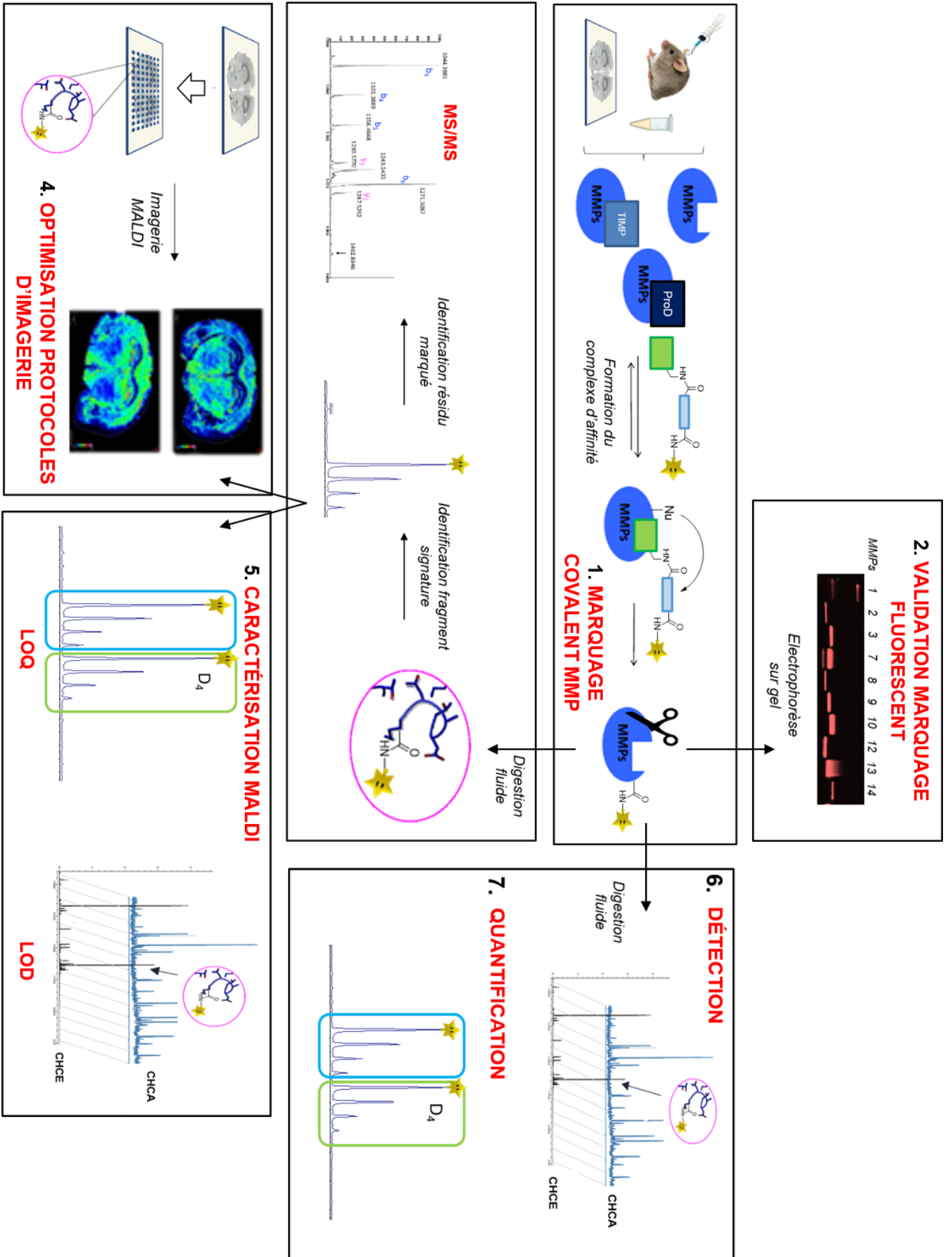


Figure 73 : Description générale du projet



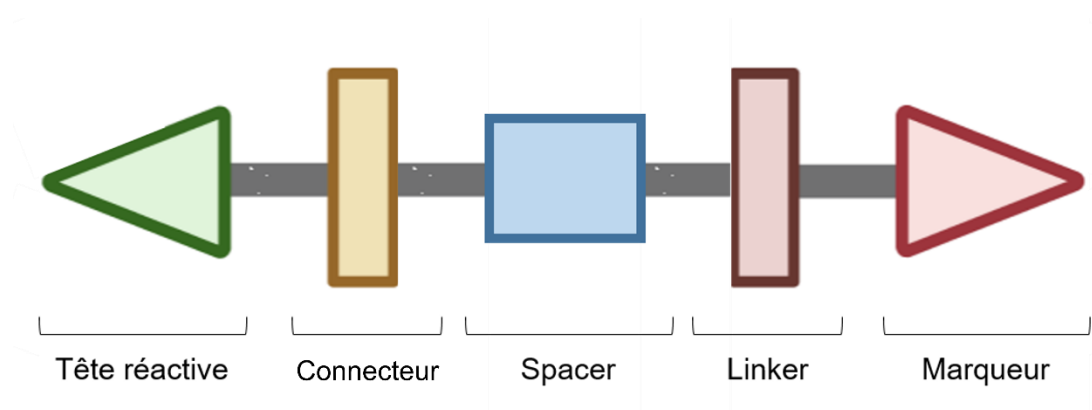
# CHAPITRE 1 : Marquage des MMPs exogènes et synthèse des fragments signatures

Une première étape a d'abord consisté à choisir la structure des sondes ABP la plus efficace pour le marquage des MMPs cibles, tout en assurant une bonne stabilité de ces sondes en conditions physiologiques. Ces travaux ont, par la suite, permis, à partir de la digestion des enzymes marquées, l'identification du résidu portant le marqueur, ainsi que, in fine, les séquences peptidiques signatures. La synthèse du bloc [linker + marqueur] portant le marqueur CHCA a été préalablement optimisée, afin d'être intégré aux sondes ABP d'intérêt. En parallèle, les séquences peptidiques signatures marquées CHCA ont été générées et utilisées pour l'optimisation des protocoles et la détermination des conditions d'analyse MALDI optimales. Ce chapitre décrit donc la validation du marquage des MMPs sur les sites  $S_3$  ou  $S_3'$  (Fig. 75) via des marqueurs fluorescents et CHCA, ainsi que la détermination des fragments peptidiques signatures et leur synthèse.

## I. Conception des sondes ABP ciblant les MMPs

Ces sondes, conçues et optimisées par nos collaborateurs du CEA, sont composées de cinq blocs distincts : (Fig. 74)

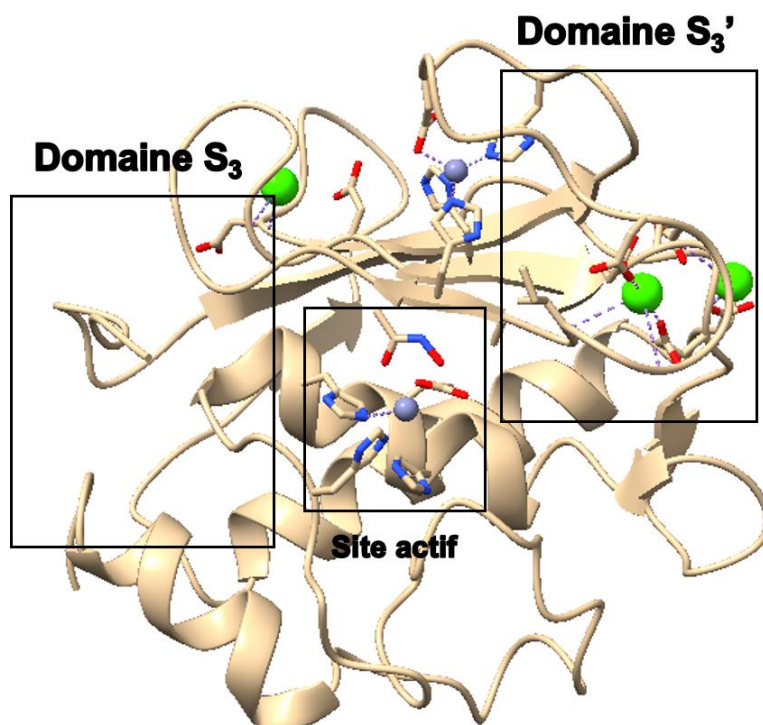
- **La tête réactive**, développée à partir d'inhibiteurs précédemment décrits et à l'origine de la spécificité de la sonde. Dans notre cas il s'agit d'un inhibiteur phosphinique intégré dans une structure pseudo-peptidique.
- **Le connecteur**, à l'origine des études de structure/activité. Il s'agit ici de la chaîne latérale de la lysine en C-ter.
- **Le spacer électrophile**, dont le rôle est de transférer de manière dirigée le marqueur sur l'enzyme.
- **Le linker**, placé entre le spacer et le marqueur, tel que l'acide aminohexanoïque ou l'acide aminobenzoïque.
- **Le marqueur**, utilisé pour la détection des molécules marquées. Un marqueur fluorescent a été utilisé en première intention. Nous avons utilisé CHCA comme marqueur MS, et un dérivé azoture dans le cadre du développement d'une stratégie click.



*Figure 74 : Structure générale des ABP*

La nomenclature ci-dessous sera utilisée dans ce manuscrit pour nommer et identifier les sondes utilisées.

Les sondes  $S_3'$  seront désignées selon la nomenclature : [Inhibiteur]-[Connecteur]-[Spacer]-[Linker]-[Marqueur] et les sondes  $S_3$  selon la nomenclature : [Marqueur]-[Linker]-[Spacer]-[Connecteur]-[Inhibiteur].



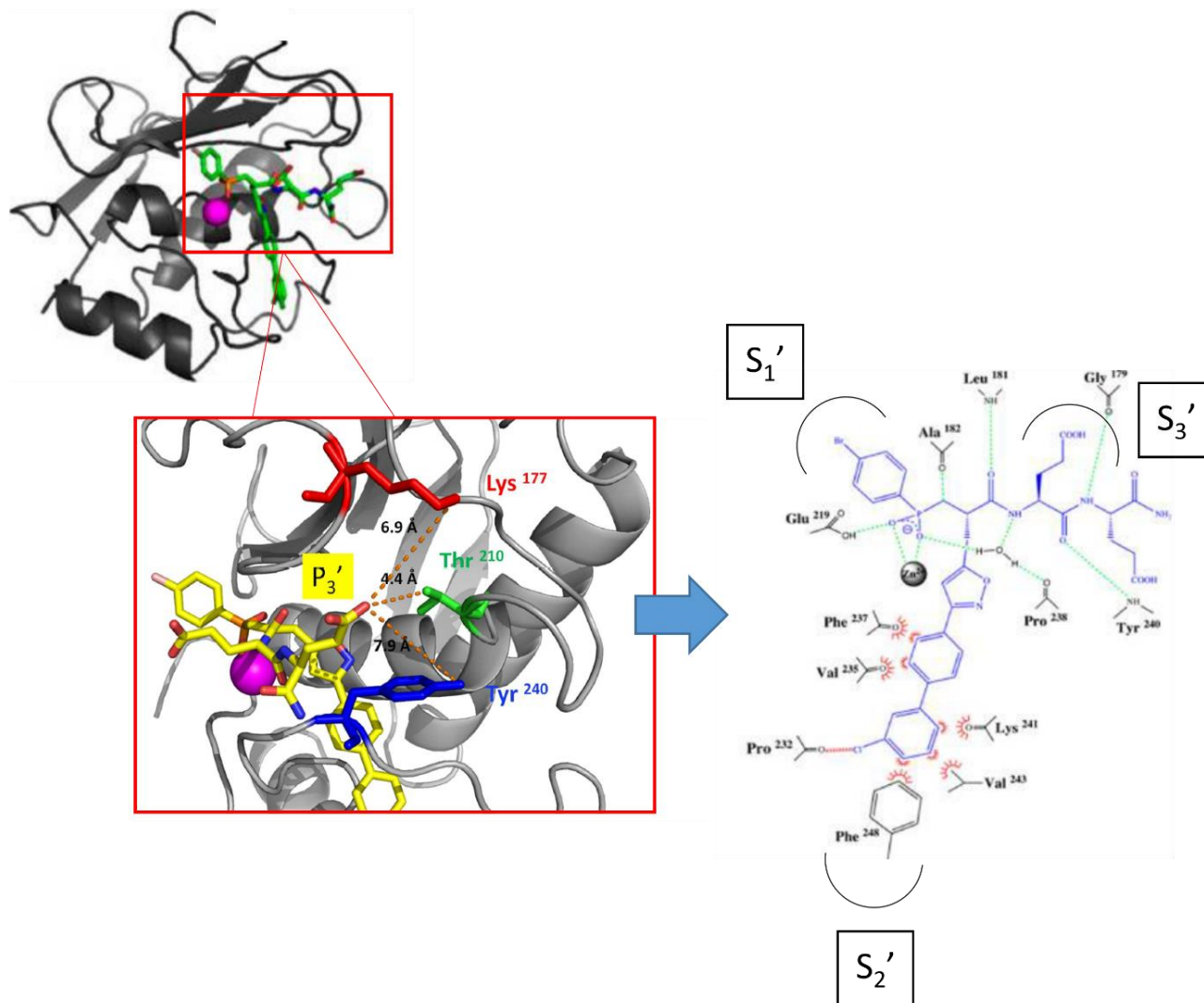
*Figure 75 : Localisation des domaines  $S_3$  et  $S_3'$  (illustration sur la hMMP-12)*

### **a. Structure de la tête réactive : L'inhibiteur phosphinique**

Bien que plusieurs motifs chimiques aient été développés pour la chélation de l'ion  $Zn^{2+}$ , tels que les groupements hydroxamate ou carboxylate, le phosphinate, spécifique des métalloprotéases zinc-dépendantes, a été choisi, assurant une insertion complète de la sonde dans le site actif de l'enzyme.

Ce motif phosphinate doit être inclus dans une séquence pseudo-peptidique, mimétique d'un substrat ou d'un inhibiteur de l'enzyme cible, permettant d'assurer la formation d'un complexe d'affinité forte entre l'enzyme et la sonde. En effet, le groupement phosphinate étant un agent chélatant assez faible, comparé aux groupements hydroxamate ou carboxylate, le squelette pseudo-peptidique assure, au sein de la poche catalytique, des interactions supplémentaires, permettant de renforcer l'interaction et de conférer à la sonde sa sélectivité.

Dans notre cas, toutes les sondes ont été développées à partir de l'inhibiteur RXP470.1, identifié par le CEA comme le plus efficace, et le plus spécifique, dans le cadre du marquage de la MMP-12 au niveau de la poche  $S_3'$  ( $K_i$  de 0.24nM).[205] Celui-ci a démontré son efficacité sur des cas d'athérosclérose en bloquant la croissance et la rupture de la plaque d'athérome. La force de cet inhibiteur vient de sa longue chaîne  $P_1'$  qui assure une insertion maximale dans la poche  $S_1'$  de l'enzyme. Des études cristallographiques menées par le CEA ont permis une modélisation de l'insertion de cet inhibiteur au sein de la poche  $S_3'$  de la MMP-12 humaine, identifiant trois résidus nucléophiles à proximité du glutamate en  $P_3'$ , désignant ainsi ce site comme idéal pour l'élongation de la sonde. (Fig. 76)



*Figure 76 : Modélisation de l'interaction entre l'inhibiteur RXP470.1 et la MMP-12 humaine et prédiction des liaisons non covalentes impliquant les résidus de proximité*

### **b. Le connecteur**

La partie « connecteur » concerne la chaîne latérale d'une lysine positionnée en C-terminal du squelette pseudo-peptidique, pour les motifs visant  $S_3'$ , et en N-terminal pour les motifs visant  $S_3$ . Plusieurs longueurs et configurations ont été testées pour celle-ci, dans l'optique d'améliorer l'insertion de la sonde dans la poche, mais également de permettre au spacer une plus grande proximité avec certains résidus nucléophiles. Les ligands privilégiés sont de type de K, Dab et (D)Dab. Ces trois ligands ont été validés pour les motifs  $S_3'$  alors que seul le ligand (D)Dab a été conservé pour le motif  $S_3$ .

### **c. Spacer ligand-directed**

La stratégie ABP dans le cadre du marquage des métalloprotéases n'est pas triviale. En effet, c'est sur l'ion zinc, et non sur un résidu nucléophile, que repose le mécanisme catalytique de ces enzymes. Ainsi, il n'est donc pas possible de générer directement une liaison covalente entre la sonde et le site actif des MMPs puisque le groupement phosphinate ne permet qu'une liaison de coordination. L'utilisation de groupements

électrophiles dont la réactivité, dirigée par la chimie de proximité (stratégie « ligand-directed »), permet alors la génération d'un lien covalent entre la sonde et l'enzyme, non pas dans le site actif, ce qui induirait une inactivation de l'enzyme, mais sur les sites proximaux ( $S_3$  ou  $S_3'$ ), sans aucune perturbation de l'activité première de l'enzyme ainsi modifiée.

Dans notre cas, ces groupements sont fixés sur la chaîne latérale du ligand K, Dab ou (D)Dab, via une liaison amide.

Parmi tous les motifs réactifs décrits dans le chapitre trois de la partie A, les spacers acylimidazole (LDAI), dibromophényl benzoate (LDBB) et N-acyl-N-alkyl sulfonamide (NASA) ont été choisis, présentant une réactivité et une sélectivité différente vis-à-vis des différents acides aminés canoniques. (Fig. 77) (Fig. 81) (Fig. 82) Les groupements LDAI et LDBB induisent une modification de la protéine cible via des réactions d'acylation. Le résidu sulfonamide, quant à lui, présente la cinétique de réaction la plus rapide. Des travaux préliminaires ont tout d'abord été menés avec le motif acylimidazole et sulfonamide, sur différentes MMPs, dans le but de valider la technologie et la détection du marquage. [206] Ces travaux, et plus particulièrement la caractérisation et l'étude du marquage sur la MMP-12 humaine recombinante, ont d'ailleurs précédemment fait l'objet d'une thèse. [207]

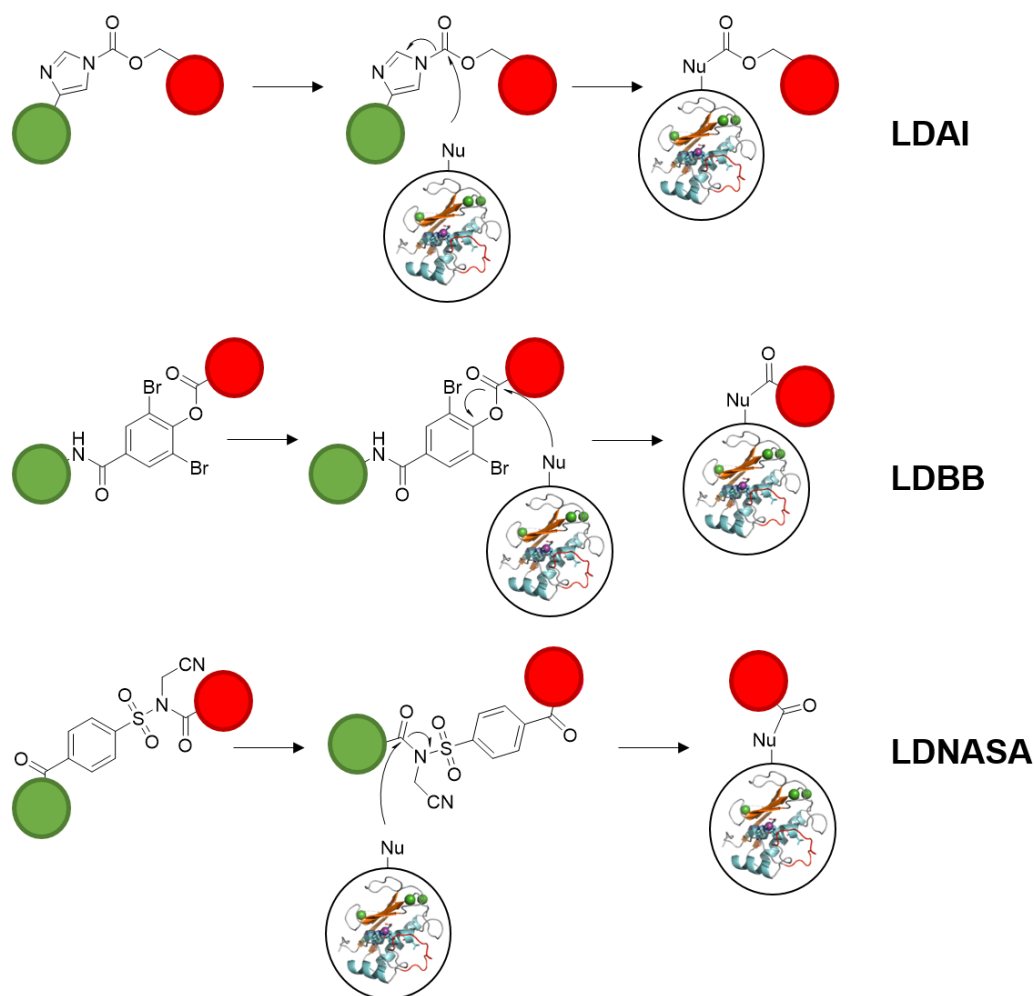


Figure 77 : Mécanismes et structures associées aux différents spacers. La sphère verte modélise la tête réactive et la sphère rouge le bloc [linker + marqueur] transféré sur l'enzyme



L'utilisation de spacers électrophiles offre, comme indiqué, l'avantage de n'apporter aucune modification covalente dans le site actif de l'enzyme, qui n'est donc pas « inactivée ». Cette stratégie se révèle donc non seulement compatible avec une utilisation *in-vivo*, mais permet également un suivi dynamique de l'activité des MMPs.

#### d. Nature des linkers et des marqueurs

La fluorescence offrant l'avantage d'une visualisation facile et rapide de l'efficacité de marquage des protéines, un marqueur fluorescent a été utilisé en première instance afin de valider le processus de marquage des MMPs cibles. La sulfocyanine 3 a permis de visualiser ce marquage sur gel d'électrophorèse.

Le cœur de notre travail repose sur l'utilisation du marqueur CHCA qui a démontré sa puissance pour la détection ultra-sensible et spécifique de peptides en MALDI-MS.[128] Le transfert covalent d'un tel marqueur sur les MMPs apparaît être des plus pertinents face à la très faible quantité de protéines à détecter dans un milieu relativement complexe. Au cours de la dernière année de thèse, l'intégration d'un marqueur N<sub>3</sub> a également été mis au point afin de développer une alternative « click » de notre stratégie de marquage. L'objectif est de promouvoir la polyvalence du marquage via la possibilité d'utiliser différents marqueurs et différentes technologies d'analyse sans avoir à nécessairement changer de sonde.

Enfin, le linker a pour but d'éloigner le marqueur du spacer, ceci afin de ne pas gêner sa réactivité. Plusieurs linkers, présentant des propriétés physico-chimiques variées, ont été introduits dans la structure des sondes évaluées.(Fig. 78)

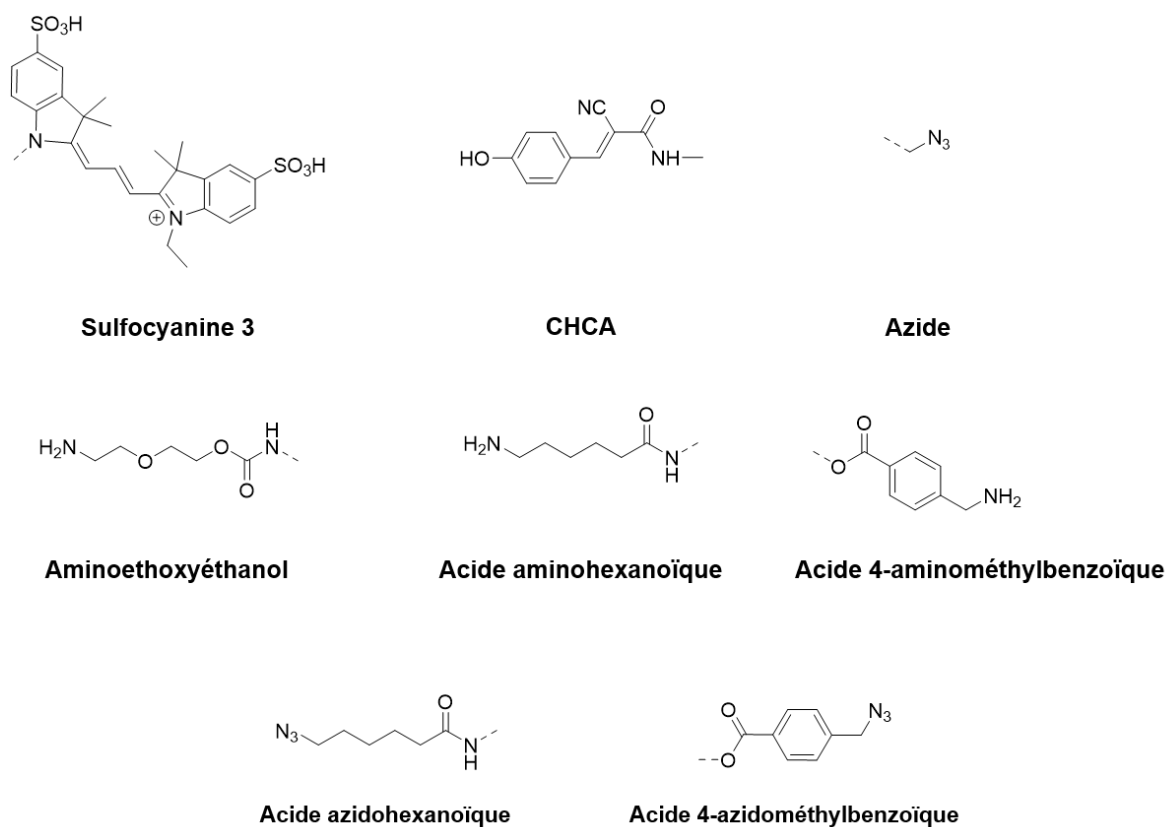
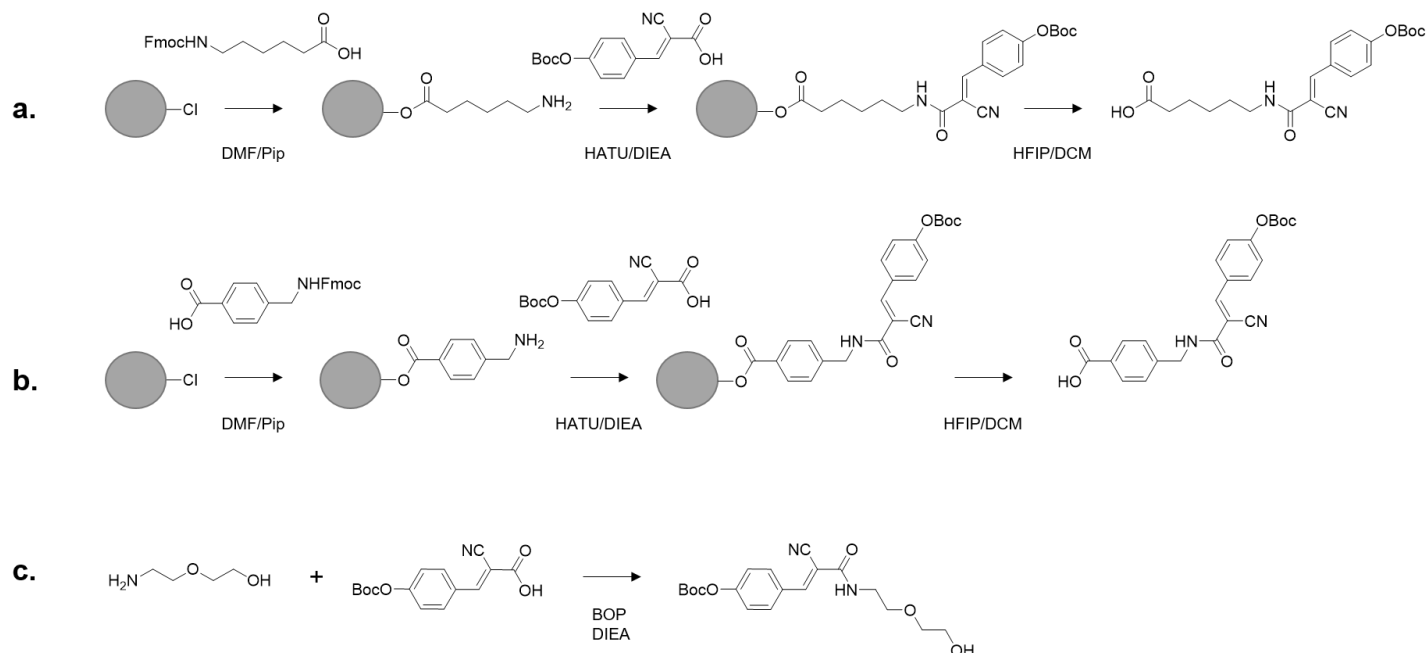


Figure 78 : Structure des différents linkers et marqueurs utilisés

Nous avons pris en charge la synthèse des différents blocs [linker + CHCA]. La figure 79 résume les différentes voies de synthèse des blocs CHCA. (Molécules A, B, C, D et E) Dans le cas des marqueurs N<sub>3</sub>, nous avons utilisé des analogues commerciaux des linkers acide aminohexanoïque et 4-aminométhylbenzoïque pour lesquels l'amine terminale a été remplacé par un groupement N<sub>3</sub>. Les blocs N<sub>3</sub> n'ont donc nécessité aucun travail de synthèse avant leur introduction sur le squelette de la sonde.



**Figure 79 : Voies de synthèse des différents blocs linkers avec le marqueur CHCA**

Il est à noter que les sondes acylimidazole n'ont été synthétisées qu'avec le linker aminoéthoxyéthanol, linker qui n'a été utilisé que pour ces sondes (voie c). De même, les sondes NASA n'ont à ce jour été uniquement synthétisées qu'avec un linker aminohexanoïque. (voie a)

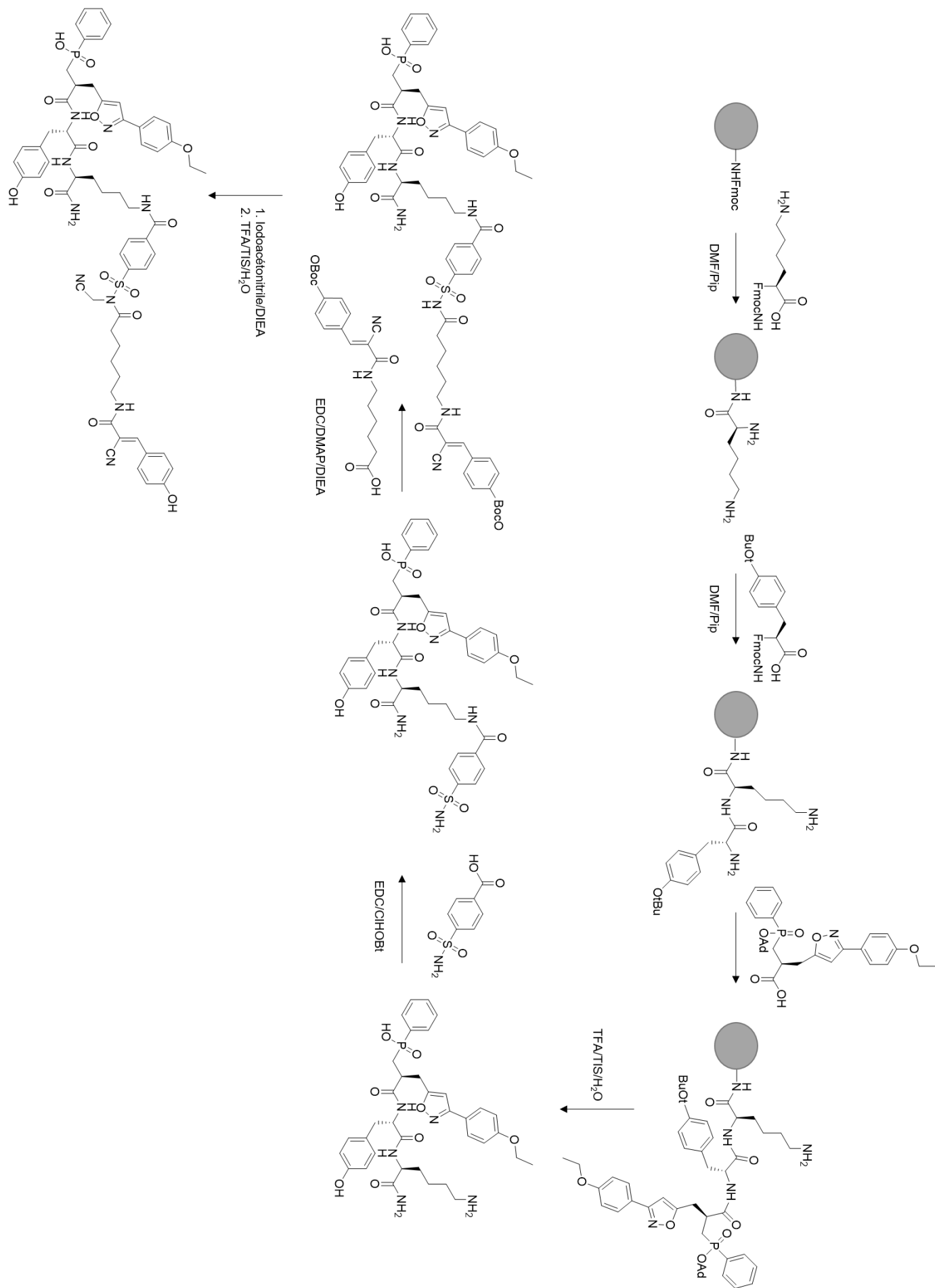
### **e. Assemblage des sondes**

Les sondes ont donc été assemblées au CEA à partir des différentes parties a, b, c et d précédemment décrites :

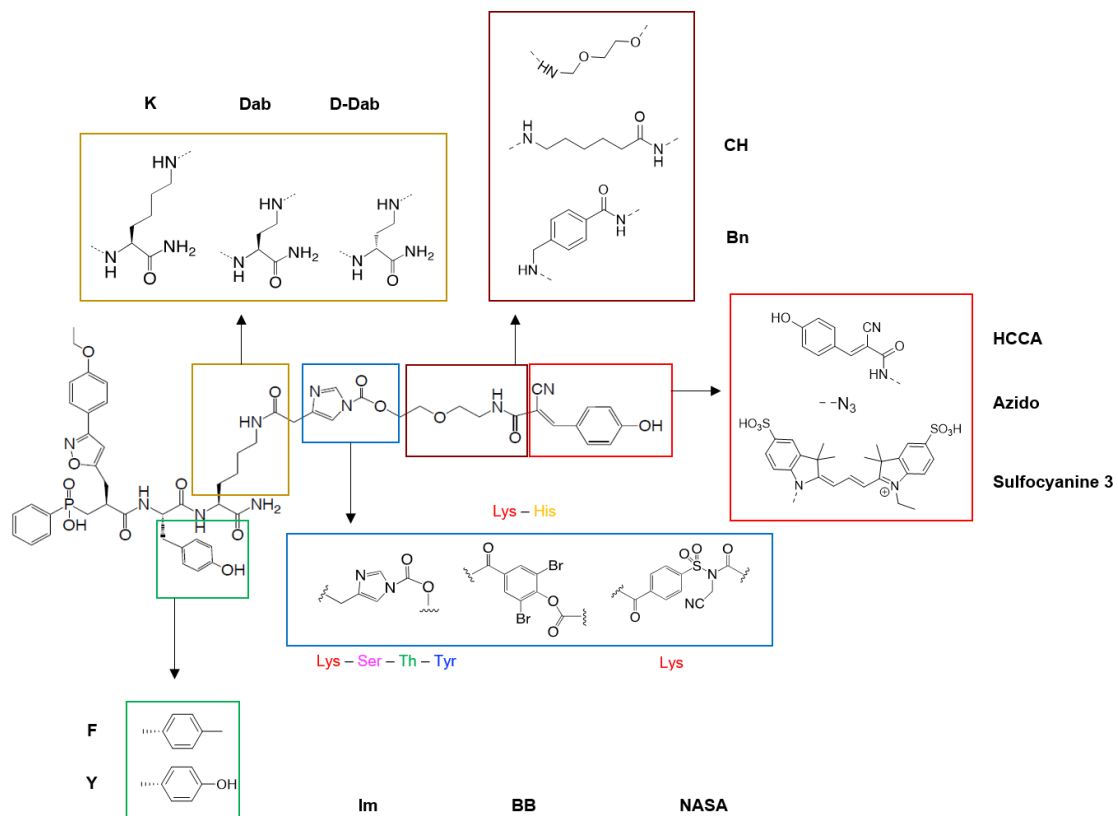
- L'inhibiteur phosphinique dans le squelette pseudo-peptidique
- Le « ligand »
- Le spacer électrophile
- Le bloc linker/marqueur

La figure 80 illustre, en exemple, la synthèse totale de la sonde RXP500-K-NASA-CH-CHCA.

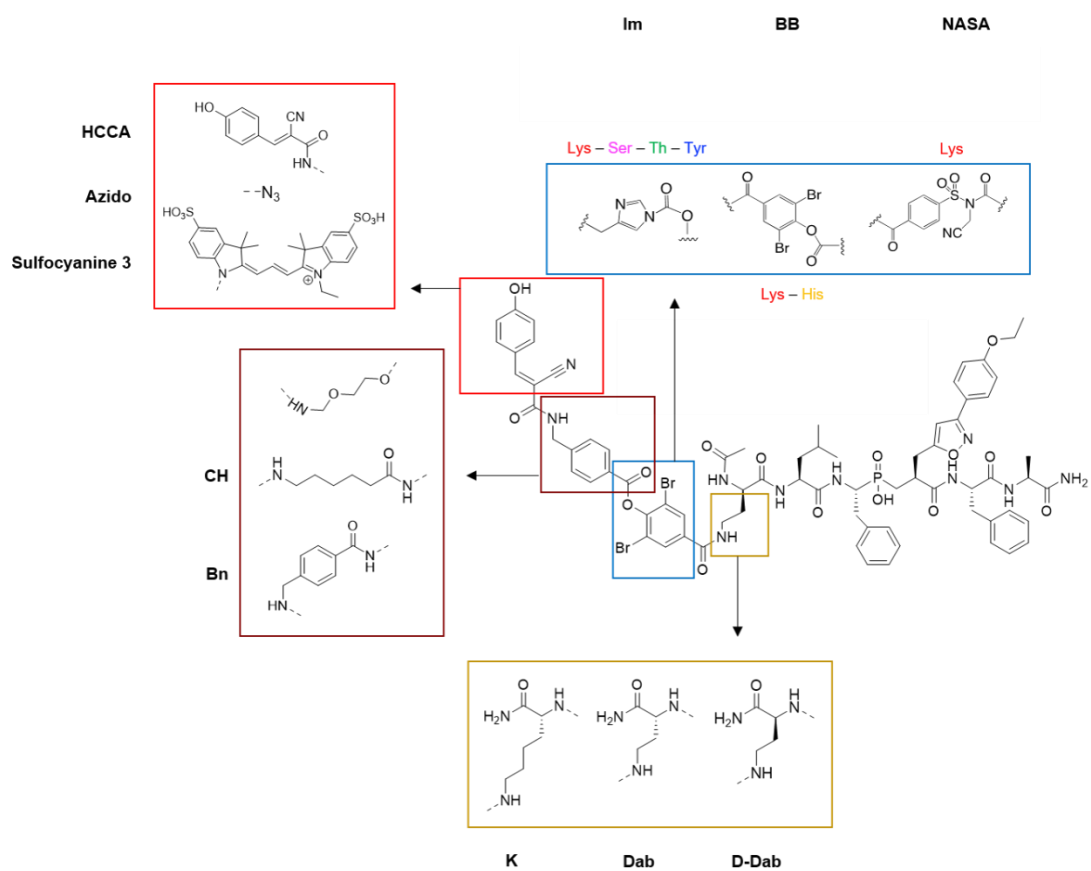
Le CEA a ainsi pu générer vingt-trois sondes, permettant une étude plus extensive du marquage des MMPs d'intérêt afin de définir les sondes préférentielles pour chaque cible. Le tableau 5 résume l'ensemble des sondes synthétisées.



**Figure 80 : Synthèse totale de la sonde RXP500-K-NASA-CH-CHCA**



**Figure 81 : Résumé des modifications structurales effectuées sur les sondes  $S_3'$**



**Figure 82 : Résumé des modifications structurales effectuées sur les sondes  $S_3$**

N°	Nom	Poche		Ligand			Spacer			Linker			Tag		
		S <sub>3</sub>	S <sub>3</sub> '	K	Dab	(D)Dab	Im	BB	NASA	A	CH	Bn	CHCA	Cy <sub>3</sub>	N <sub>3</sub>
1	Cy <sub>3</sub> -Bn-BB-(D)Dab-RXP500														
2	RXP500-(D)Dab-BB-Bn-Cy <sub>3</sub>														
3	RXP500-Dab-BB-Bn-Cy <sub>3</sub>														
4	RXP500-K-BB-Bn-Cy <sub>3</sub>														
5	Cy <sub>3</sub> -CH-BB-(D)Dab-RXP500														
6	RXP500-K-BB-CH-Cy <sub>3</sub>														
7	Cy <sub>3</sub> -CH-NASA-(D)Dab-RXP500														
8	RXP500-(D)Dab-NASA-CH-Cy <sub>3</sub>														
9	RXP500-Dab-NASA-CH-Cy <sub>3</sub>														
10	RXP500-K-NASA-CH-Cy <sub>3</sub>														
11	CHCA-Bn-BB-(D)Dab-RXP500														
12	RXP500-K- BB-Bn-CHCA														
13	CHCA-CH-BB-(D)Dab-RXP500														
14	RXP500-K-BB-CH-CHCA														
15	RXP500-Dab-NASA-CH-CHCA														
16	N <sub>3</sub> -Bn-BB-(D)Dab-RXP500														
17	RXP500-K-BB-Bn-N <sub>3</sub>														
18	N <sub>3</sub> -CH-BB-(D)Dab-RXP500														
19	RP500-K-BB-CH-N <sub>3</sub>														
20	N <sub>3</sub> -CH-NASA-(D)Dab-RXP500														
21	RXP500-Dab-Im-A-Cy <sub>3</sub>														
22	RXP500-K-Im-A-Cy <sub>3</sub>														
23	RXP500-(D)Dab-Im-A-Cy <sub>3</sub>														

*Tableau 5 : Résumé des sondes ABP synthétisées*

## II. Caractérisation du marquage et identification des fragments signatures

### a. Marquage fluorescent des MMPs cibles

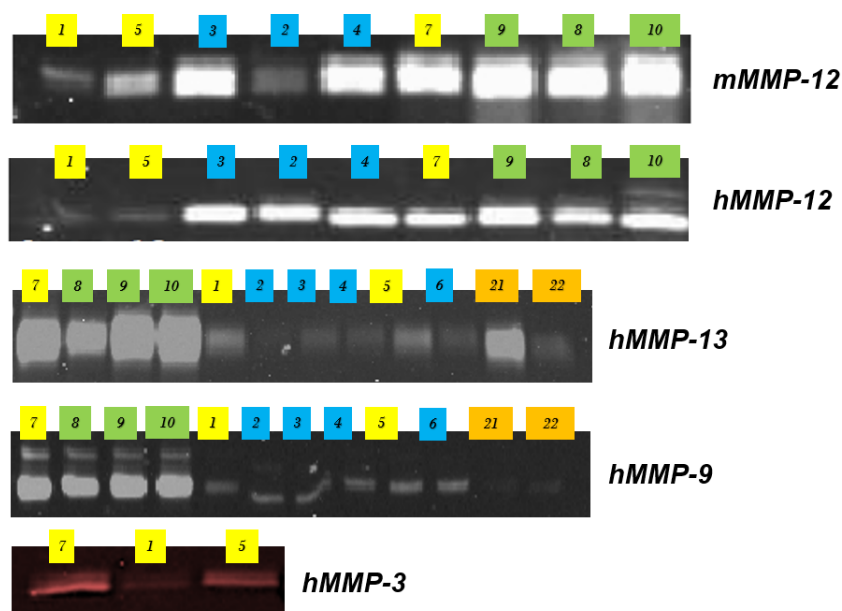
La validation du processus de marquage et d'identification des MMPs cibles a été menée par le CEA, dans des conditions non complexes, utilisant des protéines purifiées ou recombinantes. À cette fin, des sondes permettant le transfert du marqueur Cy<sub>3</sub> ont été utilisées afin de visualiser le marquage par électrophorèse. Les protocoles de marquage ont été optimisés et une estimation des rendements de marquage par mesure de fluorescence, a ainsi pu être effectuée, pour chacune de nos MMPs cibles. L'étude a été menée pour une dizaine de domaines catalytiques de MMPs recombinantes pures, pour la poche S<sub>3</sub>, via les sondes 1, 5 et 7, tout comme pour la poche S<sub>3</sub>' via les sondes 2, 3, 4, 6, 8, 9 et 10. Le marquage a été effectué avec 100nM de sonde pour 40nM de MMPs. Le tableau 6 résume les résultats obtenus pour le marquage S<sub>3</sub>' et S<sub>3</sub>.

Numéro	Sondes	Marquage S <sub>3</sub> '
<b>Sondes Imidazole</b>		
<b>MMPs</b>		
		2 3 8 9 10 12 13
x	RX470K-Im-Cy3	13 100
x	RX500YK-Im-Cy3	64 17 40 100 16
22	RX500FK-Im-Cy3	100 5 63 69 13
21	RX500F-Dab-Im-Cy3	100 83 16 59
23	RX500F-(D)Dab-Im-Cy3	100 63 7 66 5 43
<b>Sondes BB</b>		
4	RX500FK-BB-Bn-Cy3	2 3 9 100
6	RX500FK-BB-CH-Cy3	5 28 10 100
3	RX500F-Dab-BB-Bn-Cy3	6 4 100
2	RX500F-(D)Dab-BB-Bn-Cy3	100
<b>Sondes NASA</b>		
10	RX500FK-NASACy3	4 91 5 100 48
9	RX500F-Dab-NASA-Cy3	4 79 100 75
8	RX500F-(D)Dab-NASA-Cy3	9 1 54 100 9
Numéro	Sondes	Marquage S <sub>3</sub>
<b>MMPs</b>		
		1 2 3 7 8 9 10 12 13 14
<b>Sondes</b>		
1	Cy3-Bn-BB-(D)-Dab-RX500	23 17 25 27 3 10 5 100
5	Cy3-CH-BB-(D)-Dab-RX500	100 78 89 78 5 19 11 78
7	Cy3-NASA-(D)-Dab-RX500	9 22 99 9 100 23 76 67 51

Tableau 6 : Gels d'électrophorèse obtenus après marquage de différentes MMPs en fonction des sondes utilisées. Les rendements de marquage sont exprimés en pourcentage

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous nous sommes focalisés sur les MMPs 3, 9, 12 et 13, humaine ou murine. Ce choix a été fait au regard de l'efficacité de marquage de ces cibles et des modèles pathologiques explorés. En effet, certaines MMPs, notamment la 1, demeurent inaccessible au marquage, peu importe la sonde utilisée. D'autres MMPs ne sont uniquement accessibles que via un seul type de marquage,  $S_3$  pour la MMP-2 et la MMP-8,  $S_3'$  pour la MMP-10. Enfin, certaines MMPs ne peuvent être marquées que via l'utilisation préférentielle d'un spacer particulier, c'est le cas pour la MMP-3 qu'il n'est possible de marquer en  $S_3'$  qu'avec un spacer acylimidazole. La MMP-12 étant la MMP qui montre la plus grande tolérance vis-à-vis du type de sonde utilisée,  $S_3$  ou  $S_3'$ , ou du spacer électrophile, elle a été choisie pour être au centre du développement de notre méthodologie. Les sondes 4, 6, 12 et 14 ont été retenues pour l'étude du marquage spécifique de la MMP-12. Enfin, il est à noter que la sonde 7 est la seule qui permet le marquage de 10 MMPs testées, ce qui en fait un excellent candidat pour le multiplexage en milieu biologique.

De plus, ces MMPs, notamment la MMP-3, 9, 12 et 13, jouent un rôle important dans de nombreuses pathologies inflammatoires, certains cancers ou encore les pathologies liées à l'arthrite. Nous avons ainsi validé les sondes 1 à 10, 21 et 22 sur ces cibles selon des conditions identiques aux gels précédents en ayant diminué la concentration en MMPs à 30nM. Les résultats obtenus sont résumés sur la figure 83.



Numéro	Sonde	Numéro	Sonde
Sondes $S_3$		Sondes $S_3'$ - BB	
7	(D)Dab-NASA-CH	2	(D)Dab-BB-Bn
1	(D)Dab-BB-Bn	3	Dab-BB-Bn
5	(D)Dab-BB-CH	4	K-BB-Bn
Sondes $S_3'$ - NASA		6	K-BB-CH
8	(D)Dab-NASA-CH	Sondes $S_3'$ - Im	
9	Dab-NASA-CH	21	Dab-Im
10	K-NASA-CH	22	K-Im

Figure 83 : Résultats obtenus pour le marquage des MMPs d'intérêt

Nous avons pu observer que les sondes NASA sont efficaces sur toutes nos cibles d'intérêt, que ce soit via un marquage  $S_3$  ou  $S_3'$ . Nous avons donc sélectionné les sondes NASA,  $S_3$  et  $S_3'$ , pour les hMMPs 9 et 13, uniquement leur version  $S_3$  pour le marquage de la hMMP-3. Enfin, bien que les sondes NASA soient efficaces pour le marquage de la MMP-12, humaine ou murine, nous avons choisi de retenir les sondes  $S_3'$  K-BB-Bn et  $S_3'$  K-BB-CH pour leur sélectivité presque exclusive pour ces enzymes. Le marquage via ces différentes sondes ainsi validé par fluorescence, les analogues CHCA de ces sondes ont ensuite été synthétisés afin de promouvoir l'analyse MS des enzymes marquées.

Les enzymes pures marquées par CHCA ont été caractérisées par ESI-MS via la détection simultanée des ions multichargés associés respectivement à l'enzyme native et à l'enzyme marquée. Ceci a été validé sur le marquage de la MMP-12 humaine par la sonde 12. Pour illustration, une solution à 100nM de domaine catalytique de hMMP-12 a été préparée dans du tampon TRIS 50mM,  $CaCl_2$  10mM,  $ZnCl_2$  50 $\mu$ M pH=7.5, puis la sonde est introduite à la concentration de 200nM. Après 4 heures d'incubation à 26°C, nous observons bien les ions associés au domaine catalytique de la MMP-12 humaine non marquée et ceux associés à l'enzyme marquée. La co-visualisation de ces différents pics nous permet de conclure que le transfert d'un marqueur CHCA sur l'enzyme est possible, mais que ce marquage n'est pas total. (Fig. 84)

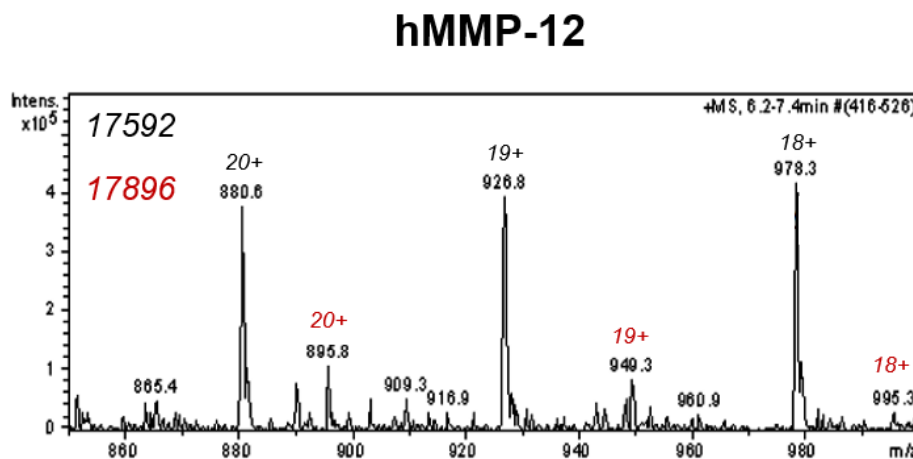


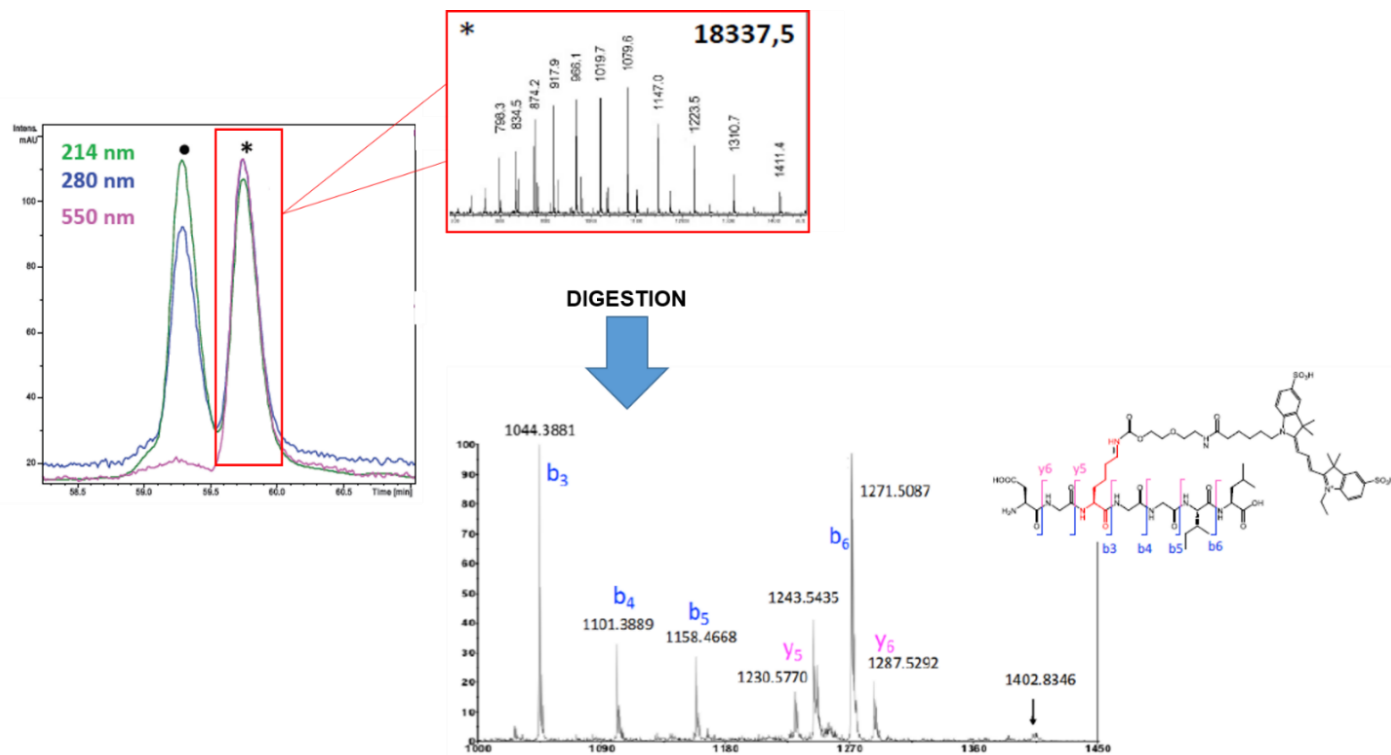
Figure 84 : Spectre ESI obtenu après marquage de la hMMP-12 par la sonde 12. Les MW de la MMP-12 native et marquée, ainsi que les ions multichargés correspondants, sont respectivement indiquées en noir et en rouge.

### **b. Identification des sites de marquage et des fragments peptidiques associés**

Une fois l'étape de marquage validée, la caractérisation moléculaire du site de marquage a été entreprise. Les enzymes marquées CHCA (100nM) ont été digérées par la chymotrypsine, dans le cas d'un marquage  $S_3'$ , ou par la trypsine, dans le cas d'un marquage  $S_3$ . En se basant sur la réactivité des différents spacers pour les acides aminés nucléophiles, (Fig. 81) (Fig. 82), il a été possible de générer théoriquement l'ensemble des fragments peptidiques issus de la digestion susceptibles de porter le marqueur. La comparaison des spectres expérimentaux avec les données issues des prédictions de digestion en fonction des résidus marqués, a mené à l'identification des fragments marqués. L'identité de ces fragments a été confirmée par l'analyse MS/MS du fragment marqué dans le digestat. Cette analyse est également à l'origine de la validation du



résidu marqué via l'étude des différents ions obtenus. La figure 85 présente un exemple de ce protocole avec le marquage de la MMP-12 humaine par la sonde 22.



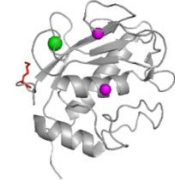

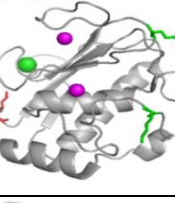
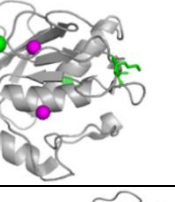

*Figure 85 : Identification du fragment issu du marquage de la hMMP-12 par la sonde RXP500-K-Im-Cy3 (Sonde 22)*

La séquence des fragments signatures associés au marquage  $S_3$  ou  $S_3'$  de nos différentes MMPs cibles ont pu être établis. Il a été ainsi démontré que le marquage était systématiquement porté soit par la chaîne latérale d'une lysine, mais aussi par l'extrémité N-terminale de la séquence, dans le cas d'un marquage  $S_3$ .

Le marquage N-terminal est d'un grand intérêt car il peut être utilisé comme témoin de l'activation de la MMP, l'extrémité N-terminale du domaine catalytique étant libérée par le clivage du prodomaine. Le résidu N-terminal est également plus accessible puisqu'il se trouve à l'entrée de la poche catalytique, contrairement à la poche  $S_3'$  où le marqueur est enclavé profondément dans la poche.

Cependant, il faut noter que le prodomaine n'est pas toujours clivé au même endroit, à l'acide aminé près, et que le résidu N-terminal peut donc différer d'une activation à une autre, ce qui peut rendre l'identification des fragments signatures fastidieuse.

Le tableau 8 résume les différents résidus obtenus en fonction du type de marquage et de la MMP cible. Dans certains cas, plusieurs résidus ont été identifiés pour un même type de marquage. Dans ce cas, afin de hiérarchiser la présence de ces fragments peptidiques et ainsi identifier le fragment « majoritaire », des analyses MALDI-MS ont été menées afin de comparer l'intensité et le rapport signal/bruit des signaux obtenus pour chacun des fragments. Le fragment présentant le signal le plus intense et le plus résolu a donc été retenu comme étant le fragment d'intérêt pour l'étude en milieu biologique complexe.

MMP	Type de marquage	Fragment peptidique	Résidu marqué	Structure cristalline
hMMP-3	S <sub>3</sub>	H- <b>K</b> THLYR-OH	K <sup>111</sup>	
hMMP-9	S <sub>3</sub>	<b>NH</b> -GFQTFEGDLK-OH	N-ter	
	S <sub>3</sub> '	H-SLG <b>K</b> GVVVPTR-OH	K <sup>214</sup>	
hMM-12	S <sub>3</sub>	H- <b>K</b> HYITYR-OH	K <sup>111</sup>	
	S <sub>3</sub> '	H-DG <b>K</b> GGIL-OH	K <sup>177</sup>	
		H- <b>K</b> YVDINTF-OH	K <sup>241</sup>	
mMMP-12	S <sub>3</sub>	H-WM <b>K</b> R-OH	K <sup>115</sup>	
		H-M <b>K</b> RY-OH		
	S <sub>3</sub> '	H-DG <b>K</b> GGTL-OH	K <sup>181</sup>	
		H-T <b>K</b> SF-OH	K <sup>209</sup>	
		H-IFQ <b>K</b> AF-OH	K <sup>140</sup>	
hMMP-13	S <sub>3</sub>	<b>NH</b> -YNVFPR-OH	N-ter	
		H-TL <b>K</b> WSK-OH	K <sup>112</sup>	
		H-TG <b>K</b> SHF-OH	K <sup>249</sup>	
	S <sub>3</sub> '	H-TSS <b>K</b> GY-OH	K <sup>212</sup>	

*Tableau 7 : Séquences des fragments peptidiques obtenus après marquage et digestion des MMPs cibles. Le résidu portant le marqueur est indiqué en gras et en rouge. Les séquences sont modélisées en rouge pour un marquage S<sub>3</sub> et en vert pour un marquage S<sub>3</sub>'*

### SYNTHESE DES SONDES

- Mise au point de la structure RXP500 pour le marquage  $S_3$  et  $S_3'$  – Synthèse de vingt-deux sondes CHCA, Cy et  $N_3$
- Conservation des spacers NASA et BB – Le spacer BB a été retenu pour le marquage sélectif de MMPs cibles, le spacer NASA pour les expériences de multiplexage
- Conservation du ligand D(Dab) pour le marquage  $S_3$  – Conservation des ligands K et Dab pour le marquage  $S_3'$

### MARQUAGE DES MMPs CIBLES

- Marquage validé sur 9 MMPs : 2, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 13 et 14
- Marquage  $S_3'$  mMMP-12 : RXP500 – K ou Dab – BB – Bn et RXP500-K-BB-CH
- Marquage  $S_3'$  hMMP-12 : RXP500 – K, Dab ou D(Dab) – BB – Bn
- Marquage  $S_3$  hMMP-3 : CH - NASA – D(Dab) – RXP500
- Marquage  $S_3'$  hMMP-9 : RXP500 – K, Dab ou D(Dab) – NASA – CH
- Marquage  $S_3'$  hMMP-13 : RXP500 – K, Dab ou D(Dab) – NASA – CH

### IDENTIFICATION DES FRAGMENTS D'INTERET

- Marquage exclusif sur la chaîne latérale des lysines ou sur l'extrémité N-terminale (marquage  $S_3$ )
- Identification des fragments signatures :
  - hMMP-3 : H-**K**THLYR-OH ( $S_3$ )
  - hMMP-9 : H-SLG**K**GVVVPTR-OH ( $S_3'$ )
  - mMMP-12  $S_3'$  : H-DG**K**GGTL-OH ( $S_3'$ )
  - mMMP-12  $S_3$  : H-WM**K**R-OH ( $S_3$ )
  - hMMP-12  $S_3'$  : H-DG**K**GGIL-OH ( $S_3'$ )
  - hMMP-12  $S_3$  : H-**K**HYITYR-OH ( $S_3$ )
  - hMMP-13 : H-TSS**S**KGY-OH ( $S_3'$ )
- Validation du marquage CHCA



### **c. Conception et synthèse des fragments peptidiques modèles**

Nous avons synthétisé les fragments peptidiques d'intérêt, marqués CHCA et non marqués, déterminés dans la partie précédente. Ces peptides ont ainsi été utilisés comme référence afin de déterminer les conditions analytiques optimales de détection à appliquer au digestat des enzymes entières marquées, sur les différents supports MALDI et en imagerie, dans des milieux de complexité croissante.

Nous avons également synthétisé, en parallèle, les fragments signatures de la hMMP-12, mMMP-12 et hMMP-3 portant un marqueur N<sub>3</sub> pour explorer différentes stratégies de marquage click.

Enfin, même si seuls les fragments issus du marquage S<sub>3</sub>' de la MMP-12, humaine ou murine, ont été retenus comme fragments signatures du marquage pour la suite de notre étude, nous avons tout de même synthétisé et caractérisé les fragments issus du marquage S<sub>3</sub>. Nous avons entrepris dans un premier temps l'étude de ces peptides en milieux simples (ACN/H<sub>2</sub>O) afin de déterminer les limites de détection et de quantification en MALDI. Ces peptides nous ont également permis d'optimiser les protocoles d'imagerie jusqu'à obtention d'un protocole fiable et reproductible.

Chaque fragment signature a donc été synthétisé en trois versions différentes :

- Une version non marquée, nous parlerons de forme native qui servira de contrôle négatif
- Une forme marquée CHCA simulant le fragment obtenu après marquage et digestion de l'enzyme
- Une forme portant une version deutérée du marqueur CHCA afin de quantifier le fragment d'intérêt

Ces peptides ont été synthétisés sur support solide en stratégie Fmoc/tBu [208] dans un premier temps sur résine Wang préalablement préchargée avec notre premier acide aminé. Cependant, les résines préchargées ont un coût très important et l'insertion du premier acide aminé sur résine Wang nécessite un protocole spécifique d'estérification, réaction qui peut s'avérer longue, avec des rendements variables dépendamment de l'acide aminé à incorporer. Nous nous sommes ainsi tournés vers l'utilisation de la résine 2-Chlorotriyle, pour laquelle l'insertion du premier acide aminé se fait par substitution nucléophile d'un atome de chlore en milieu basique, après activation de la résine.

Afin de pouvoir introduire spécifiquement le marqueur sur la chaîne latérale de la lysine en cours de synthèse, nous avons utilisé des résidus lysines possédant, sur leur chaîne latérale, des protections orthogonales de type Alloc. L'utilisation de tels groupements protecteurs nous a permis de déprotéger la chaîne latérale de la lysine après élongation du peptide, sans déprotéger les autres chaînes latérales ou l'extrémité N-terminale. Nous avons ainsi pu introduire le linker, puis le CHCA, protégé par un groupement Boc sur le phénol. Le peptide est enfin clivé de la résine en conditions acides, purifié et lyophilisé. La figure 86 résume les différentes étapes de synthèse du fragment 12mS<sub>3</sub>CHCHCA. (Fragment 2-D)

N°	Nom	Séquence	Cible	Linker	Marqueur	Masse
1-A	12mS <sub>3</sub> '	H-DGKGGTL-OH	12m	x	x	646.70 Da
1-B	12mS <sub>3</sub> 'BnCHCA	H-DGK(Bn-CHCA)GGTL-OH		Bn	CHCA	950.41 Da
1-C	12mS <sub>3</sub> 'BnCHCAd <sub>4</sub>	H-DGK(Bn-CHCAd <sub>4</sub> )GGTL-OH		Bn	CHCAd <sub>4</sub>	954.44 Da
1-D	12mS <sub>3</sub> 'CHCHCA	H-DGK(CH-CHCA)GGTL-OH		CH	CHCA	930.44 Da
1-E	12mS <sub>3</sub> 'CHCHCAd <sub>4</sub>	H-DGK(CH-CHCAd <sub>4</sub> )GGTL-OH		CH	CHCAd <sub>4</sub>	934.47 Da
2-A	12mS <sub>3</sub>	H-WMKR-OH		x	x	619.33 Da
2-D	12mS <sub>3</sub> CHCHCA	H-WMK(Ahx-CHCA)R-OH		CH	CHCA	903.44 Da
2-E	12mS <sub>3</sub> CHCHCAd <sub>4</sub>	H-WMK(Ahx-CHCAd <sub>4</sub> )R-OH		CH	CHCAd <sub>4</sub>	907.47 Da
x	12mS <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	H-WMK(AhxN <sub>3</sub> )R-OH		CH	N <sub>3</sub>	758.4 Da
x	12hS <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	H-K(AhxN <sub>3</sub> )HYITYR-OH		CH	N <sub>3</sub>	1118.6 Da
x	12mS <sub>3</sub> 'N <sub>3</sub>	H-DGK(AhxN <sub>3</sub> )GGTL-OH		CH	N <sub>3</sub>	785.4 Da
3-A	12hS <sub>3</sub> '	H-DGKGGIL-OH		12h	x	x
3-B	12hS <sub>3</sub> 'BnCHCA	H-DGK(Bn-CHCA)GGIL-OH	Bn		CHCA	962.45 Da
3-C	12hS <sub>3</sub> 'BnCHCAd <sub>4</sub>	H-DGK(Bn-CHCAd <sub>4</sub> )GGIL-OH	Bn		CHCAd <sub>4</sub>	966.47 Da
4-A	12hS <sub>3</sub>	H-KHYITYR-OH	x		x	979.52 Da
4-D	12hS <sub>3</sub> CHCHCA	H-K(Ahx-CHCA)HYITYR-OH	CH		CHCA	1263.64 Da
4-E	12hS <sub>3</sub> CHCAd <sub>4</sub>	H-K(Ahx-CHCAd <sub>4</sub> )HYITYR-OH	CH		CHCAd <sub>4</sub>	1267.67 Da
5-A	13hS <sub>3</sub> '	H-TSSSKGY-OH	13	x	x	728.33 Da
5-D	13hS <sub>3</sub> 'CHCHCA	H-TSSSK(Ahx-CHCA)GY-OH		CH	CHCA	1012.45 Da
5-E	13hS <sub>3</sub> 'CHCHCAd <sub>4</sub>	H-TSSSK(Ahx-CHCAd <sub>4</sub> )GY-OH		CH	CHCAd <sub>4</sub>	1016.48 Da
6-A	3hS <sub>3</sub>	H-KTHLYR-OH	3	x	x	917.51 Da
6-D	3hS <sub>3</sub> CHCHCA	H-K(Ahx-CHCA)THLYR-OH		CH	CHCA	1201.62 Da
6-E	3hS <sub>3</sub> CHCHCAd <sub>4</sub>	H-K(Ahx-CHCAd <sub>4</sub> )THLYR-OH		CH	CHCAd <sub>4</sub>	1205.65 Da
7-A	9hS <sub>3</sub> '	H-SLGKGVVPTR-OH	9	x	x	1111.67 Da
7-D	9hS <sub>3</sub> 'CHCHCA	H-SLGK(Ahx-CHCA)GVVPTR-OH		CH	CHCA	1395.79 Da
7-E	9hS <sub>3</sub> 'CHCHCAd <sub>4</sub>	H-SLGK(Ahx-CHCAd <sub>4</sub> )GVVPTR-OH		CH	CHCAd <sub>4</sub>	1399.81 Da

**Tableau 8 : Tableau de référence des différents fragments peptidiques synthétisés. Numérotation : 1-12mS<sub>3</sub>' – 2-12mS<sub>3</sub> – 3-12hS<sub>3</sub>' – 4-12hS<sub>3</sub> – 5-13hS<sub>3</sub>' – 6-3hS<sub>3</sub> – 7-9hS<sub>3</sub>'. Lettre associée : A-Fragment natif, B-Spacer Bn, C-Bn D<sub>4</sub>; D-Spacer CH, E-CH D<sub>4</sub>**







## CHAPITRE 2 : Caractérisation MALDI des fragments signatures pur

Notre objectif est ici de caractériser les différents fragments signatures (Tab. 9) afin de déterminer, (i) les conditions analytiques MALDI optimales pour chaque fragment, (ii) les limites de détection et (iii) de quantification de ces composés, dans des milieux de complexité diverses. Pour ce faire, nous avons développé des conditions d'analyse sensibles et discriminantes qui reposent sur l'association du composé CHCE comme matrice d'analyse MALDI. En effet, contrairement à son analogue acide, CHCA, CHCE présente une fonction ester (Me ou Et) et non l'acide carboxylique, réduisant considérablement l'affinité protonique du composé et la facilité des échanges acido-basiques usuels entre matrice et analyte. L'utilisation de CHCE en tant que matrice MALDI a pour conséquence une extinction des signaux due à la diminution de l'efficacité d'ionisation des espèces. Ainsi, dans ces conditions, le marquage covalent CHCA permet, quant à lui, une ionisation ultra-sensible et sélective du fragment d'intérêt. Présent en quantité équimolaire par rapport à l'analyte et non en très large excès, comme c'est usuellement le cas lorsque ce composé est utilisé en tant que matrice, celui-ci ne permet donc qu'une ionisation de proximité. On observe alors une extinction des signaux de tous composés non marqués et une ionisation efficace et sélective du seul fragment marqué.

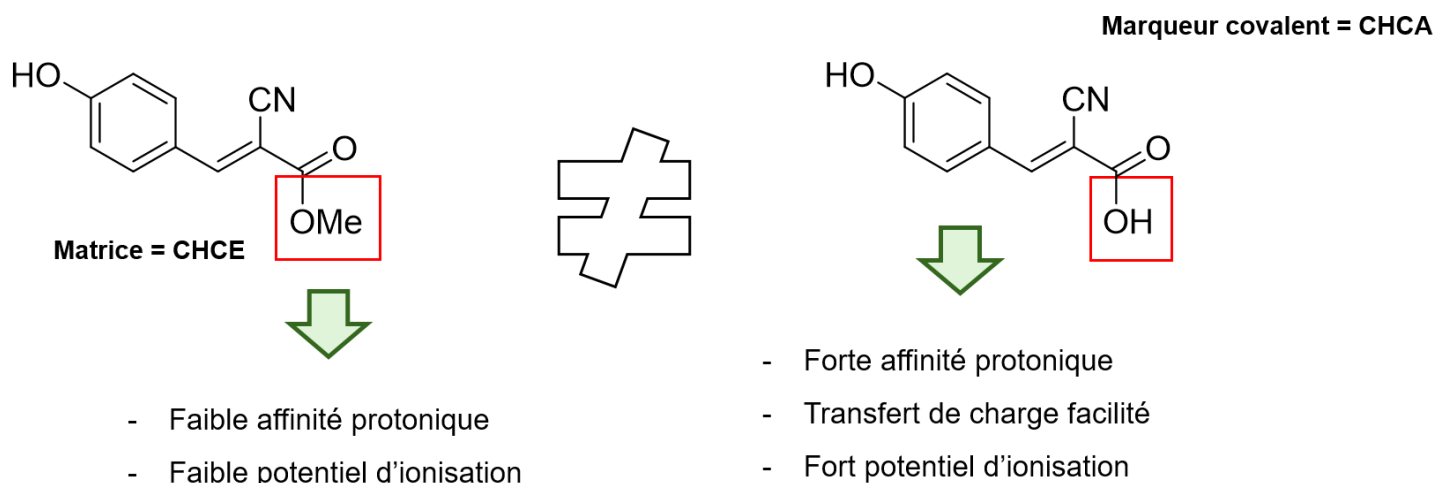


Figure 87 : Résumé des propriétés MALDI liées aux conditions d'analyse discriminantes développées

Dans le but de déterminer les conditions d'analyse préférentielles de nos analytes, plusieurs paramètres sont à prendre en compte, comme le solvant d'analyse ou la concentration de la matrice. Une analyse de référence utilisant CHCA à la concentration de 10 mg/mL est systématiquement réalisée afin d'illustrer les effets de marquage et de discrimination via de l'utilisation de la matrice CHCE.

Nous avons ainsi déterminé les limites de détection et de quantification des analytes d'intérêt en déposant les fragments peptidiques purs, préalablement synthétisés, à différentes concentrations, sur différents supports :

- La plaque MALDI Brüker® SmallAnchor™ 400µm
- Les lames ITO
- Les coupes de tissus associés aux pathologies cibles

Dans le cas des coupes de tissus, nous avons également travaillé sur l'optimisation des protocoles d'imagerie, afin de localiser l'analyte au sein d'un tissu d'intérêt.

## I. Caractérisation sur plaque MALDI

### a. Détermination de la LOD

Les expériences, menant à la détermination de la limite de détection des fragments peptidiques signatures, ont été menées sur les fragments natifs et sur les fragments marqués CHCA. Pour ce faire nous avons préparé une gamme de dilution pour chacun des fragments, respectivement liés au marquage des MMPs humaines 3, 9, 12 et 13 et à la MMP murine 12. (Tab. 8) Une gamme de dilution allant de  $10^{-5}M$  à  $10^{-12}M$  a été utilisée pour les fragments marqués CHCA, et de  $10^{-5}M$  à  $10^{-8}M$  pour les fragments non modifiés, le travail avec les fragments natifs nous permettant de démontrer le gain de détection associé au marquage CHCA .

Nous avons conservé l'utilisation de la matrice CHCA à une concentration usuelle de 10mg/mL, dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.1% TFA, comme référence et nous avons testé différentes concentrations pour la matrice CHCE : 1mg/mL et 0.1mg/mL. Nous avons utilisé des concentrations plus faibles pour la matrice CHCE, conditions permettant la détection des concentrations les plus faibles d'analyte. Chacune des différentes concentrations considérées pour les deux matrices a été testées dans quatre solvants différents, chacun préparé dans des solutions à 0.1% TFA. (Tab. 9)

<b>Matrice</b>	<b>Solvant</b>
CHCA 10mg/mL	H <sub>2</sub> O/ACN 50/50 0.1% TFA
CHCE 1mg/mL	H <sub>2</sub> O/ACN 50/50 0.1% TFA
	ACN 0.1% TFA
	Acétone 0.1% TFA
	MeOH 0.1% TFA
CHCE 0.1mg/mL	H <sub>2</sub> O/ACN 50/50 0.1% TFA
	ACN 0.1% TFA
	Acétone 0.1% TFA
	MeOH 0.1% TFA

*Tableau 9 : Résumé des conditions de préparation d'échantillon d'analyse MALDI testées*

Un total de douze conditions analytiques différentes couvrant différents ratios [matrice]/[analyte] et différentes propriétés d'hydrophobie ont été testées pour chacun des fragments considérés.

La figure 88 présente les spectres de chacun des composés, à leur limite de détection, dans les meilleures conditions analytiques trouvées. Le tableau 10 résume l'ensemble des résultats obtenus pour la caractérisation des différents fragments sur plaque MALDI.

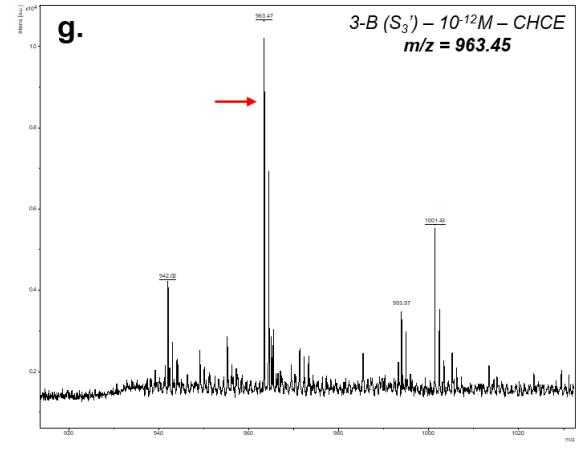
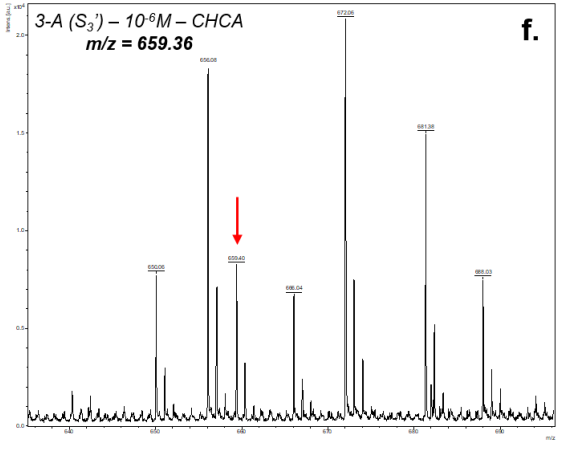
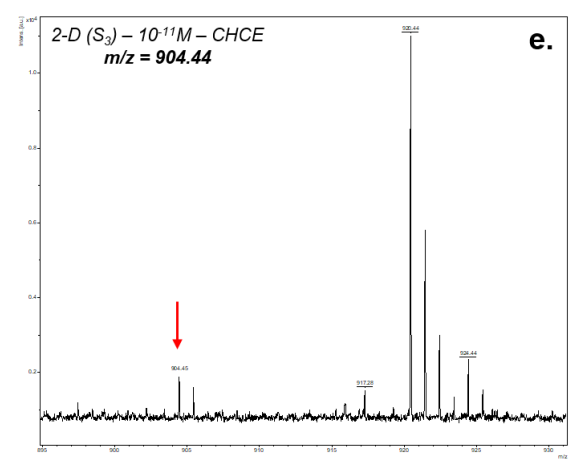
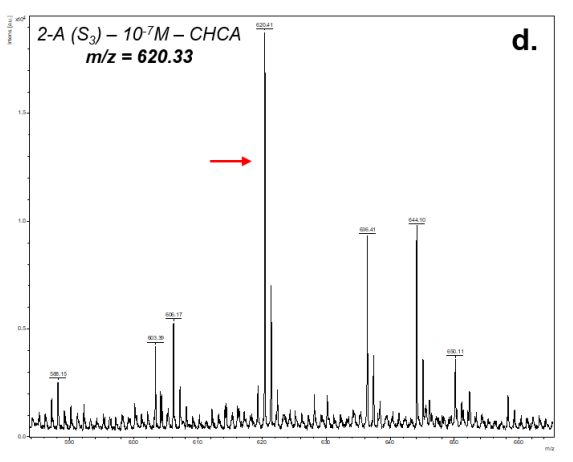
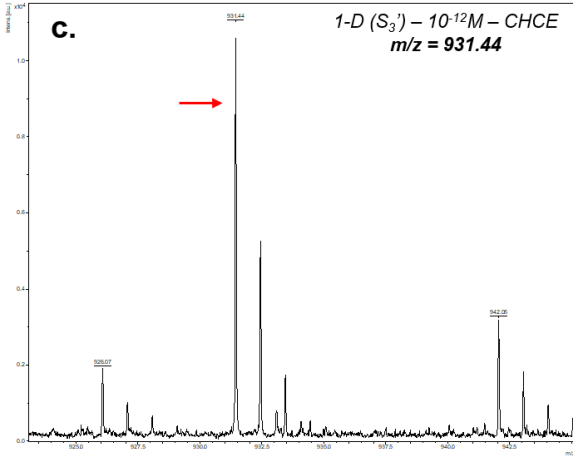
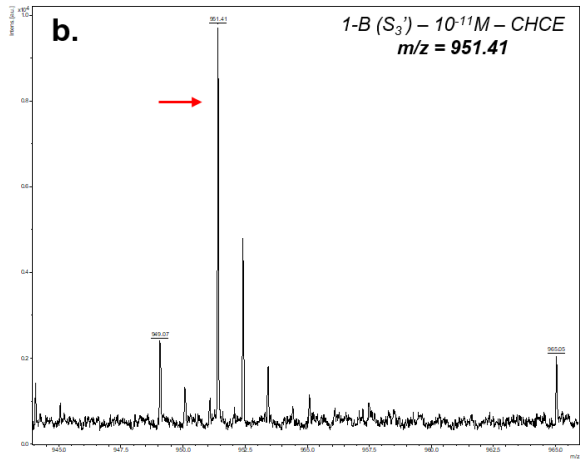
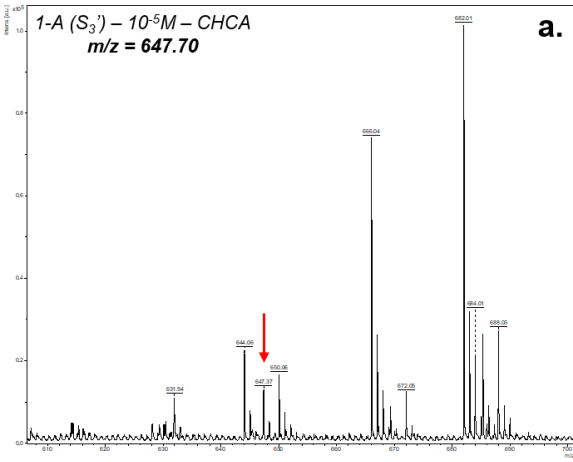
Fragments	N°	LOD Forme non marquée (CHCA)	N°	LOD Forme marquée (CHCA)	LOD Forme marquée (CHCE)	Conditions d'analyse optimale
12hS <sub>3</sub>	4-A	10 <sup>-8</sup> M	4-D	10 <sup>-9</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	CHCE 0.1mg/mL - Acétone
12hS <sub>3'</sub>	3-A	10 <sup>-5</sup> M	3-B	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	CHCE 0.1mg/mL - Acétone
12mS <sub>3</sub>	2-A	10 <sup>-7</sup> M	2-D	10 <sup>-8</sup> M	10 <sup>-11</sup> M	CHCE 0.1mg/mL - ACN
12mS <sub>3'</sub>	1-A	10 <sup>-5</sup> M	1-D	10 <sup>-8</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	CHCE 0.1mg/mL - ACN
			1-B	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-11</sup> M	CHCE 0.1mg/mL - ACN
13hS <sub>3'</sub>	5-A	10 <sup>-6</sup> M	5-D	10 <sup>-9</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	CHCE 0.1mg/mL - Acétone
9hS <sub>3'</sub>	6-A	10 <sup>-8</sup> M	6-D	10 <sup>-9</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	CHCE 0.1mg/mL - ACN
3hS <sub>3</sub>	7-A	10 <sup>-7</sup> M	7-D	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	CHCE 0.1mg/mL - Acétone

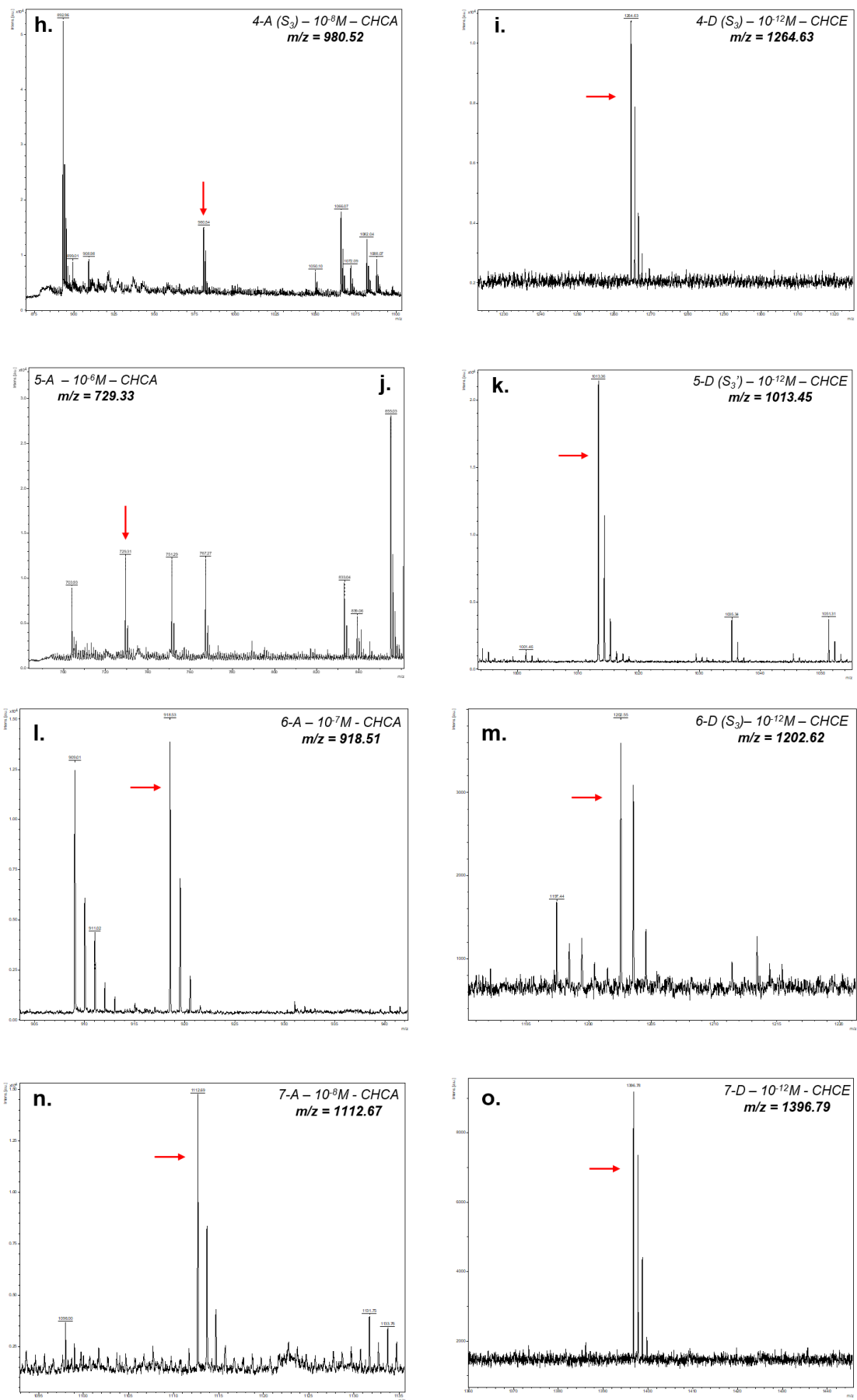
**Tableau 10 : Résumé des LODs et conditions analytiques optimales obtenues à la suite de la caractérisation des différents fragments sur plaque MALDI**

De manière générale, l'utilisation conjointe du marquage CHCA et de la matrice CHCE permet un gain de sensibilité allant de 10<sup>3</sup> à 10<sup>6</sup>, en comparaison avec leur fragment correspondant non marqué, garantissant systématiquement une LOD de l'ordre du picomolaire (correspondant à la détection d'environ 1 attomole), en conservant une résolution équivalente.

Sans surprise, la matrice CHCA permet d'atteindre une détection optimale des fragments non marqués, puisqu'il s'agit usuellement de la matrice de choix pour la détection de routine de peptides .

En revanche, la matrice CHCE à la concentration de 0.1mg/mL permet, quant à elle, d'atteindre des LODs optimales pour les fragments marqués. En effet, la matrice promeut l'ionisation/désorption des analytes à de faibles concentrations, tout en tirant profit de la présence du marqueur CHCA qui améliore leurs propriétés d'absorption de l'énergie laser.

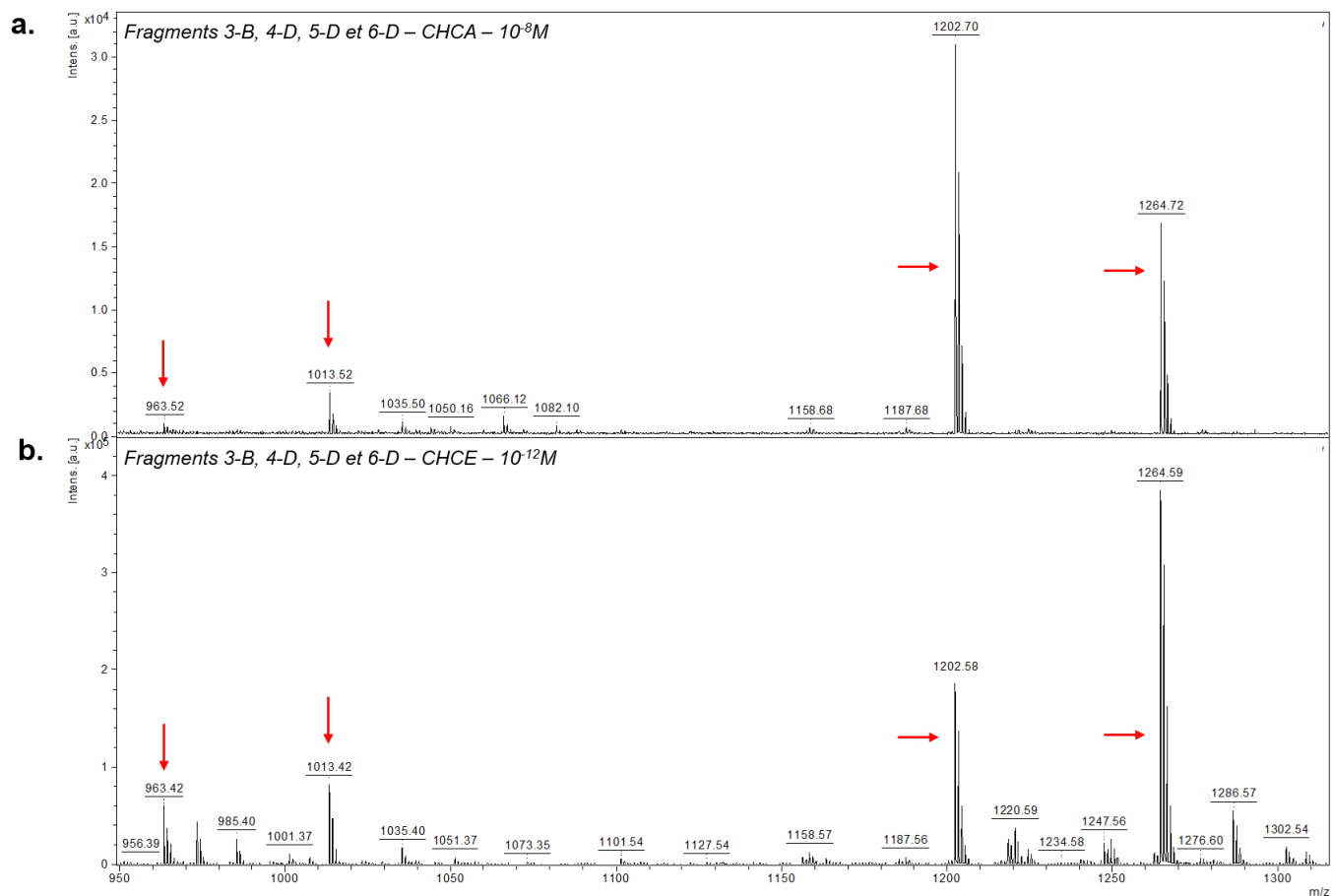




**Figure 88 : Spectres obtenus à leur LOD pour les fragments 1-A (a), 1-B (b), 1-D (c), 2-A (d), 2-D (e), 3-A (f), 3-B (g), 4-A (h), 4-D (i), 5-A (j), 5-D (k), 6-A (l), 6-D (m), 7-A (n) et 7-D (o) dans les matrices CHCE et CHCA**

Par la suite, des analyses de détection de mélange de fragments ont été menées dans le but d'étudier les problématiques de discrimination ionique liées à la présence de plusieurs fragments marqués CHCA dans le même milieu. Ces études ont été faites dans une idée de multiplexage où une seule sonde serait utilisée pour le marquage de plusieurs MMPs présentes dans le même milieu.

Ici, une solution mère contenant les fragments 3-B, 4-D, 5-D et 6-D à la concentration de  $10^{-3}M$  a été préparée, suivi d'une gamme de dilution allant de  $10^{-5}$  à  $10^{12}M$ . La gamme de dilution a été analysée dans les matrices CHCA 10mg/mL et CHCE 0.1mg/mL. La figure 89 présente les spectres obtenus dans les deux matrices.



**Figure 89 : Spectres associés à la détection du mélange des fragments 3-B ( $m/z = -963.45$ ), 4-D ( $m/z = 1264.64$ ), 5-D ( $m/z = 1013.45$ ) et 6-D ( $m/z = 1202.62$ ) à leur LOD dans les matrices CHCA (a) et CHCE (b)**

On obtient ici une LOD, dans CHCA, de  $10^{-8}M$  et, dans CHCE, de  $10^{-12}M$ . On peut donc en conclure que la détection simultanée des quatre fragments marqués CHCA est possible, sans impact majeur d'une éventuelle discrimination ionique. De plus, la matrice CHCE permet ici, une fois encore, un gain de sensibilité de  $10^4$ . Des expériences identiques sont à mener en milieux biologiques complexes, dans le but de valider ces conclusions.

## b. Caractérisation MS/MS

L'objectif premier est de pouvoir caractériser sans équivoque les fragments signatures par MALDI-MS/MS, aux différentes LODs. Cette caractérisation à faible concentration n'a pas été possible car nous avons rencontré des difficultés techniques vis-à-vis de l'appareillage et plus précisément, vis-à-vis de la calibration en mode MS/MS. L'utilisation d'un spectromètre de masse ESI-Q-TOF (Synapt2 Waters) nous a permis malgré tout de pouvoir caractériser classiquement les fragments à l'issue de leur synthèse. Il est à noter que les profils de spectres MS/MS de l'ion monochargé sont similaires en ESI et en MALDI.[209]

La figure 90 présente un exemple de spectre MS/MS du fragment 12mS<sub>3</sub>'BnCHCA (1-B).

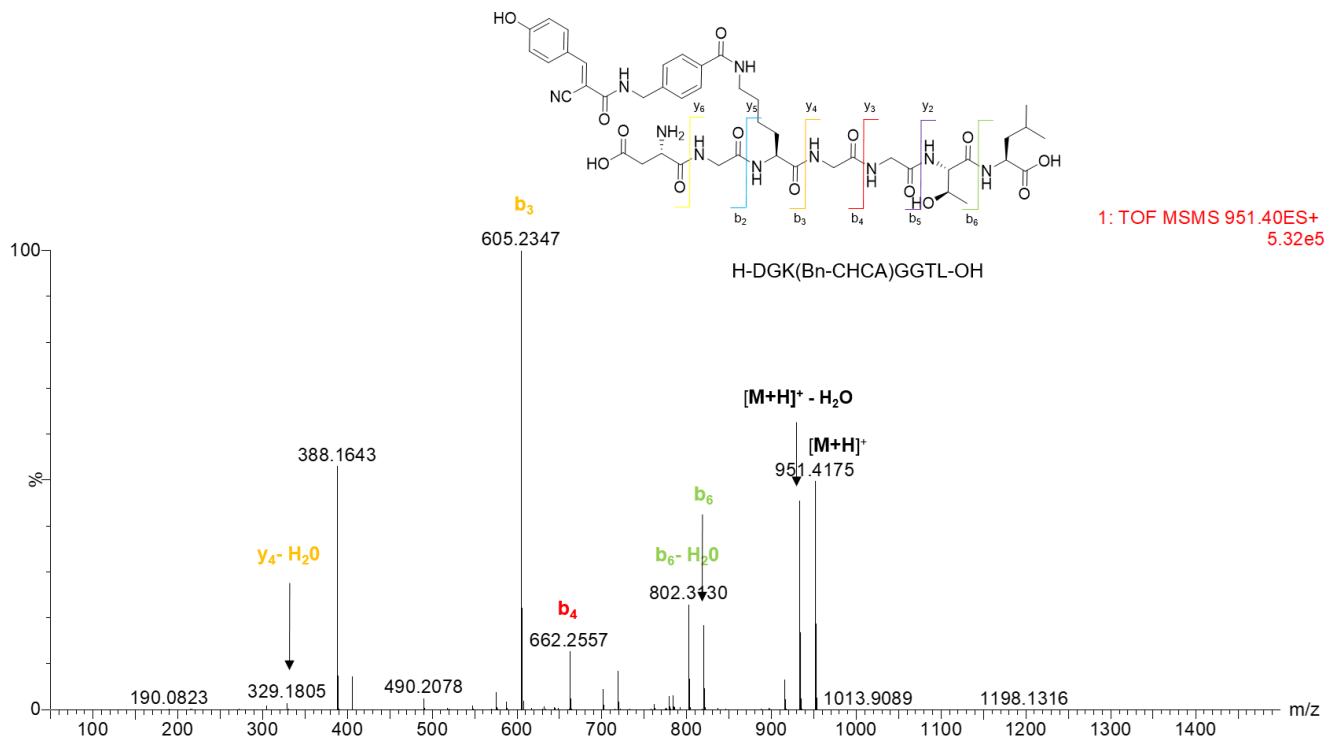
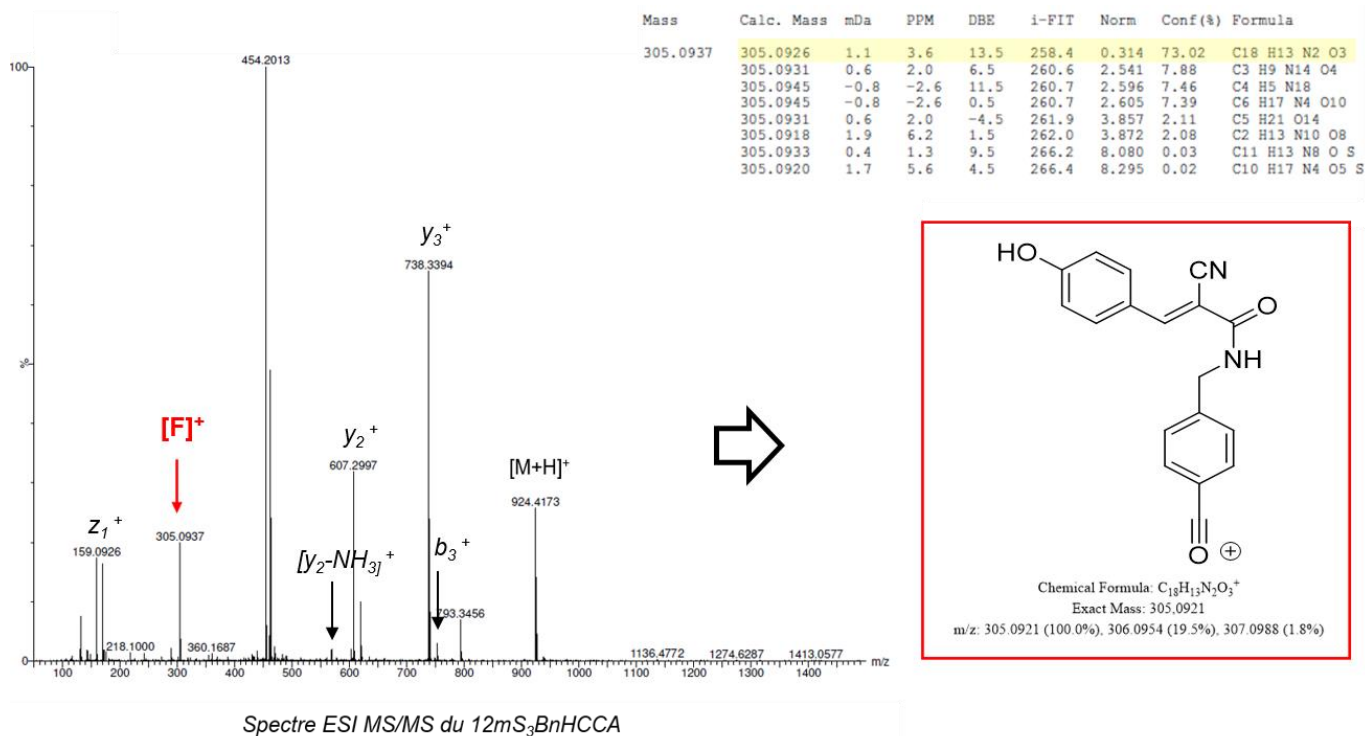


Figure 90 : Spectre obtenu pour l'analyse MS/MS par ESI du fragment 1-B (m/z = 951.41) à 100 μM

Par ailleurs, l'analyse MS/MS des peptides présentant un marquage Bn-CHCA (12mS<sub>3</sub>'BnCHCA et 12hS<sub>3</sub>'BnCHCA) nous a conduit à l'identification d'un ion, très intéressant, caractéristique du marquage CHCA à un m/z de 305. L'analyse haute résolution sur cet ion fragment nous a permis de déterminer sa formule brute et d'en déduire sa structure. Nous avons pu conclure qu'il s'agissait de l'ion acylium correspondant au marqueur CHCA lié au linker Bn. (Fig. 91) Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons synthétisé le fragment 12mS<sub>3</sub>BnCHCA, H-WMK(Bn-CHCA)R-OH, avec une masse molaire de 923.4 g/mol. Les expériences MS/MS menées sur ce peptide ont abouti aux mêmes conclusions, nous permettant de confirmer l'existence de cet ion acylium récurrent et caractéristique du marquage Bn-CHCA. Cet ion pourra donc être utilisé par la suite comme signature MS/MS du marquage pour l'identification de peptides marqués en milieux complexes.



**Figure 91 : Identification de l'ion acylium associé au marquage Bn-CHCA du peptide 12mS<sub>3</sub>BnCHCA (2-B) ( $m/z = 923.41$ )**

## II. Caractérisation sur lame ITO pour imagerie MALDI

Ces fragments signatures ont ensuite été challengés sur d'autres supports d'analyse. En effet, afin d'étudier des systèmes biologiques complexes, associés aux pathologies présentées dans le chapitre 4 de la partie A, il apparaissait indispensable de mettre au point un protocole innovant et unique afin de permettre la détection des fragments marqués d'intérêt sur des coupes de tissus avec l'objectif final de visualiser ces peptides par imagerie MALDI. Dans ce cadre, des lames adaptées de type ITO Brüker® (Indium Tin Oxyde), présentant sur une de leur face une couche d'oxyde d'indium, qui confère à la lame une planéité optimum et une bonne conductivité électronique, propriétés essentielles pour une analyse MALDI.

Nous avons ainsi procédé de manière similaire à l'optimisation des conditions de détection et caractérisation des fragments, précédemment décrites, à la différence près que nous avons réduit les conditions analytiques testées. Les objectifs étaient de confirmer l'utilisation des lames ITO comme support d'analyse et de vérifier que ce support n'induisait pas de pertes de sensibilité.

Des gammes de dilutions allant de 10<sup>-5</sup>M à 10<sup>-12</sup>M ont été utilisées pour chaque peptide marqué et de 10<sup>-5</sup>M à 10<sup>-8</sup>M pour chaque peptide natif. Nous avons utilisé une matrice CHCA à 10mg/mL comme matrice de référence, et, une matrice CHCE 0.1mg/mL dans un mélange eau/ACN 50/50 0.1% TFA, condition de solvant compatibles avec l'imagerie MALDI. En effet, à terme, la matrice est déposée sur un tissu via vaporisation et dans cette optique, il faut, d'un côté, impérativement utiliser un solvant ou mélange de solvants peu volatiles pour permettre à la fois la solubilisation de la matrice de travail avec les analytes, afin de favoriser leur co-cristallisation, et d'un autre côté, le dépôt doit sécher suffisamment vite pour ne pas créer de phénomène



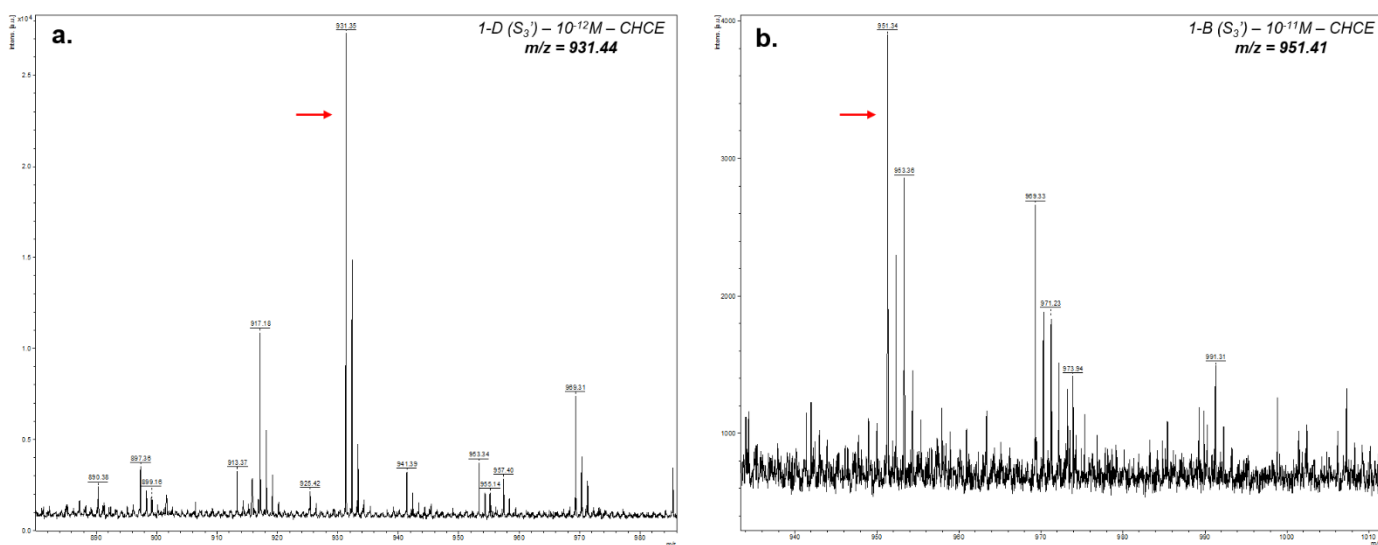
de dilution trop important au sein du tissu, garantissant une résolution spatiale optimale.. Il nous a donc été impossible d'utiliser de l'acétonitrile pur, du méthanol ou encore de l'acétone, solvants qui avaient été retenus lors de la détermination des conditions analytiques optimales en fluides, mais non adaptée dans notre cadre pour l'imagerie MALDI de peptides.

Nous avons pris pour modèles d'optimisation les fragments peptidiques issus du marquage  $S_3$  ou  $S_3'$  de la MMP-12 murine (1-A, 1-B, 1-D, 2-A et 2-D), en étudiant les formes non marquée et marquées CHCA de chacun de ces fragments. La figure 92 présente les spectres obtenus à la LOD, pour les fragments issus du marquage  $S_3'$ .

Le tableau 11 résume les LODs obtenues sur les différents supports pour les fragments peptidiques associés à la MMP-12 murine.

Fragment	m/z	LOD Plaque MALDI	LOD Lame ITO
2-A	620.33	$10^{-8}$ M	$10^{-7}$ M
2-D	904.44	$10^{-11}$ M	$10^{-11}$ M
1-A	647.7	$10^{-6}$ M	x
1-D	931.44	$10^{-12}$ M	$10^{-12}$ M
1-B	951.41	$10^{-11}$ M	$10^{-11}$ M

**Tableau 11 : Résumé des LODs obtenus pour les fragments associés au marquage  $S_3$  de la MMP-12 murine, soit 2-A et 2-D, et au marquage  $S_3'$ , soit 1-A, 1-B et 1-D, sur plaque MALDI et sur lame ITO**



**Figure 92 : Spectres sur lame ITO, dans la matrice CHCE, des fragments 1-D (a) et 1-B (b), issus du marquage  $S_3'$  de la MMP-12 murine**

L'utilisation des lames ITO comme support de dépôt n'induit donc aucune modification significative des LODs des fragments. L'amélioration des signaux MALDI due au marquage CHCA est également visible sur ce type de support avec une amélioration de la LOD allant de  $10^4$  à  $10^7$  par rapport aux fragments natifs. L'utilisation de la matrice CHCE, particulièrement à faible concentration, est aussi bénéfique pour la LOD des fragments et la qualité des signaux associés avec une amélioration de la sensibilité allant de  $10^3$  à  $10^5$  pour les fragments

marqués alors que l'utilisation de cette matrice est défavorable dans le cas des fragments natifs, induisant une perte de sensibilité. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus sur plaque MALDI et valident l'utilisation du support ITO.

### III. Caractérisation sur coupes de tissus

Nous avons ensuite exploré la détection des fragments peptidiques directement sur les coupes de tissus. Pour ce faire, nous avons utilisé des coupes de poumons et des coupes d'aortes murines issues de souris ApoE, une lignée utilisée comme modèle de l'athérosclérose. Cette pathologie est également étroitement liée à une surexpression de la MMP-12. En effet, l'athérosclérose est caractérisée par le développement d'une plaque lipidique dans le canal artériel appelée plaque d'athérome. À un stade avancé de la pathologie, on observe une rupture de cette plaque, à l'origine de conséquences graves telles que l'infarctus ou l'AVC. Le développement et la rupture de la plaque d'athérome sont liés à une surproduction de macrophages induisant, en particulier, la surexpression de certaines protéases et tout particulièrement de la MMP-12.[210]

Dans les deux cas, les coupes sont issues d'organes murins frais, congelés dans l'azote liquide, puis enrobés dans une matrice de carboxyméthylcellulose (enrobage de choix dont l'optimisation est illustrée en IV. 1) afin de maintenir leur intégrité lors de la découpe. Des coupes de 10µm ont été générées via l'utilisation d'un cryomicrotome, puis directement déposées sur les lames ITO. Les coupes ont ensuite été séchées sous dessiccateur puis maintenues sous vide et au sec pour une utilisation ultérieure.



*Aorte murine*



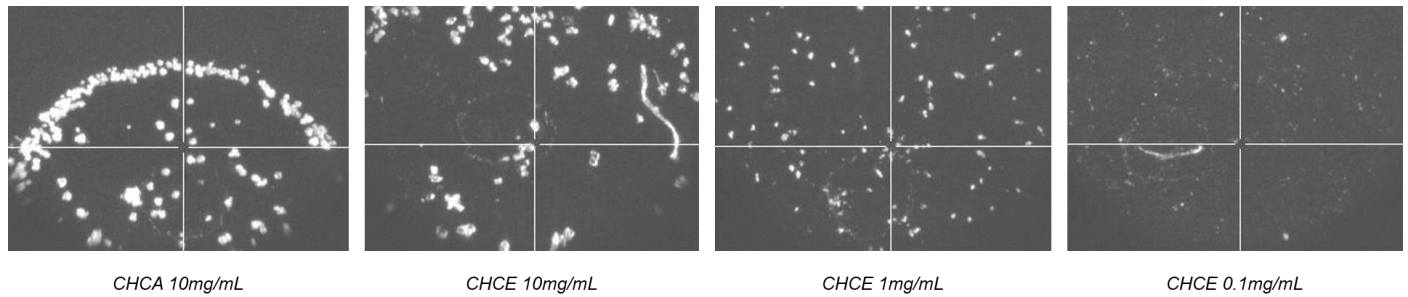
*Poumon murin*

*Figure 93 : Coupes d'aorte et poumons murins sur lame ITO*

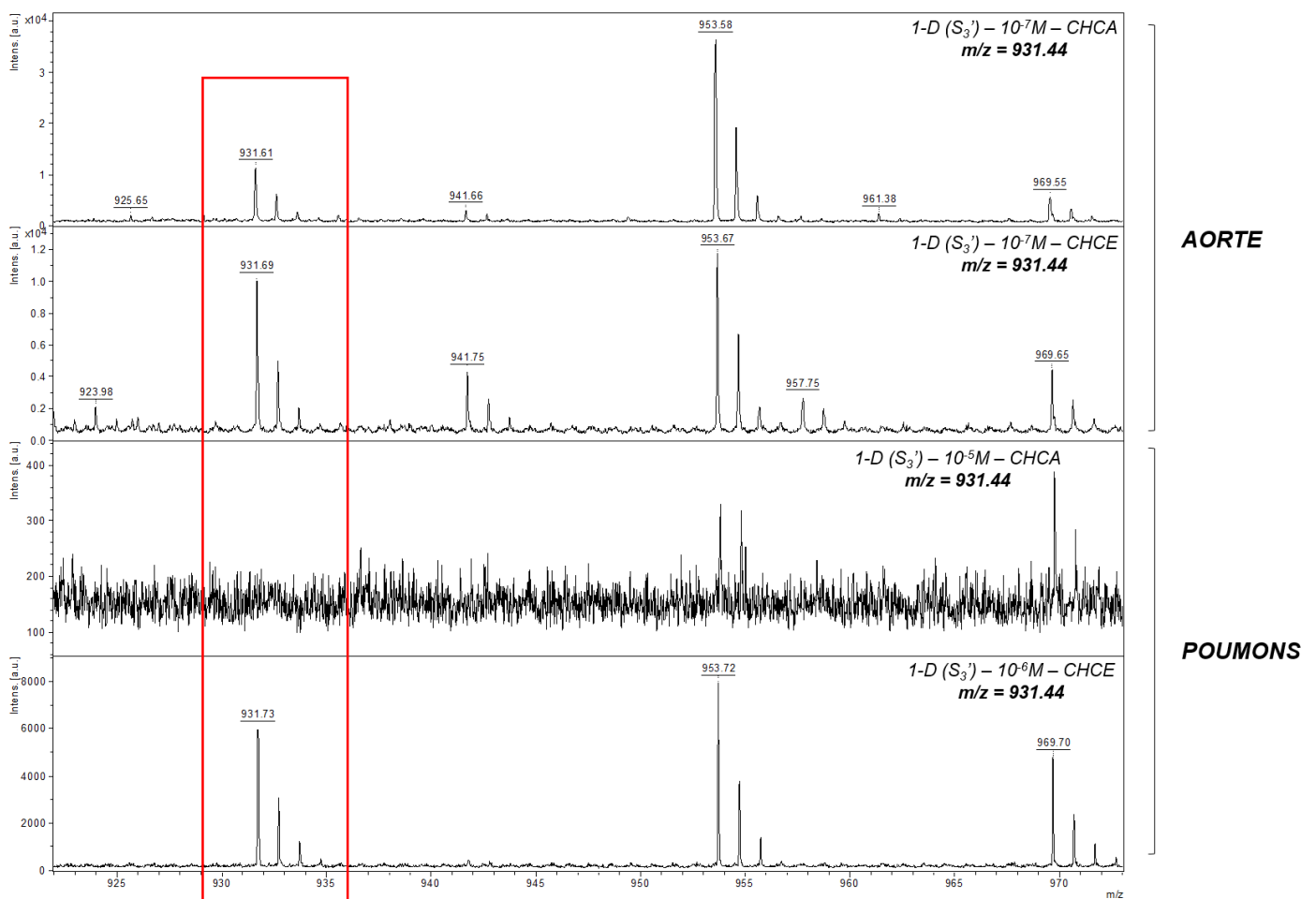
Les tissus ont d'abord dû être délipidés avant toute analyse. En effet, les lipides présents naturellement dans tout organisme biologique peuvent être particulièrement délétères dans nos conditions d'analyse MALDI, et sont responsables d'un phénomène de discrimination ionique très important.

Un dépôt à  $10^{-5}M$ ,  $10^{-6}M$  et  $10^{-7}M$  du fragment  $12mS_3'CHCHCA$  (1-D), choisi pour cette étape d'optimisation, est effectué sur les coupes préalablement traitées. Pour chacun des tissus, nous avons déposé le fragment dans deux matrices différentes, une matrice CHCA à 10mg/mL comme référence et une matrice CHCE 1mg/mL. Le choix de cette concentration de 1mg/mL a été fait selon les observations précédentes que plus la matrice CHCE est diluée plus elle permet l'ionisation et la détection de l'analyte à des concentrations

basses. Or, une concentration de 0.1mg/mL s'est montrée incompatible avec le travail sur tissus, ne permettant plus aucune détection. (Fig. 94)



**Figure 94 : Visualisation des différents types de cristallisation dans H<sub>2</sub>O/ACN 50/50 0.1% TFA en fonction des matrices utilisées et de leurs concentrations**



**Figure 95 : LODs obtenues pour la détection du fragment 1-D sur coupes de poumons (spectres du bas) et d'aortes murine (spectres du haut) dans les matrices CHCE et CHCA**

Les bénéfices du marquage et de la matrice CHCE sont clairement visibles dans le cas des coupes de poumons. En effet, le fragment ne se détecte pas du tout dans la matrice CHCA, et ce même à 10<sup>-5</sup>M, alors que la matrice CHCE permet non seulement sa détection mais également d'atteindre une LOD de 10<sup>-6</sup>M.

Ce phénomène est beaucoup moins marquant dans le cas des coupes d'aortes. Cependant, il faut noter que les tissus n'ont pas la même homogénéité. En effet, dans le cas des coupes de poumons, il s'agit d'une « tranche » de tissu plein sur lequel il est facile de déposer le peptide avec la certitude que celui-ci se trouve sur le tissu. Dans le cas des coupes d'aortes, il s'agit d'un canal coupé dans sa longueur, soit une coupe majoritairement creuse. Ainsi, statistiquement, lorsque l'on dépose le peptide sur le tissu, sachant que le dépôt fait environ 2mm de diamètre, celui-ci se retrouve principalement dans le canal aortique et donc sur l'enrobage de carboxyméthylcellulose. (Fig. 96) Ainsi, lors de l'analyse MALDI, ces analytes ne souffrent pas de l'extinction du signal due à la nature organique du support, il est donc difficile de conclure ou de s'appuyer sur les résultats obtenus sur coupes d'aortes.

Ces résultats nous ont permis de conclure qu'il était possible de détecter les fragments signatures sur des coupes de tissus pulmonaires : nous conserverons ce modèle par la suite.

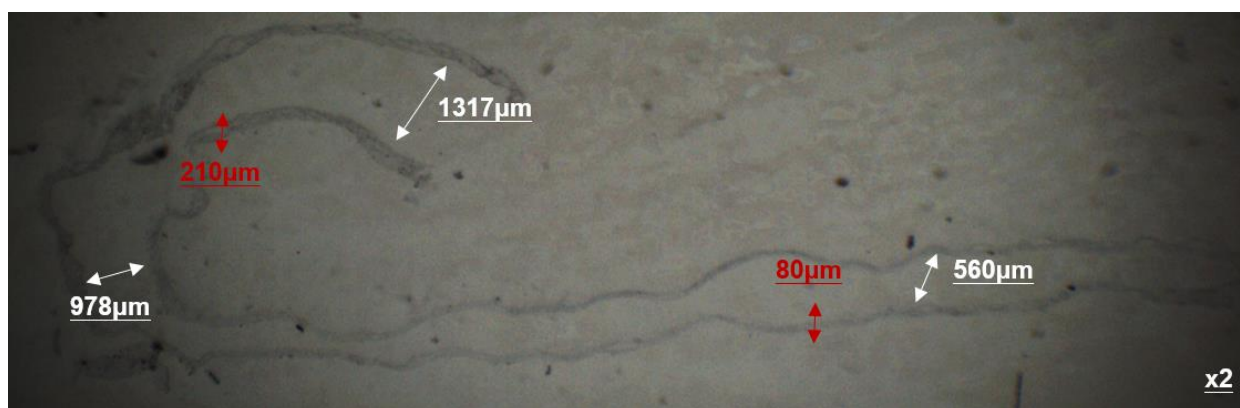


Figure 96 : Mesures d'une coupe longitudinale d'aorte murine

LOD Plaque MALDI	LOD lame ITO	LOD Aortes	LOD Poumons
$10^{-12}M$	$10^{-11}M$	$10^{-7}M$	$10^{-6}M$

Tableau 12 : Résumé des LODs obtenues pour le fragment 1-D sur les différents supports considérés, dans la matrice CHCE

À titre de caractérisation, il est ainsi possible d'établir le coefficient d'extinction de ces tissus due à leur nature organique. Il s'agit de la différence entre la LOD obtenue sur la lame ITO, et celle obtenue sur les tissus. (Tab. 12) Dans ce cas, le coefficient d'extinction du poumon est donc de  $10^5$ .

#### IV. Caractérisation en imagerie MALDI

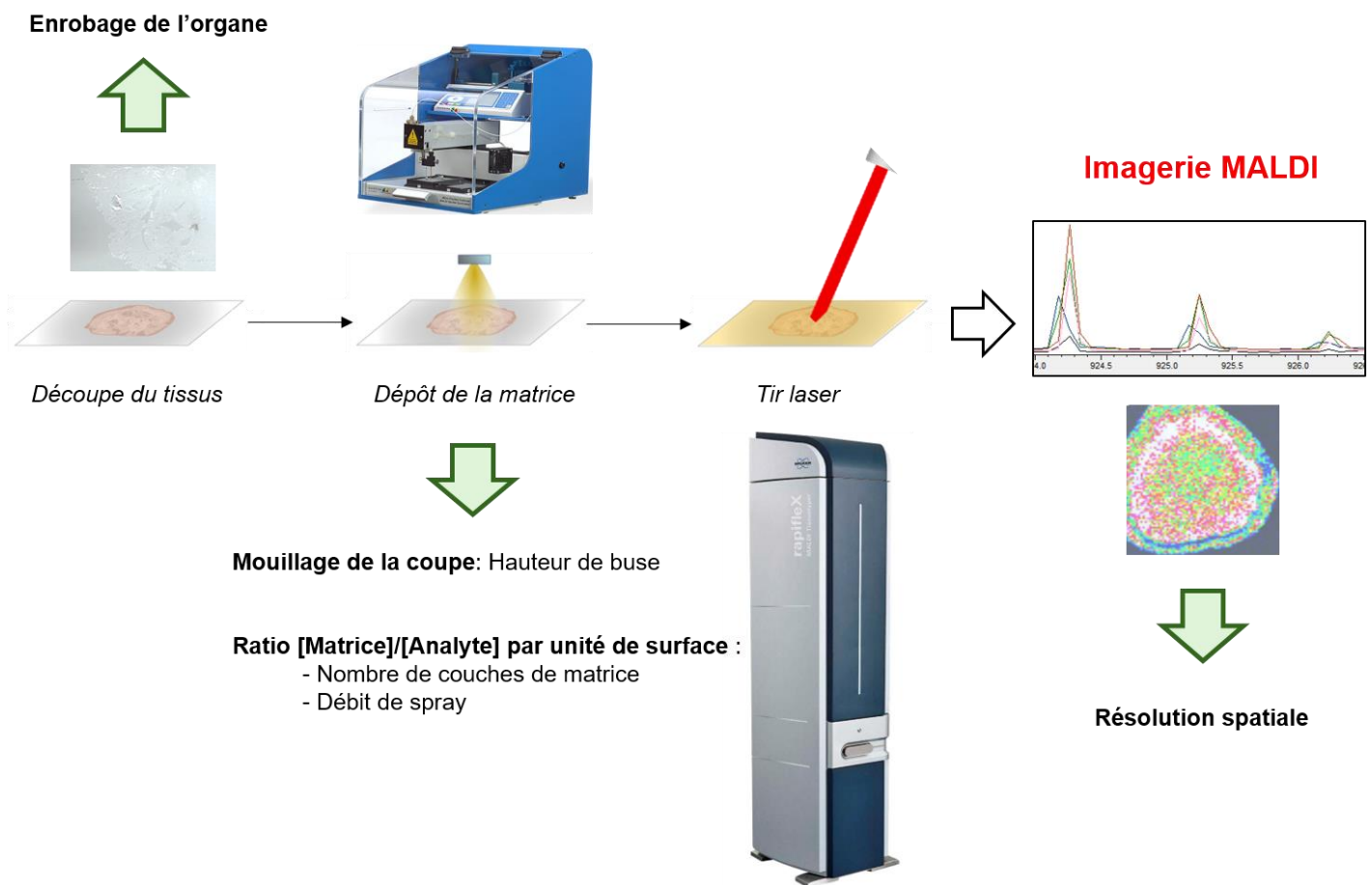
##### a. Optimisation des protocoles d'analyse

Comme présenté dans le chapitre 1 de la partie A, l'analyse par imagerie MALDI obéit à plusieurs règles :

- Travailler avec des coupes de tissu intègres compatibles avec la technologie MALDI
- Déposer la matrice de façon homogène, en quantité contrôlée sur toute la surface de la coupe
- Humidifier le tissu de manière suffisante, lors du dépôt de la matrice, pour permettre l'extraction des analytes tout en évitant le phénomène de dilution de surface.

Chacune de ces règles est liée à une caractéristique technique de l'imagerie MALDI. (Fig. 97)

- **L'enrobage de l'organe** : Il est nécessaire d'enrober l'organe avant sa découpe afin de maintenir l'intégrité des coupes générées. Les solutions utilisées pour l'enrobage doivent être compatibles avec l'analyse MALDI et ne pas avoir d'influence sur les signaux obtenus.
- **Le mouillage du tissu** : Celui-ci doit permettre l'extraction des analytes afin de promouvoir leur co-cristallisation avec la matrice. Or si ce taux d'humidité est trop important, il peut provoquer la dilution des analytes de surface au lieu de promouvoir leur co-cristallisation. Ce phénomène est contrôlé par la hauteur de la buse permettant la vaporisation de la matrice.
- **Le nombre de couches de matrice** : Il permet de contrôler la quantité de matrice déposée par unité de surface.
- **Le débit de spray** : Le dépôt de la matrice par spray est la méthode la plus efficace pour déposer la matrice de la manière la plus homogène possible sur toute la surface du tissu. On utilise donc une vaporisation robotisée, guidée par ordinateur.

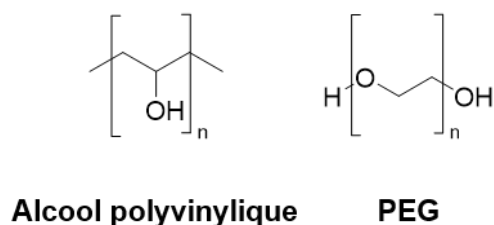


*Figure 97 : Présentation des différents paramètres influençant l'analyse par imagerie MALDI*

Chaque paramètre a été étudié de manière individuelle pour optimiser les protocoles d'imagerie MALDI pour la détection sur tissus des fragments issus du marquage de la MMP-12 murine.

## 1. L'enrobage des tissus

C'est généralement l'OCT, une solution composée d'alcool polyvinylique et de PEG, qui est utilisé pour l'enrobage des organes avant leur découpe et utilisation en histologie. Or, le PEG est totalement incompatible avec l'analyse MALDI. En effet, c'est un composé qui s'ionise très facilement, engendrant des phénomènes de discrimination ionique extrêmes.

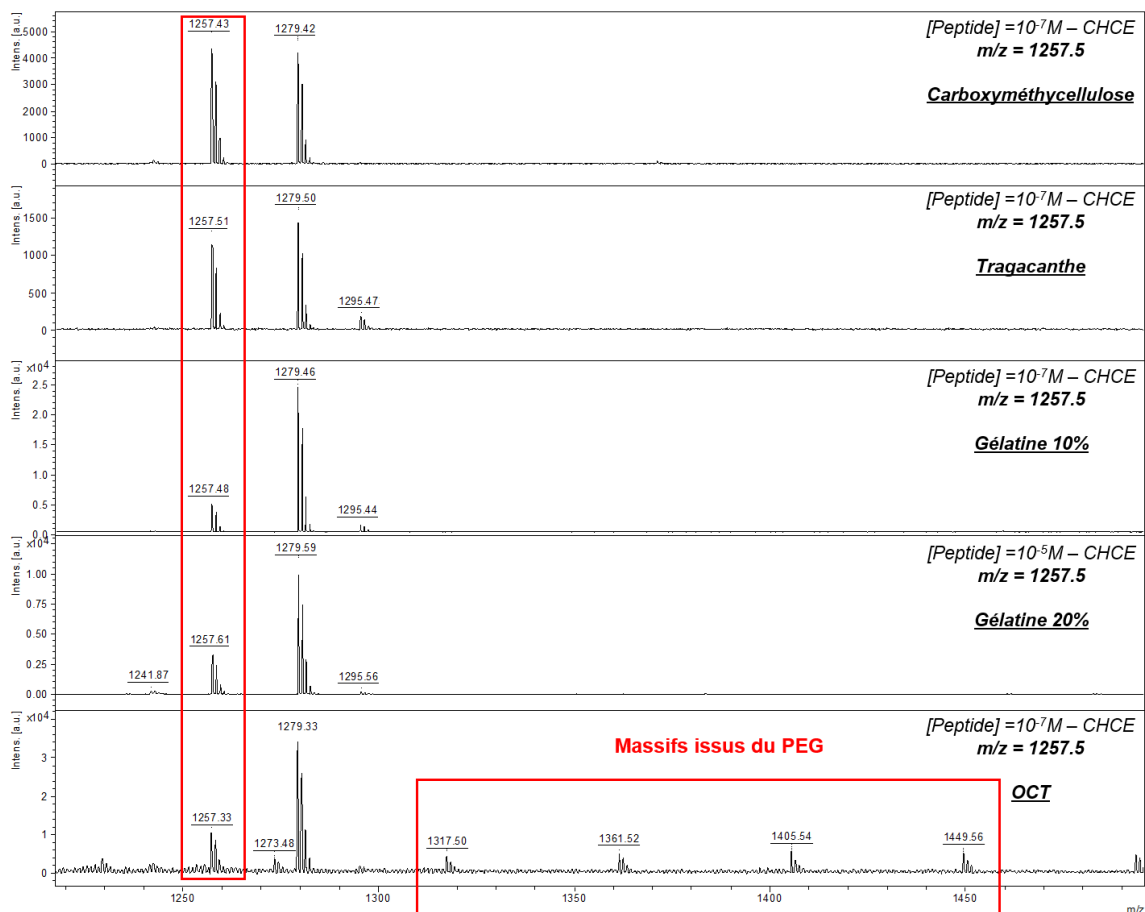


*Figure 98 : Structures des composés chimiques de bases entrant dans la composition de l'OCT*

Afin de remplacer l'OCT, nous avons identifié, dans la littérature, quatre composés, compatibles avec la technologie MALDI :

- Une solution de carboxyméthylcellulose
- Une solution de Tragacathe, un dérivé de sève végétale [65]
- Une solution de gélatine à 10% [63]
- Une solution de gélatine à 20%

Toutes ces solutions ont été utilisées pour enrober des aortes murines lors de leur prélèvement. Des coupes de 7 $\mu$ m ont ensuite été générées, afin de minimiser les effets d'extinction de signal. Nous avons, ensuite, effectué un dépôt sur les coupes de tissus, et analysé les dépôts en utilisant une matrice CHCE à 1mg/mL dans un mélange eau/ACN 50/50 0.1% TFA. Nous avons ainsi comparé la qualité et l'intensité des signaux obtenus pour un peptide de référence à 10<sup>-7</sup>M ayant une masse monoisotopique de 1256.5 Da. Il s'agit d'un peptide, marqué CHCA, dont la séquence est CHCA-BpA-PTTKFAA-NH<sub>2</sub>. (Fig. 99)



**Figure 99 : Comparaison des différents enrobages considérés dans la matrice CHCE**

Les quatre solutions permettent de remplacer efficacement l’OCT. En effet, elles ont toutes permis d’obtenir des coupes d’aortes intègres et ne sont à l’origine d’aucun signal parasite en MALDI. Afin de faire un choix parmi les différents enrobages, nous avons considéré la facilité de préparation et la qualité générale des spectres obtenus. Ainsi, nous avons pu éliminer la gélatine car les solutions se sont avérées fastidieuses à préparer. Nous avons comparé le rapport signal/bruit et la résolution du pic obtenus avec la carboxyméthylcellulose et la Tragacanth. (Tab. 13)

Composé	S/N	Résolution
Carboxyméthylcellulose	62	7508
Gomme de Tragacanth	37	7679

**Tableau 13 : Caractéristiques spectrales obtenues pour les deux enrobages**

La carboxyméthylcellulose présentant le meilleur rapport S/N, avec une résolution équivalente, elle a été sélectionnée comme enrobant.

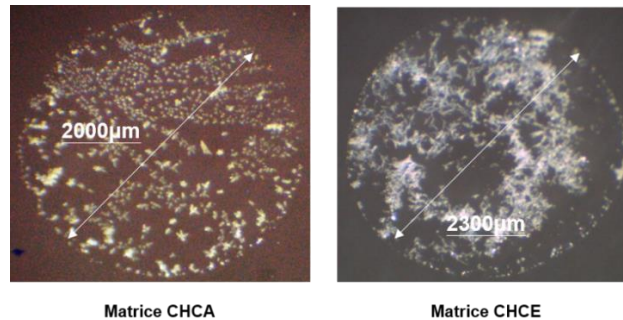
## **2. Le débit de spray**

Concernant le débit de vaporisation, nous avons tenté de se rapprocher au mieux des conditions de dépôt goutte sèche sur plaque ITO. Pour rappel, il s’agissait d’un dépôt de 0.6µL de matrice à une concentration de 1mg/mL, soit une quantité totale de matrice déposée de 6.10<sup>-4</sup> mg. D’après des mesures de dépôt goutte



sèche sur ITO au microscope, nous avons pu établir que le diamètre moyen d'un dépôt est d'environ 2mm, ce qui nous fait donc une surface totale de  $\pi \text{ mm}^2$ . (Fig. 100) En considérant le dépôt homogène, on obtient un ratio de  $1.91.10^{-4} \text{ mg}$  de matrice par  $\text{mm}^2$ . Cette valeur est bien entendue à prendre avec précautions puisque la cristallisation est inhomogène au sein du dépôt. Ces calculs permettent l'obtention d'un ordre de grandeur qu'il faudra par la suite optimiser au regard des différents paramètres et de l'expérience.

Nous avons modélisé le tissu d'intérêt par un carré de 2 cm de côté, soit une aire totale de  $400 \text{ mm}^2$ . Via le ratio de matrice par unité de surface précédemment déterminé, il nous faut donc déposer  $80\mu\text{g}$  de matrice soit un volume de  $80\mu\text{L}$  pour une matrice à  $1\text{mg/mL}$ .



*Figure 100 : Mesure des dépôts goutte sèche sur plaque ITO dans CHCA et dans CHCE*

En considérant que le temps nécessaire pour vaporiser est de 30 secondes, et en prenant en compte la nécessité d'avoir un débit croissant au fur et à mesure des couches déposées, essentiel à la bonne extraction des analytes et donc à leur co-cristallisation avec la matrice, nous avons établi le gradient suivant :

- 1<sup>ère</sup> couche :  $10\mu\text{L}/\text{min}$
- 2<sup>ème</sup> couche :  $15\mu\text{L}/\text{min}$
- 3<sup>ème</sup> couche :  $20\mu\text{L}/\text{min}$
- 4<sup>ème</sup> couche et plus :  $25\mu\text{L}/\text{min}$

Ce débit a été déterminé selon le volume de matrice qu'il nous fallait déposer, sur le modèle des recommandations constructeurs. En effet, Brüker préconise un gradient croissant 10-20-30-40 $\mu\text{L}$ , cependant, ce gradient aboutirait à un dépôt trop rapide de la matrice. Nous avons préféré un gradient plus lent de manière à favoriser l'extraction des analytes par le solvant de dépôt.

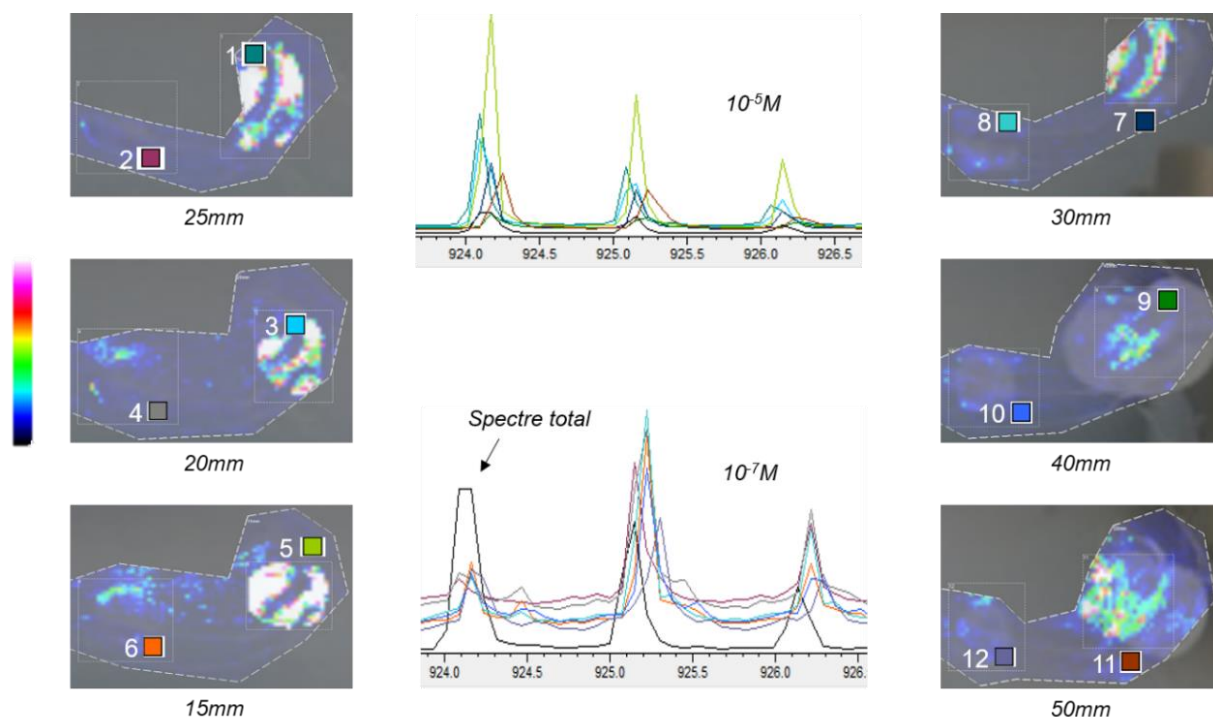
Avec le débit mis en place, il nous faut un minimum de 9 couches pour atteindre le volume de matrice nécessaire évalué.

### **3. La hauteur de la buse de spray**

Nous avons déposé  $0.6\mu\text{L}$  du fragment peptidique  $12\text{mS}_3\text{BnCHCA}$  (Fragment 2-B) à  $10^{-5}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$  et  $10^{-9}\text{M}$ , sur des coupes d'aortes murine de  $10\mu\text{m}$ . Nous avons ensuite vaporisé la matrice CHCE  $1\text{mg/mL}$  selon le gradient de débit précédemment déterminé (10 couches). Nous avons fait varier la hauteur de la buse de vaporisation selon un axe Z vertical où  $Z=0$  correspond à la position initiale de la buse (position la plus haute). Nous avons utilisé six hauteurs de buse différentes : 15mm, 20mm, 25mm, 30mm, 40mm et 50mm, 50 étant la valeur où la buse est la plus proche de la coupe de tissu.



Nous avons lancé une acquisition d'image, avec une résolution spatiale de 100 $\mu$ m, et comparé l'intensité des signaux obtenus pour le pic correspondant à l'analyte. La figure 101 résume les spectres et les images obtenus.



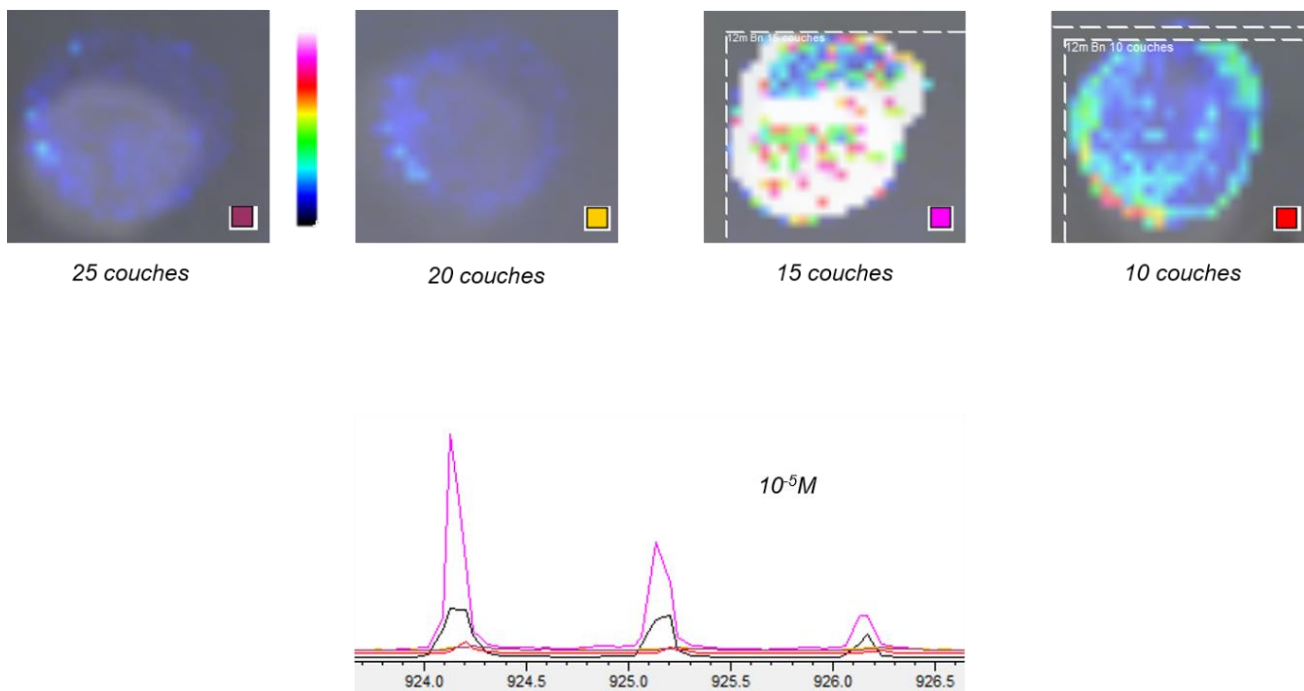
**Figure 101 : Spectres et images du fragment 12mS<sub>3</sub>BnCHCA (m/z =924.41) obtenus en fonction de la hauteur de la buse de spray, dans la matrice CHCE 1mg/mL ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.1% TFA. Les zones impaires correspondent à un dépôt à 10<sup>-5</sup>M, les zones paires à un dépôt à 10<sup>-7</sup>M**

Dans ces conditions, nous n'avons jamais détecté le peptide en-deçà de 10<sup>-7</sup>M. C'est une hauteur de buse comprise entre 0 et 15mm qui permet d'obtenir les pics les plus intenses sur le spectre et la meilleure visualisation du peptide sur le spot. Plus on rapproche la buse de la coupe, moins les pics sont intenses et moins le peptide est visible sur l'image du spot. Lorsque la buse se trouve être trop près de la coupe, le spray entraîne la dilution des analytes de surface avant que le dépôt ne sèche, ce qui aboutit à une mauvaise détection des analytes.

Nous avons donc choisi de conserver, pour la suite des analyses, une hauteur de buse de 15mm.

#### **4. Le nombre de couches de matrice**

Dans l'optique de déterminer plus précisément le nombre optimal de couche nécessaire, nous avons déposé, sur des coupes d'aortes de 10 $\mu$ m, le fragment 12mS<sub>3</sub>BnCHCA (2-B) à 10<sup>-5</sup>M. Nous avons ensuite vaporisé la matrice CHCE 1mg/mL selon le gradient de débit précédemment déterminé, avec une hauteur de buse de spray de 15mm. Nous avons fait varier le nombre de couches de matrice déposées, de 10 à 25 couches avec pas de 5. De même que précédemment, nous avons comparé les différents spectres et image en termes de qualité d'image et d'intensité de signal. Nous avons acquis les images avec une résolution spatiale de 100 $\mu$ m. La figure 102 résume les spectres et les images obtenus.



**Figure 102 : Spectres et images obtenus du  $12mS_3BnCHCA$  ( $m/z = 924.41$ ) en fonction du nombre de couches de matrice déposées, dans la matrice CHCE  $1mg/mL$  ACN/ $H_2O$  50/50 0.1% TFA**

Ces résultats nous ont permis de conclure que la valeur idéale était de 15 couches de matrice. En effet, c'est dans ces conditions que l'on obtient le pic le plus intense. Cette différence d'intensité est également clairement visible sur les images des spots où plus le spot est blanc et lumineux, plus l'analyte est présent. Cette valeur nous mène donc, dans nos conditions de dépôt et en tenant compte des considérations précédemment établies, à un volume d'environ  $170\mu L$  de matrice déposée. Cette valeur est deux fois supérieure à celle que nous avons estimée mais reste cohérente avec nos calculs, et dans l'ordre de grandeur défini, compte tenu de l'imprécision liée à la taille du tissu (il a été montré que l'aorte n'était pas le tissu de choix), ou à l'estimation de la durée de vaporisation d'une couche de matrice. Nous conserverons donc pour la suite de ces travaux la valeur de 15 couches de matrice.

### **5. La résolution spatiale**

Les expériences précédentes nous ont permis de déterminer les différents paramètres essentiels à l'obtention d'images par MALDI. La résolution spatiale, quant à elle, est un paramètre qui relève plus de la qualité des images obtenues que de leur obtention propre. En effet, elle caractérise la distance entre deux tirs laser et permet donc de conclure sur la taille du plus petit objet détectable. Ainsi, au plus la résolution spatiale est faible, au plus le nombre de pixels pris en compte augmente et donc plus la résolution de l'image augmente.

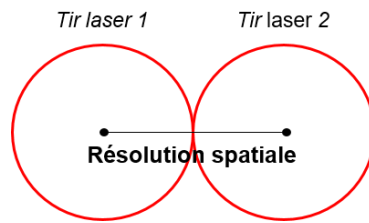


Figure 103 : Résolution spatiale

Nous avons déposé, sur des coupes de poumons de  $10\mu\text{m}$ , le fragment  $12\text{mS}_3\text{BnCHCA}$  à  $10^{-5}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$  et  $10^{-7}\text{M}$ . Nous avons ensuite vaporisé 15 couches de matrice CHCE  $1\text{mg/mL}$  selon le gradient de débit précédemment déterminé, avec une hauteur de buse de spray de  $15\text{mm}$ . Nous avons, ici, fait varier la valeur de la résolution spatiale allant de  $25\mu\text{m}$  à  $100\mu\text{m}$  par pas de 25. Nous avons comparé les différents spectres et images en termes de sensibilité de détection et d'intensité de signal. (Fig. 106)

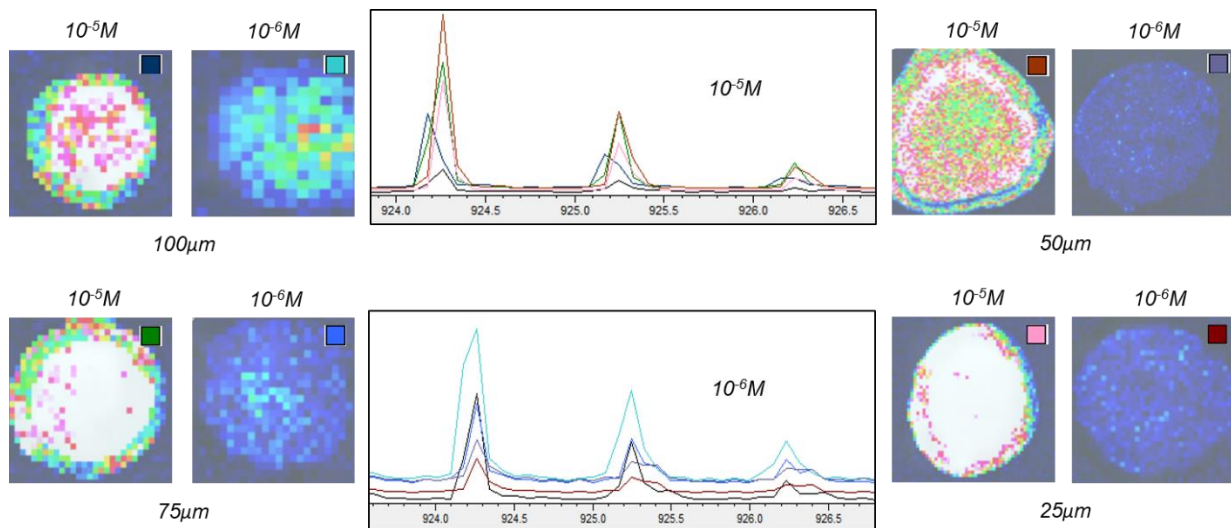


Figure 104 : Résumé des spectres et images obtenus à la suite de la variation de la valeur de la résolution spatiale

Nous n'avons jamais détecté le peptide à  $10^{-7}\text{M}$  mais le peptide a été visualisé jusqu'à  $10^{-6}\text{M}$  quelles que soient les valeurs de résolution spatiale testées. Cette valeur est en cohérence avec les valeurs de coefficient d'extinction précédemment déterminée. Le pic le plus intense à  $10^{-5}\text{M}$  est atteint avec une résolution spatiale de  $50\mu\text{m}$ , mais c'est clairement avec une résolution de  $100\mu\text{m}$  que la détection du peptide à  $10^{-6}\text{M}$  est la meilleure. A une valeur de  $25\mu\text{m}$ , le signal est trop intense et la résolution trop faible, ce qui conduit à l'obtention d'une image saturée ou les variations de densité spatiale du peptide ne sont plus visibles. Nous avons choisi, pour la suite de conserver la valeur de  $50\mu\text{m}$  car elle permet l'obtention d'images de bien meilleure qualité et permet une sensibilité tout à fait raisonnable.

Nous conserverons donc pour la suite des expériences d'imagerie MALDI les paramètres suivants :

- Un gradient de débit croissant : 10-15-20-25  $\mu\text{L}/\text{min}$
- Une hauteur de buse de 15mm
- 15 couches de matrice déposées
- Une résolution spatiale de 50 $\mu\text{m}$

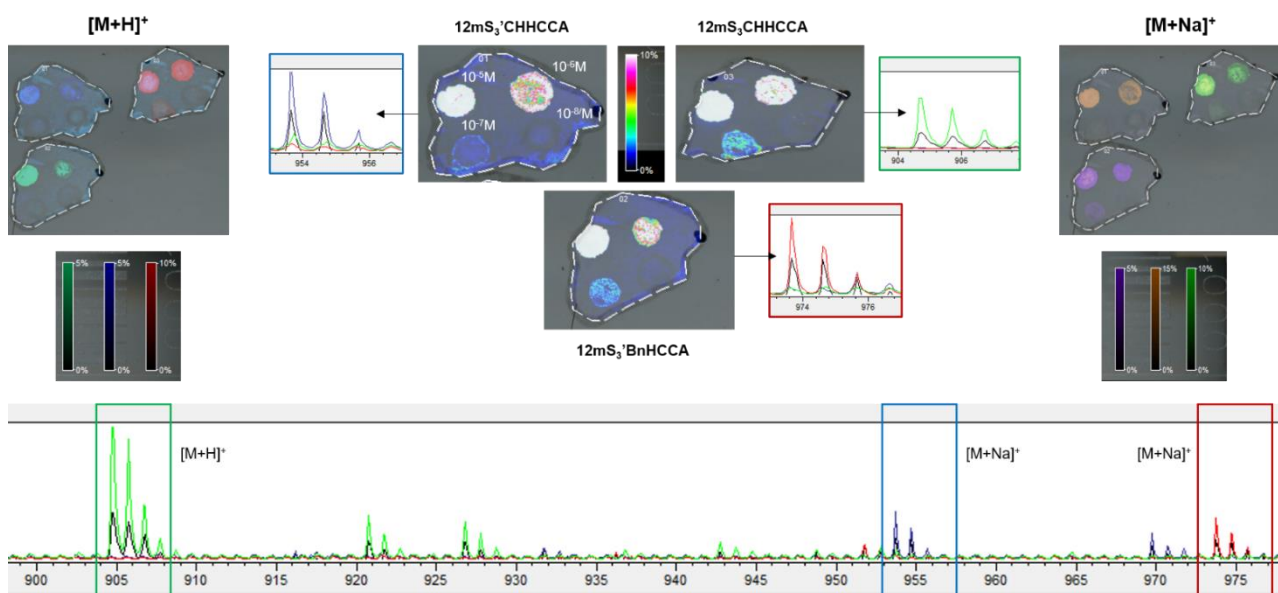
Ce jeu de paramètres a été optimisé pour offrir le meilleur compromis entre sensibilité de détection, résolution et qualité de l'image obtenue.

### **b. Détermination de la LOD**

Une fois les protocoles d'analyse déterminés, nous avons caractérisé les fragments 2-D, 1-B et 1-D, issus du marquage de la MMP-12 murine sur les coupes de poumons et d'aortes. Ces fragments ont été déposés à quatre concentrations :  $10^{-5}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$  et  $10^{-8}\text{M}$ , dans le but de valider les LODs précédemment déterminées par dépôt goutte sèche sur les coupes de tissus.

Nous avons ensuite vaporisé 15 couches de matrice CHCE 1mg/mL ou CHCA 10mg/mL, dans un mélange eau/ACN 50/50 0.1% TFA. Les images ont été acquises avec une résolution spatiale de 50 $\mu\text{m}$ , Les signaux associés aux trois fragments ont été acquis lors de la même analyse, et visualisés conjointement sur un même spectre, résultant de la somme de tous les spectres acquis sur toute la surface du tissu. La figure 105 présente les résultats obtenus sur les coupes de poumons.

Seules figurent les données obtenues dans CHCE car nous n'avons jamais détecté aucun des trois fragments dans CHCA, et ce même à  $10^{-5}\text{M}$ , ce qui montre à nouveau le potentiel de la technologie liée au marquage CHCA en présence de matrice CHCE.



**Figure 105 : Image MALDI des fragments issus du marquage de la MMP-12 murine (1-B  $m/z = 951.41$ , 1-D  $m/z = 931.44$ , 2-D  $m/z = 904.44$ ) sur coupes de poumons murins, dans la matrice CHCE**

Sur la figure 105 sont modélisés, par une échelle de couleur où le blanc représente le maximum, la densité de présence des trois fragments étudiés, sur les coupes de tissus. Sont annotés sur le spectre de masse, les massifs isotopiques à l'origine de la meilleure visualisation des peptides, soit l'ion moléculaire protoné dans le cas du  $12\text{mS}_3\text{CHCHCA}$  (Fragment 2-D) et l'adduit sodium, noté Na, dans le cas des deux autres fragments (Fragments 1-B et 1-D). Le spectre associé à chaque fragment est annoté à côté de l'image correspondante.

Fragments	Masse monoisotopique	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$
1-B	950.41	951.41	973.41
1-D	930.44	931.44	953.44
2-D	903.44	904.44	926.44

Tableau 14 : Récapitulatif des fragments utilisés pour la détermination de la LOD sur coupes de poumons murins

Ces résultats nous ont tout d'abord permis de valider les LOD précédemment obtenues en goutte sèche sur les coupes de tissus. Ils permettent également de valider la nature « discriminante » de nos conditions d'analyse. En effet, nous ne sommes jamais parvenus à détecter aucun des fragments signatures en utilisant CHCA comme matrice d'analyse. Ceci s'explique par le fait que le support de dépôt est ici un tissu biologique et donc un milieu organique complexe, capable d'influer sur les signaux et le spectre obtenu, notamment via des phénomènes de discrimination ionique. L'utilisation de CHCE comme matrice permet alors de contrer ces phénomènes en limitant l'ionisation de tout composé non marqué quand l'ionisation des composés marqués est favorisée par la présence du marqueur CHCA. On ne parle plus ici seulement d'un gain de sensibilité mais directement de la détection ou non des signaux caractéristiques de nos fragments signatures. Enfin, ces résultats valident également de manière définitive toutes les étapes d'optimisation de conditions analytiques réalisées au préalable et nous permettent de présenter un protocole viable et fonctionnel pour de futures expériences d'imagerie MALDI. Le tableau 15 résume les LODs obtenues pour les différents fragments sur les deux types de tissus.

Composé	Coupes de poumons
$12\text{mS}_3'\text{CHCHCA} - 1\text{-D}$	$10^{-6}\text{M}$
$12\text{mS}_3'\text{BnCHCA} - 1\text{-B}$	$10^{-7}\text{M}$
$12\text{mS}_3\text{CHCHCA} - 2\text{-D}$	$10^{-7}\text{M}$

Tableau 15 : Résumé des LODs obtenues par imagerie pour les fragments associés à la mMMP-12 sur coupes de tissus murins

## **V. Caractérisation en milieux complexes**

Une fois les fragments purs caractérisés et les LODs déterminées sur les différents supports de travail, nous avons déterminé les LODs de certains fragments d'intérêt dans deux milieux biologiques fluides complexes, choisis comme milieux biologiques fluides de références : du surnageant de cellules dendritiques et de chondrocytes. Il s'agit ici d'introduire le fragment peptidique dans le milieu complexe dans un milieu complexe digéré, avant d'analyser les différentes solutions en MALDI.

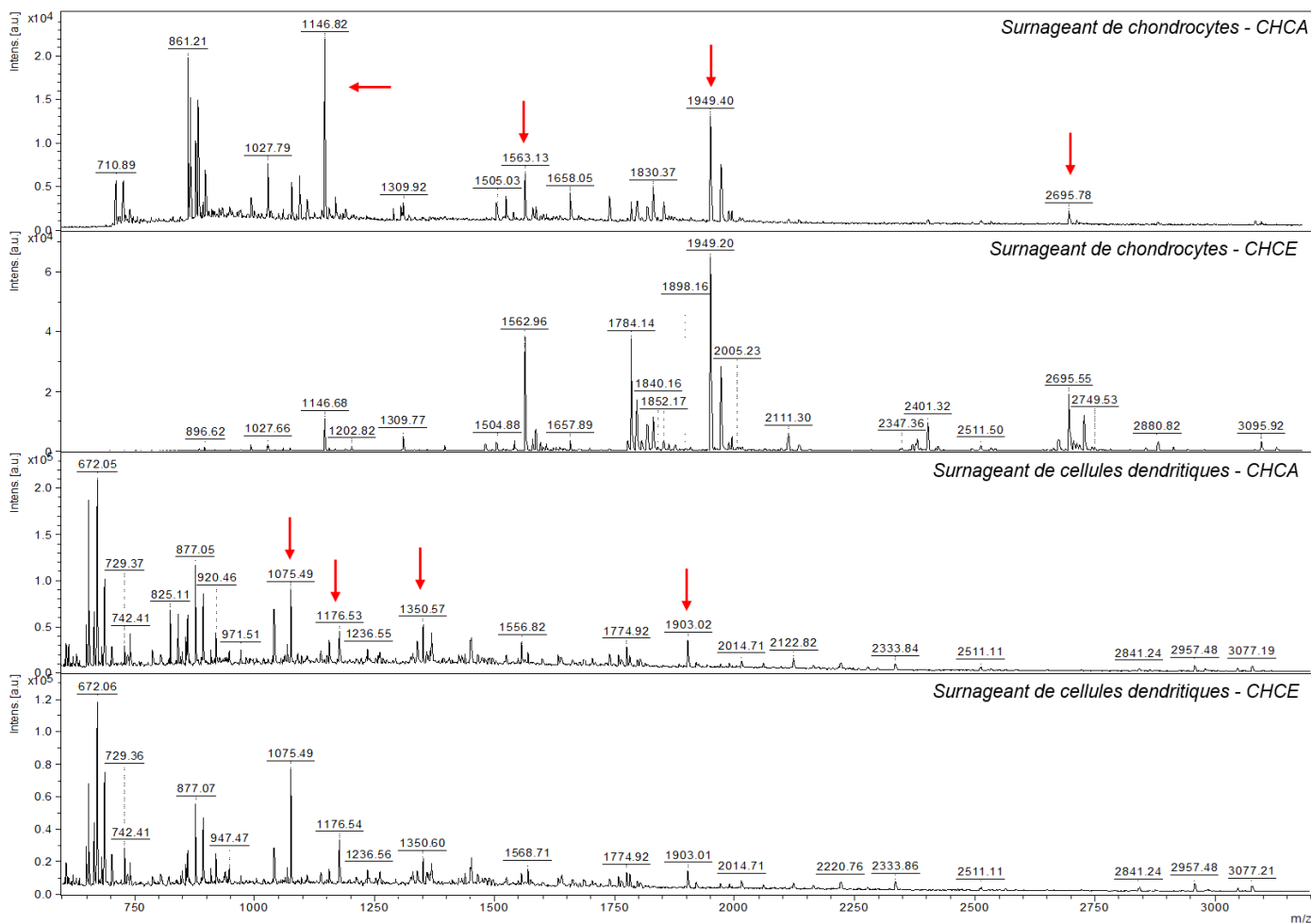
Les cellules dendritiques sont des cellules associées à la réponse immunitaire et plus particulièrement à la réponse inflammatoire. Ces cellules sont capables, lors d'un stimulus inflammatoire, d'exprimer de la MMP-12, ce milieu a donc été choisi pour étudier la détection des fragments associés au marquage de la MMP-12.

D'autre part, les chondrocytes sont des cellules associées au cartilage et sont liées à la surexpression des MMPs 3 et 13, notamment dans le cas des pathologies associées à l'arthrite, comme décrit dans le chapitre 4 de la partie A. Leur surnageant nous a donc servi de milieu de référence pour l'étude des fragments associés au marquage des MMP-3 et 13.

Nous avons tout d'abord caractérisé les milieux seuls afin de mettre en place le protocole de digestion enzymatique en milieux complexes, et caractériser la signature MALDI de ces milieux. Nous avons donc digéré à la chymotrypsine un échantillon de surnageant de cellules dendritiques à 1mg/mL et un échantillon composé d'un mélange équimolaire de quatre échantillons de surnageant, respectivement associés à quatre lots différents de chondrocytes, à 0.1mg/mL. Ces lots correspondent au surnageant de culture de deux populations identiques de chondrocytes, chaque population ayant été séparée en deux lots distincts. Une moitié a subi un traitement à l'interleukine-4, pour stimuler l'inflammation, l'autre moitié n'ayant subi aucun traitement. Ces quatre échantillons nous ont été fournis par Danièle NOEL (IRCM, Montpellier).

Une fois la digestion terminée, les dépôts ont été effectués dans la matrice CHCA 10mg/mL et dans la matrice CHCE 0.1mg/mL, dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.4% TFA. Nous avons ici légèrement augmenté le pourcentage de TFA afin que celui-ci aide à l'ionisation des analytes, au vu de la richesse moléculaire des milieux de travail.[211]

La figure 107 présente les spectres obtenus pour les deux types de surnageants dans les deux matrices utilisées.



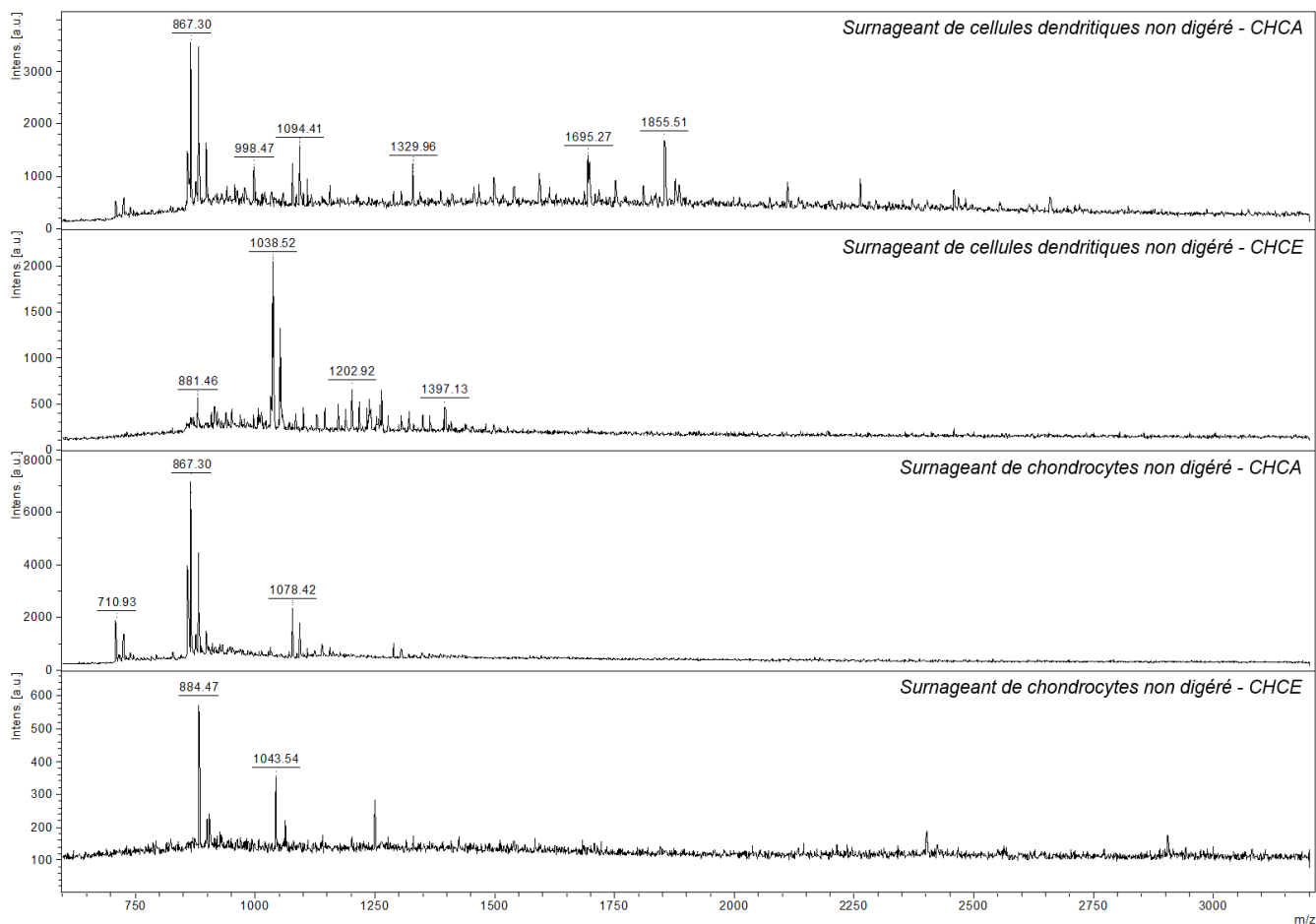
**Figure 106 : Spectres associés à la digestion des surnageants de chondrocytes (spectres du haut) et de celles dendritiques (spectres du bas) à la chymotrypsine dans les matrices CHCE et CHCA. Les fragments caractéristiques sont indiqués par une flèche rouge**

L'observation de différents ions sur les spectres, dans un intervalle de masse compris entre 600 et 3500 Da nous a permis d'identifier certains peptides caractéristiques de la digestion du milieu (peptides intenses et récurrents). Nous avons ainsi désigné les ions les plus abondants, présents dans les deux matrices. La comparaison avec les spectres des milieux non digérés nous a permis de valider ces ions. (Fig. 107)

Ceux-ci nous serviront de références pour valider la digestion des milieux dans le contexte du marquage des MMPs. (Tab. 16)

Surnageant de chondrocytes	Surnageant de cellules dendritiques
1146.82	1075.49
1563.13	1176.53
1949.4	1350.57
2695.78	1903.02

**Tableau 16 : Fragments peptidiques caractéristiques identifiés dans les digestats de surnageants de cellules dendritiques et de chondrocytes**



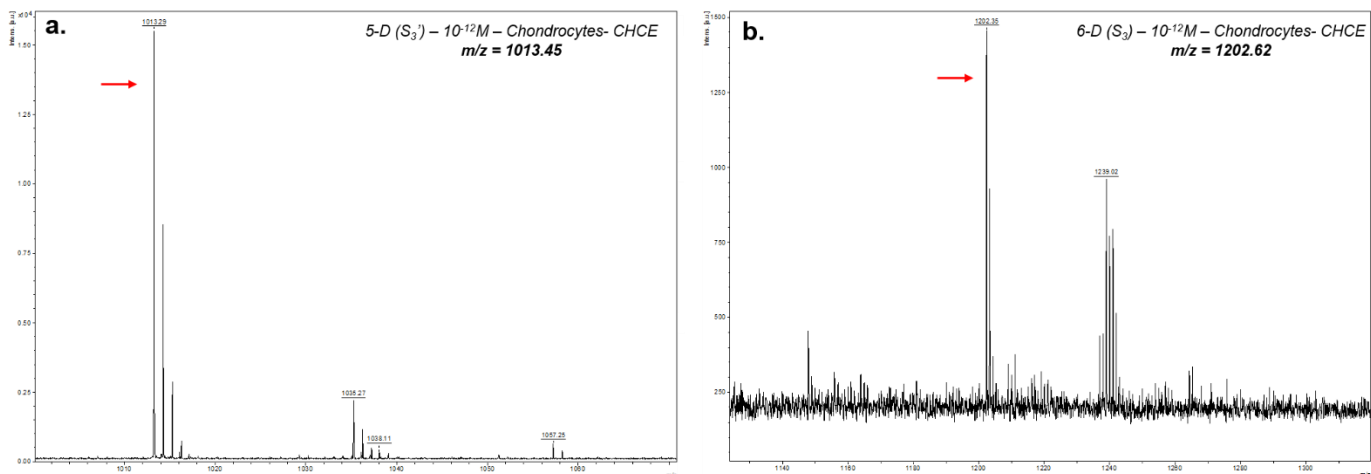
**Figure 107 : Spectres associés aux surnageant de cellules dendritiques (spectres du haut) et de chondrocytes (spectres du bas) non digérés, à 1mg/mL dans les matrices CHCA et CHCE**

Nous avons ensuite préparé une gamme de dilution de  $10^{-4}$ M à  $10^{11}$ M pour nos quatre fragments d'intérêt :

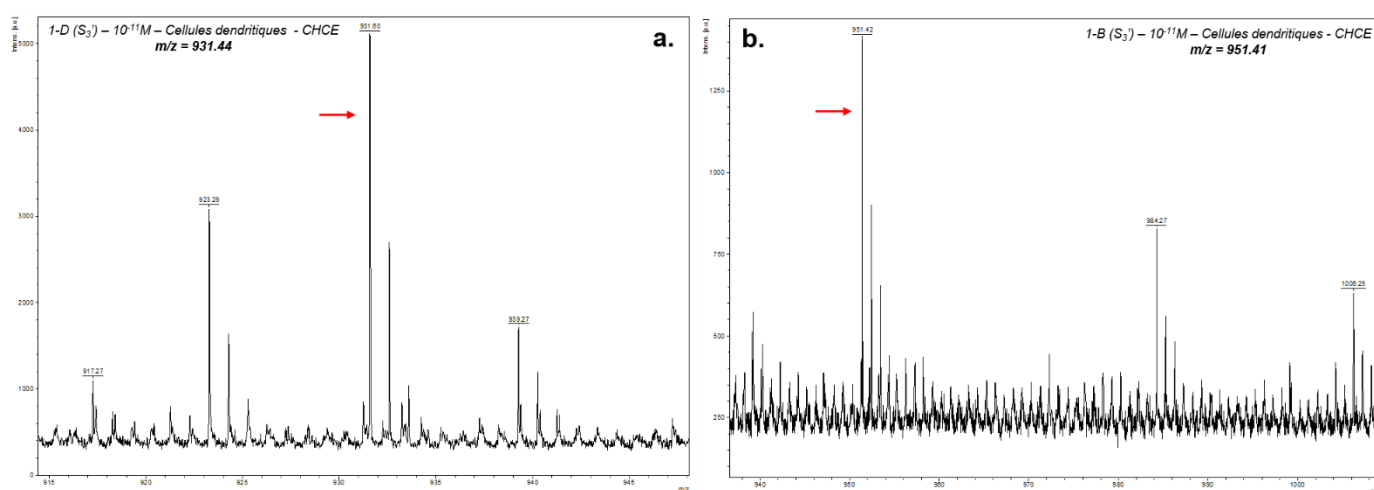
- 13hS3'CHCHCA (5-D)
- 12mS<sub>3</sub>'CHCHCA (1-D)
- 12mS<sub>3</sub>'BnCHCA (1-B)
- 3hS<sub>3</sub>CHCHCA (6-D)

Nous avons ensuite préparé une solution à 10% pour chacun des fragments, dans le milieu biologique qui lui est associé. Les dépôts ont été faits dans la matrice CHCA 10mg/mL et dans la matrice CHCE 0.1mg/mL. (Fig. 108) (Fig. 109)





**Figure 108 : Spectres obtenus pour les fragments 5-D (a) et 6-D (b) dans le surnageant de chondrocytes digéré à 0.1mg/mL, dans la matrice CHCE à leur LOD**



**Figure 109 : Spectres obtenus pour les fragments 1-B (b) et 1-D (a) dans le surnageant de cellules dendritiques digéré à 0.1mg/mL, dans la matrice CHCE à leur LOD**

Fragment peptidique	LOD sur plaque MALDI	LOD en milieu complexe dans CHCE	LOD en milieu complexe dans CHCA
3hS <sub>3</sub> CHCHCA (6-D)	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-7</sup> M
13hS <sub>3</sub> 'CHCHCA (5-D)	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-7</sup> M
12mS <sub>3</sub> 'CHCHCA (1-D)	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-7</sup> M
12mS <sub>3</sub> 'BnCHCA (1-B)	10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-8</sup> M

**Tableau 17 : Résumé des LODs obtenues pour les fragments 1-B, 1-D, 2-D, et 6-D, dans la matrice CHCE, sur plaque MALDI et en milieu biologique complexe**

Globalement, ces expériences nous ont permis de valider la détection des fragments marqués CHCA, introduit dans un milieu biologique complexe d'intérêt. En effet, tous les massifs isotopiques associés à nos fragments de travail se détectent en milieu complexe. (Fig. 108) (Fig. 109)

On retrouve, pour les fragments 1-B, 1-D, 5-D et 6-D, des LODs similaires à celles obtenues sur plaque MALDI dans le mélange ACN/H<sub>2</sub>O, induisant que la détection dans des milieux biologiques à 0.1 mg/mL n'est pas impactée par la complexité du milieu. De plus, l'utilisation de CHCE comme matrice permet un gain de sensibilité entre 10<sup>3</sup> et 10<sup>5</sup>, par rapport à la détection des fragments marqués CHCA dans la matrice CHCA.

## VI. Quantification du fragment d'intérêt

La quantification en MALDI n'est efficace qu'en la présence d'un standard interne possédant des propriétés physico-chimiques similaires à celles de l'analyte afin de minimiser la discrimination ionique (méthode SID décrite dans le chapitre 1 de la partie A). Nous avons utilisé un analogue deutéré de chacun de nos fragments peptidiques marqués CHCA. Ces peptides standards présentent un motif CHCA possédant quatre deutériums sur le cycle aromatique, induisant donc un delta de masse de 4 Da par rapport à l'équivalent hydrogéné. Nous le noterons CHCA D<sub>4</sub>. (Fig. 21)

Nous avons divisé nos expériences de quantification en 2 étapes :

- La détermination de la LOQ de chacun des fragments CHCA, soit la concentration la plus faible à partir de laquelle une évaluation quantitative n'est plus possible. Nous parlerons ici non pas d'une quantification précise mais d'une quantification approximative [212]
- La détermination d'une gamme de linéarité au sein de laquelle il est alors possible de quantifier de manière précise [213]

### a. Détermination de la LOQ

La limite de quantification approximative correspond à la concentration la plus faible à laquelle il est possible de détecter simultanément sur le même spectre le fragment CHCA et le fragment CHCA D<sub>4</sub>. À partir du moment où il est possible de visualiser simultanément les ions de l'analyte son analogue deutéré sur le même spectre de manière plus ou moins intense, nous pouvons déduire que l'analyte se trouve présent dans le milieu à une concentration du même ordre de grandeur que la concentration du standard deutéré.

Nous avons donc travaillé avec des gammes de dilution de 10<sup>-5</sup>M à 10<sup>-12</sup>M pour chacun des fragments CHCA et CHCA D<sub>4</sub>. Les deux fragments ont été co-déposés à la même concentration, et ce, pour chacune des concentrations de la gamme. Ces dépôts ont été faits dans les conditions optimales déterminées dans le Tableau 10.

La figure 110 présente les spectres obtenus pour chacun des fragments à leur LOQ. Le tableau 18 résume les valeurs obtenues pour les LOQ de chacun des fragments peptidiques.

<b>Fragment peptidique</b>	<b>LOD sur plaque MALDI</b>	<b>LOQ</b>
13hS <sub>3</sub> 'CHCHCA (5-D)	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-9</sup> M
3hS <sub>3</sub> 'CHCHCA (6-D)	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-10</sup> M
9hS <sub>3</sub> 'CHCHCA (7-D)	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-10</sup> M
12hS <sub>3</sub> CHCHCA (4-D)	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-11</sup> M
12hS <sub>3</sub> 'BnCHCA (3-B)	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
12mS <sub>3</sub> CHCHCA (2-D)	10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-11</sup> M
12mS <sub>3</sub> 'CHCHCA (1-D)	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-11</sup> M
12mS <sub>3</sub> 'BnCHCA (1-B)	10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-11</sup> M

Tableau 18 : Rappel des LODs sur plaque MALDI et résumé des LOQs de chacun des fragments d'intérêt, dans la matrice CHCE 0.1mg/mL

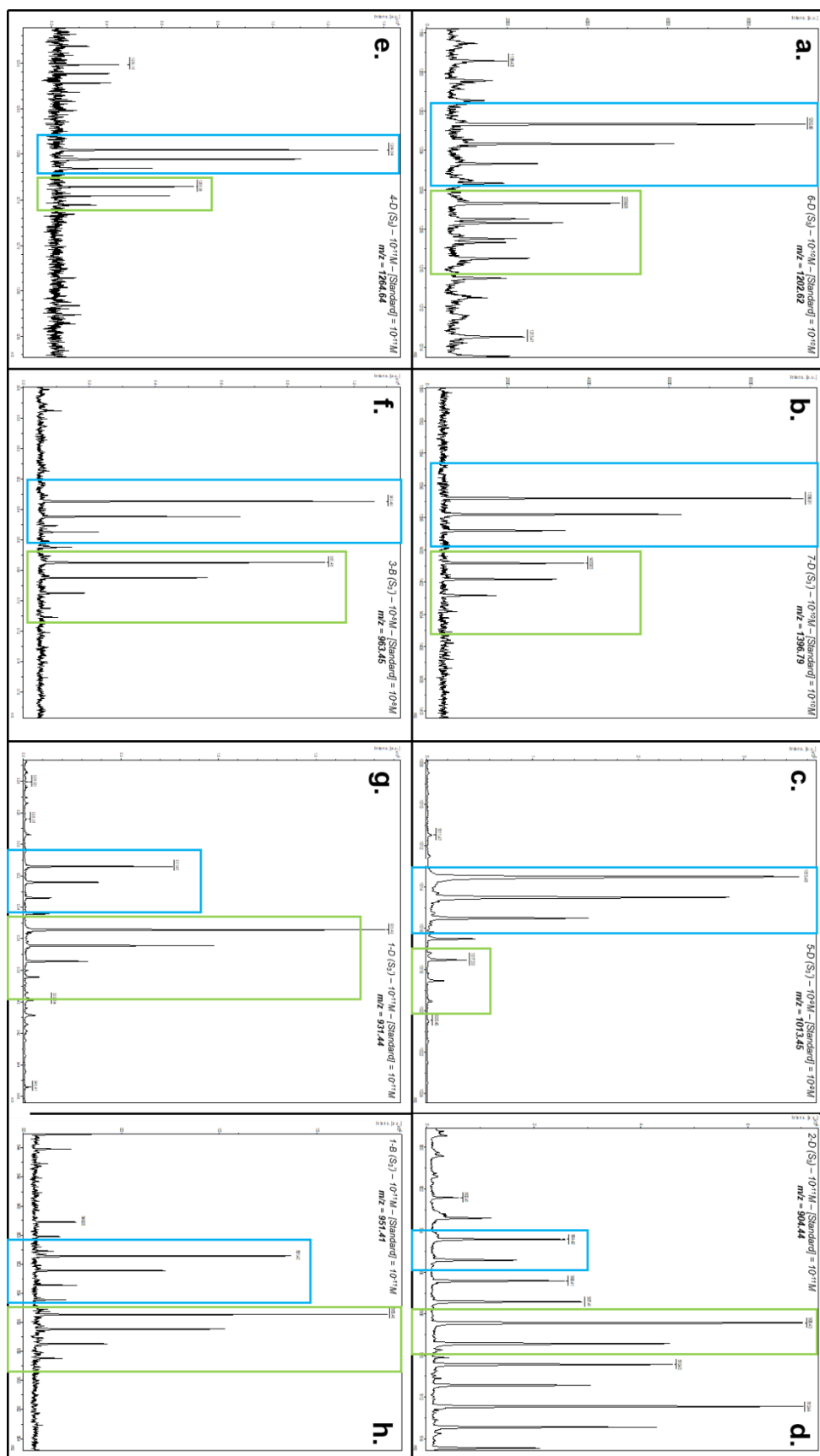


Figure 110 : Spectres expérimentaux obtenus pour les fragments 6-D (a), 7-D (b), 5-D (c), 2-D (d), 4-D (e), 3-B (f), 1-D (g) et 1-B (h), à leur LOQ, dans la matrice CHCE 0.1mg/mL. Le fragment CHCA est indiqué par un cadre bleu, le fragment D4 par un cadre vert

## **b. Mise en place des courbes d'étalonnage**

La quantification précise en spectrométrie de masse se fait toujours en liant un rapport d'aires des ions d'intérêt détectés et un rapport de concentrations. Il s'agit donc de comparer les signaux obtenus pour l'analyte avec ceux obtenus pour le standard interne. Il faut tout d'abord établir une courbe étalon où le rapport des aires des deux composés, analyte et standard, est fonction du rapport des concentrations. Par la suite, le co-dépôt d'un mélange de concentration inconnue en analyte et d'une solution de standard à une concentration connue permet de rapporter sur la courbe un rapport d'aires qui nous donne alors directement accès à un rapport de concentrations. La concentration en standard interne étant connue, l'équation de la droite nous permet donc d'obtenir la concentration en analyte dans l'échantillon à doser.

Pour la construction des droites étalons en MALDI, la gamme dynamique de travail est de l'ordre de 2 log, ce qui signifie que nous devons travailler avec une gamme de concentrations à plus ou moins un log autour de la concentration choisie du standard interne. Ainsi, nous avons établi des droites étalons, pour chacun des fragments marqués CHCA, pour des concentrations en standard deutéré à  $10^{-7}M$  et  $10^{-8}M$ , soit une possibilité de quantification exacte entre  $10^{-6}M$  et  $10^{-9}M$  pour chacun des fragments signatures.

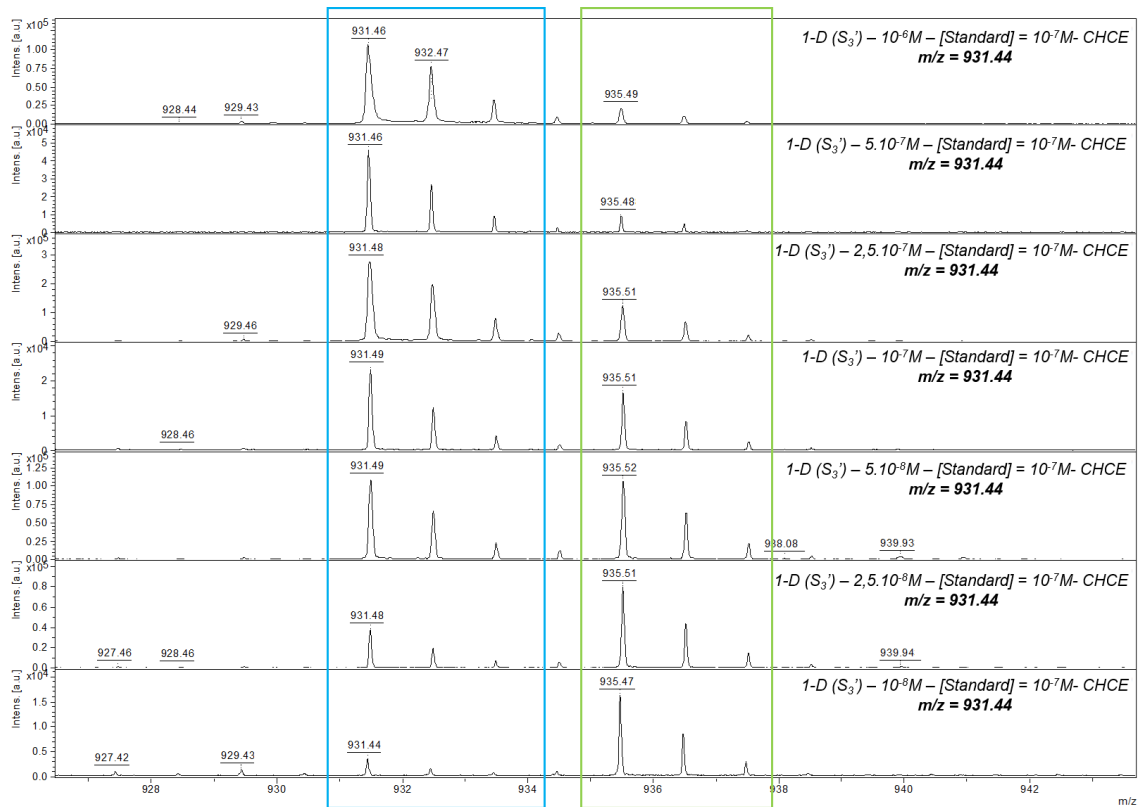
Nous avons ainsi préparé deux gammes de dilutions pour chacun des fragments CHCA. Pour chacune des courbes d'étalonnage, sept concentrations ont été prises en compte et un minimum de six points valides sur la droite a été nécessaire pour valider la régression linéaire.

- Une gamme pour la courbe d'étalonnage à  $10^{-7}M$  :  $10^{-6}M$ ,  $5.10^{-7}M$ ,  $2,5.10^{-7}M$ ,  $10^{-7}M$ ,  $5.10^{-8}M$ ,  $2,5.10^{-8}M$ ,  $10^{-8}M$
- Une gamme pour la courbe d'étalonnage à  $10^{-8}M$  :  $10^{-7}M$ ,  $5.10^{-8}M$ ,  $2,5.10^{-8}M$ ,  $10^{-8}M$ ,  $5.10^{-9}M$ ,  $2,5.10^{-9}M$ ,  $10^{-9}M$

Dans chacun des cas, nous avons co-déposé l'analyte et le standard interne. Ces dépôts ont été faits dans les conditions optimales déterminées dans le Tableau 10.

Pour chacun des spectres obtenus, les valeurs des aires pour le pic du fragment CHCA  $D_4$  et pour celui du fragment CHCA ont été relevées et, après calcul du rapport des aires et du rapport des concentrations, nous avons pu construire les courbes. Toutes les analyses ont été faites en duplicatas et ce sont les valeurs moyennes qui ont été utilisées pour la construction des courbes. Celles-ci ont été validées par l'obtention de la droite de régression linéaire et du coefficient de linéarité associé. Dans le cas d'un  $R^2$  supérieur à 0.95, nous avons considéré la courbe d'étalonnage suffisamment fiable, validant la quantification précise. En revanche, dans le cas contraire, nous avons conclu que la quantification précise à de telles concentrations n'était pas possible.

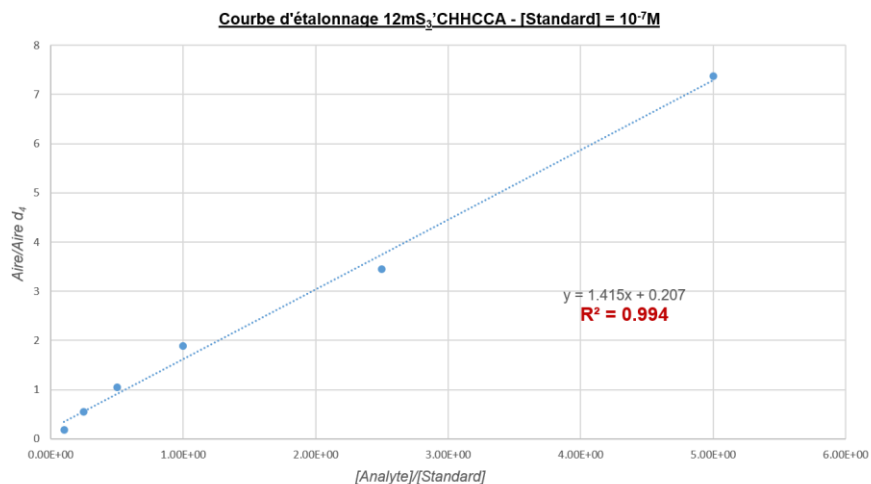
La figure 111 présente un exemple de spectre obtenu pour la construction de la courbe de calibration pour le fragment 1-D à  $10^{-7}M$ .



**Figure 111 : Spectres obtenus pour la quantification du fragment 12mS3'CHCHCA (1-D) à une concentration de standard interne de  $10^{-7}M$ , dans la matrice CHCE. Le massif isotopique associé à l'analyte est indiqué dans le cadre bleu, celui correspondant au standard dans le cadre vert**

La figure 112 présente la construction de la courbe d'étalonnage associée à la quantification du fragment 1-D pour une concentration en standard interne de  $10^{-7}M$ .

[Analyte]	Aire 1	Aire D <sub>4</sub> 1	Aire 2	Aire D <sub>4</sub> 2	Rapport concentrations	Moyenne aire	Moyenne aire D <sub>4</sub>	Rapport moyennes aires
1.00E-06	19099	2365	1753	177	1.00E+01	10426	1271	8.203
5.00E-07	4116	608	21477	2865	5.00E+00	12796.5	1736.5	7.369
2.50E-07	44467	13046	1619	303	2.50E+00	23043	6674.5	3.452
1.00E-07	2259	1499	5857	2809	1.00E+00	4058	2154	1.884
5.00E-08	12983	11705	5178	5709	5.00E-01	9080.5	8707	1.043
2.50E-08	2964	7007	56416	102279	2.50E-01	29690	54643	0.543
1.00E-08	258	1161	1195	6680	1.00E-01	726.5	3920.5	0.185



**Figure 112 : Exemple de courbe étalon obtenue pour la quantification du fragment 1-D à une concentration de standard interne de  $10^{-7}M$**

Ces expériences et ces calculs ont été menés pour chacun des fragments CHCA associés au marquage des MMPs cibles. Le tableau 18 résume les coefficients de linéarité obtenus dans chacun des cas.

<b>Fragment peptidique</b>	<b>R<sup>2</sup> Courbe 10-7M</b>	<b>R<sup>2</sup> Courbe 10-8M</b>
13hS <sub>3</sub> 'CHCHCA (5-D)	0.968	0.971
3hS <sub>3</sub> 'CHCHCA (6-D)	0.981	0.952
9hS <sub>3</sub> 'CHCHCA (7-D)	0.955	0.989
12hS <sub>3</sub> CHCHCA (4-D)	0.995	0.934
12hS <sub>3</sub> 'BnCHCA (3-B)	0.993	0.946
12mS <sub>3</sub> CHCHCA (2-D)	0.945	X
12mS <sub>3</sub> 'CHCHCA (1-D)	0.994	0.939
12mS <sub>3</sub> 'BnCHCA (1-B)	0.967	0.920

Tableau 19 : Résumé des coefficients de linéarité obtenus pour chacun des fragments. Les R<sup>2</sup> conservés sont indiqués en vert

La quantification exacte des fragments 5-D, 6-D, 7-D et 3-B est possible entre 10<sup>-6</sup>M et 10<sup>-9</sup>M. Pour les autres fragments, elle est possible entre 10<sup>-6</sup> et 10<sup>-8</sup>M.

Hors de la gamme de linéarité, il n'est plus possible de quantifier de manière précise. Il est, en revanche, toujours possible de déterminer une estimation de la concentration de l'analyte au log près via une quantification approximative. L'objectif final est d'avoir une vision quantitative de la détection du fragment CHCA, issu de la digestion d'une MMP présente en concentration faible, préalablement marquée, en milieu biologique complexe, cette estimation pouvant être plus ou moins précise dépendamment des MMPs ciblées.



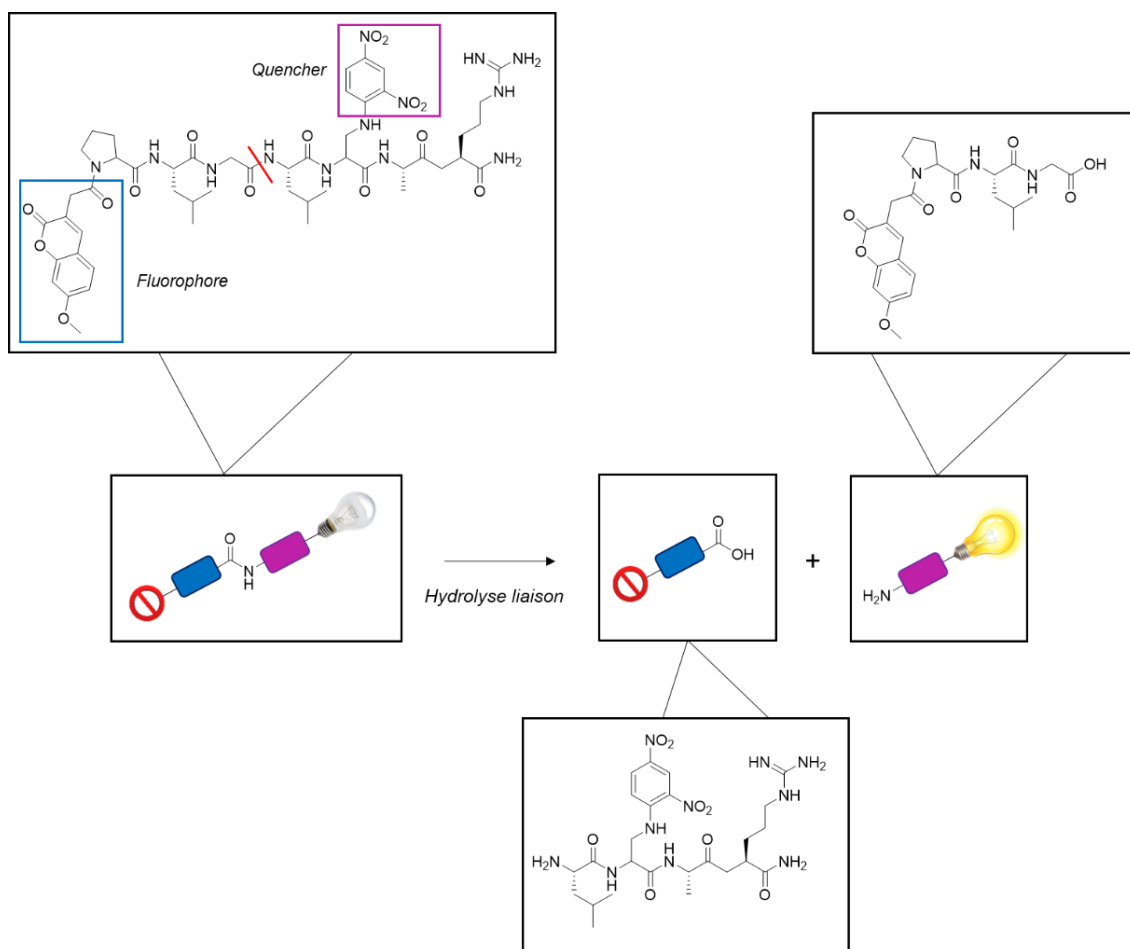


## CHAPITRE 3 : Marquage de MMPs exogènes et endogènes

Les travaux précédents nous ont permis de valider notre stratégie, tant sur le plan du marquage via les ABPs que sur celui de la détection et de la caractérisation (MS/MS, LOD, LOQ) des fragments signatures. Le but est, maintenant, de confronter notre stratégie au marquage à la détection de MMPs de manière, exogènes dans un premier temps, puis endogènes, en milieux complexes.

### I. Caractérisation de l'activité protéolytique des MMPs

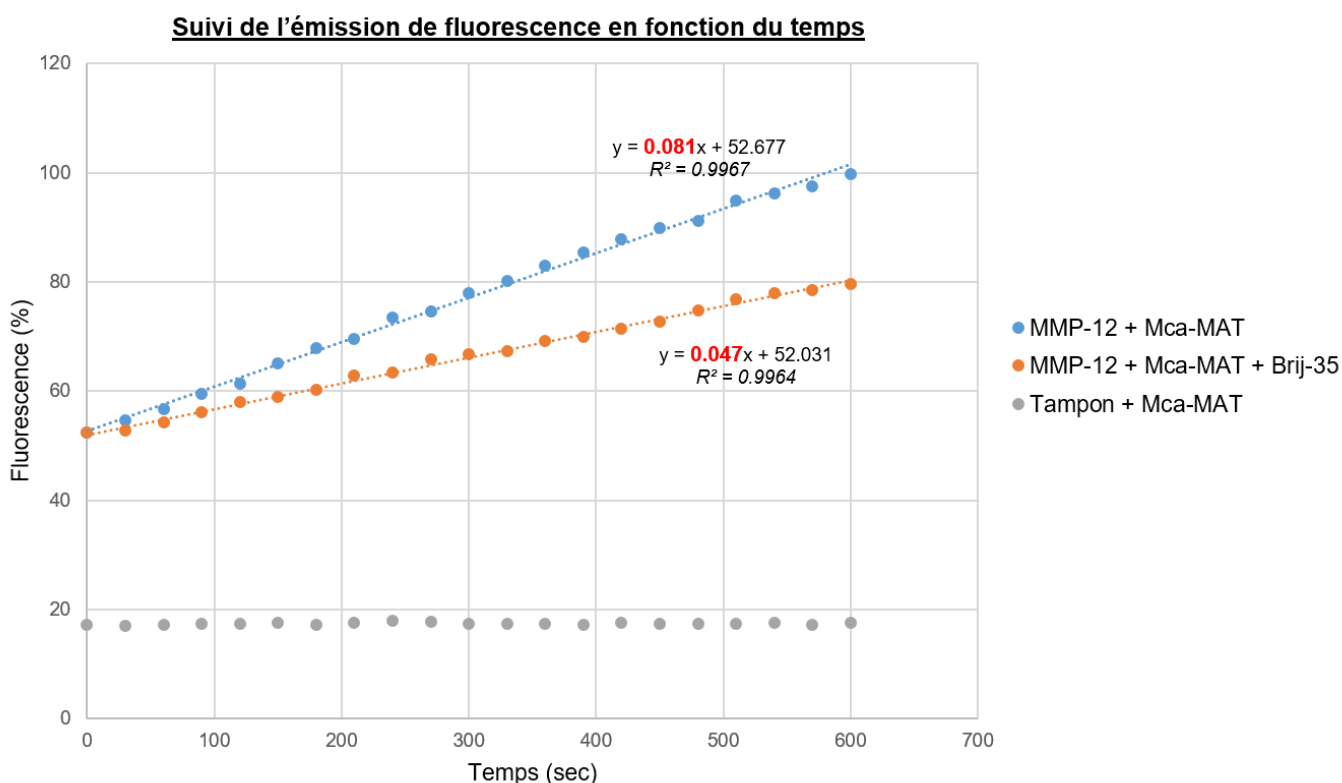
Comme décrit dans les chapitres précédents, l'interaction entre nos sondes et les MMPs cible, indispensable à leur marquage spécifique, dépend exclusivement de la présence d'une forme enzymatique active. Il est donc indispensable de caractériser l'activité protéolytique de nos enzymes modèles. Pour ce faire, nous avons étudié l'interaction entre un substrat fluorogénique et la MMP-12 murine, tout d'abord réduite à son domaine catalytique, puis sous sa forme entière. Le MCA-mat a été utilisé comme substrat fluorogénique. Celui-ci, composé d'une séquence peptidique spécifique de la MMP-12, présente sur une extrémité un composé fluorescent, ici un dérivé coumarine, et sur l'autre extrémité de la séquence, un groupement quencher, utilisé pour désactiver la fluorescence naturelle du fluorophore, ici, un dérivé dinitrophényl. (Fig. 113) Ce composé absorbe à 405nm et émet à 320nm.



*Figure 113 : Structure du substrat Mca-MAT*

Dans le cas où le substrat est intègre, le fluorophore et le quencher sont trop proches, on observe alors une extinction de la fluorescence de la molécule. En revanche, lorsque le substrat interagit avec la MMP-12, le peptide est clivé, libérant ainsi le fluorophore de la proximité du quencher, permettant ainsi de rétablir la fluorescence du composé. L'activité protéolytique de la MMP-12 se caractérise donc, par fluorimétrie, via une augmentation de la fluorescence émise, induite par l'augmentation de la quantité de fluorophore libéré dans le milieu.

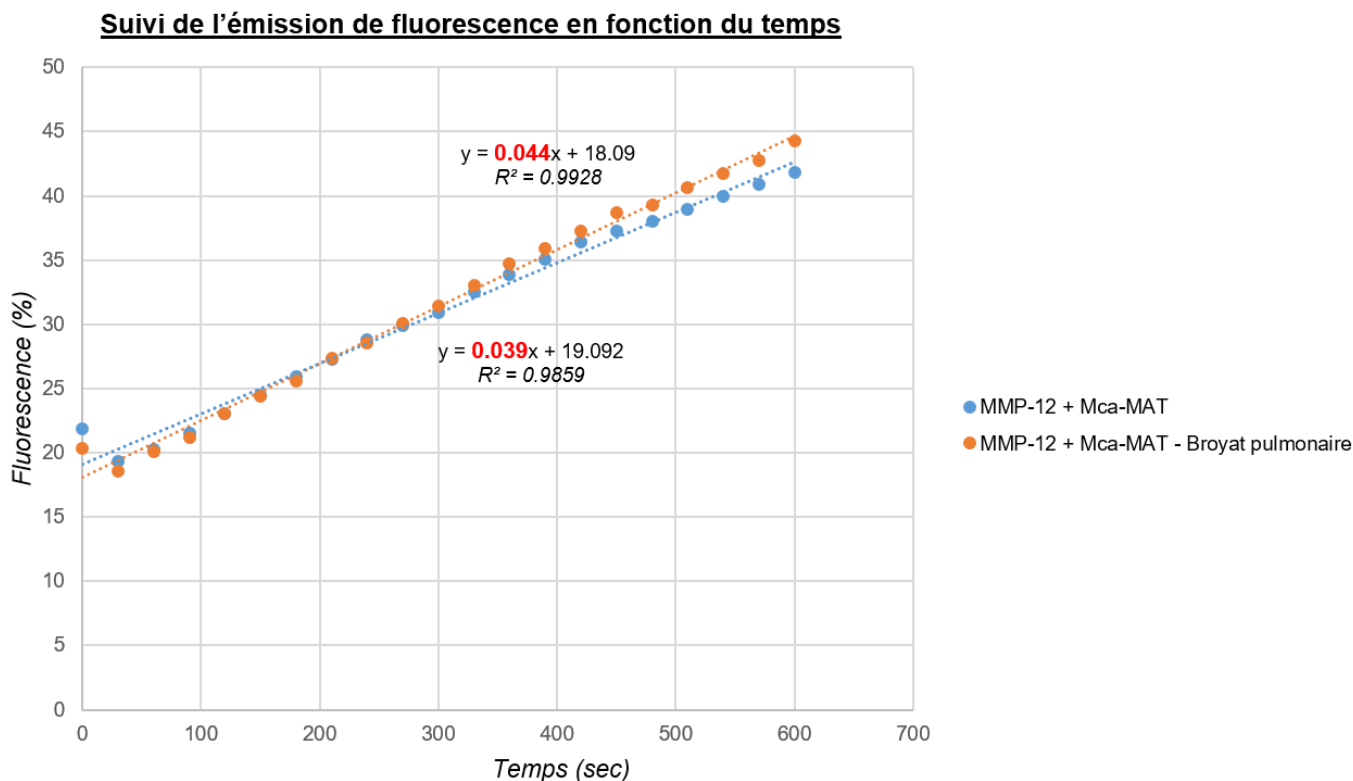
Nous avons tout d'abord testé l'activité de la MMP-12 murine, réduite à son domaine catalytique, en présence et en l'absence de 0.01% de Brij-35, un détergent non ionique induisant l'inactivation de la protéine. Une solution de tampon ne contenant pas de MMP-12 a été utilisée comme contrôle négatif de la fluorescence intrinsèque du milieu.(Fig. 114)



**Figure 114 : Suivi de l'émission de fluorescence induite par l'hydrolyse du Mca-MAT par la MMP-12 réduite à son domaine catalytique**

Nous avons ainsi observé une augmentation de l'émission de fluorescence en présence de MMP-12, modélisée par l'aspect croissant des courbes bleue et orange, permettant de valider le caractère actif et intègre de l'enzyme. La pente des courbes modélise la vitesse d'hydrolyse du substrat, plus la pente de la droite est importante, plus le substrat est hydrolysé rapidement. Ainsi, nous avons également pu valider que la présence de Brij-35 induisait une hydrolyse plus lente du substrat, illustrée par une pente plus faible de la courbe. De même, en l'absence de MMP-12, le milieu possède bien une légère fluorescence intrinsèque mais celle-ci demeure constante sur toute la durée de l'analyse.

Par la suite, nous avons caractérisé cette activité protéolytique en milieu biologique complexe. Pour ce faire, le tampon a été remplacé par un milieu complexe lié aux pathologies pulmonaires inflammatoires. Une solution de broyat pulmonaire murin, à 0.1mg/mL en protéines, a été générée par prélèvement puis broyage de poumons murins soumis à l'instillation d'élastase porcine pour stimuler l'inflammation. (Fig. 115) Cette concentration sera conservée comme base de travail pour toutes les expériences en milieu complexes, quel que soit l'analyte ou le milieu biologique.



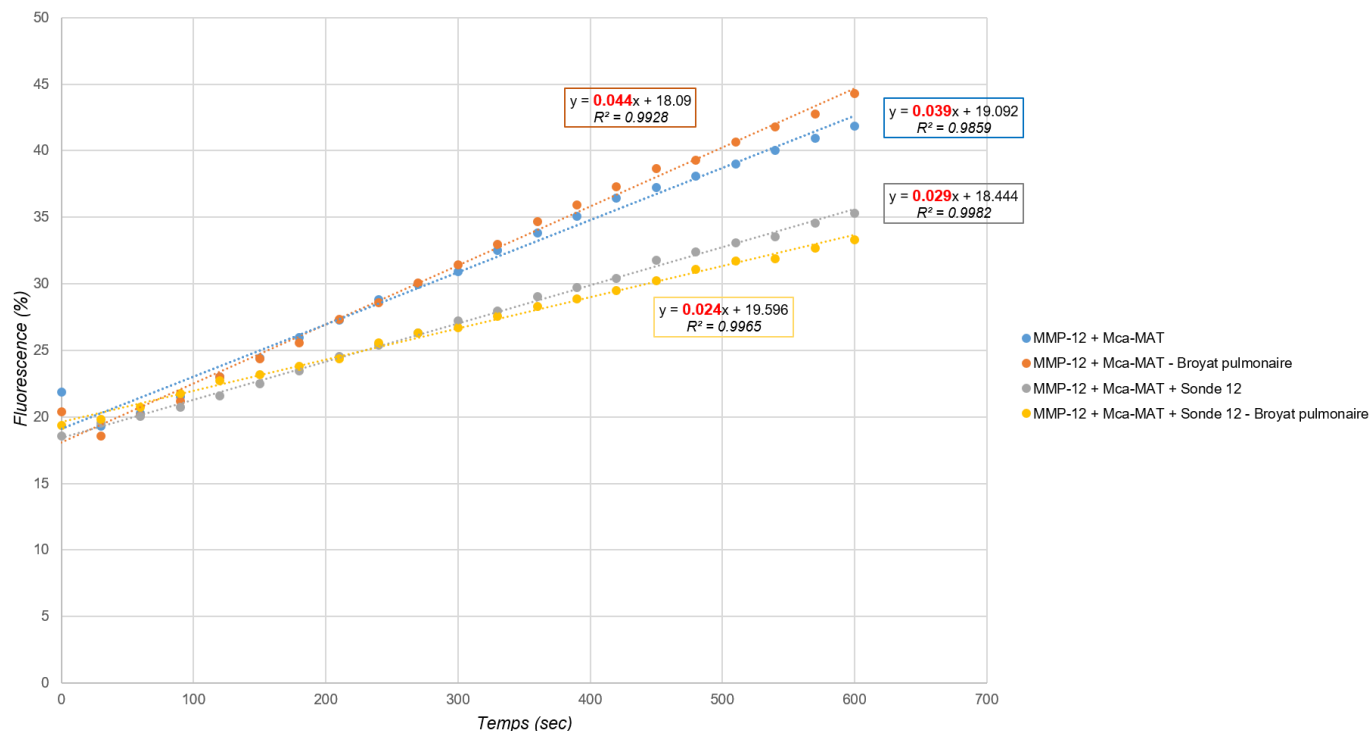
**Figure 115 : Suivi de l'émission de fluorescence induite par l'hydrolyse du Mca-MAT par le domaine catalytique de la MMP-12, dans le tampon et le broyat pulmonaire**

On observe ici que peu importe le milieu, les deux courbes sont très similaires et illustrent une augmentation de l'émission de fluorescence au cours du temps. En effet, les deux courbes sont croissantes et présentent une valeur de pente similaire, indiquant une vitesse d'hydrolyse du substrat comparable.

On peut donc en conclure, premièrement, que le domaine catalytique de la mMMP-12 reste actif en milieu biologique complexe et, deuxièmement, que la nature et la complexité du milieu ne perturbe pas son activité

Nous avons, enfin, vérifié l'interaction entre les sondes d'intérêt et le domaine catalytique de la MMP-12 murine, dans le tampon et dans le broyat pulmonaire. Le domaine catalytique a été introduit à 100nM, avec 200nM de sonde RXP500-K-BB-Bn-CHCA (Sonde 12), décrite dans le chapitre 1 pour le marquage spécifique de la MMP-12. (Fig. 116)

**Suivi de l'émission de fluorescence en fonction du temps**



**Figure 116 : Suivi de l'émission de fluorescence induite par l'hydrolyse du Mca-MAT par le domaine catalytique de la MMP-12 en tampon et dans le broyat pulmonaire, en présence et en l'absence de sonde RXP500-K-BB-Bn-CHCA (Sonde 12)**

Les courbes bleue et orange correspondent à l'émission de fluorescence induite par l'hydrolyse du Mca-MAT (9µm) par le domaine catalytique de la MMP-12, respectivement dans le tampon et dans le broyat pulmonaire, en l'absence de la sonde. Les courbes grise et jaune correspondent aux mêmes expériences en présence de la sonde 12. On observe alors que l'hydrolyse du Mca-MAT est plus lente en présence de la sonde, que ce soit dans le tampon ou dans le broyat pulmonaire, puisque les courbes grise et jaune présentent une valeur de pente plus faible. Nous pouvons ainsi en conclure que cette diminution est due à la compétition de liaison entre la sonde 12 et le Mca-MAT au niveau du domaine catalytique de la MMP-12. Il est à noter que l'interaction entre la sonde et l'enzyme n'est pas impactée par la complexité du milieu de travail. En effet, les courbes grise et jaune possèdent une valeur de pente similaire, indiquant que la vitesse d'hydrolyse du substrat dans ces deux cas est proche. On peut donc en conclure que l'interaction entre le domaine catalytique de la MMP-12 et la sonde 12 est également identique dans les deux cas.

Enfin, nous pouvons remarquer que la présence de la sonde n'inhibe pas totalement l'hydrolyse du Mca-MAT, mais la ralentit. En effet, la sonde ne se lie pas de manière covalente dans le site actif de la MMP-12, le domaine catalytique conserve donc son activité normale lorsque le site actif est libéré et conferte donc la possibilité de marquage des MMP d'intérêt sans altérer leur activité.

Nous avons vérifié l'activité protéolytique de la MMP-12 murine entière activée. Nous avons travaillé avec une solution à 100nM de MMP-12 dans le tampon. (Fig. 117)

De même que pour les expériences précédentes, l'augmentation de l'émission de fluorescence au cours du temps, caractéristique de l'hydrolyse du Mca-MAT par la MMP-12, était attendue. La figure 117 montrant

une courbe croissante, l'activité de la forme entière de la MMP-12 murine présente bien une activité, apparemment moins importante, cependant, que le domaine catalytique.

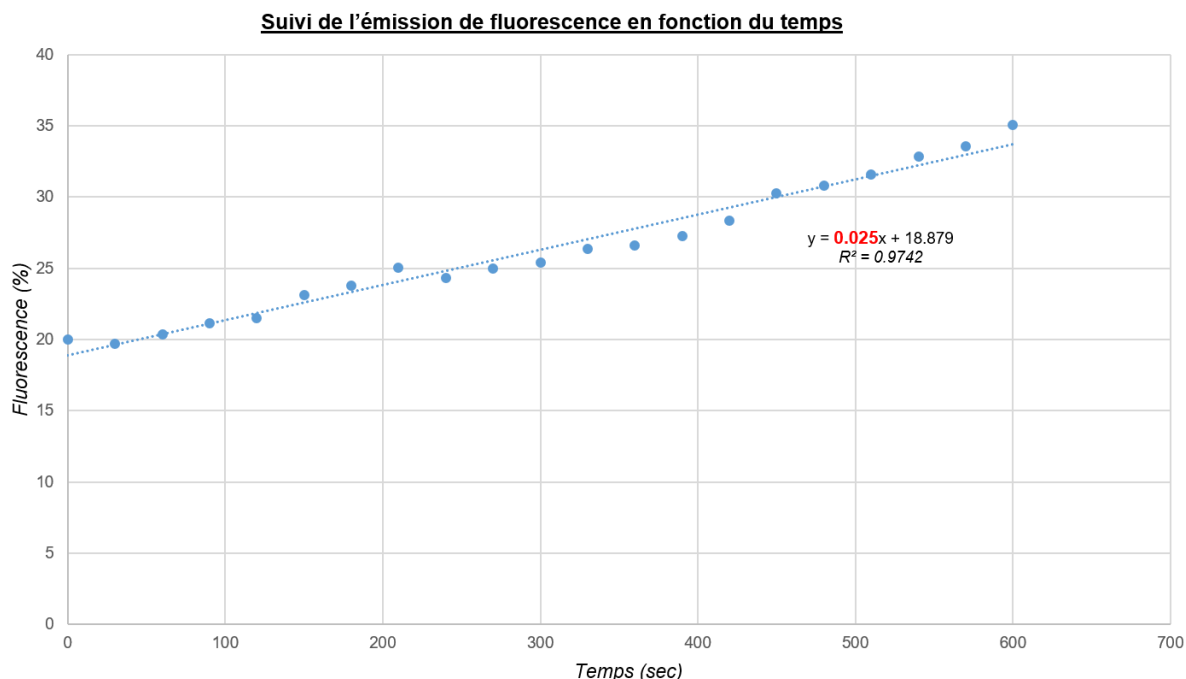


Figure 117 : Suivi de l'émission de fluorescence induite par l'hydrolyse du Mca-MAT par la MMP-12 entière

## II. Détection de MMPs exogènes

L'activité protéolytique des MMPs, entières et réduites à leur domaine catalytique, ayant été confirmée, nous nous sommes tournées vers la détection MS des enzymes exogènes. Pour ce faire, une étape d'optimisation des conditions de digestion enzymatique a été nécessaire avant d'effectuer le marquage des enzymes, en tampon biologique et en milieux complexes. L'analyse de ce marquage a donné lieu, lorsque cela été possible, à des expériences de quantification.

### a. Détection de la MMP-12 murine

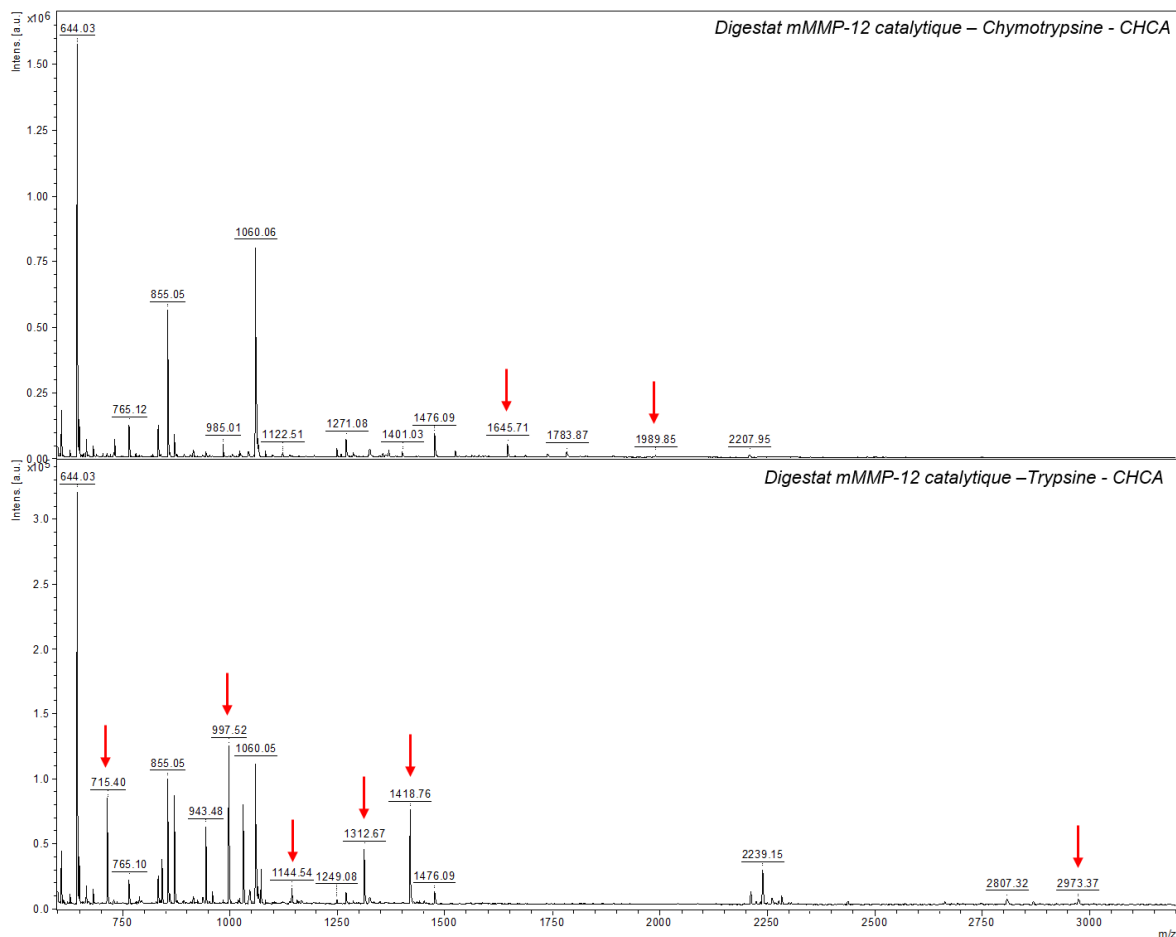
#### 1. Optimisation des conditions de digestion enzymatique

Nous avons donc tout d'abord validé le protocole de digestion enzymatique du domaine catalytique de la MMP-12 murine non marqué (MMP-12 catalytique). Pour ce faire, différents ratios [MMP-12] / [Trypsine ou Chymotrypsine] ont été testés, ainsi que différentes durées de digestion. La trypsine est associée au marquage  $S_3$ , alors que la chymotrypsine est associée au marquage  $S_3'$ .

Nous avons premièrement considéré trois ratios de concentrations [MMP-12 catalytique]/[Protéase de digestion] pour la trypsine et la chymotrypsine : 3/1, 1/1 et 1/3. La concentration en MMP-12 catalytique murine a été maintenue constante à 100nM. Toutes les digestions ont été suivie sur 24 heures, avec des prélèvements à 30min, 1 heure et 2 heures et 24 heures. Nous avons incubé les différents échantillons à 50°C pendant 2h puis à 37°C pour les 22 heures restantes. (Tab. 20)

Les digestats ont été analysés dans la matrice CHCA 10mg/mL. Nous avons ainsi pu apprécier l'efficacité de digestion via le calcul des pourcentages de recouvrement de séquence associés à l'identification des peptides caractéristiques.

La figure 118 présente les spectres obtenus dans les meilleures conditions, dans les deux cas, après digestion à la chymotrypsine et à la trypsine. Le tableau 20 résume les pourcentages de recouvrement obtenus dans chacun des cas. Les tableaux 21 et 22 présentent les fragments caractéristiques respectivement obtenus dans le cas d'une digestion à la trypsine et à la chymotrypsine.



**Figure 118 : Spectres expérimentaux issus de la digestion du domaine catalytique de la MMP-12 murine par la chymotrypsine (spectre du haut) et la trypsine (spectre du bas), dans la matrice CHCA, après 24 heures d'incubation. Les peptides caractéristiques sont indiqués par une flèche rouge**

[MMP]/[Protéase]	Trypsine				Chymotrypsine			
	30 min	1h	2h	24h	30 min	1h	2h	24h
3/1	16%	29%	29%	21%	5%	8%	5%	12%
1/1	29%	35%	35%	27%	5%	13%	20%	24%
1/3	32%	32%	32%	54%	13%	13%	13%	34%

**Tableau 20 : Pourcentage de recouvrement obtenu pour chacun des digestats du domaine catalytique de la MMP-12 murine**

m/z expérimentaux	m/z théoriques	Fragments peptidiques
715.40	715.38	(R)YLTYR(R)
997.52	997.51	(R)YLNPFSTR(L)
1144.54	1144.53	(R)IYNYTPDMK(R)
1312.67	1312.65	(K)REDVDYIFQK(A)
1418.76	1418.74	(K)AFQVWSDVTPLR(F)
2973.37	2973.38	(K)GGTLAHAFYPGOGIQGDAHFDFAETWTK(S)

Tableau 21 : Fragments caractéristiques obtenus à la suite de la digestion du domaine catalytique de la MMP-12 murine par la trypsine

m/z expérimentaux	m/z théoriques	Fragments peptidiques
1645.71	1645.72	(Y)NYTPDMKREDVDY(I)
1989.85	1989.86	(F)YPPGPIQGDAHFDFAETW(T)

Tableau 22 : Fragments caractéristiques obtenus à la suite de la digestion du domaine catalytique de la MMP-12 murine par la chymotrypsine

Digestion à la trypsine : 54%

<sup>110</sup> RAVPQR	<sup>120</sup> SRWMKRYLTY	<sup>130</sup> RIYNYTPDMK	<sup>140</sup> REDVDYIFQK	<sup>150</sup> AFQVWSDVTP	<sup>160</sup> LRFRKLHKDE
<sup>170</sup> ADIMILFAFG	<sup>180</sup> AHGDFNYFDG	<sup>190</sup> KGGLAHAFY	<sup>200</sup> PGPGIQGDAH	<sup>210</sup> FDEAETWTKS	<sup>220</sup> FQGTNLFVA
<sup>230</sup> VHELGHSLGL	<sup>240</sup> QHSNNPKSIM	<sup>250</sup> YPTYRYLNPS	<sup>260</sup> TFRLSADDIR	<sup>267</sup> NIQSLYG	

Digestion à la chymotrypsine : 34%

<sup>110</sup> RAVPQR	<sup>120</sup> SRWMKRYLTY	<sup>130</sup> RIYNYTPDMK	<sup>140</sup> REDVDYIFQK	<sup>150</sup> AFQVWSDVTP	<sup>160</sup> LRFRKLHKDE
<sup>170</sup> ADIMILFAFG	<sup>180</sup> AHGDFNYFDG	<sup>190</sup> KGGLAHAFY	<sup>200</sup> PGPGIQGDAH	<sup>210</sup> FDEAETWTKS	<sup>220</sup> FQGTNLFVA
<sup>230</sup> VHELGHSLGL	<sup>240</sup> QHSNNPKSIM	<sup>250</sup> YPTYRYLNPS	<sup>260</sup> TFRLSADDIR	<sup>267</sup> NIQSLYG	

Figure 119 : Recouvrement de séquence pour la digestion du domaine catalytique de la MMP-12 murine par la trypsine et la chymotrypsine, dans les conditions les plus favorables. Les fragments détectés sont indiqués en rouge

Ces résultats nous ont tout d'abord permis de conclure que la digestion à la trypsine est globalement plus efficace que celle à la chymotrypsine. Enfin, nous avons observé les meilleurs pourcentages de recouvrement via une digestion sur 24h avec 3 équivalents de protéase, trypsine ou chymotrypsine. Ce sont donc ces paramètres de digestion que nous avons conservés pour nos expériences de digestion enzymatique.

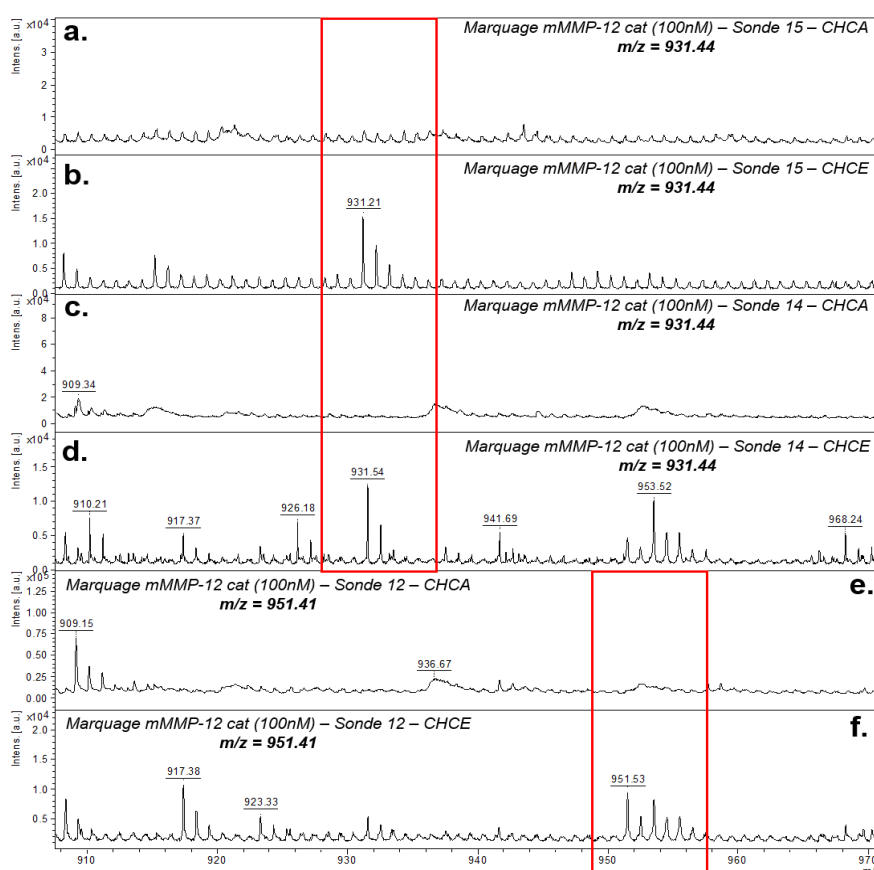
## 2. Marquage de la mMMP-12 catalytique

Une fois les protocoles de digestion validés, nous nous sommes tournés vers le marquage du domaine catalytique de la MMP-12 murine. Pour ce faire, nous avons privilégié trois sondes, précédemment définies comme spécifique de la MMP-12 :

- La sonde RXP500-Dab-NASA-CH-CHCA ( Sonde 15)
- La sonde RXP500-K-BB-CH-CHCA (Sonde 14)
- La sonde RXP500-K-BB-Bn-CHCA (Sonde 12)

Les sondes NASA-CH-CHCA et BB-CH-CHCA impliquent le transfert du groupement CH-CHCA, soit un incrément de masse de 284 Da. La sonde BB-Bn-CHCA, quant à elle, implique le transfert du groupement Bn-CHCA, soit un incrément de masse de 304 Da. Les fragments signatures associés à ces marquages sont respectivement les fragments 1-D pour les sondes 14 et 15 ( $m/z = 931.44$ ) et le fragment 1-B pour la sonde 12 ( $m/z = 951.41$ ). (Tab. 9)

Nous avons marqué 100nM de domaine catalytique de la MMP-12 murine. Les digestats ont été analysés dans la matrice CHCA 10mg/mL et dans CHCE 0.1 mg/mL, les deux matrices ayant été préparées dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.4% TFA. La figure 120 présente les spectres obtenus pour chacune des sondes considérées.



**Figure 120 : Marquage du domaine catalytique de la mMMP-12, en tampon biologique, par les sondes 14 (spectres c et d) , 15 (spectres a et b) (fragment associé  $m/z = 931.44$ ) et 12 (spectres e et f) (fragment associé  $m/z = 951.41$ ), dans les matrices CHCA et CHCE. Les massifs isotopiques des fragments signatures sont indiqués dans un cadre rouge**



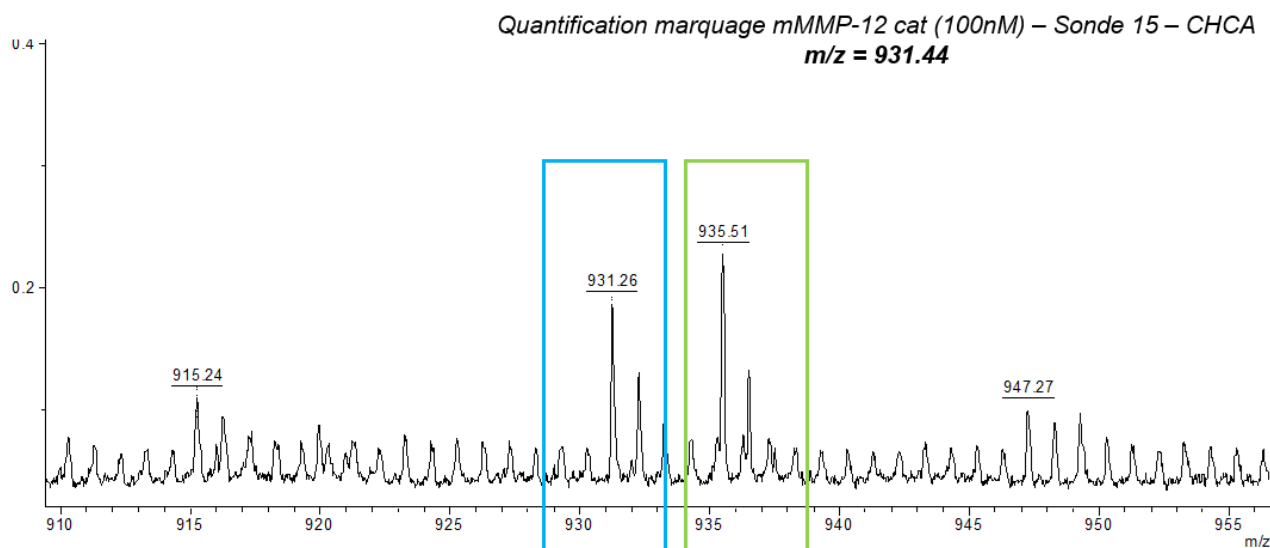
Quelle que soit la sonde utilisée, le fragment marqué ne se détecte que dans la matrice CHCE. En effet, la matrice CHCA, favorisant une ionisation de la majeure partie des peptides générés, provoque un fort phénomène d'extinction de signal des analytes les uns par rapport aux autres. La matrice CHCE induisant une ionisation beaucoup plus sélective et discriminante, elle facilite la détection du peptide signature au sein du milieu complexe.

L'observation des fragments marqués, 1-B et 1-D, respectivement associés aux sondes 12, 14 et 15, permet ainsi de valider le marquage de la MMP-12, réduite à son domaine catalytique.

Nous avons par la suite travaillé sur la quantification de ces marquages. En effet, connaissant la concentration en MMP-12 initialement introduite, soit 100 nM, nous voulions estimer le rendement de marquage via la détermination de la concentration en MMP-12 marquée finale, déterminée à partir de la concentration finale du fragment signature marqué. Pour ce faire, nous avons co-déposé chacun des digestats avec le fragment peptidique marqué D<sub>4</sub> associé, puis analysé les dépôts dans la matrice CHCE 0.1mg/mL dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.4% TFA.

L'objectif est de déterminer si une quantification approximative et/ou linéaire était possible. Nous avons étudié le cas du marquage avec la sonde 15. Les aires liées au pic de chacun des deux fragments, marqué CHCA (1-D) et CHCA D<sub>4</sub> (1-E), ont été relevées et leur rapport reporté sur la courbe de calibration précédemment construite. Nous obtenons ainsi une concentration de 85 nM, soit un rendement de marquage de 85%. (Fig. 121) Cette valeur est cohérente avec le rendement de marquage (100%), obtenus sur gel via un marquage fluorescent, présenté dans le chapitre 1 de la partie B.

Les résultats obtenus avec les sondes 12 et 14 n'étant pas concluants, ils sont à reprendre.

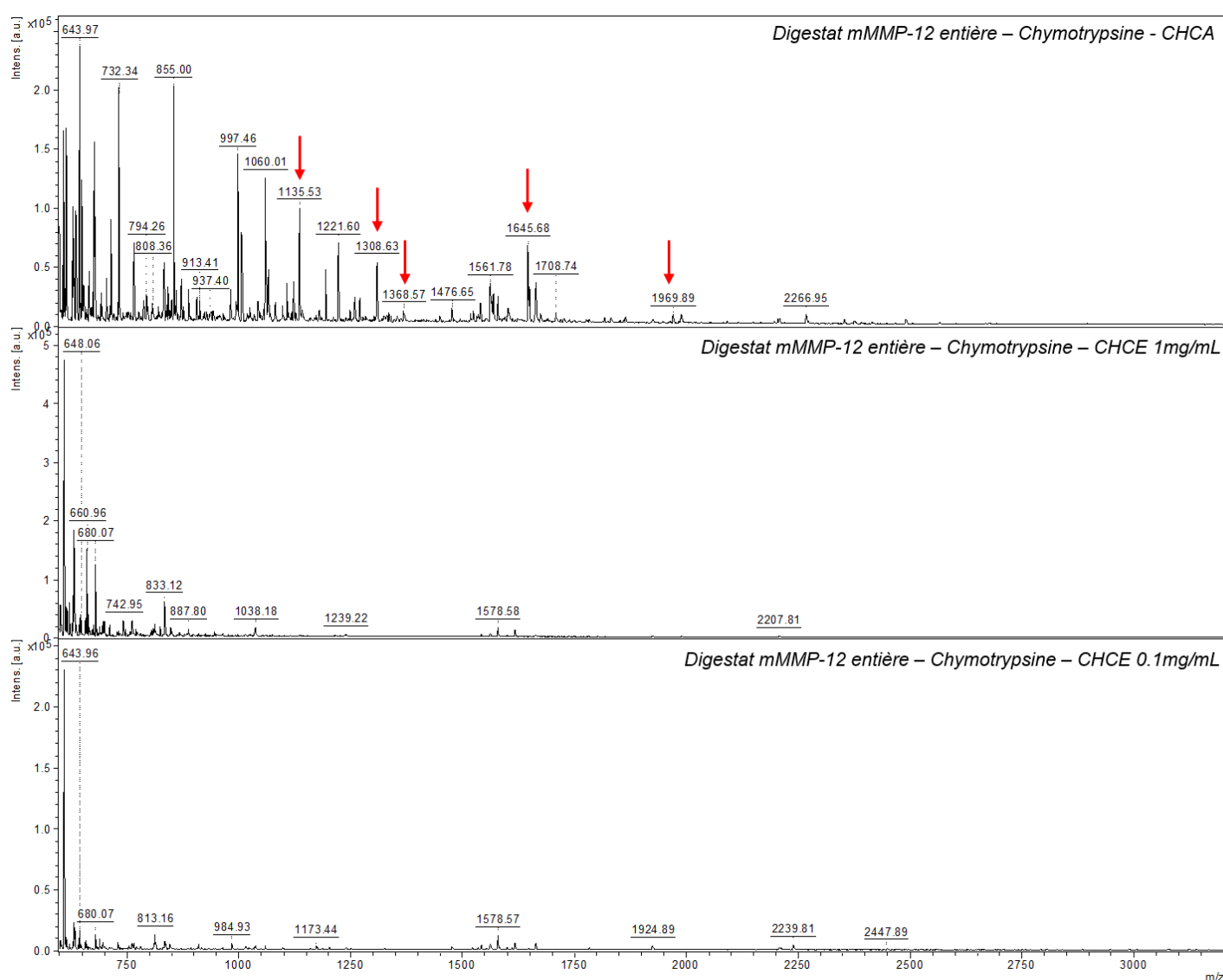


**Figure 121 : Quantification approximative du marquage du domaine catalytique de la mMMP-12 (100nM) par la sonde 15 (fragment associé m/z = 931.44). Le fragment CHCA est indiqué dans un cadre bleu, le fragment D<sub>4</sub> dans un cadre vert**

### 3. Détection de mMMP-12 exogène

Une fois le travail sur le domaine catalytique de la MMP-12 murine terminé, nous avons effectué la même démarche sur l'enzyme entière activée, en concentrant nos paramètres de travail sur les impératifs liés au travail en milieu biologique complexe. Ainsi, nous avons tout d'abord digéré l'enzyme native à la chymotrypsine, en passant à 4 équivalents de chymotrypsine pour certifier la digestion de la MMP. Nous avons analysé le digestat dans trois matrices préparées afin de pouvoir comparer les digestats : CHCA 10mg/mL, CHCE 1mg/mL et CHCE 0.1 mg/mL. (Fig. 122)

Nous nous sommes, ici, concentrés sur une digestion à la chymotrypsine au vu de la nature  $S_3'$  des deux sondes développées pour le marquage sélectif de la MMP-12 (Sondes 12 et 14). Le tableau 23 résume les peptides caractéristiques identifiés dans le digestat. Un pourcentage de recouvrement de 17% a été observé. (Fig. 123)



**Figure 122 : Spectres expérimentaux associé au digestat de MMP-12 murine dans les matrices CHCA, CHCE 1mg/mL et CHCE 0.1mg/mL**

m/z expérimentaux	m/z théoriques	Fragments peptidiques
1135.53	1135.57	(Y)EIESRNQLF(L)
1308.63	1308.66	(L)KEKLQEMQQF(F)
1368.57	1368.61	(Y)TPDMKREDVDY(I)
1645.68	1645.71	(Y)NYTPDMKREDVDY(I)
1989.83	1989.86	(F)YPPGPIQGDAHFDFAETW(T)

Tableau 23 : Fragments caractéristiques obtenus à la suite de la digestion de la MMP-12 murine entière activée par la chymotrypsine

Digestion à la chymotrypsine : 17%

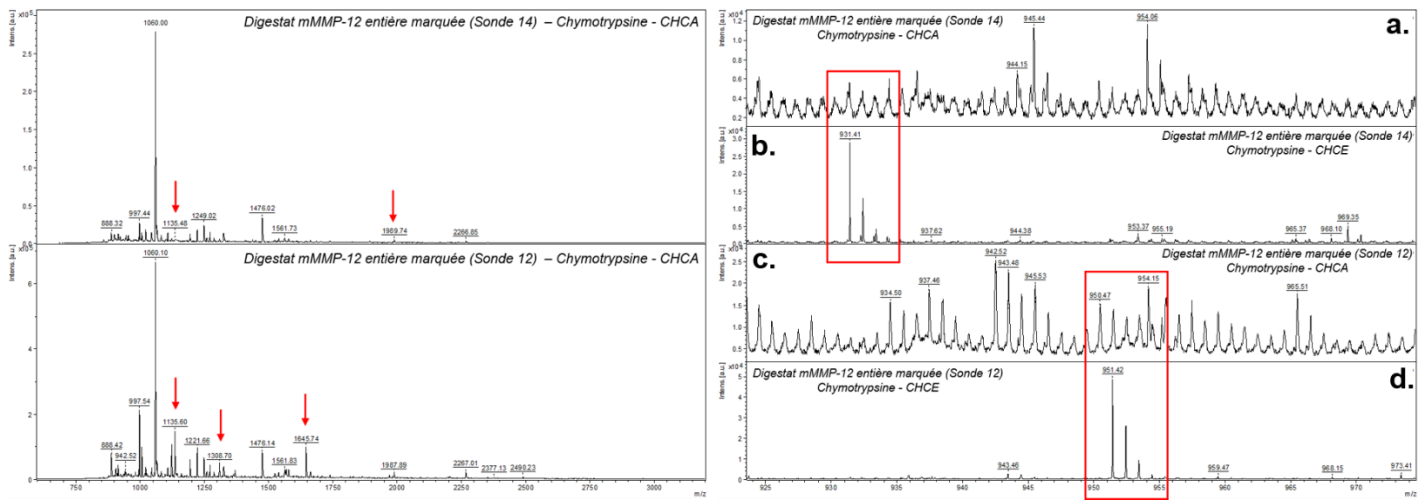
10	20	30	40	50	60
<b>MSCTLLK</b> GVC	TMKFLMMIVF	LQVSACGAAP	MNDSEFAEWY	LSRFYDYGKD	RIPMTKTKTN
70	80	90	100	110	120
RNFL <b>KEKLQE</b>	<b>MQQFFGLEAT</b>	<b>GQLDNSTLAI</b>	MHIPRCGVDP	<b>VQHLRAVPQR</b>	<b>SRWMKRYLTY</b>
130	140	150	160	170	180
<b>RIYNYTPDMK</b>	<b>REDVDYIFQK</b>	<b>AFQVWSDVTP</b>	<b>LRFRKLHKDE</b>	<b>ADIMILFAFG</b>	<b>AHGDFNYFDG</b>
190	200	210	220	230	240
<b>KGGLAHAFY</b>	<b>PGPGIQGDAH</b>	<b>FDEAETWTKS</b>	<b>FQGTNLF</b> LVA	<b>VHELGHSLGL</b>	<b>QHSNNPKSIM</b>
250	260	270	280	290	300
<b>YPTYRYLNPS</b>	<b>TFRLSADDIR</b>	<b>NIQSLYGAPV</b>	KPPSLTKPSS	PPSTFCHQSL	SFDAVTTVGE
310	320	330	340	350	360
KIFFFKDWFF	WWKLPGSPAT	NITSISSIWP	SIPSGIQAAY	EIESRNQLFL	FKDEDYWLIN
370	380	390	400	410	420
NLVPEPHYPR	SIYSLGFSAS	VKKVDAAVFD	<b>PLRKQKVYFV</b>	<b>DKHYWRYDVR</b>	QELMDPAYPK
430	440	450	460	470	
LISTHFPGIK	<b>PKIDAVLYFK</b>	<b>RHYIYFQ</b> GAY	<b>QLEYDPLFRR</b>	VTKTLKTSW	FGC

Figure 123 : Recouvrement de séquence pour la digestion de la MMP-12 murine entière activée par la chymotrypsine. Les fragments détectés sont indiqués en rouge et le domaine catalytique est indiqué en gras

C'est sur la cystéine en position 96 que repose le mécanisme d'activation de la mMMP-12. Les fragments peptidiques détectés en amont de cet acide aminé semblent appartenir au prodomaine de l'enzyme, nous indiquant donc que la mMMP-12 utilisée n'est pas totalement activée et présente en réalité un mélange forme active/proforme, la proforme étant la forme zymogène de la mMMP-12, soit une forme inactive. Il faudra tenir compte de ce mélange lors du marquage de l'enzyme.

Ces spectres seront utilisés par la suite comme références afin de valider cette étape de digestion.

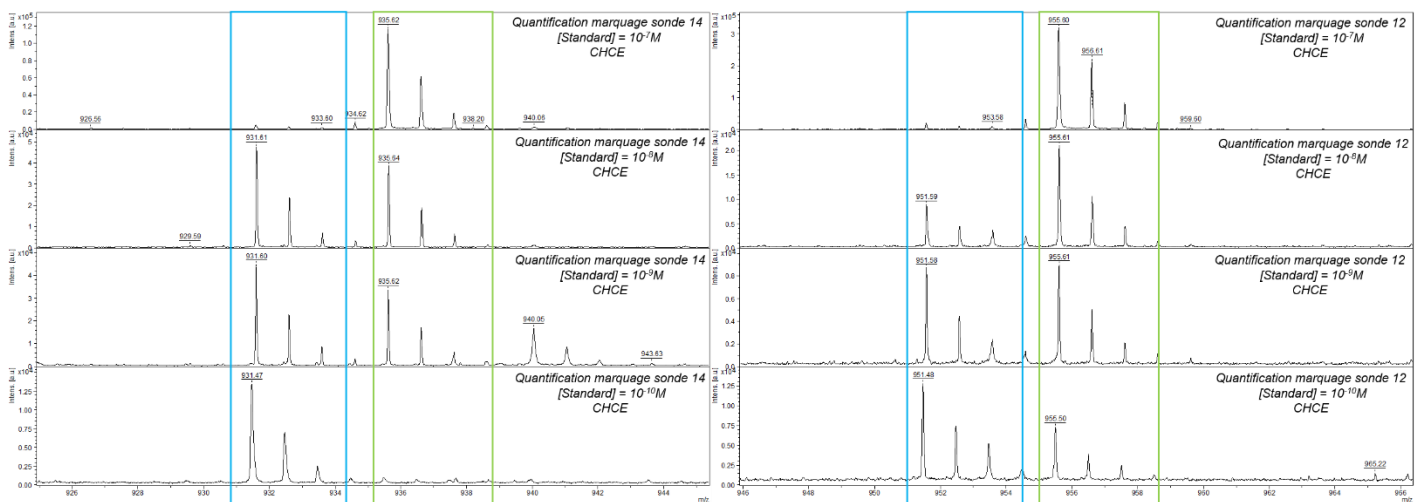
Nous avons poursuivi le processus par le marquage de la MMP-12 murine entière activée, à 100nM dans le tampon biologique, avec les sondes RXP500-K-BB-CH-CHCA (Sonde 14) et RXP500-K-BB-Bn-CHCA (Sonde 12). Le marquage s'est effectué selon le même protocole que celui utilisé pour le marquage du domaine catalytique. Les digestats ont été analysés, après une étape de dessalage, dans la matrice CHCA 10mg/mL et CHCE 0.1 mg/mL, dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.4% TFA. La figure 124 présente les spectres obtenus pour chacune des sondes considérées.



**Figure 124 : Marquage, en tampon biologique, de la MMP-12 murine entière activée par les sondes 12 (fragment associé  $m/z = 951.41$ ) (spectres b et d, zoom dans la zone d'intérêt) et 14 (fragment associé  $m/z = 931.44$ ) (spectres a et b, zoom dans la zone d'intérêt). Les fragments caractéristiques validant la digestion sont indiqués par une flèche rouge et les fragments signatures du marquage sont encadrés en rouge**

Du fait de l'ionisation sélective et discriminante induite par la matrice HCCE, les massifs isotopiques associés aux deux fragments marqués ne se détectent encore une fois que dans la matrice CHCE. La détection de certains fragments peptidiques caractéristiques associés à la digestion de la mMMP-12 (Tab. 23) nous a permis de valider la digestion des milieux.

Au vu de ces résultats, nous avons tenté la quantification du marquage, selon un protocole identique à celui utilisé pour la quantification du marquage du domaine catalytique de la MMP-12 murine. (Fig. 125)

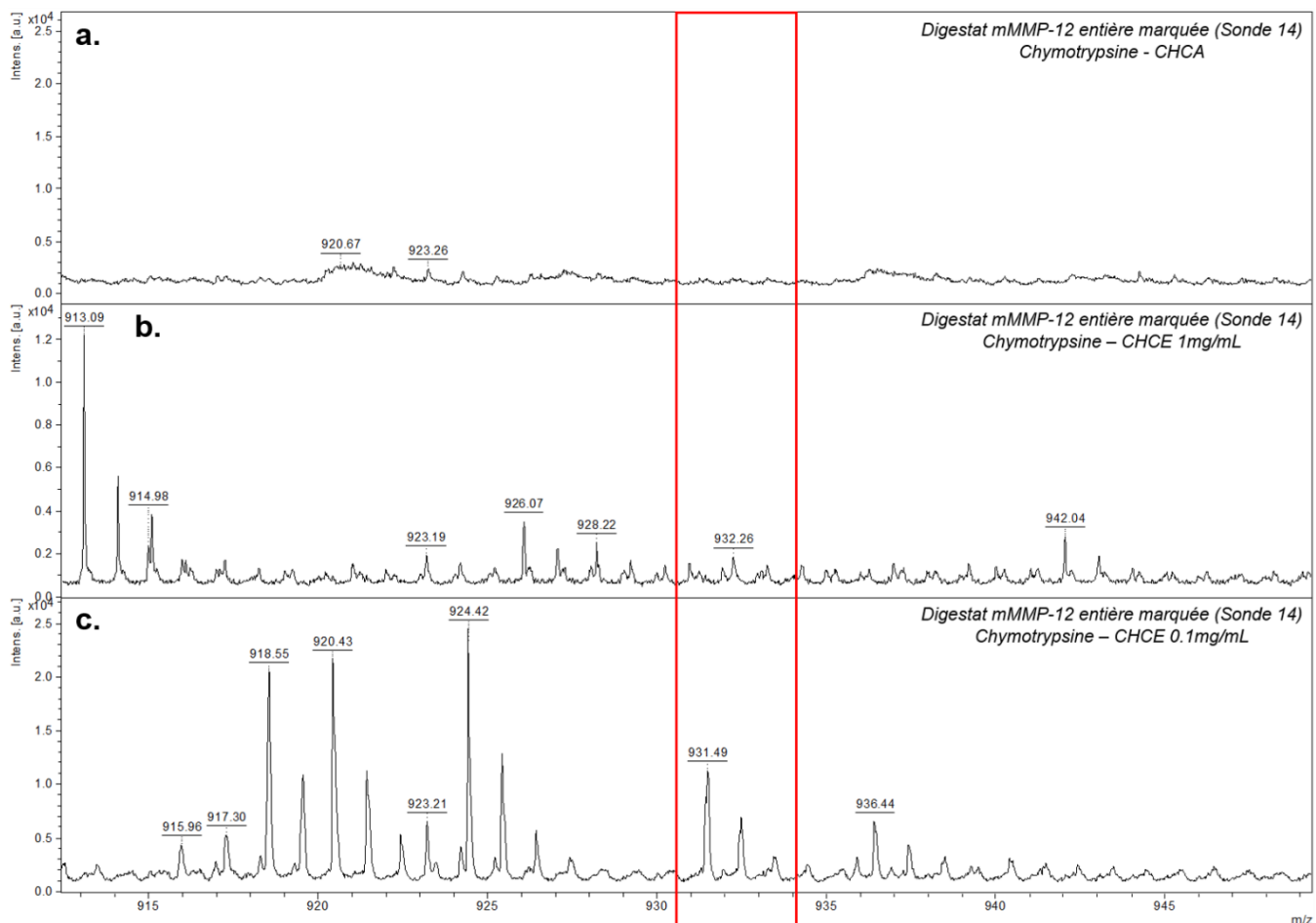


**Figure 125 : Quantification approximative du marquage, en tampon biologique, de la mMMP-12 entière activée par les sondes 12 (spectres de droite) (fragment associé  $m/z = 951.41$ ) et 14 (spectres de gauche) (fragment associé  $m/z = 931.44$ ). Le fragment CHCA est indiqué dans un cadre bleu, le fragment  $D_4$  dans un cadre vert**

Concernant le marquage par la sonde 12, les fragments CHCA (1-B) et CHCA D<sub>4</sub> (1-C) se co-détectent entre 10<sup>-8</sup>M et 10<sup>-10</sup>M. Les pics correspondant aux fragments, pour une concentration en standard de 10<sup>-9</sup>M, sont d'intensité similaire, indiquant que les deux composés sont probablement présents à des concentrations proches. Ces résultats nous permettent donc d'estimer la concentration du fragment 1-B, dans le digestat de mMMP-12 entière, autour de 10<sup>-9</sup>M, soit 1nM. Pour le marquage par la sonde 14, il est possible de co-détecter le fragment CHCA (1-D) et le standard D<sub>4</sub> (1-E) entre 10<sup>-8</sup>M et 10<sup>-9</sup>M. De plus, les spectres associés à une concentration en standard interne de 10<sup>-8</sup>M et de 10<sup>-9</sup>M sont similaires en termes d'intensité et de rapport signal/bruit pour les pics caractéristiques. Ainsi, nous estimons la concentration du fragment 1-D, dans le digestat de mMMP-12 entre 5 et 10nM. On obtient donc un rendement de marquage, pour les fragments 1-B et 1-D, entre 1 et 10%. Il est à noter que la présence d'un mélange forme active/proforme, pour la mMMP-12 de travail, impacterait comme attendu le rendement de marquage puisque la proforme ne peut interagir avec les sondes.

## **2. Marquage de la MMP-12 murine exogène en milieu biologique complexe**

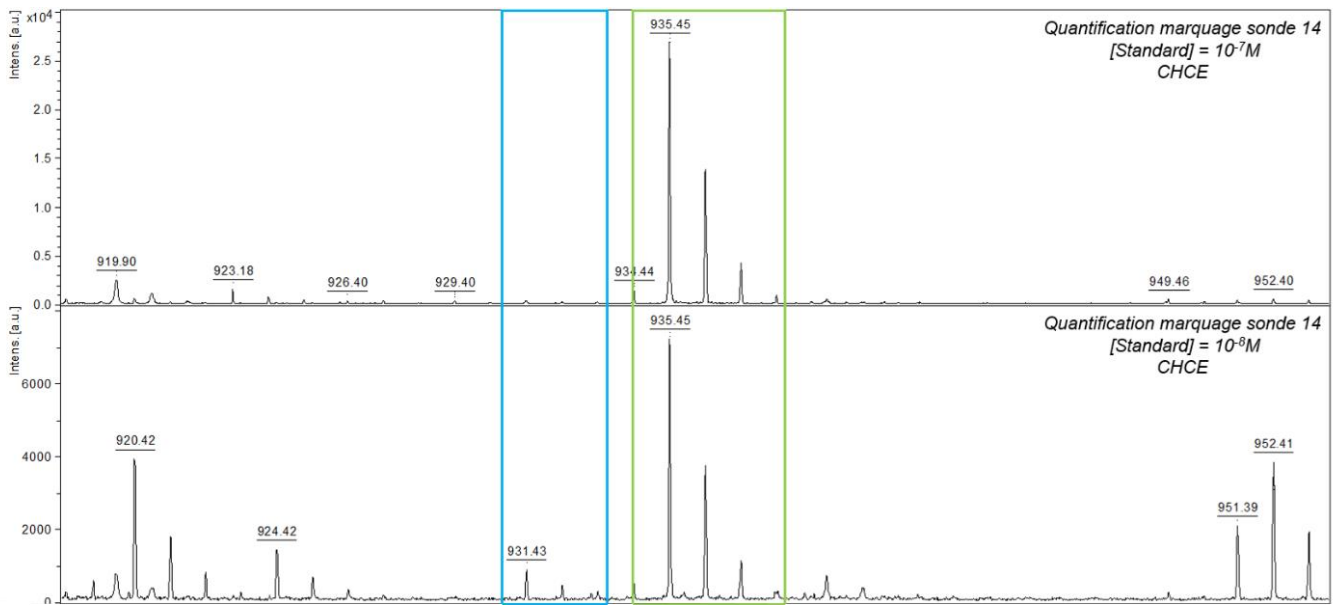
Une fois le marquage de l'enzyme validé en tampon biologique, nous avons entrepris le marquage de cette même enzyme, introduite dans un milieu biologique complexe de référence. Comme énoncé précédemment, nous avons deux milieux complexes à notre disposition, du broyat pulmonaire et du surnageant de cellules dendritiques, tous deux associés à une surexpression de la MMP-12 sous stimuli ou pathologie inflammatoire. Nous avons choisi de travailler avec le surnageant de cellules dendritiques, à une concentration totale en protéines de 0.1mg/mL. Nous avons ainsi introduit la MMP-12 murine entière activée à la concentration de 100nM dans ce milieu, avant de marquer l'enzyme par la sonde RXP500-K-BB-CH-CHCA (Sonde 14). Après une étape de précipitation, le milieu a été digéré à la chymotrypsine. Après dessalage, les digestats ont été analysés dans la matrice CHCA 10mg/mL et dans CHCE 1 et 0.1 mg/mL. La figure 126 présente les spectres obtenus pour chacun des échantillons.



**Figure 126 : Marquage de la mMMP-12 entière (100nM), dans le surnageant de cellules dendritiques à 0.1mg/mL, par la sonde 14 (fragment associé m/z = 931.44), dans les matrices CHCA (a), CHCE 1mg/mL (b) et CHCE 0.1mg/mL (c) . Le fragment signature est indiqué dans un cadre rouge**

Le marquage de la mMMP-12, en solution dans le surnageant de cellules dendritiques, a pu être observé, via la détection du fragment signature 1-D, celui-ci ne se détectant que dans la matrice CHCE 0.1mg/mL. Les phénomènes de discrimination ionique, très important en milieu biologique complexe, se trouvent, en effet, réduits par l'utilisation conjointe du marquage CHCA et de la matrice CHCE 0.1mg/mL. Nous conserverons les résultats obtenus pour la solution à 0.1mg/mL comme référence pour la validation du marquage de l'enzyme exogène en milieu complexe.

Enfin, des expériences de quantification approximative ont été menées pour le marquage de la mMMP-12 dans le surnageant de cellules dendritiques à 0.1mg/mL. Nous n'avons conservé que la condition d'analyse avec la matrice CHCE 0.1mg/mL, se plaçant ainsi dans les conditions les plus favorables à la détection du fragment marqué. (Fig. 127)



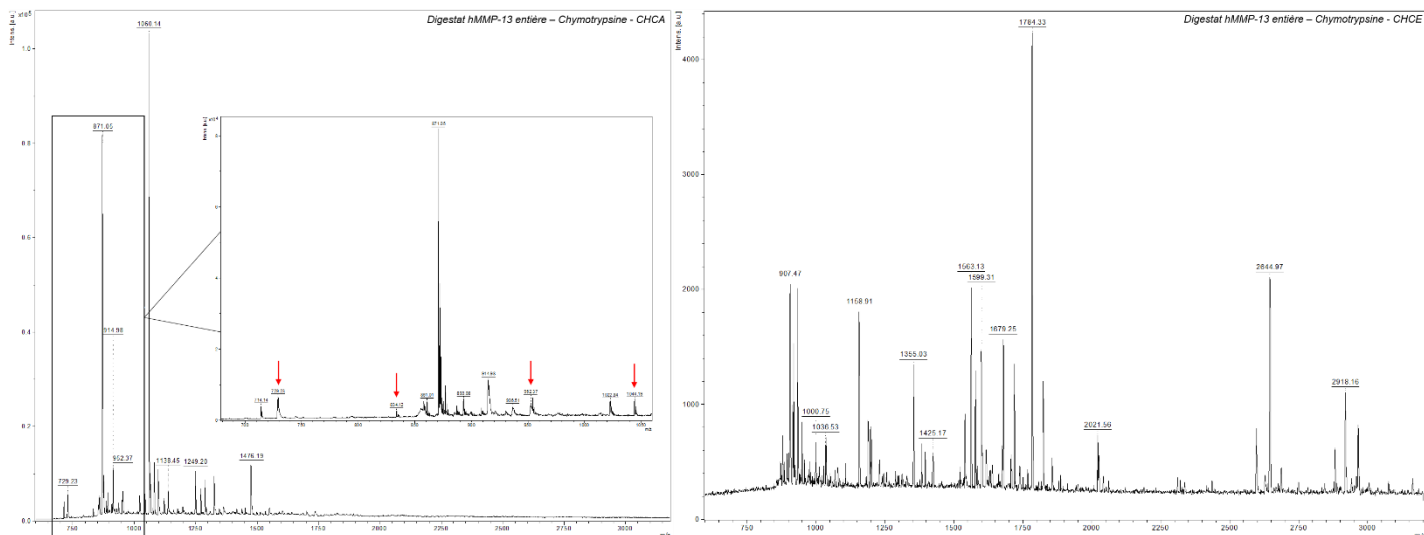
**Figure 127 : Quantification approximative du marquage de la mMMP-12 entière (100nM), dans le surnageant de cellules dendritiques à 0.1mg/mL, par la sonde 14 (fragment associé m/z = 934.44). Le fragment CHCA est indiqué dans un cadre bleu, le standard D<sub>4</sub> dans un cadre vert à la concentration de 10<sup>-7</sup>M (spectre haut) et 10<sup>-8</sup> (spectre bas)**

Ces résultats nous permettent d'estimer la concentration du fragment marqué et donc le rendement du marquage enzymatique. Les fragments CHCA (1-D) et D<sub>4</sub> (1-E) ne se détectent simultanément que pour une concentration en D<sub>4</sub> (1-E) de 10<sup>-8</sup>M et non pour 10<sup>-7</sup>M, ce qui nous permet de conclure que la concentration en fragment 1-D est de l'ordre de 10<sup>-8</sup>M.

## **b. Détection de la MMP-13 humaine**

### **1. Marquage de l'enzyme pure**

Nous avons suivi, ici, un protocole comparable à celui mis en place pour le marquage de la MMP-12 murine. Nous avons tout d'abord digéré l'enzyme seule, à la chymotrypsine. L'idée était, comme pour le MMP-12 murine, de déterminer les fragments peptidiques caractéristiques de la digestion enzymatiques et de déterminer la signature de l'enzyme en spectrométrie de masse. Après dessalage, le digestat a été analysé dans les matrices CHCA 10mg/mL et CHCE 0.1mg/mL. (Fig. 128) Le tableau 24 résume les fragments peptidiques caractéristiques identifiés dans le digestat et le recouvrement de séquence associé. (Fig. 129)



**Figure 128 : Analyse du digestat de la h-MMP-13 (100nM) entière, non marqué, dans les matrices CHCA (spectre de gauche) et CHCE (spectre de droite). Les fragments caractéristiques sont indiqués par une flèche rouge**

m/z expérimentaux	m/z théoriques	Fragments peptidiques
729.23	729.34	(W)TSSSKGY(N)
834.12	834.37	(Y)EHPSHDL(I)
952.37	952.44	(F)YFPDGPSSL(L)
1044.19	1044.57	(F)KVWSDVTPL(N)

**Tableau 24 : Fragments caractéristiques obtenus à la suite de la digestion de la MMP-13 humaine entière, non marquée, par la chymotrypsine**

**Digestion à la chymotrypsine : 7%**

10	20	30	40	50	60
MHPGVLA AFL	FLSWTHCRAL	PLPSGGDEDD	LSEEDLQFAE	RYLRSYYHPT	NLAGILKENA
70	80	90	100	110	120
ASSMTERLRE	MQSFFGLEVT	GKLDNTLDV	MKKPRCGVP	DVGEYNVFP	<b>RTLKWSKMNL</b>
130	140	150	160	170	180
TYRIVNYTPD	<b>MTHSEVEKAF</b>	<b>KKAFKVWSDV</b>	<b>TPLNFTRLHD</b>	GIADIMISFG	<b>IKEHGDFYPF</b>
190	200	210	220	230	240
<b>DGPSGLLAHA</b>	FPPGPNYGGD	AHFDDDETWT	<b>SSSKGYNLFL</b>	VAAHEFGHS	<b>LGLDHSKDPG</b>
250	260	270	280	290	300
ALMFPIYTYT	GKSHFMLPDD	DVQGIQSLYGP	GDEDPNPKHP	KTPDKCDPSL	SLDAITSLRGET
310	320	330	340	350	360
MIFKDRFFWR	LHPQQVDAEL	FLTKSFWPEL	PNRIDAAYEH	<b>PSHDLIFIFRG</b>	RKFWALNGYD
370	380	390	400	410	420
ILEGYPKKIS	ELGLPKEVKK	ISAAVHFEDT	GKTLFSGNQ	VWRYDDTNH	IMDKDYPRLI
430	440	450	460	470	
EEDFPGIGDK	VDAVYEKNGY	IYFFNGPIQF	EYSIWSNRIV	RVMPANSILW	C

**Figure 129 : Recouvrement de séquence pour la digestion du domaine catalytique de la MMP-13 humaine par la chymotrypsine. Les fragments détectés sont indiqués en rouge et le domaine catalytique est indiqué en gras**



Nous obtenons ici une valeur très faible concernant le recouvrement de séquence, soit 7%, signe que le protocole de digestion n'est pas optimal pour cette enzyme. Cependant, le fragment caractéristique (5-D) du marquage de la MMP-13 humaine, ayant un m/z de 729.23 Da, est, ici, visible dans le digestat enzymatique. Nous avons donc conclu que ces paramètres de digestion pouvaient être utilisés pour les expériences suivantes avec la MMP-13.

Une fois la digestion de cette enzyme caractérisée, nous avons marqué la MMP-13 humaine entière, en tampon biologique. Pour ce faire, il nous a tout d'abord fallu activer la métalloprotéase, et donc cliver le prodomaine, permettant ainsi de libérer le domaine catalytique de l'enzyme. L'activation été faite par une solution d'acétate mercurique, l'APMA, dans le DMSO. (Fig. 130) L'APMA réagit avec la cystéine 97 du prodomaine, en coordination avec l'ion zinc, permettant ainsi de déplacer l'équilibre de complexation et de libérer le site actif.

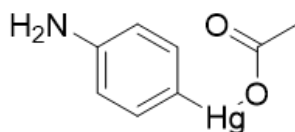


Figure 130 : Structure de l'APMA

Nous avons, par la suite, marqué l'enzyme présumée activée, à une concentration de 100nM, avec la sonde RXP500-Dab-NASA-CH-CHCA (Sonde 15), sonde dont la sélectivité a été validée dans le premier chapitre de cette partie. Après une phase de précipitation, le milieu a été digéré par la chymotrypsine. Après dessalage, le digestat a été analysé dans les matrices CHCA 10mg/mL et CHCE 0.1 mg/mL. (Fig. 131)

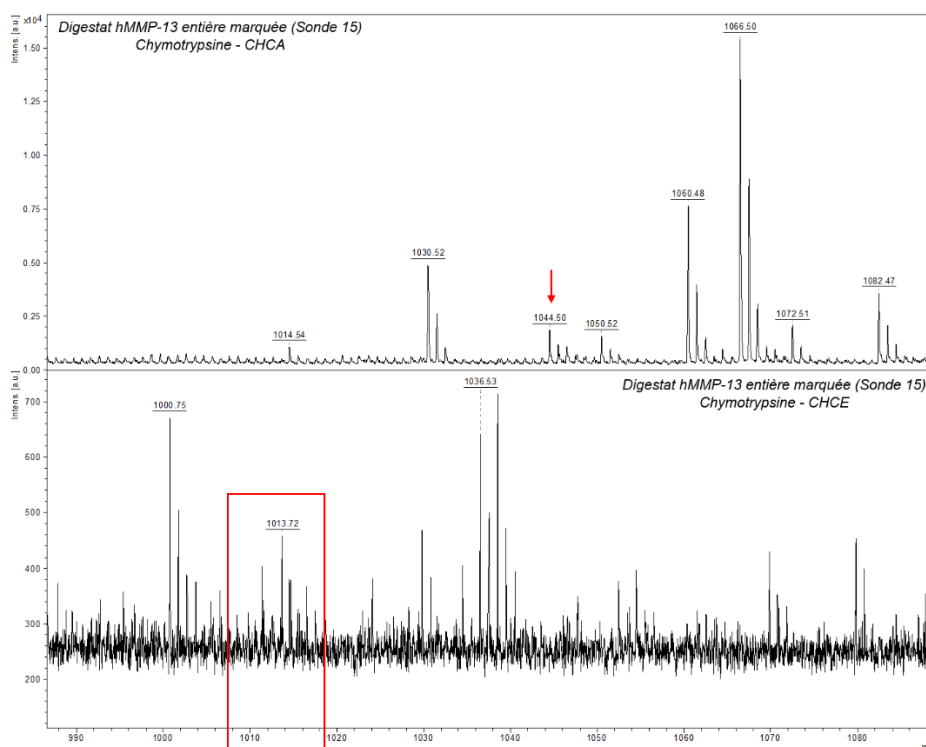
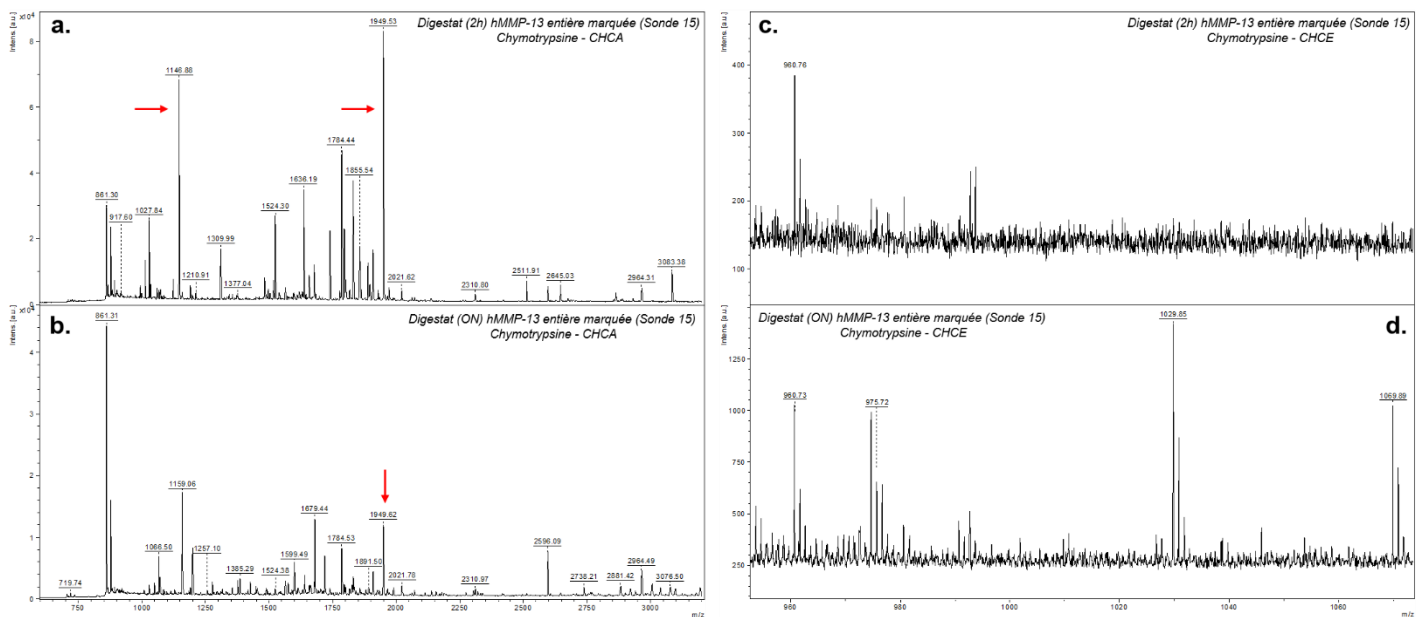


Figure 131 : Marquage de la hMMP-13 entière (100nM), dans le tampon biologique, par la sonde 15 (fragment associé 5-D m/z = 1013.45), dans les matrices CHCA (spectre du haut) et CHCE (spectre du bas). Le fragment signature est indiqué dans un cadre rouge. Les peptides caractéristiques associés à la digestion sont indiqués par une flèche rouge

Nous avons pu, ici, valider le marquage de l'enzyme via la détection du fragment à 1013.72 Da correspondant au fragment H-TSSSKGY-OH (5-D), caractéristique du marquage de la MMP-13 humaine. Ce fragment ne se détecte que dans la matrice CHCE, ce qui valide une fois de plus nos conditions discriminantes. Cependant, le pic associé à l'ion moléculaire possède un rapport signal/bruit de 5, ce qui montre que la détection du fragment marqué est vraiment faible. Ayant préalablement validé les protocoles de digestion et de marquage, nous avons émis l'hypothèse d'une mauvaise ou d'une faible activation de la pro-MMP-13, hypothèse qu'il faudra valider par un test d'activité enzymatique.

## **2. Marquage de la hMMP-13 exogène en milieu biologique complexe**

L'objectif est, ici, de valider le marquage et la digestion de l'enzyme exogène (100nM) dans un milieu biologique complexe, dans le but de se rapprocher au maximum des conditions de marquage de l'enzyme endogène. Nous avons alors introduit la sonde RXP500-Dab-NASA-CHCA (Sonde 15) dans le milieu complexe, ici du surnageant de chondrocytes à 1mg/mL, dont le lien avec la hMMP-13 a été présenté dans le chapitre 4 de la partie A. Après une phase de précipitation, le milieu a été digéré par la chymotrypsine. Après dessalage, le digestat a été analysé dans les matrices CHCA 10mg/mL et CHCE 0.1 mg/mL. La figure 132 présente les spectres obtenus dans les deux matrices.



**Figure 132 : Marquage de la hMMP-13 entière (100nM), dans le surnageant de chondrocytes à 1mg/mL, par la sonde 15 (fragment associé m/z = 1013.45), dans les matrices CHCA (spectres a et b) et CHCE (spectres c et d). Les peptides caractéristiques de la digestion sont indiqués par une flèche rouge**

Le fragment caractéristique du marquage de la MMP-13 humaine, fragment 1-E, ne se détecte pas dans ces conditions. La présence, sur les spectres associés aux digestats, de peptides caractéristiques, nous permet de confirmer que les milieux ont bien été digérés, le problème de détection ne vient donc pas de la digestion. En revanche, nous avons montré, lors du marquage de l'enzyme, en tampon biologique, que l'activation de l'enzyme était probablement peu efficace, ce qui nous a poussé à la conclusion que le problème venait donc, ici, de l'impossibilité de marquer correctement la MMP-13, dont la forme active est présente en quantités

très faibles. Des expériences similaires ont été menées avec du surnageant de chondrocytes à 0.1mg/mL et nous avons obtenu des résultats comparables, renforçant l'hypothèse avancée.

### **III. Marquage de MMPs endogènes**

Il s'agissait, ici, de marquer des MMPs actives endogènes, directement présentes dans les milieux biologiques complexes pour lesquels les MMPs d'intérêts sont susceptibles d'être surexprimées.

#### **a. Marquage de la mMMP-12**

Dans le cadre de la détection de peptides signatures de la mMMP-12, nous avons deux milieux complexes murins à notre disposition, associés à la surexpression de la MMP-12 sous stimuli inflammatoire. Le surnageant de cellules dendritiques, d'une part, illustrant un contexte inflammatoire général, et des échantillons de broyats pulmonaires issus de poumons enflammés, illustrant le modèle des pathologies pulmonaires chroniques obstructives. Pour le passage au marquage de la MMP-12 murine endogène, nous avons conservé ces deux modèles.

D'une part, les cellules dendritiques ont été soumises à une stimulation inflammatoire via l'introduction d'interleukine-4 dans le milieu de culture. Le surnageant de culture a été collecté après 8 jours, remplacé par du milieu de culture neuf, et réservé à -80°C. Au 9<sup>ème</sup> jour, nous avons effectué la lyse des cellules, dans le but de récupérer, en plus des MMPs sécrétées dans le milieu de culture, les MMPs présentes à proximité de la membrane cellulaire. Le lysat est, tout comme le surnageant, aliquoté et réservé à -80°C. Les échantillons de surnageant et de lysat sont concentrés d'un facteur 10 pour atteindre environ 1mg/mL. Le marquage sera effectué par la suite avec 300nM de sonde 14.

D'autre part, concernant le broyat pulmonaire, les souris ont été directement soumises à un stimulus inflammatoire, via l'injection de 15µg de d'élastase porcine. Par la suite, la sonde RXP500-K-Bn-CH-CHCA (Sonde 14) est injectée par voie topique, directement dans les poumons. Plusieurs lots de souris sont générés afin de pouvoir dupliquer nos résultats et traiter deux périodes inflammatoires différentes. En effet, le premier lot de souris est sacrifié 5 jours après l'injection de la sonde. Celui-ci est constitué d'une souris n'ayant pas reçu l'injection de sonde, utilisée comme contrôle négatif, et de 3 souris ayant reçu la sonde. Les poumons de chacune de ces souris ont été prélevés afin de générer les broyat pulmonaires, réalisés dans le PBS. Le second lot de souris, constitué d'une souris contrôle et de 4 souris marquées, est sacrifié 14 jours après l'instillation de la sonde. Les broyats pulmonaires ont été générés de manière identique au premier lot. Ces échantillons de broyats pulmonaires ont été mis en suspension dans un tampon biologique afin de générer des aliquots à 1mg/mL de protéines.

De même que pour les expériences précédentes, les milieux biologiques ont été digérés par la chymotrypsine, en l'absence de sonde, afin de déterminer les peptides caractéristiques de la digestion. Le surnageant de cellules dendritiques ayant déjà été caractérisé (Fig. 106), nous nous sommes concentrés, ici, sur le broyat pulmonaire. L'analyse de deux lots différents de digestats nous a permis l'identification des fragments caractéristiques, via la sélection des peptides communs aux deux lots, les plus abondants.

Après dessalage, les digestats ont été analysés dans les matrices CHCA 10mg/mL et CHCE 0.1mg/mL. Les figures 133 et 134 présentent les spectres obtenus.

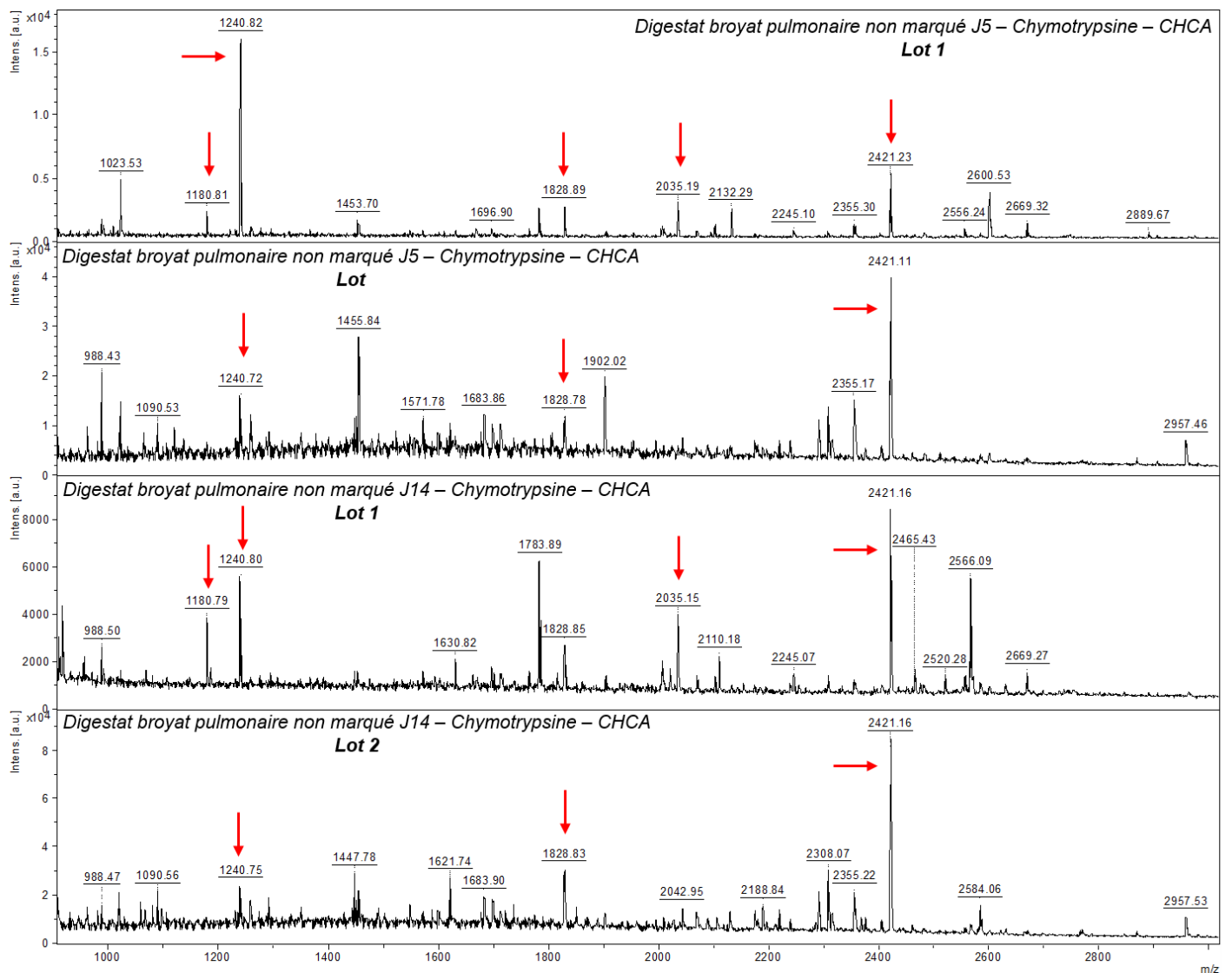


Figure 133 : Digestats des broyats pulmonaires, non marqués, J5 (spectres du haut) et J14 (spectres du bas), à la chymotrypsine, dans la matrice CHCA. Les fragments caractéristiques sont indiqués par une flèche rouge

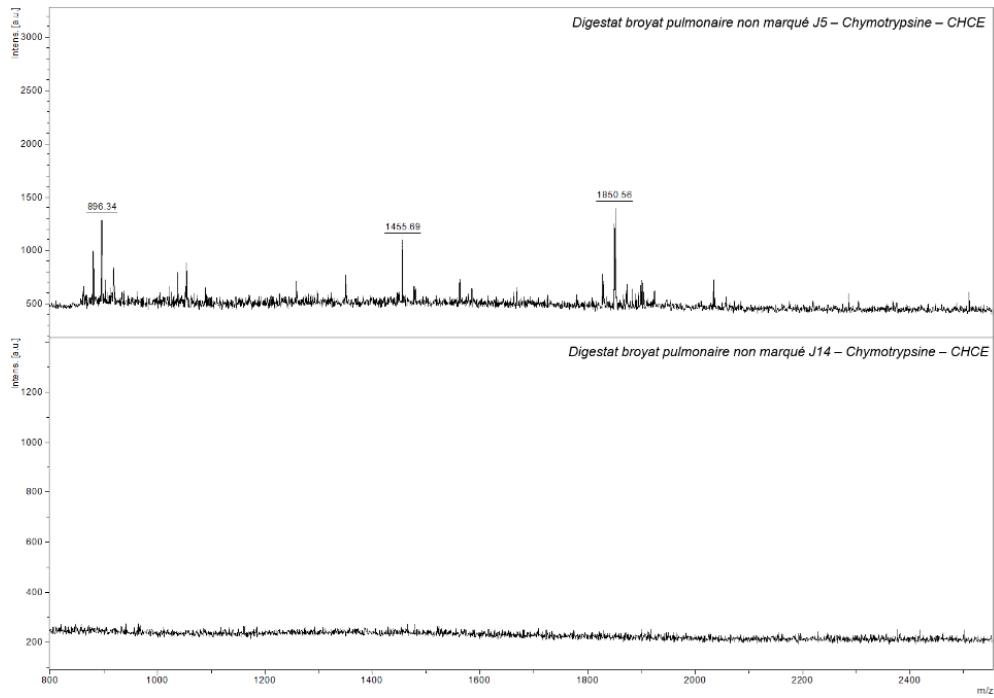


Figure 134 : Digestats des broyats pulmonaires, non marqués, J5 (spectre du haut) et J14 (spectre du bas), Lot 2, à la chymotrypsine, dans la matrice CHCE

Une fois le protocole de digestion de ces milieux validé, via l'observation et la détermination des fragments caractéristiques, nous nous sommes tournés vers l'analyse des aliquots issus des milieux marqués. Les échantillons, issus de la digestion à la chymotrypsine des milieux marqués, ont été analysés après dessalage dans la matrice CHCA 10mg/mL et dans CHCE 0.1 mg/mL. La figure 135 présente les résultats obtenus pour le surnageant de cellules dendritiques, les figures 136 et 137 les résultats obtenus pour les différents broyats pulmonaires.

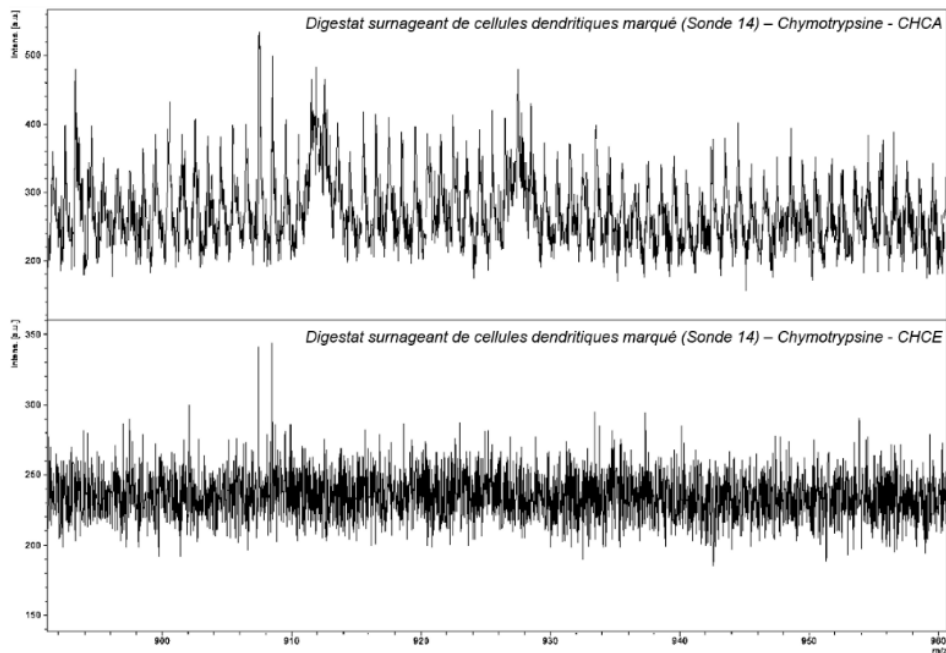
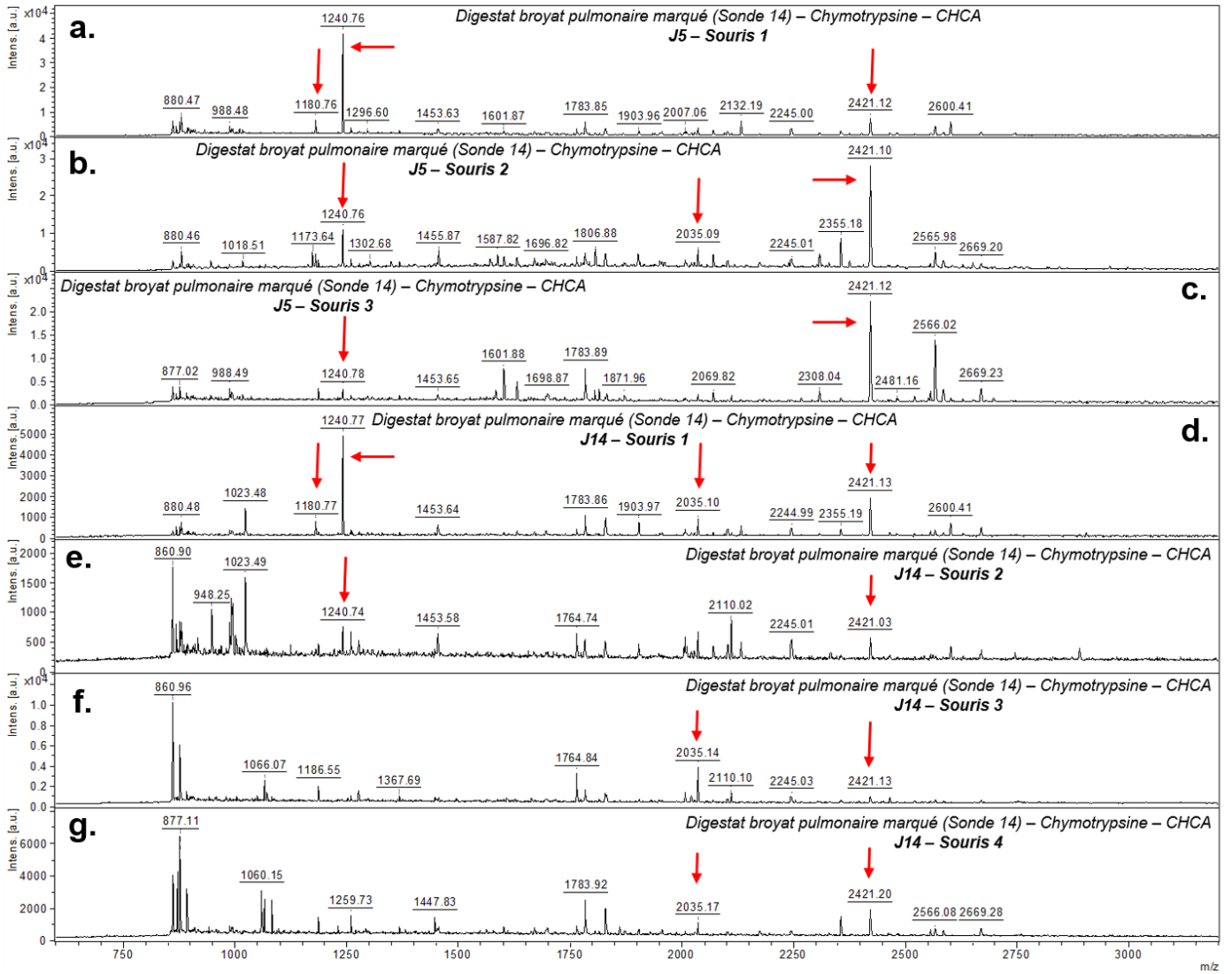
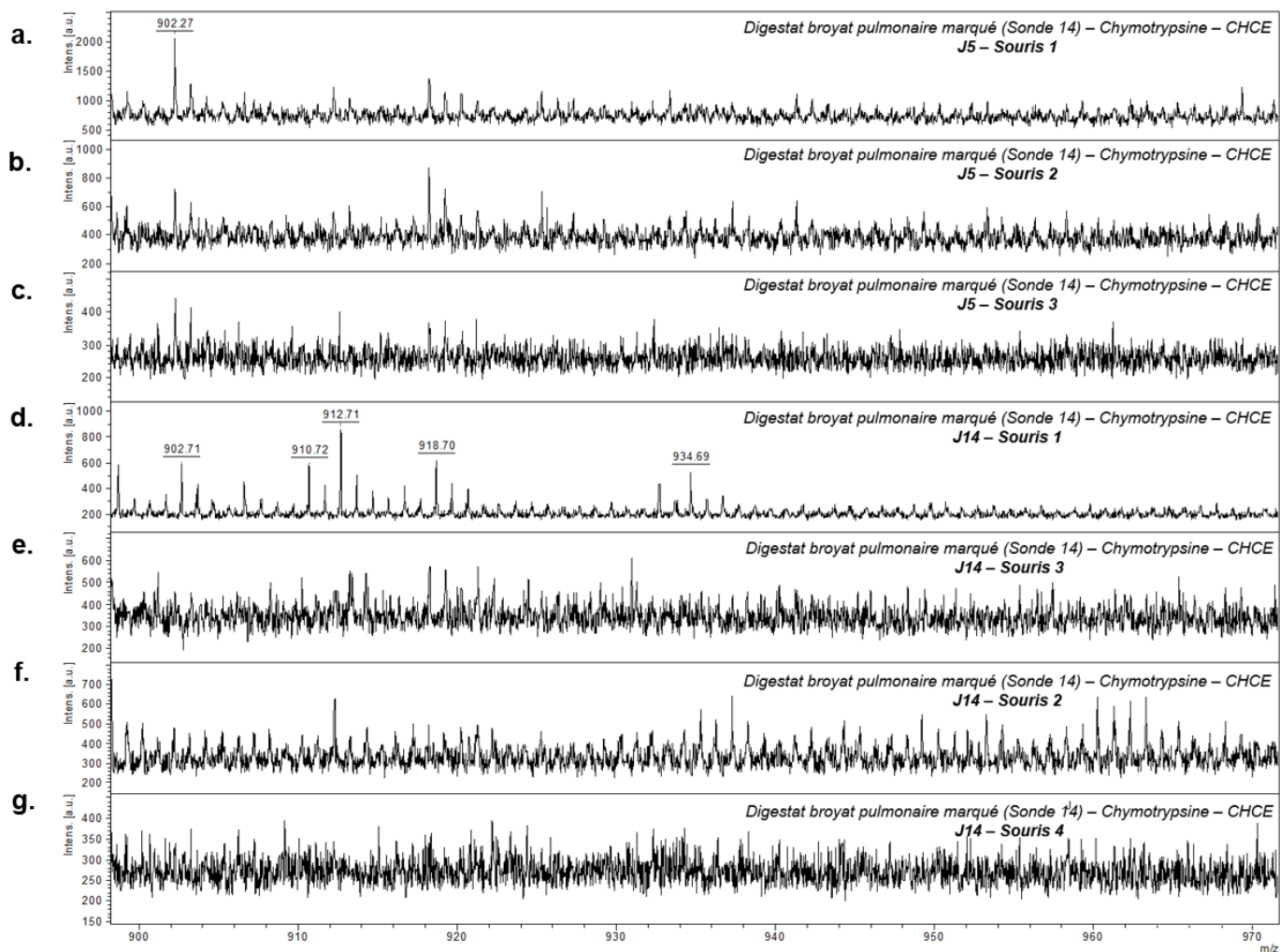


Figure 135 : Digestats du surnageant de cellules dendritiques marqué, par la sonde 14 (Fragment associé m/z = 931.44), dans les matrices CHCA (spectre du haut) et CHCE (spectre du bas)



**Figure 136 : Digestats des échantillons J5 (spectres a, b et c) et J14 (spectre d, e, f et g) de broyats pulmonaires marqués par la sonde 14 (fragment associé  $m/z = 931.44$ ), dans la matrice CHCA. Les fragments caractéristiques associés à la digestion du milieu sont indiqués en rouge**



**Figure 137 : Digestats des échantillons J5 (spectres a, b et c) et J14 (spectres d, e, f et g) de broyats pulmonaires marqués par la sonde 14 (fragment associé  $m/z = 931.44$ ), dans la matrice CHCE**

Le marquage ne s'est avéré concluant ni pour le surnageant de cellules dendritiques, ni pour les broyats pulmonaires. Il est clairement visible sur tous les spectres que le fragment signature du marquage (1-D,  $m/z = 931.44$ ) ne se détecte pas dans les digestats, quel que soit le milieu. La digestion, quant à elle, a été validée pour les deux milieux, via la détection de fragments caractéristiques. Les protocoles de marquage ayant été mis en place sur 100nM d'enzyme et la LOD de ce fragment, en milieu complexe, ayant été déterminée entre  $10^{-8}$  et  $10^9$ M, il est plus que probable que l'enzyme soit présente dans ces milieux à une concentration sub-nanomolaire.

Toutes ces expériences ont été menées avec des milieux à 1mg/mL de protéines. Des expériences similaires dans des milieux à 0.1mg/mL ont été menées mais elles ont conduit à l'obtention de résultats comparables, signe que la non-détection du fragment signature ne vient pas simplement d'un problème de discrimination ionique due à la richesse du milieu.

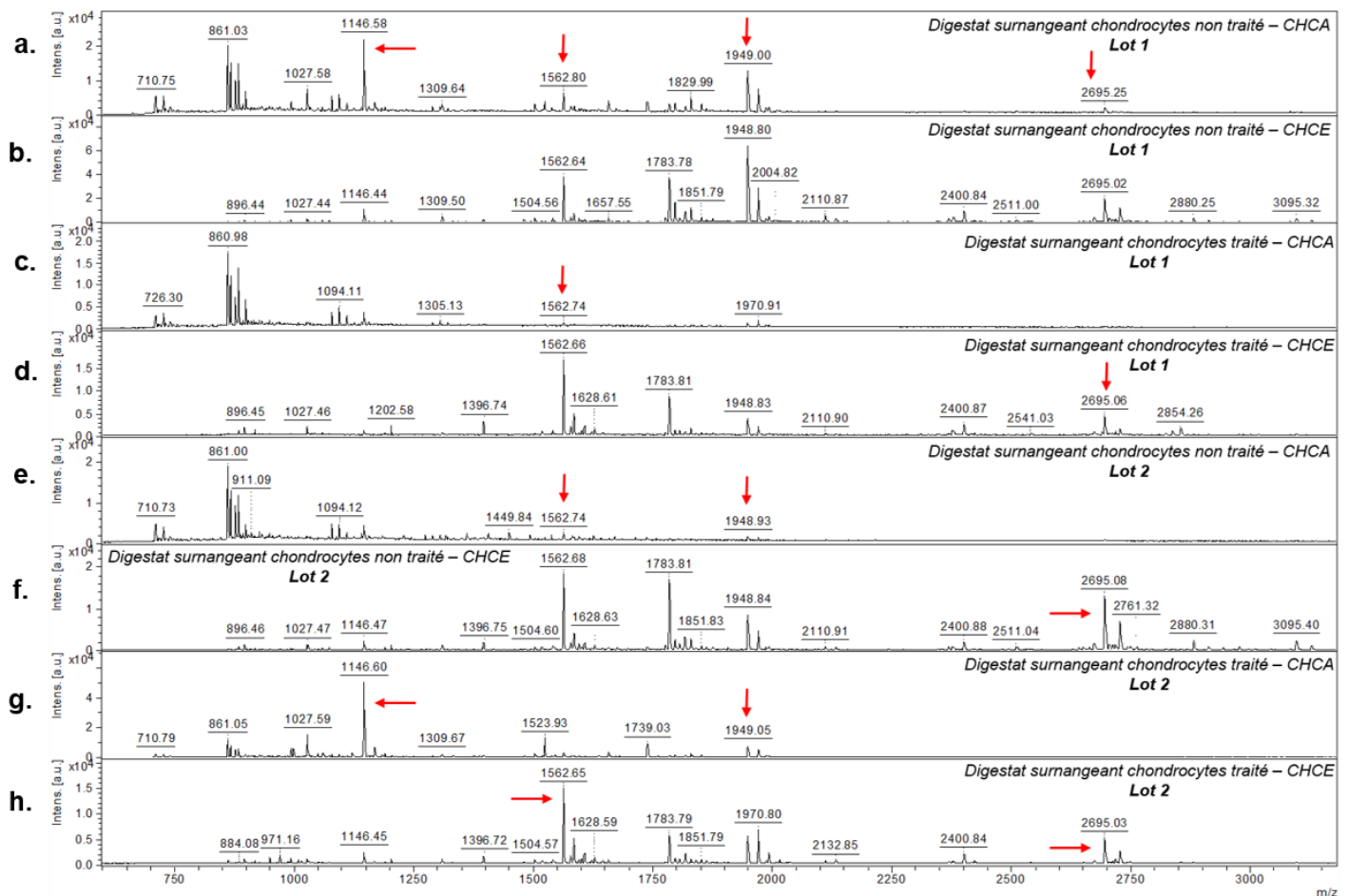
Enfin, des caractérisations ELISA de ces milieux complexes, nous permettront de certifier la présence de mMMP-12 (active et non active) dans ces milieux, leur caractérisation n'étant pas totalement finalisée.



## **b. Marquage de la hMMP-13**

Les modèles biologiques associés à cette enzyme sont les surnageants de chondrocytes. Avec la collaboration de Danièle NOEL (IRCM Montpellier), nous avons eu accès à deux lots différents de surnageants. Pour chacun des lots, une première moitié a été traitée à l'interleukine-4 afin de stimuler le processus inflammatoire, l'autre moitié a été utilisée comme contrôle négatif. Tous les échantillons de surnageants de chondrocytes ont été travaillés à une concentration d'environ 1mg/mL.

De la même manière que pour la mMMP-12, nous avons tout d'abord, caractérisé les milieux biologiques, non marqués, via une digestion à la chymotrypsine. Les digestats ont ensuite été analysés dans la matrice CHCA 10mg/mL. (Fig. 138)

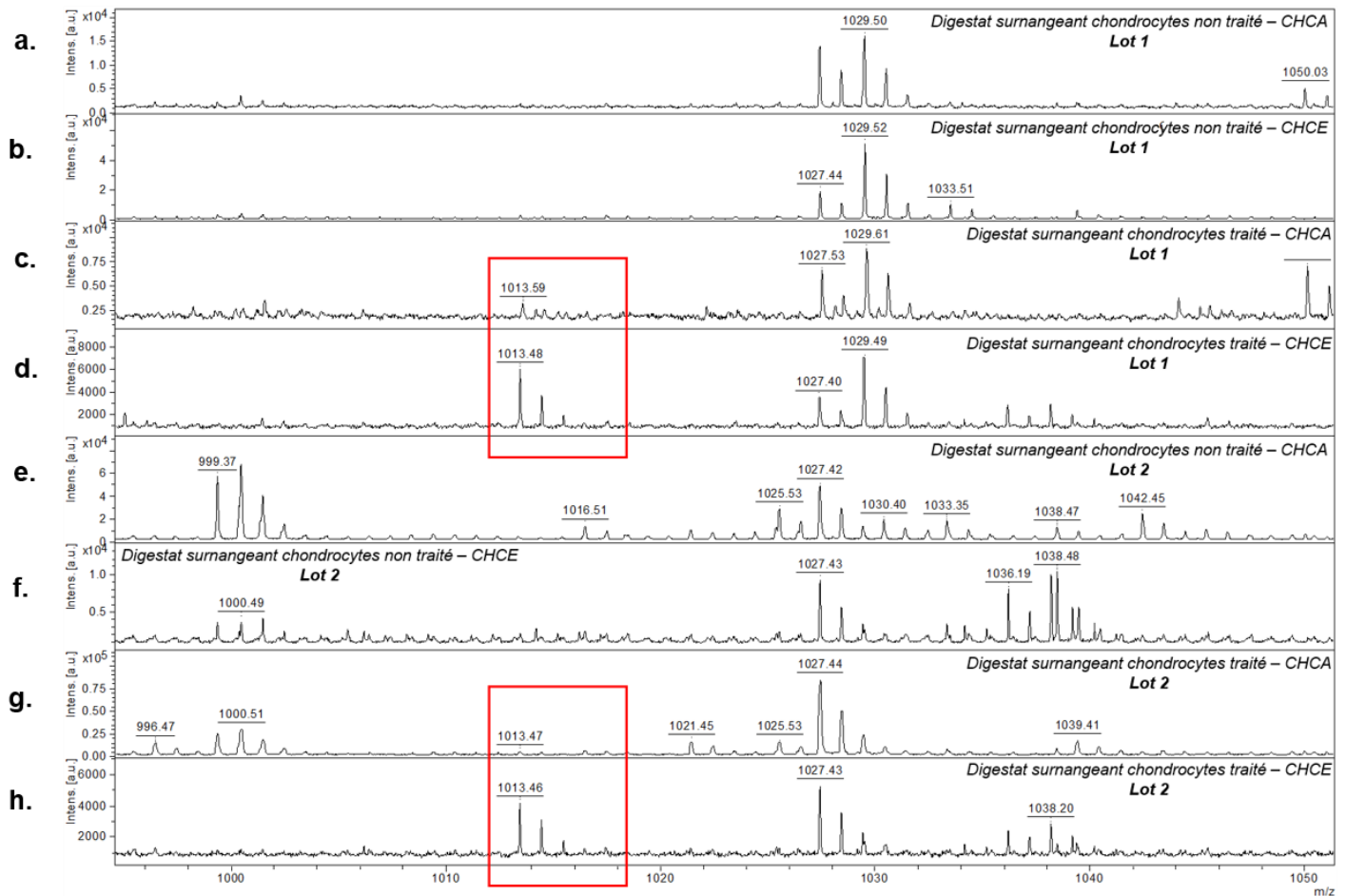


**Figure 138 : Digestats, par la chymotrypsine, des différents lots de surnageants de chondrocyte, traités (spectres c, d, g et h) et non traités (spectres a, b, e et f) aux interleukines, non marqués, dans les matrices CHCA (spectres a, c, e et g) et CHCE (spectres b, d, f et h)**

Nous avons ainsi validé la digestion de ces milieux complexes, tout en confirmant qu'ils ne contiennent pas d'ions parasite ayant une masse similaire à notre fragment signature. Ici, il s'agit du fragment marqué (5-D) H-TSSSKGY-OH avec un m/z de 1013.45.



Par la suite, nous avons marqué ces milieux avec la sonde RXP500-Dab-NASA-CH-CHCA (Sonde 15), sonde de référence pour le marquage de la hMMP-13. Ainsi, la sonde a été introduite directement dans les quatre échantillons de surnageant à une concentration de 300nM. Après digestion à la chymotrypsine, les échantillons ont été analysés dans la matrice CHCA 10mg/mL et dans CHCE 0.1 mg/mL. La figure 139 présente les spectres associés aux échantillons pour lesquels nous avons observé le marquage.



**Figure 139 : Digestats des surnageants de chondrocytes marqués, traités (spectres c,d, g et h) et non traités (spectres a, b, e et f) aux interleukines, par la sonde 15 (fragment associé  $m/z = 1013.45$ ), dans les matrices CHCA (spectres a, c, e et g) et CHCE (spectres b, d, f et h)**

Le fragment signature 5-D ( $m/z = 1013.45$ ) est très aisément détecté dans les deux lots chondrocytes traités à l'interleukine-4. Le fragment ne se détecte pas dans les échantillons non traités, ce qui est en totale cohérence avec les résultats attendus, l'inflammation induite par les interleukines devant engendrer une surexpression ou tout du moins l'activation de la hMMP-13.

Nous pouvons noter l'observation d'un signal très faible dans CHCA correspondant à la détection du fragment signature, cependant, la qualité du signal (S/N) ne permettrait pas de conclure. En revanche, la détection du fragment signature est bien meilleure dans la matrice CHCE et ne laisse aucune ambiguïté quant à la présence du fragment d'intérêt, gage de la présence de hMMP-13 active dans le milieu. Ces résultats présentent donc le premier marquage, et détection en spectrométrie de masse, de métalloprotéases endogènes actives en milieu biologique complexe.

La quantification approximative des échantillons marqués, n'a à ce stade pas été concluante. Ces expériences sont à refaire.

Enfin, afin de nous assurer que les dépôts étaient homogènes (distribution du peptide au sein du dépôt) et que les conditions d'imagerie pouvaient être effectuées sur ce type de milieu, nous avons acquis des images des dépôts du digestat de Lot 1 traité, dans la matrice CHCE. Les images ont été directement acquises à partir du dépôt goutte sèche effectué sur la plaque MALDI (Fig.140)

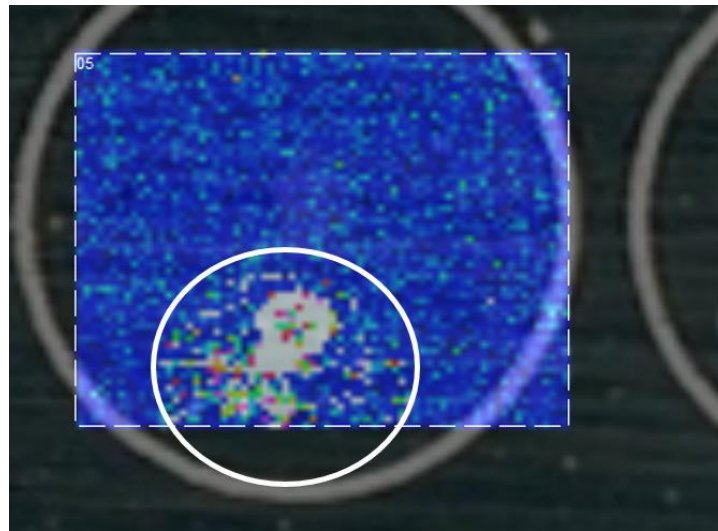


Figure 140 : Image MALDI du dépôt de digestat associé au marquage du Lot 1 de chondrocytes traités, dans la matrice CHCE

Cette étude avait pour objectif principal de promouvoir la détection et la quantification des MMPs actives en milieu biologique. Dans cette optique, nous avons caractérisé l'activité protéolytique des enzymes modèles et validé les protocoles de marquage CHCA sur les MMPs cibles. Plusieurs étapes intermédiaires nous ont permis d'optimiser les protocoles associés à la digestion enzymatique ou à la gestion des échantillons biologiques et leur caractérisation.

La dernière étape consistait à effectuer le marquage de MMPs cibles, présentes de manière endogène dans divers milieux biologiques associés aux pathologies décrites. Il a été ainsi possible de détecter de manière qualitative la présence de hMMP-13 active dans des surnageants de chondrocytes traités à l'interleukine-4, provoquant une inflammation et donc l'activation de la hMMP-13.

## SYNTHESE

- Synthèse de 26 fragments peptidiques, non marqués, marqués CHCA et CHCA D<sub>4</sub>, associés au marquage des MMPs cibles – Synthèse validée par MS/MS

## CARACTERISATION

- Détermination des conditions d'analyse MALDI optimales pour chacun des fragments
- Détermination de la LOD de chacun des fragments signatures sur différent supports
  - Plaque MALDI SmallAnchor™ Brüker®
  - Lames ITO
  - Coupes de poumons
- Détermination de la LOD de chacun des fragments signatures dans un milieu biologique complexe de référence
- Validation de la détection en multiplexing de 4 fragments signatures jusqu'à 10<sup>-12</sup>M
- Détermination de la LOQ de chacun des fragments signatures – Mise en place de protocoles de quantification approximative et précise
- Validation des conditions d'analyse MALDI discriminantes associées à l'ionisation sélective des analytes marqués CHCA
- Optimisation des protocoles d'imageries :
  - Enrobage des organes dans la carboxyméthylcellulose
  - 15 couches de matrice
  - Vaporisation de la matrice selon un débit croissant : 10-15-20-25 µL/min
  - Hauteur de buse fixée à Z=15mm
  - Résolution spatiale de 50 µm

Fragment marqué	LOD Plaque MALDI	LOD Lame ITO	LOD Coupe poumons	LOD Imagerie	LOD Milieux complexes	LOQ
4-D	10 <sup>-12</sup> M	x	x	x	x	10 <sup>-11</sup> M
3-B	10 <sup>-12</sup> M	x	x	x	x	10 <sup>-8</sup> M
2-D	10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-11</sup> M	x	10 <sup>-7</sup> M	x	10 <sup>-11</sup> M
1-B	10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-11</sup> M	x	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-11</sup> M
1-D	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-11</sup> M	10 <sup>-11</sup> M
5-D	10 <sup>-12</sup> M	x	x	x	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-19</sup> M
7-D	10 <sup>-12</sup> M	x	x	x	10 <sup>-12</sup> M	10 <sup>-10</sup> M
6-D	10 <sup>-12</sup> M	x	x	x	x	10 <sup>-10</sup> M

### **DETECTION DES MMPs ENDOGENES ET EXOGENES**

- Caractérisation de l'activité protéolytique de la mMMP-12 par fluorimétrie, en tampon biologique et en milieu complexe
- Validation de la digestion des milieux complexes de référence non marqués – Détermination des ions caractéristiques associés à la digestion
- Validation du protocole de digestion de la mMMP-12, catalytique et entière, et de la hMMP-13 entière – Détermination des ions caractéristiques associés à la digestion
- Obtention des pourcentages de recouvrement de séquences associés à la digestion de la mMMP-12, catalytique et entière, et de la hMMP-13
- Validation du marquage de la mMMP-12, catalytique et entière, en tampon biologique et en milieu biologique complexe
- Validation des protocoles de quantification approximative sur le marquage de la mMMP-12, catalytique et entière, en tampon biologique et en milieu biologique complexe
- **Marquage et détection de hMMP-13 endogène en milieu biologique complexe de référence**

## **PARTIE C : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



Ces travaux de thèse avaient pour objectif final la détection, la quantification et l'imagerie, lorsque cela était possible, par spectrométrie de masse MALDI, de métalloprotéases matricielles actives endogènes, en milieux biologiques complexes.

Dans ce contexte, une stratégie de marquage innovante, compatible avec le travail *in-vivo*, a été développée, basée sur l'utilisation de sondes ABP induisant le transfert dirigé et covalent d'un marqueur de détection. Au total, 23 sondes, dont la structure a été optimisée, ont été challengées pour le marquage sélectif de 10 MMPs différentes, dans la poche  $S_3$  et dans la poche  $S_3'$ . Par ailleurs, 5 cibles d'intérêt ont été déterminées au regard de leur surexpression et de leur importance dans le cadre du développement de certaines pathologies, dont les pathologies pulmonaires inflammatoires ou celles liées à l'arthrite. La validation du marquage sur ces MMPs cibles a abouti à l'identification des fragments signatures et du site de marquage au sein de la poche catalytique des enzymes cibles.

En parallèle, des conditions discriminantes d'analyse MALDI ont été mises au point afin de promouvoir la détection et la quantification spécifique des composés marqués. Ces conditions reposent sur le transfert d'un marqueur dérivé de l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) sur l'enzyme, et sur l'utilisation de la matrice  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamate de méthyle (CHCE). En combinant ces deux aspects, cette stratégie offre une sensibilité très importante en termes de détection et de quantification.

Après la synthèse de 26 fragments peptidiques sous forme non marquée, marquée CHCA et marquée CHCA  $D_4$ , les conditions d'analyse MALDI optimales de chacun de fragments signatures, marqué et non marqué, ont été déterminées. Celles-ci nous ont permis de déterminer la limite de détection et de quantification de ces différents fragments signatures, par MALDI-MS, sur différents supports d'analyse, en tampon biologique et en milieux biologiques complexes de référence. Par la suite, la mise en place et l'optimisation de protocoles d'imagerie MALDI dédiés à la détection des fragments signatures sur coupes de tissus biologiques a ouvert la voie de la localisation par imagerie MALDI de MMPs endogènes au sein de coupes de tissus d'intérêt.

Par la suite, une fois l'activité protéolytique de nos MMPs cibles caractérisée, nous avons validé, après optimisation, les protocoles de marquage et de digestion de ces enzymes (mMMP-12 et hMMP-13), en tampon biologique et en milieux complexes. Ces milieux complexes de référence ont été préalablement caractérisés afin de déterminer leur signature en spectrométrie de masse et ainsi apprécier et valider chaque étape du processus de marquage et de détection des MMPs.

Enfin, l'aboutissement de ce projet est modélisé par le marquage et la détection de hMMP-13 active endogène en milieu biologique complexe. Ces résultats représentent, à ce jour, le premier marquage, et détection par spectrométrie de masse, de métalloprotéases endogènes actives en milieu biologique complexe.

Ce marquage de MMPs endogènes en milieu biologique complexe représente à ce jour, une des plus grandes perspectives de ce projet. En effet, de nombreuses caractérisations primaires concernant la hMMP-13, notamment le marquage ou la digestion de l'enzyme isolée, ne sont pas encore optimales et leur optimisation pourrait offrir de meilleures opportunités de détection ou de quantification de cette MMP endogène, dans son milieu biologique de référence. De plus, une diversification des échantillons biologiques

disponibles nous permettrait une meilleure caractérisation et une meilleure compréhension du lien entre surexpression de la MMP-13 et développement pathologique.

Dans ce contexte, il serait intéressant d'explorer, plus en détail, une autre cible : La hMMP-3. En effet, cette métalloprotéase est un des premiers marqueurs à être surexprimés à la genèse du processus pathologique, et elle est, entre autres, responsable de l'activation de la hMMP-13 dans le cas des pathologies arthritiques. Dans une dynamique de diagnostic précoce, la hMMP-3 pourrait ainsi s'avérer être un indicateur clé du stade et de l'évolution de la maladie.

En parallèle, malgré la validation de stratégies de quantification approximative, en milieux biologiques complexes, il faut encore développer et optimiser la méthodologie, en ayant pour but la validation de la quantification précise, sur enzymes endogènes, en milieux complexes.

Enfin, le dernier grand axe de développement de ce projet est la composante imagerie MALDI. En effet, l'optimisation des protocoles de détection des fragments marqués est à ce jour terminée ((i) enrobage des tissus, (ii) nombre de couches de matrice, (iii) gradient de vaporisation, (iv) hauteur de buse de spray) cependant, nous n'avons travaillé que sur dépôt externe de fragments digérés. Il faut maintenant se tourner vers le dépôt d'enzymes entières isolées, marquées CHCA dans un premier temps, afin de mettre en place les protocoles de digestion sur tissus. Par la suite, le dépôt d'enzymes entières isolées, non marquées, permettra l'adaptation de notre stratégie au marquage sur tissus. Une fois ces étapes validées, notre stratégie pourra alors être challengée sur le marquage et la détection par imagerie MALDI de métalloprotéases endogènes au sein d'une coupe de tissu.



## **PARTIE D : PARTIE EXPERIMENTALE**



## I. Appareillage

### a. Spectromètres de masse

#### 1. Spectromètre MALDI

Les analyses ont été exclusivement effectuées, en MS, sur le spectromètre de masse MALDI Brüker® Rapiflex™. Il est équipé d'un laser pulsé Smartbeam 3D™ Nd : YAG ayant une longueur d'onde de 355nm.

<b>Marque</b>	Brüker
<b>Nom</b>	Rapiflex
<b>Polarité</b>	Positive
<b>Délai d'extraction</b>	160 ns
<b>Source</b>	19.84 kV
<b>Rélectron 1</b>	20.817 kV
<b>Rélectron 2</b>	0.906 kV
<b>Rélectron 3</b>	8.859 kV
<b>Lentille</b>	11.51 kV
<b>Gain du détecteur</b>	2073 V
<b>Déflexion</b>	Variable
<b>Fréquence du laser</b>	10 kHz
<b>Nombre de points/tir laser</b>	1000 (MS) – 200 (Imagerie)
<b>Sample rate</b>	5 GS/s (MS) ou 0.63 GS/s (Imagerie)
<b>Focus laser</b>	100% (Range) – 76% (Position)
<b>Puissance laser</b>	Variable
<b>Logiciel contrôle</b>	FlexControl
<b>Logiciel de traitement</b>	FlexAnalysis
<b>Gamme de masse</b>	600-3200 Da
<b>Analog Offset</b>	70 mV
<b>Global attenuator offset</b>	4%

#### 2. Spectromètre ESI

Le contrôle des peptides synthétisés a été effectué par analyse MS/MS sur le spectromètre de masse SynaptG2-S (Waters), équipé d'une source ESI Z-Spray. L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés via le logiciel MassLynx 4.2.

<b>Marque</b>	Waters
<b>Nom</b>	SynaptG2-S
<b>Analyseur</b>	QTOF
<b>Gamme de masse</b>	50-1500 Da
<b>Logiciel de contrôle et de traitement</b>	MassLynx 4.2
<b>Polarité</b>	Positive
<b>Potentiel du spray</b>	2.4 kV
<b>Température de la source</b>	100 °C
<b>Température du capillaire</b>	150 °C
<b>Pression nébuliseur</b>	6 bars
<b>Énergie de collision</b>	Variable

## **b. Appareillage chromatographique**

### **1.HPLC Préparative**

Les composés à purifier sont préalablement solubilisés dans 20mL d'un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50v 0.1% TFA. La solution est par la suite injectée dans l'HPLC préparative Gilson PLC 2250 composée d'un système chromatographique, fonctionnant sur pompes, et d'un détecteur UV 4-Wavelength Diode Array Detector, fonctionnant entre 200 et 400 nm. La récolte des fractions est automatique et effectuée selon un seuil d'absorbance fixé, l'absorbance étant mesurée à 214 et à 254 nm.

<b>Phase mobile</b>	
<b>Éluant</b>	A : H <sub>2</sub> O 0.1% Acide formique – B : ACN 0.1 % Acide formique
<b>Gradient</b>	Variable en fonction de l'échantillon à purifier
<b>Débit</b>	50 mL/min
<b>Pression</b>	4 bars
<b>Phase stationnaire</b>	
<b>Colonne</b>	Water DeltaPack C <sub>18</sub>
<b>Dimensions</b>	100 x 400 mm
<b>Taille des pores</b>	15 µm

### **2. HPLC-MS**

Le contrôle des molécules synthétisées a été effectué sur le spectromètre de masse ZQ (Merck). Il est équipé d'une source ESI de type triple quadrupôle permettant la détection des analytes sur une gamme de masse 200-1600 Da. Le spectromètre est couplé à un système de chromatographie HPLC Alliance 2695 (Waters) et à un détecteur UV-Visible de type photomultiplicateur. L'acquisition et le traitement des données sont effectués sur le logiciel MassLynx 4.0.

<b>Phase mobile</b>	
<b>Éluant</b>	A : H <sub>2</sub> O 0.1% Acide formique – B : ACN 0.1 % Acide formique
<b>Gradient</b>	Linéaire, de 0 à 100 % d'ACN en 2.5 minutes
<b>Débit</b>	3 mL/min
<b>Phase stationnaire</b>	
<b>Colonne</b>	Chromolith Speed Rod C18
<b>Dimensions</b>	25 x 4.6 mm
<b>Taille des pores</b>	2 µm
<b>Spectromètre de masse</b>	
<b>Source</b>	ESI
<b>Analyseur</b>	Triple quadrupôle
<b>Polarité</b>	Positive
<b>Mode de balayage</b>	MS Scan – Balayage par intervalle de 1 seconde
<b>Gamme de masse</b>	200-1600 Da
<b>Débit</b>	100 µL/min
<b>Tension de cône</b>	20 V

<b>Tension de capillaire</b>	3 kV
<b>Température de la source</b>	100 °C
<b>Température de désolvatation</b>	200 °C
<b>Pression nébuliseur</b>	6.5 bars
<b>Détecteur UV</b>	
<b>Longueur d'onde</b>	214 nm

### 3. UPLC-MS

Les composés obtenus ont été analysés sur le spectromètre de masse SQD2 (Waters), sur lequel la pureté des composés de synthèse a été contrôlée. Il est équipé d'une source ESI de type quadrupôle, permettant la détection des analytes sur une gamme de masse 200-1600 Da. Le spectromètre est couplé à un système chromatographique Acquity H-ClassPlus (Waters) et à un détecteur UV-Visible PDA eλ Detector (Waters). L'acquisition et le traitement des données sont effectués sur le logiciel MassLynx 4.0.

<b>Phase mobile</b>	
<b>Éluant</b>	A : H <sub>2</sub> O 0.1% Acide formique – B : ACN 0.1 % Acide formique
<b>Gradient</b>	Linéaire, de 0 à 100 % d'ACN en 5 minutes
<b>Débit</b>	0.8 mL/min
<b>Phase stationnaire</b>	
<b>Colonne</b>	Acquity UPLC Peptide HSS T3
<b>Dimensions</b>	2.0 x 50 mm
<b>Taille des pores</b>	1.8 µm
<b>Spectromètre de masse</b>	
<b>Source</b>	ESI
<b>Analyseur</b>	Quadrupôle
<b>Polarité</b>	Positive
<b>Mode de balayage</b>	MS Scan – Balayage par intervalle de 0.3 secondes
<b>Gamme de masse</b>	100-1500 Da
<b>Débit</b>	0.8 mL/min
<b>Tension de cône</b>	50 V
<b>Tension de capillaire</b>	2.54 kV
<b>Température de la source</b>	150 °C
<b>Température de désolvatation</b>	600 °C
<b>Pression nébuliseur</b>	6.5 bars
<b>Détecteur UV</b>	
<b>Longueur d'onde</b>	214 nm

## c. Autres

### 1. Thermomixeur

<b>Marque</b>	Eppendorf
<b>Nom</b>	Thermomixeur Comfort
<b>Alimentation</b>	100-240 V – 60Hz
<b>Puissance</b>	90 W

### 2. Plateforme de synthèse peptidique

Toutes les synthèses de fragments peptidiques ont été réalisées par FSPPS, sur plateforme de synthèse. Les molécules JMV 7790 et 7468 ont également été synthétisées sur plateforme de synthèse FSPPS.

<b>Marque</b>	VWR
<b>Nom</b>	Agitateur pour microplaques
<b>Vitesse</b>	100-900 rpm
<b>Capacité maximum</b>	2.3 kg
<b>Minuterie</b>	1 s – 9999 minutes
<b>Référence</b>	444-0270

### 3. Nébuliseur

Le nébuliseur SunCollect™, de la marque Sunchrom® a été utilisé pour vaporiser la matrice sur les coupes de tissus murins afin de procéder aux analyses d'imagerie MALDI. L'appareil a été utilisé selon les caractéristiques suivantes :

<b>Marque</b>	SunChrom
<b>Type</b>	MALDI Spotter
<b>Logiciel</b>	SunCollect 1.7.43
<b>Part N°</b>	458-210-100
<b>N° de série</b>	SC1312.006.106
<b>Alimentation</b>	24V DC – 1.2 A – 20 W
<b>Mode de déplacement</b>	En serpent
<b>Nombre de couches déposées</b>	15
<b>Débits utilisés</b>	10 µL/min (1 <sup>ère</sup> couche) – 15 µL/min (2 <sup>ème</sup> couche) - 20µL/min (3 <sup>ème</sup> couche) - 25µL/min (4 <sup>ème</sup> couche et plus)

### 4. Lyophilisateur

<b>Marque</b>	Buchi
<b>Nom</b>	L300
<b>Température</b>	-104.4 °C
<b>Pression</b>	0.048 bars

## **5. Spectrophotomètre UV-Visible**

Le contrôle de la charge de la résine 2-Chlorotriptyle, après chargement du premier acide aminé, a été effectuée par spectrométrie UV-Visible.

<b>Marque</b>	Agilent
<b>Nom</b>	Cary 60 Uv-Vis G6860 A
<b>N° de série</b>	MY17360002
<b>Longueur d'onde</b>	301 nm

## **6. Fluorimètre**

Les mesures d'activité enzymatique des MMPs ont été assurées par mesure de fluorescence sur le fluorimètre Xénius™, de la marque SAFAS.

<b>Marque</b>	SAFAS
<b>Nom</b>	Xénius
<b>Longueur d'onde d'excitation</b>	320 nm
<b>Longueur d'onde d'émission</b>	405 nm
<b>PEM</b>	705
<b>Fréquence de balayage</b>	Balayage par intervalle de 30 secondes

## **II. Protocoles MALDI**

### **a. Préparation des matrices**

#### **1. Solution de CHCA 10mg/mL 0.1% TFA**

Une masse de 10 mg de CHCA est introduite dans un eppendorf de 1.5 mL puis mise en solution dans 1 mL de solvant 0.1% TFA. La solution est agitée pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex, puis centrifugée à 13500 rpm pendant 3 minutes. La masse de matrice à peser est adaptée en fonction du volume de solution finale requis.

#### **2. Solution de CHCE 1mg/mL 0.1% TFA**

Une masse de 1mg de CHCE est introduite dans un eppendorf de 1.5 mL puis mise en solution dans 1 mL de solvant 0.1% TFA. La solution est agitée pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex, puis centrifugée à 13500 rpm pendant 3 minutes. La masse de matrice à peser est adaptée en fonction du volume de solution finale requis.

#### **3. Solution de CHCE 0.1mg/mL 0.1% TFA**

Un volume de 10 µL de la solution de CHCE 1 mg/mL est prélevé, à l'aide d'une micropipette, puis dilué par 90 µL de solvant 0.1% TFA. Le solvant de dilution doit être identique au solvant utilisé pour la préparation de la solution de CHCE 1mg/mL. La solution est ensuite agitée pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex.

#### **4. Solution de CHCA 10mg/mL 0.4% TFA**

Une masse de 10 mg de CHCA est introduite dans un eppendorf de 1.5 mL puis mise en solution dans 1 mL de solvant 0.4% TFA. La solution est agitée pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex, puis centrifugée à 13500 rpm pendant 3 minutes. La masse de matrice à peser est adaptée en fonction du volume de solution finale requis.

#### **5. Solution de CHCE 1mg/mL 0.4% TFA**

Une masse de 1mg de CHCE est introduite dans un eppendorf de 1.5 mL puis mise en solution dans 1 mL de solvant 0.4% TFA. La solution est agitée pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex, puis centrifugée à 13500 rpm pendant 3 minutes. La masse de matrice à peser est adaptée en fonction du volume de solution finale requis.

#### **6. Solution de CHCE 0.1mg/mL 0.4% TFA**

Un volume de 10 µL de la solution de CHCE 1 mg/mL est prélevé, à l'aide d'une micropipette, puis dilué par 90 µL de solvant 0.1% TFA. Le solvant de dilution doit être identique au solvant utilisé pour la préparation de la solution de CHCE 1mg/mL. La solution est ensuite agitée pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex.

### **b. Protocoles de dépôt**

#### **1. Dépôt sur plaque MALDI**

Les dépôts ont été faits sur plaque MALDI Brüker<sup>®</sup> SmallAnchor<sup>™</sup> 400µm, à l'aide d'une micropipette. Pour les dépôts dans MeOH et dans l'acétone, il s'agit de dépôts couche mince : 0.6 µL de matrice sont déposés, dans premier temps sur la plaque MALDI, puis 0.6 µL de la solution d'analyte sont déposés après séchage de la matrice.

Pour les dépôts dans ACN et dans le mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50, il s'agit de dépôt goutte sèche : 0.6 µL de matrice sont déposés sur la plaque MALDI, puis 0.6 µL de solution d'analyte avant séchage de la matrice.

Les dépôts impliquant l'utilisation de milieux biologiques complexes ont été fait exclusivement dans des solutions de matrices à 0.4% TFA. Le reste des dépôts a été fait dans des solutions de matrices à 0.1% TFA.

Dans les deux cas, les dépôts ont été analysés après séchage complet, sur le spectromètre MALDI Brüker<sup>®</sup> Rapiflex<sup>™</sup>, en mode réflectron positif.

#### **2. Dépôt sur plaque ITO**

Les dépôts ont été faits sur plaque ITO Laserbiolabs<sup>®</sup>, à l'aide d'une micropipette. Ce sont des dépôts goutte sèche inversé : 0.6 µL de solution d'analyte ont été déposés, puis 0.6 µL de solution de matrice, avant séchage du dépôt précédent. Les dépôts ont été analysés après séchage complet, sur le spectromètre MALDI Brüker<sup>®</sup> Rapiflex<sup>™</sup>, en mode réflectron positif.



### **3. Dépôt sur coupes de tissus**

Les dépôts ont été faits directement sur coupes de tissus (poumons ou aortes murines), à l'aide d'une micropipette. Dans le cas de la détermination de la LOD des différents fragments, il s'agit de dépôts goutte sèche inversée : 0.4  $\mu\text{L}$  d'une solution d'analyte ont été déposés, puis 0.4  $\mu\text{L}$  de solution de matrice avant séchage du dépôt précédent.

Dans le cas de l'étude de l'enrobage des organes avant découpe, il s'agit de dépôts prémix. Une solution 1/1v a été préparée en mélangeant 5  $\mu\text{L}$  de la solution d'analyte et 5  $\mu\text{L}$  de la solution de matrice, 0.6  $\mu\text{L}$  de cette solution équivolumique sont ensuite déposés sur la coupe de tissu.

Dans les deux cas, les dépôts ont été analysés après séchage complet, sur le spectromètre MALDI Brüker<sup>®</sup> Rapiflex<sup>™</sup>, en mode réflectron positif.

### **4. Quantification**

Les dépôts ont été faits sur plaque MALDI Brüker<sup>®</sup> SmallAnchor<sup>™</sup> 400 $\mu\text{m}$ , à l'aide d'une micropipette. Quelle que soit la matrice utilisée, 0.6  $\mu\text{L}$  d'une solution de matrice sont déposés sur la plaque. Après séchage de ce premier dépôt, un dépôt goutte sèche est réalisé avec 0.6  $\mu\text{L}$  de solution d'analyte et 0.6  $\mu\text{L}$  de solution de standard interne..

Les dépôts sont analysés après séchage complet, sur le spectromètre MALDI Brüker<sup>®</sup> Rapiflex<sup>™</sup>, en mode réflectron positif.

### **5. Imagerie**

Les dépôts ont été faits directement sur les coupes de tissus murins (poumons ou aortes). 0.6  $\mu\text{L}$  d'analyte ont été déposés dans tous les cas, quel que soit le tissu, lors des phases d'optimisation des protocoles d'imagerie et dans le cas de la détermination de la LOD des fragments peptidiques.

Par la suite, après séchage du dépôt, 15 couches de matrice ont été vaporisées, avec une hauteur de buse de  $Z = 15 \text{ mm}$ , à l'aide du nébuliseur SunCollect<sup>™</sup> Sunchrom<sup>®</sup>. Ce dépôt a été effectué via un mode de déplacement « en serpent », selon un gradient de débit croissant :

- 1<sup>ère</sup> couche : 10  $\mu\text{L}/\text{min}$
- 2<sup>ème</sup> couche : 15  $\mu\text{L}/\text{min}$
- 3<sup>ème</sup> couche : 20  $\mu\text{L}/\text{min}$
- 4<sup>ème</sup> couche et plus : 25  $\mu\text{L}/\text{min}$

Les dépôts ont été analysés sur le spectromètre MALDI Brüker<sup>®</sup> Rapiflex<sup>™</sup>, en mode réflectron positif, avec une résolution spatiale de 50  $\mu\text{m}$ .

### **c. Calibration**

Un mélange de peptides ayant une masse molaire comprise entre 700 et 3000 Da est utilisé pour la calibration externe des spectres de masse MALDI. Ce mélange est appelé « Peptide Calib Standard Mono » et il est composé de dix peptides :

- La Bradykinine : 757.39916 Da
- L'angiotensine II : 1046.54180
- L'angiotensine I : 1296.68480
- La Substance P : 1347.73540
- La Bombésine : 1619.82230
- La rénine : 1758.93261
- L'ACTH (1-28) : 2093.08620
- L'ACTH (18-39) : 2465.19830
- La somatostatine : 3147.47100

Une solution dans ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.1% TFA est utilisée pour la réalisation d'un dépôt goutte sèche composé de 0.6 µL de calibrant et de 0.6 µL de solution de matrice CHCA 10mg/mL dans ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.1% TFA.

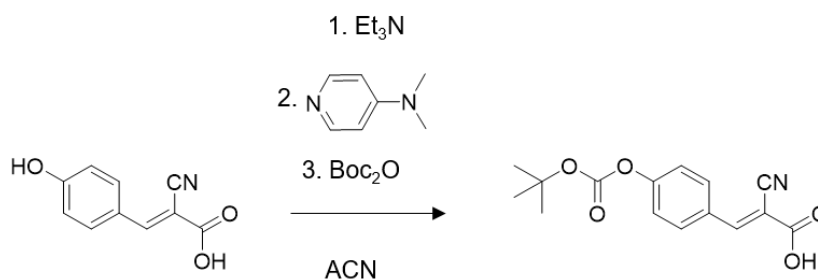
### **d. Protocole de délipidation des coupes de tissus**

La lame ITO, contenant les coupes de tissus de travail, est successivement immergée, pendant 20 secondes, dans trois bains d'EtOH selon un gradient de concentration croissant : 70%, 90% et 100% d'EtOH. La lame est, par la suite, séchée 10 minutes au dessiccateur.

### III. Protocoles de synthèse

#### a. Synthèse des marqueurs CHCA

##### 1. Synthèse du Boc-CHCA : Molécule A



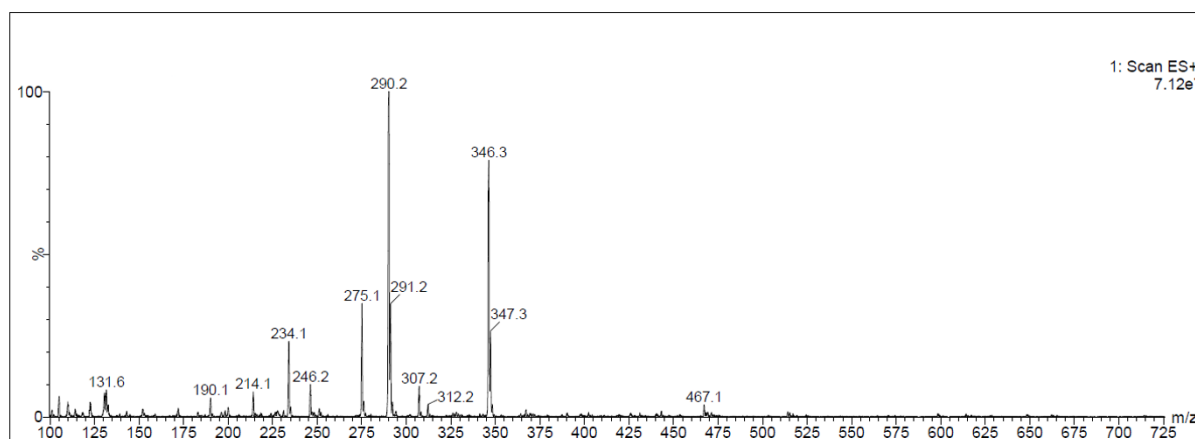
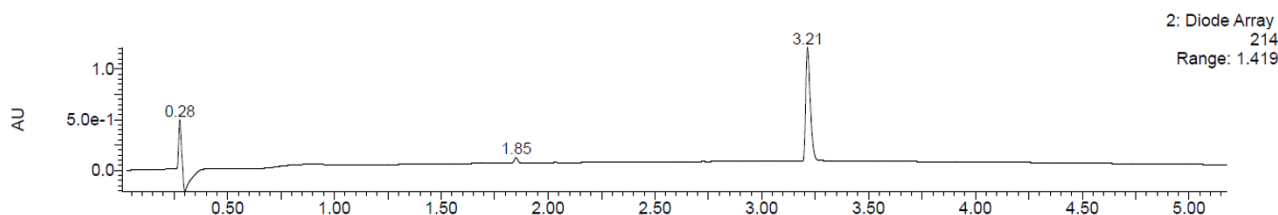
Le CHCA (5 g, 26.4 mmol, 1eq) et la TEA (7.68 mL, 52.8 mmol, 2eq) sont dissous dans 15 mL d'ACN et mis sous agitation. La DMAP (645 mg, 5.28 mmol, 0.2eq), puis le Boc<sub>2</sub>O (6.93 g, 31.8 mmol, 1.2q) sont ajoutés au mélange. Ce dernier provoque un dégagement de CO<sub>2</sub> et la décoloration du milieu réactionnel. Après 2h30, l'avancement est vérifié par HPLC-MS et 15 mL d'H<sub>2</sub>O sont ajoutés. Le mélange subit une extraction au DCM (15 mL). Après acidification par une solution de KHSO<sub>4</sub> 1M et contrôle du pH qui doit être acide, la phase organique est séparée et la phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 25 mL). Les fractions organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO<sub>4</sub>.

Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite jusqu'à obtention d'un solide marron foncé. Celui-ci est repris dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.1% TFA et purifié sur HPLC préparative. Les fractions de purification sont rassemblées et lyophilisées jusqu'à obtention d'une poudre orange.

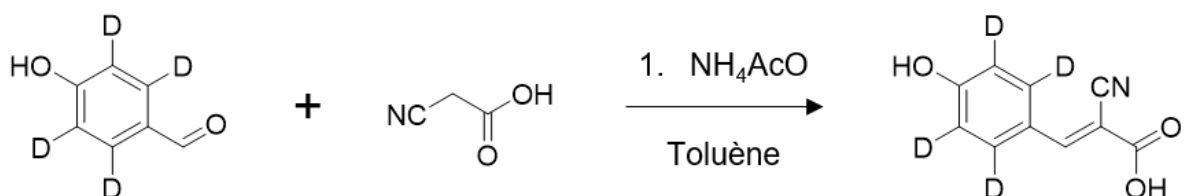
**Rendement : 75%**

**UPLC-UV : 3.21 min**

**ESI-MS : [M+H]<sup>+</sup> à 290.2**



## 2. Synthèse du CHCA d<sub>4</sub> : Molécule B

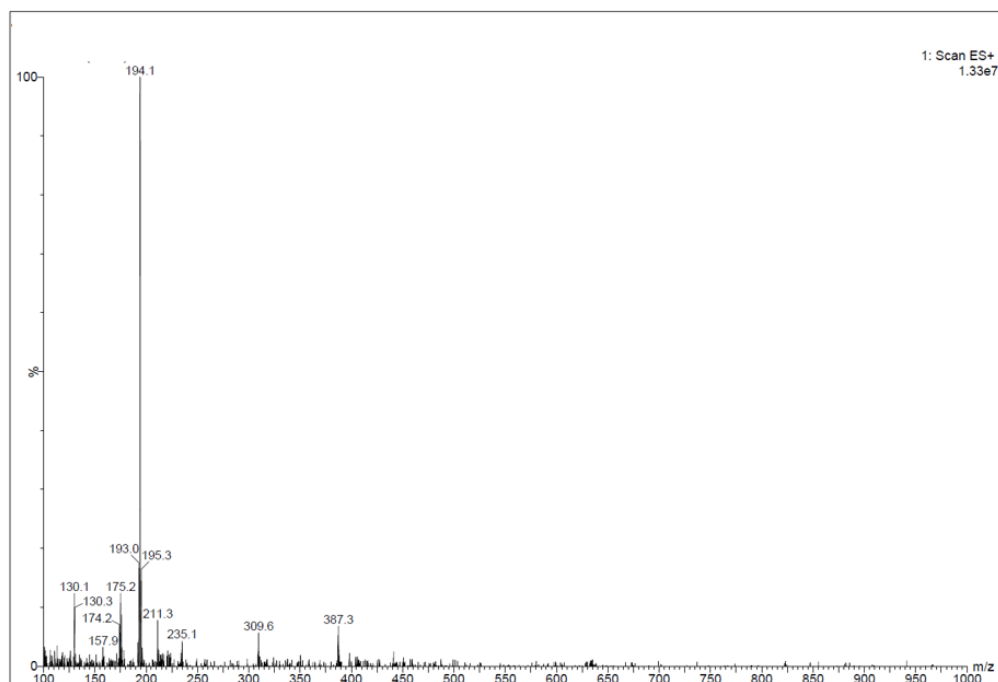
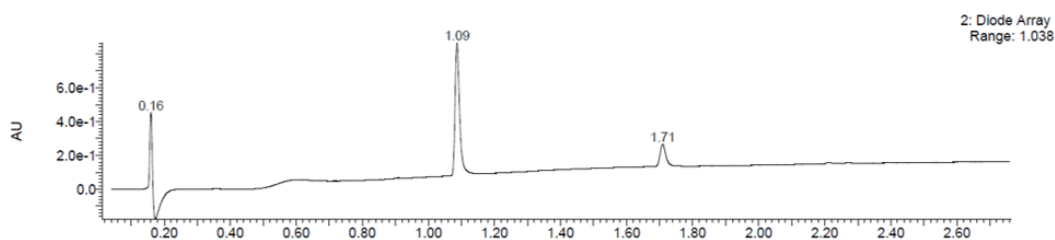


Le 4-hydroxybenzaldéhyde-2, 3, 5, 6-D<sub>4</sub> (65 mg, 0.52mmol, 1eq) est introduit dans un tube scellé avant dissolution dans 10 mL de toluène. L'acide cyanoacétique (56 mg, 0.67 mmol, 1.3eq) et l'acétate d'ammonium (40 mg, 0.52 mmol, 1eq) sont ajoutés au mélange. La réaction est agitée pendant 4h à 120°C. L'avancement est vérifié par HPLC-MS après 4h. Le mélange est filtré sur fritté et lavé avec H<sub>2</sub>O. Le produit obtenu est repris dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.1% TFA et lyophilisé jusqu'à obtention d'une poudre jaune clair.

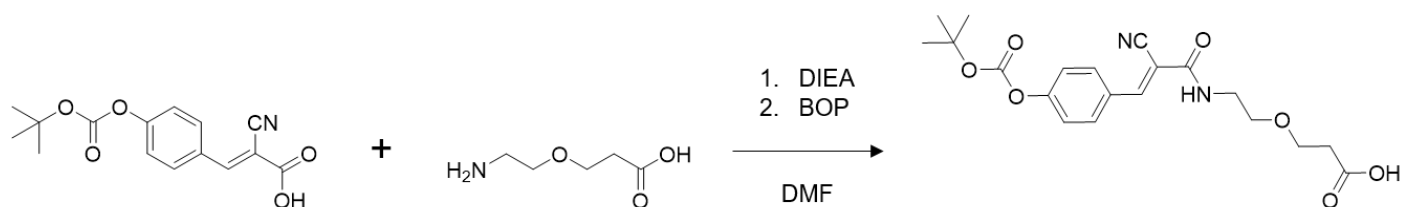
**Rendement : 46%**

**HPLC-UV : 1.09 min**

**ESI-MS : [M+H]<sup>+</sup> à 194.1**



### 3. JMV6747 : Molécule C

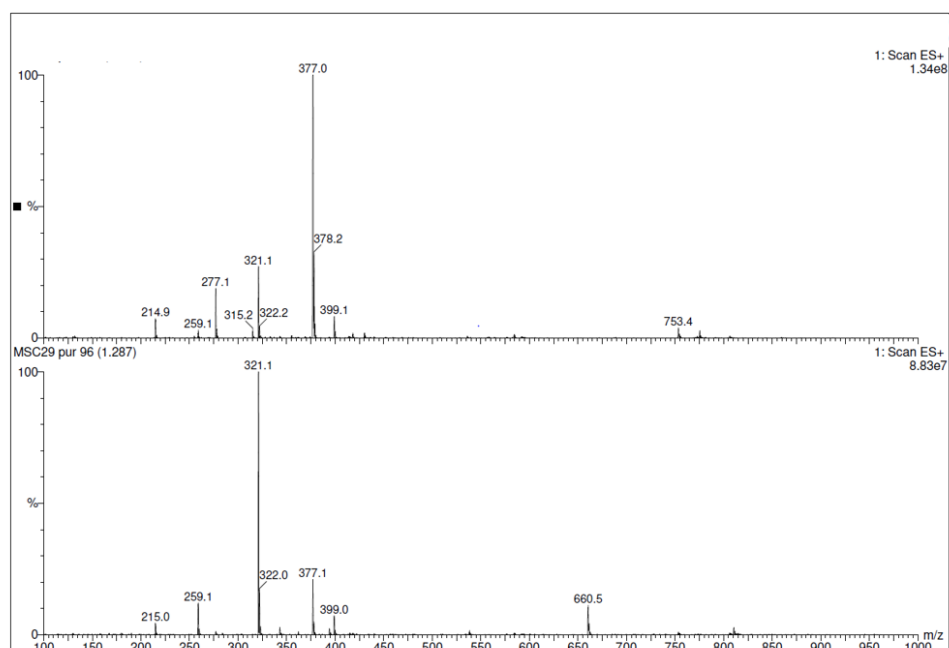
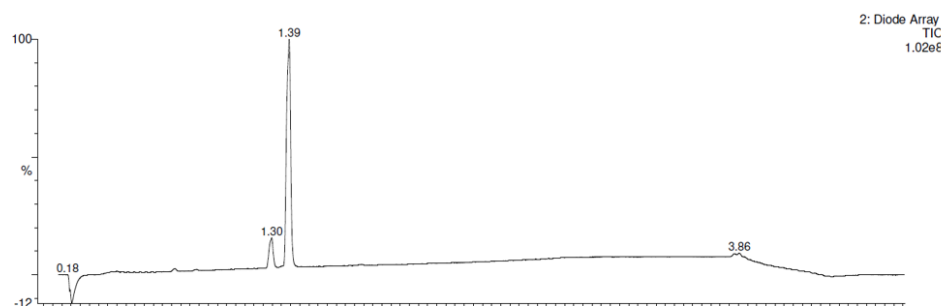


Le Boc-CHCA (300 mg, 1.04 mmol, 1eq) est dissout dans 3 mL de DMF et mis sous agitation. L' aminoéthoxyéthanol (105  $\mu$ L, 1.04mmol, 1eq), la DIEA (360  $\mu$ L, 2.08 mmol, 2eq) et le BOP (464 mg, 1.04 mmol, 1eq) sont ajoutés au mélange dans cet ordre. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 15 min, la complétion de la réaction est vérifiée par HPLC-MS. 20 mL d' $H_2O$  sont ajoutés et le mélange subit une extraction au DCM. Après acidification par une solution de  $KHSO_4$  1M et contrôle du pH qui doit être acide, la phase organique est séparée et la phase aqueuse est extraite au DCM (3 x 25 mL). Le mélange subit un lavage à NaCl et la phase aqueuse est extraite au DCM. Les fractions organiques sont rassemblées et séchées sur  $MgSO_4$ . Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite jusqu'à obtention d'un solide blanc.

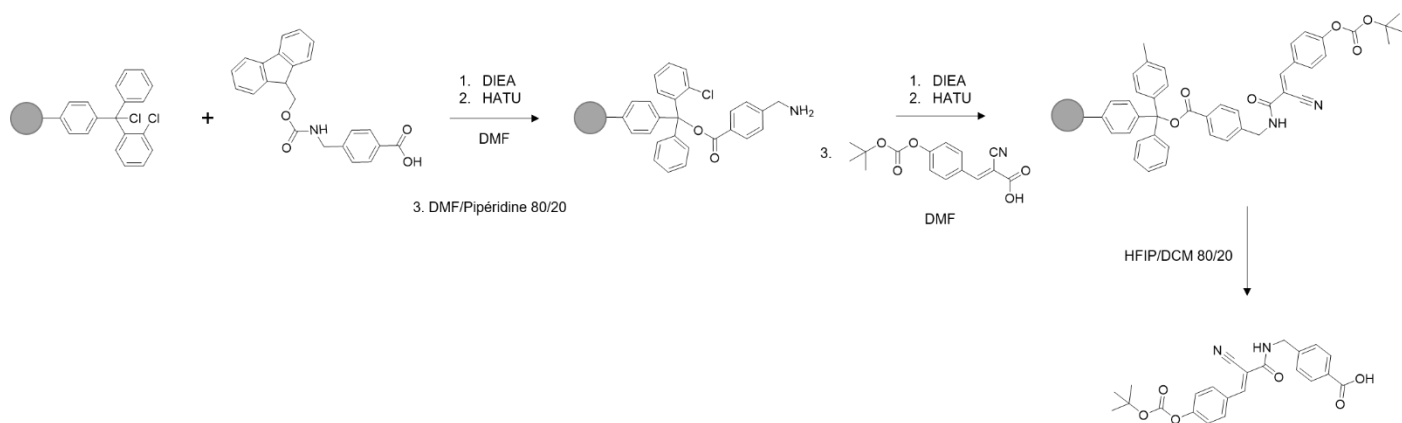
Rendement : 71%

HPLC-UV : 1.3 min et 1.38 min

ESI-MS :  $[M+H]^+$  à 377.0 et 377.1



#### 4. JMV 7790 : Molécule D



Une solution contenant 2 mL de DCM, 836  $\mu$ L de DIEA (4.8 mmol, 6eq), 4.8 mL d'acide 4-(Fmoc-aminométhyl)benzoïque à 0.5M dans le DMF (1.6 mmol, 3eq) est ajouté sur 500 mg de résine 2-Chlorotrityle. Le mélange est agité overnight. 2 mL de MeOH sont ajoutés au mélange réactionnel, laissé sous agitation pendant 30 min.

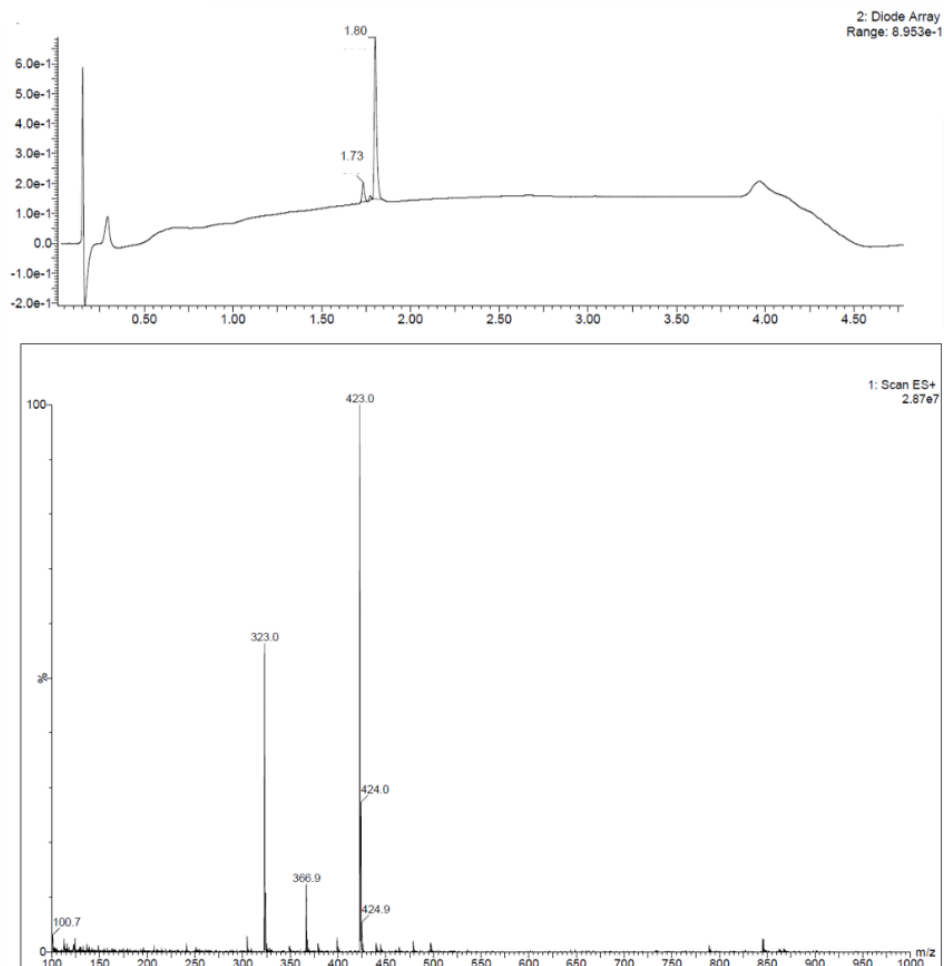
Après filtration sur fritté, le mélange est rincé au DMF puis au DCM, à répéter 3 fois. 1 mL d'un mélange DMF/Pipéridine 80/20 sont ajoutés avant d'agiter le mélange pendant 1min, à répéter 2 fois. Le Boc-CHCA (1.15 g, 2.67 mmol, 5eq), la DIEA (1.39 mL, 5.34 mmol, 10eq) et l'HATU (1.02 g, 2.67 mmol, 5eq) sont ajoutés au mélange dans 8 mL de DMF. Le mélange est agité 30 min à température ambiante. La résine est filtrée sur fritté, puis lavée 3 fois au DMF et 3 fois au DCM. La résine est séchée avec Et<sub>2</sub>O.

La résine est mise en suspension dans un mélange 20% HFIP/DCM et laissée sous agitation 30 min à température ambiante. Après filtration sur fritté et rinçage de la résine au DCM, le filtrat est concentré sous pression réduite puis repris dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.1% TFA. Le produit est purifié sur HPLC préparative puis lyophilisé jusqu'à obtention d'une poudre blanche.

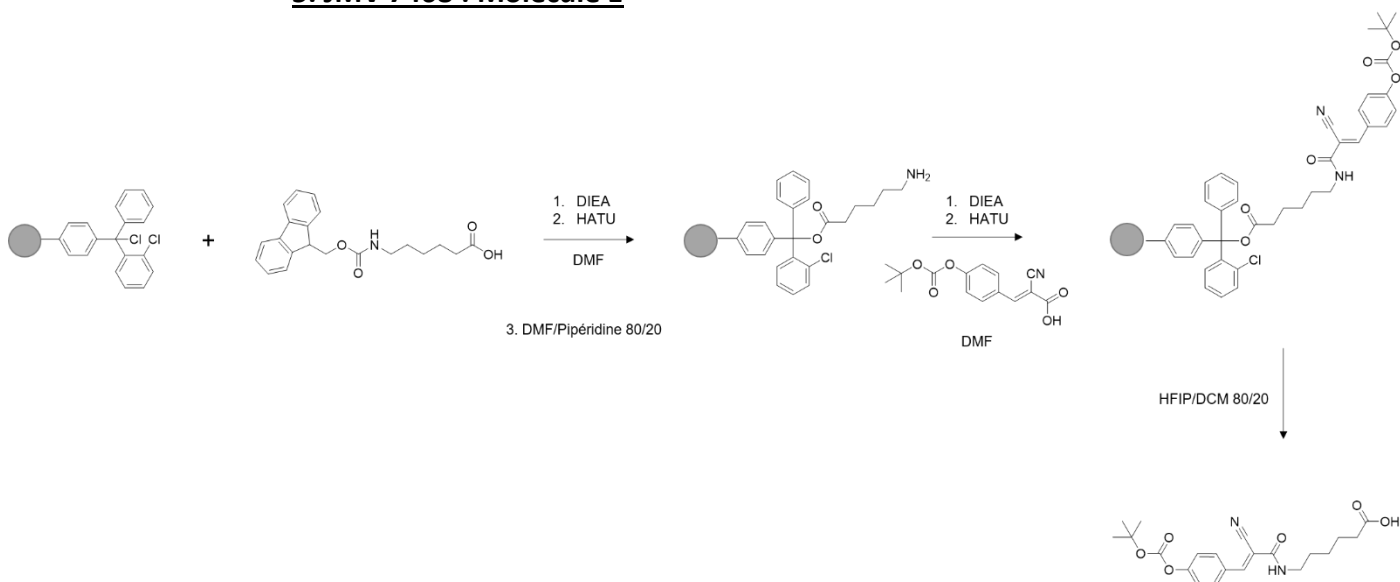
Rendement : 30%

HPLC-UV : 1.80 min

ESI-MS : [M+H]<sup>+</sup> à 423.0



### 5. JMV 7468 : Molécule E



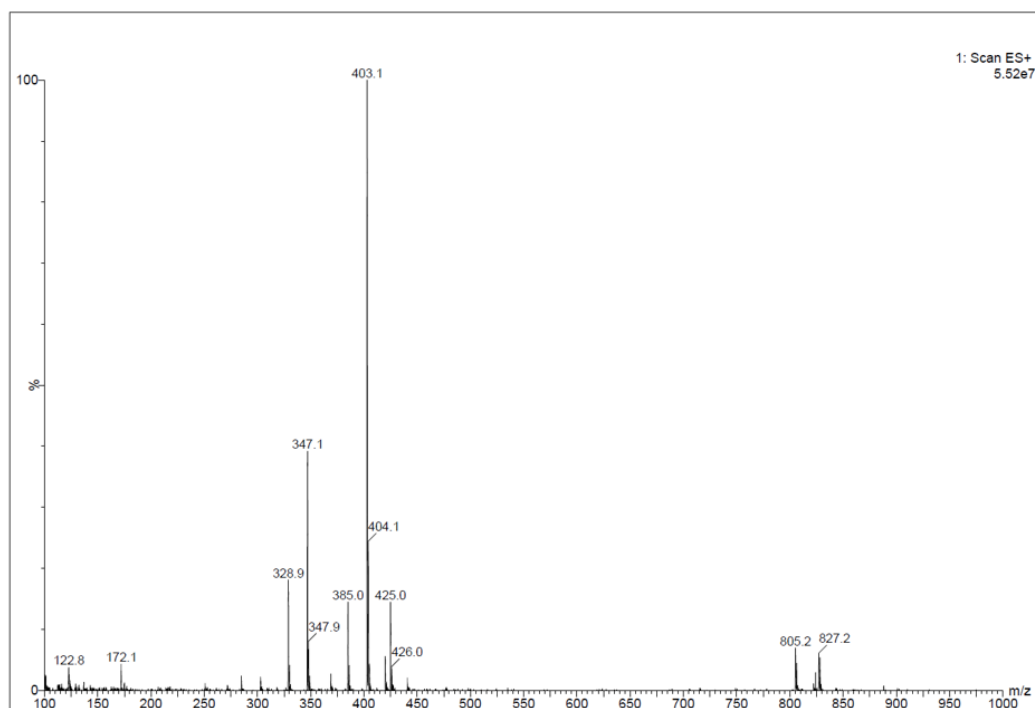
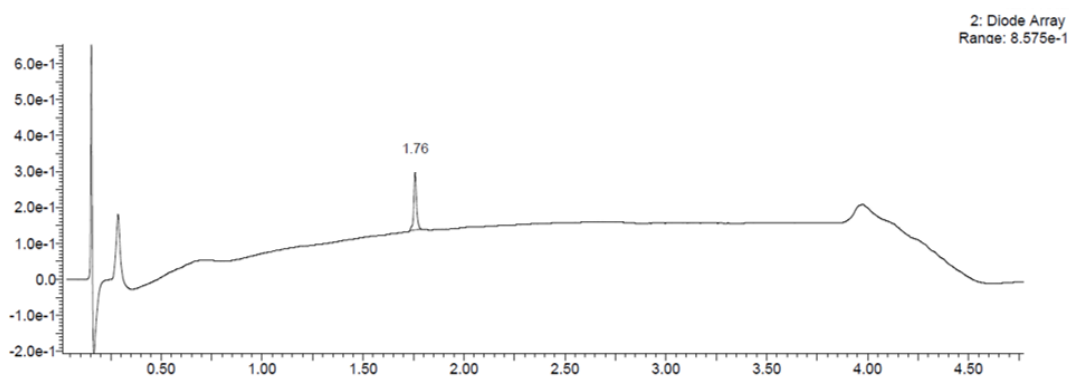
Une solution contenant 2 mL de DCM, 836  $\mu$ L de DIEA (4.8 mmol, 6eq), 4.8 mL d'acide Fmoc- $\epsilon$ -aminohexanoïque à 0.5M dans le DMF (1.6 mmol, 3eq) est ajouté sur 500 mg de résine 2-Chlorotrityle. Le mélange est agité overnight. 2 mL de MeOH sont ajoutés au mélange réactionnel, laissé sous agitation pendant 30 min. Après filtration sur fritté, le mélange est rincé au DMF puis au DCM, à répéter 3 fois. 1 mL d'un mélange DMF/Pipéridine 80/20 sont ajoutés avant d'agiter le mélange pendant 1min, à répéter 2 fois.

Le Boc-CHCA (713 mg, 2.47 mmol, 5eq), la DIEA (860  $\mu$ L, 4.93 mmol, 10eq) et l'HATU (937 mg, 2.47 mmol, 5eq) sont ajoutés au mélange dans 8 mL de DMF. Le mélange est agité 30 min à température ambiante. La résine est filtrée sur fritté, puis lavée 3 fois au DMF et 3 fois au DCM. La résine est séchée avec Et<sub>2</sub>O. La résine est mise en suspension dans un mélange 20% HFIP/DCM et laissée sous agitation 30 min à température ambiante. Après filtration sur fritté et rinçage de la résine au DCM, le filtrat est concentré sous pression réduite puis repris dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.1% TFA. Le produit est purifié sur HPLC préparative puis lyophilisé jusqu'à obtention d'une poudre blanche.

Rendement : 26%

HPLC-UV : 1.76 min

ESI-MS : [M+H]<sup>+</sup> à 403.1





## **b. Synthèse des fragments peptidiques**

Tous les fragments peptidiques ont été synthétisés sur plateforme de synthèse FSPPS, dans des seringues de 25mL munies d'un fritté. Toutes les synthèses ont été faites en utilisant des solutions d'HATU et d'acides aminés à 0.5M dans le DMSO.

La résine Wang utilisée est une résine préchargée Fmoc-Arg(Pbf)-Wang Resin, de numéro CAS 47362, ayant une charge initiale de 0.64mmol/g. La résine a été directement utilisée en considérant cette charge.

La résine 2-Chlorotrityle utilisée est une résine polystyrène 2-Chlorotrotyl Chloride Resin, de numéro CAS 42074-68-0, ayant une charge initiale de 1.6mmol/g. La charge de la résine a systématiquement été vérifiée après insertion du premier acide aminé.

Toutes les synthèses ont été faites sur 250 mg de résine, quelle que soit la résine utilisée, en suivant le sens de synthèse de l'acide aminé N-terminal vers l'acide aminé C-terminal.

<b>Composé utilisé</b>	<b>Numéro</b>	<b>Masse</b>	<b>Volume de DMSO</b>
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	1	9.720 g	30 mL
Fmoc-Val-OH	2	5.085 g	
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	3	6.885 g	
Fmoc-His(Trt)-OH	4	9.285g	
Fmoc-Ile-OH	5	5.295 g	
Fmoc-Trp(Boc)-OH	6	7.890 g	
Boc-Trp-OH	7	6.067 g	
Fmoc-Lys(Boc)-OH	8	7.020	
Boc-Lys(Fmoc)-OH	9	7.028 g	
Fmoc-Lys(Alloc)-OH	10	6.788 g	
Fmoc-Leu-OH	11	5.295	
Fmoc-Ser(tBu)-OH	12	5.745 g	
Boc-Ser(tBu)-OH	13	3.920 g	
Fmoc-Gly-OH	14	4.455 g	
Fmoc-Asp(tBu)-OH	15	6.165 g	
Boc-Asp(tBu)-OH	16	4.34 g	
Fmoc-Met-OH	17	5.565 g	
Fmoc-Thr(tBu)-OH	18	5.955 g	
Boc-Thr(tBu)-OH	19	4.130 g	
Fmoc-Pro-OH	20	5.055 g	
HATU	x	38 g	200 mL

### **1. Protocole général de la synthèse peptidique sur phase solide**

La résine est introduite dans une seringue munie d'un fritté. 10 mL de DCM sont ajoutés afin de faire gonfler la résine, puis la seringue est agitée, à 500 rpm pendant 10 minutes. L'ensemble de la résine doit être mis en suspension lors de l'agitation, il ne doit pas y avoir de dépôt au fond de la seringue.

Après filtration, le premier acide aminé subit une déprotection Fmoc, puis, après 3 lavages au DMF et un lavage au DCM, le couplage du second acide aminé. Ce couplage est suivi de 3 lavages au DMF et d'un lavage au DCM. S'en suit ainsi un cycle de déprotections Fmoc et de couplages jusqu'à élongation complète du peptide. Une fois l'élongation terminée, la résine est lavée au DMF puis séchée au DCM et à Et<sub>2</sub>O avant de cliver le peptide.

## **2. Déprotection Fmoc**

La résine est mise en suspension dans 5 mL d'une solution DMF/Pipéridine 80/20. La seringue est agitée pendant 1 minute à 500 rpm. Après filtration, la résine est de nouveau mise en suspension dans 5 mL d'une solution DMF/Pipéridine 80/20, puis agitée pendant 1 minute à 500 rpm. Le solvant est filtré et la résine est rincée 3 fois au DMF et une fois au DCM.

## **3. Couplage des acides aminés**

Après déprotection Fmoc de l'acide aminé précédent, sont ajoutés sur la résine, dans cet ordre, 5 équivalents d'acide aminé à coupler, 10 équivalents de DIEA et 5 équivalents d'HATU. Le mélange est agité pendant 5 minutes à 500 rpm. Après filtration, la résine est lavée une fois au DMF et une fois au DCM. Enfin, sont de nouveau ajoutés sur la résine, 5 équivalents du même acide aminé, 10 équivalents de DIEA et 5 équivalents d'HATU, avant d'agiter la solution à 500 rpm pendant 5 minutes. Après filtration, la résine est rincée 3 fois au DMF et une fois au DCM.

## **3. Déprotection Alloc**

La résine est mise en suspension dans 5 mL de DCM, auxquels sont ajoutés 0.4 équivalents de Palladium-tétrakis(triphénylphosphine) et 40 équivalents de phénylsilane. Le mélange est agité pendant 30 min à 500 rpm. La réaction de déprotection doit provoquer une coloration noire de la solution et de la résine. Après filtration, la résine est lavée au DMF, puis au DCM, lavages que l'on répète 3 fois. Ce protocole doit être répété 2 fois pour que la déprotection soit efficace.

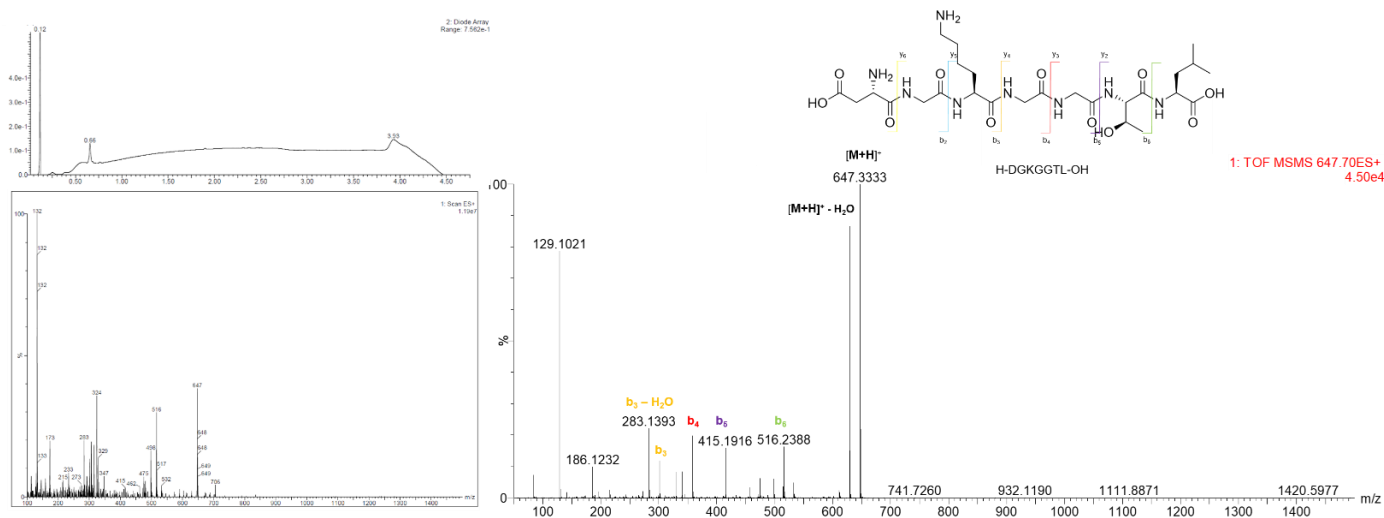
## **4. Clivage de la résine – Déprotection Boc – Déprotection tBu**

La résine est mise en suspension dans un mélange TFA/TIS/H<sub>2</sub>O 95/2.5/2.5 et mise sous agitation à température ambiante. Après 30 minutes d'agitation, la résine est filtrée sur fritté, puis lavée au DCM. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Après précipitation dans Et<sub>2</sub>O, la solution est centrifugée 5 min à 4°C à 2000 rpm. Le surnageant est retiré et le culot est repris dans 20 mL d'un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.1% TFA avant d'être purifié sur HPLC préparative. Les fractions de purification sont rassemblées et lyophilisées jusqu'à obtention d'une poudre blanche.

## 5. Synthèse des peptides non marqués

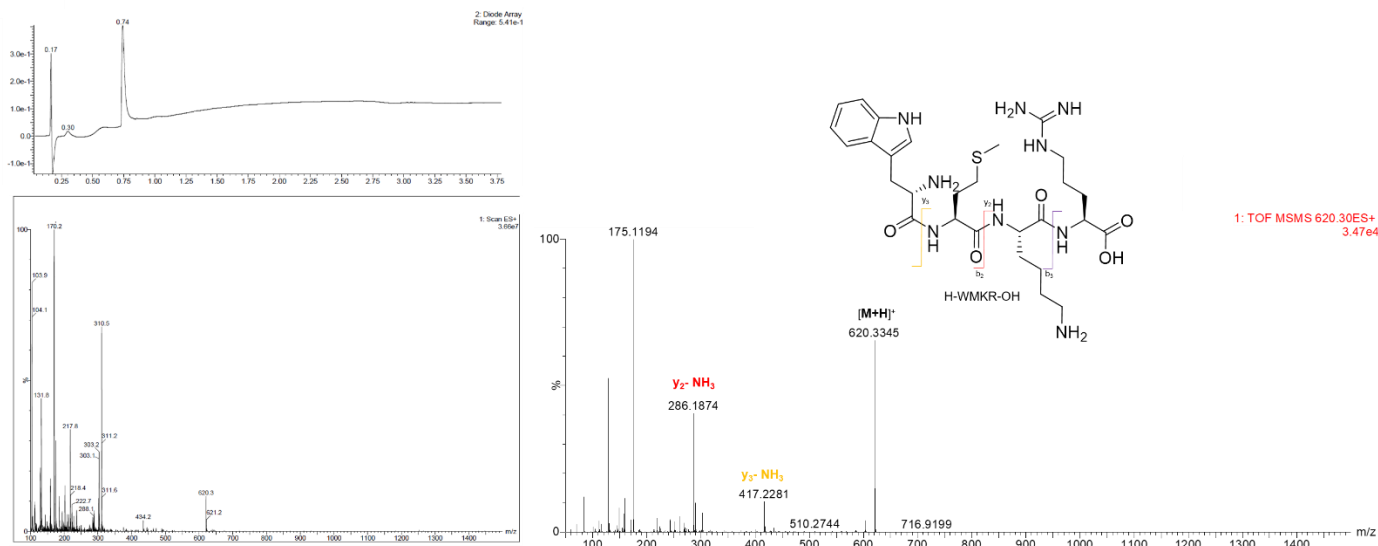
### Composé 1-A

Séquence	H-DGKGGTL-OH
Résine utilisée	2-Chlorotrityle
Acides aminés utilisés	11-18-14-8-15
Rendement	52 %
HPLC-UV	0.66 minutes
ESI-MS – $[M+H]^+$	647



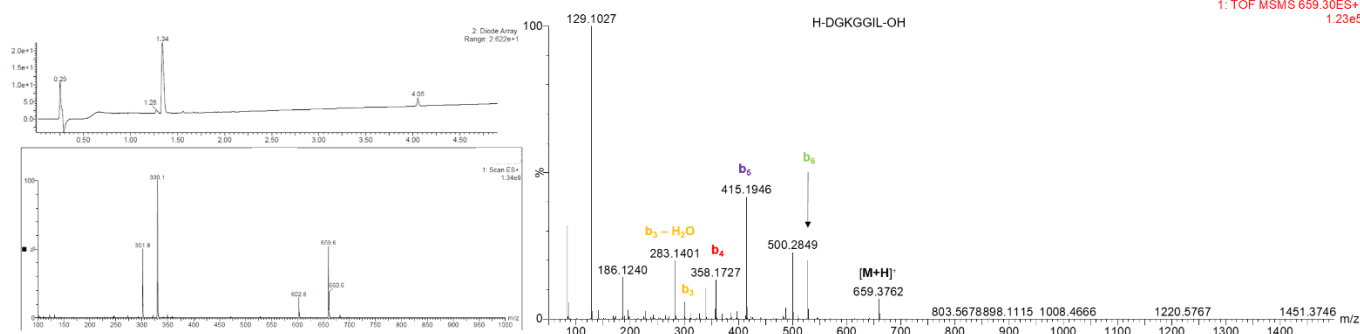
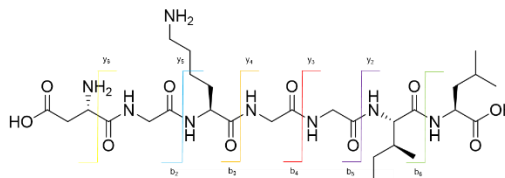
### Composé 2-A

Séquence	H-WMKR-OH
Résine utilisée	Wang
Acides aminés utilisés	8-17-6
Rendement	47 %
HPLC-UV	0.74 minutes
ESI-MS – $[M+H]^+$	620.3



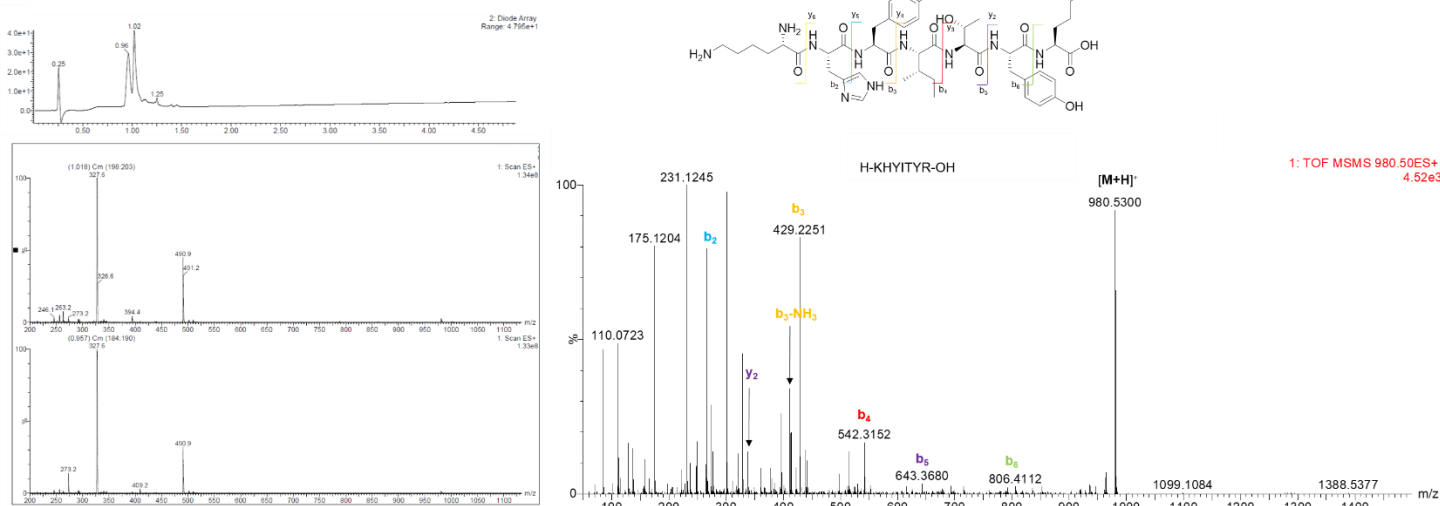
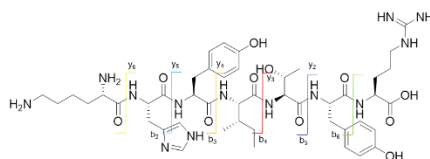
### Composé 3-A

Séquence	H-DGKGGIL-OH
Résine utilisée	2-Chlorotrityle
Acides aminés utilisés	11-5-14-8-15
Rendement	39 %
HPLC-UV	1.34 minutes
ESI-MS – [M+H] <sup>+</sup>	659.6



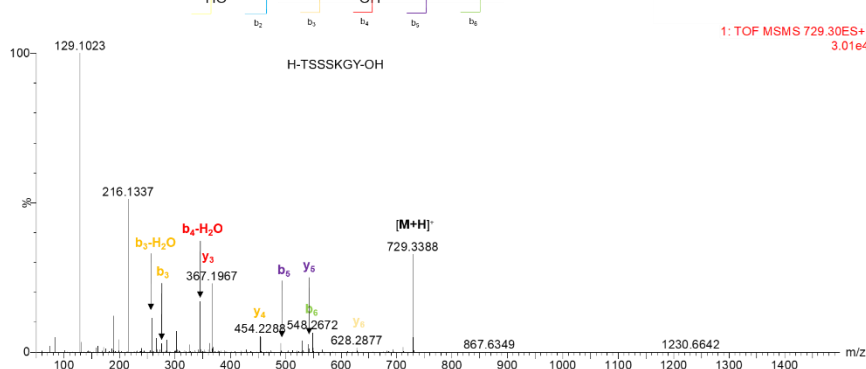
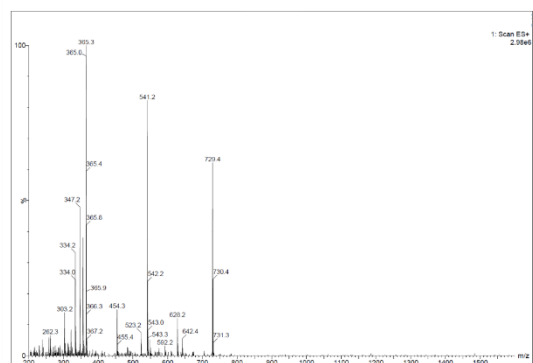
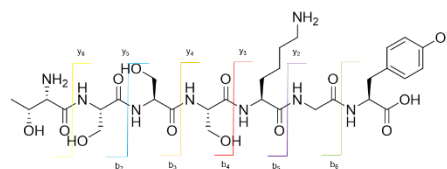
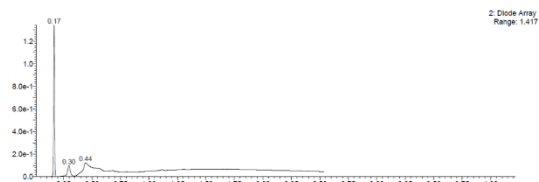
### Composé 4-A

Séquence	H-KHYITYR-OH
Résine utilisée	Wang
Acides aminés utilisés	3-18-5-4-8
Rendement	35 %
HPLC-UV	0.96 et 1.02 minutes
ESI-MS – [M+2H] <sup>2+</sup>	490.9



## Composé 5-A

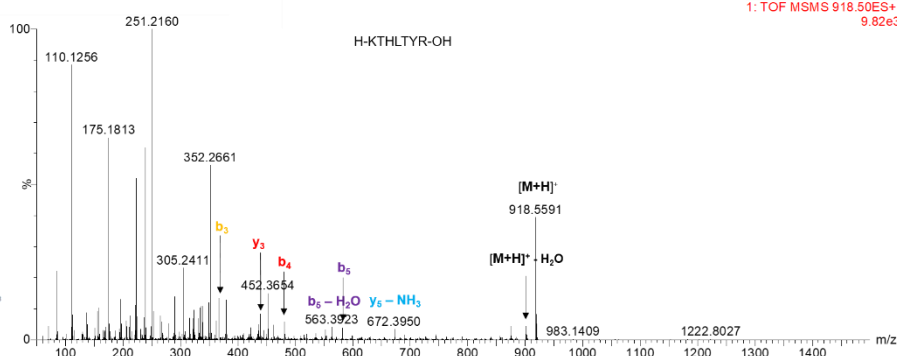
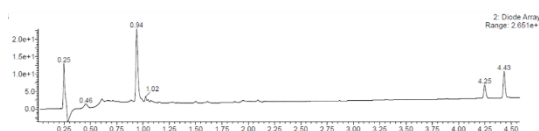
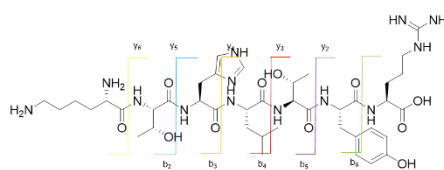
<b>Séquence</b>	H-TSSSKGY-OH
<b>Résine utilisée</b>	2-Chlorotrityle
<b>Acides aminés utilisés</b>	3-14-8-12-18
<b>Rendement</b>	42 %
<b>HPLC-UV</b>	0.44
<b>ESI-MS – [M+H]<sup>+</sup></b>	729.4



1: TOF MSMS 729.30ES+  
3.01e4

## Composé 6-A

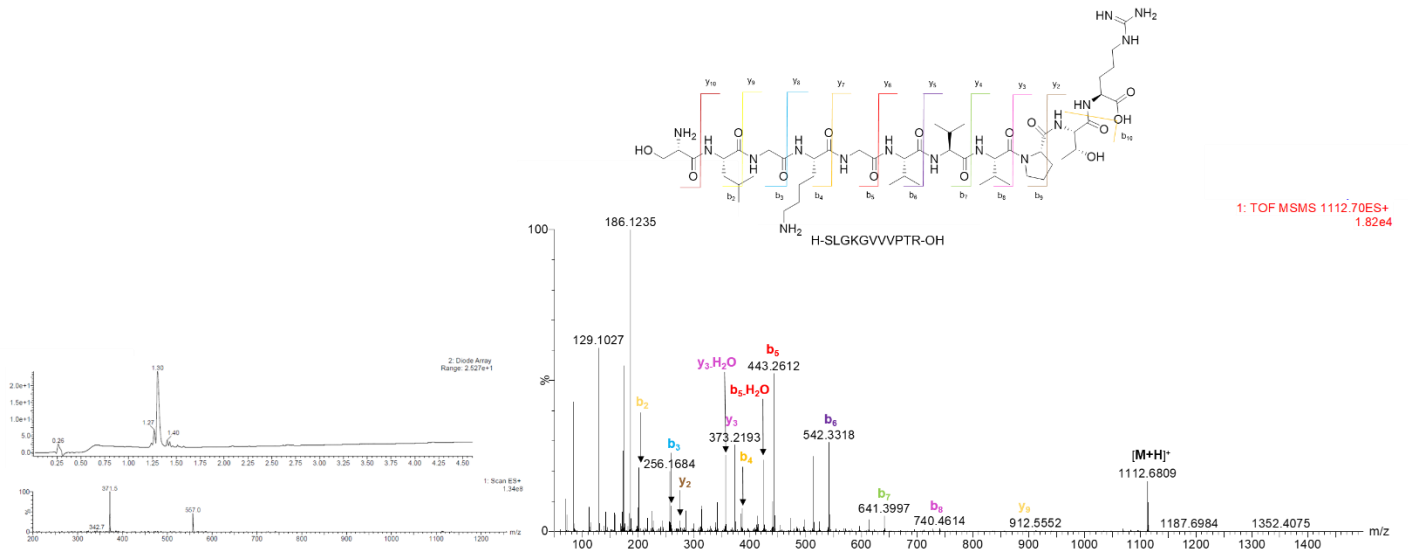
<b>Séquence</b>	H-KTHLTYR-OH
<b>Résine utilisée</b>	Wang
<b>Acides aminés utilisés</b>	3-18-11-4-8
<b>Rendement</b>	31 %
<b>HPLC-UV</b>	0.94 minutes
<b>ESI-MS – [M+2H]<sup>2+</sup></b>	459.9



1: TOF MSMS 918.50ES+  
9.82e3

## Composé 7-A

<b>Séquence</b>	H-SLGKGVVVPTR-OH
<b>Résine utilisée</b>	Wang
<b>Acides aminés utilisés</b>	18-20-2-14-8-11-12
<b>Rendement</b>	48 %
<b>HPLC-UV</b>	1.3 minutes
<b>ESI-MS – [M+2H]<sup>2+</sup></b>	557



## 6. Synthèse des peptides marqués CHCA

L'élongation et le clivage de la chaîne peptidique se font de manière identique aux fragments non marqués.

### Couplage du marqueur CHCA sur la chaîne peptidique des fragments 1-B et 3-B

Ces fragments peptidiques sont synthétisés via l'utilisation d'une lysine protégée par un groupement Alloc sur la chaîne latérale. Afin de permettre l'élongation sur la chaîne latérale de la lysine, les acides aminés en position N-terminale, utilisés pour la synthèse des fragments non marqués, ont été remplacés par des analogues présentant une protection Boc sur le N-ter au lieu d'une protection Fmoc.

Une solution à 0.5M d'acide 4-(Fmoc-aminométhyl)benzoïque est préparée dans le DMSO, cette solution sera utilisée pour l'insertion du linker sur la séquence.

Une fois l'élongation de la chaîne peptidique terminée, une déprotection Alloc est effectuée sur la lysine portant le marqueur. Par la suite, une étape de couplage est effectuée en utilisant l'acide 4-(Fmoc-aminométhyl)benzoïque comme espèce à coupler. Après la déprotection Fmoc du linker, sont ajoutés sur la résine, 5 équivalents de Boc-CHCA, préalablement mis en solution dans 3mL de DMF, 10 équivalents de DIEA et 5 équivalents d'HATU. Le mélange est agité pendant 30 minutes à 500 rpm.. Une fois la synthèse terminée, le solvant est filtré et la résine lavée 3 fois au DMF et une fois au DCM avant séchage à Et<sub>2</sub>O.

### Couplage du marqueur CHCA sur la chaîne peptidique des fragments 1-D, 2-D, 5-D et 7-D

Ces fragments peptidiques sont synthétisés via l'utilisation d'une lysine protégée par un groupement Alloc sur la chaîne latérale. Afin de permettre l'élongation sur la chaîne latérale de lysine, les acides aminés en position N-terminale, utilisés pour la synthèse des fragments non marqués, ont été remplacés par des analogues présentant une protection Boc sur le N-ter au lieu d'une protection Fmoc.

Une solution à 0.5M d'acide Fmoc-ε-aminohexanoïque est préparée dans le DMSO, cette solution sera utilisée pour l'insertion du linker sur la séquence.

Une fois l'élongation de la chaîne peptidique terminée, une déprotection Alloc est effectuée sur la lysine portant le marqueur. Par la suite, une étape de couplage est effectuée en utilisant l'acide Fmoc-ε-aminohexanoïque comme espèce à coupler. Après la déprotection Fmoc du linker, sont ajoutés sur la résine, 5 équivalents de Boc-CHCA, préalablement mis en solution dans 3mL de DMF, 10 équivalents de DIEA et 5 équivalents d'HATU. Le mélange est agité pendant 30 minutes à 500 rpm.. Une fois la synthèse terminée, le solvant est filtré et la résine lavée 3 fois au DMF et une fois au DCM avant séchage à Et<sub>2</sub>O.

### Couplage du marqueur CHCA sur la chaîne peptidique des fragments 4-D et 6-D

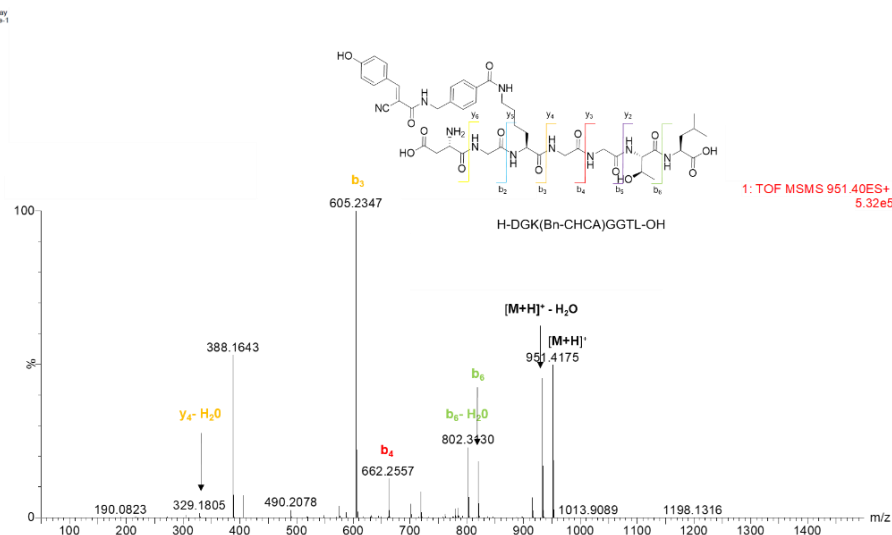
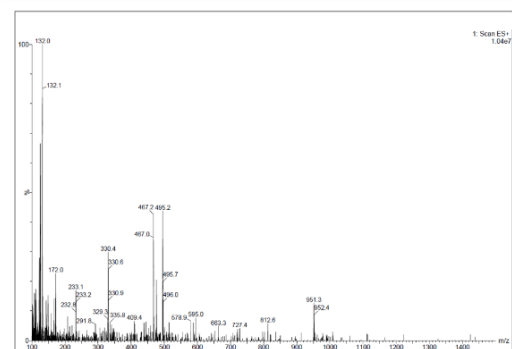
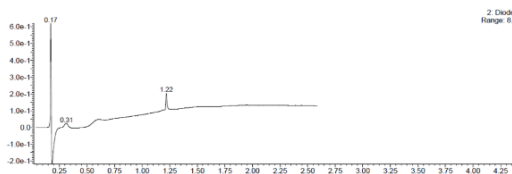
Ces fragments peptidiques sont synthétisés via l'utilisation d'une lysine protégée par un groupement Fmoc sur la chaîne latérale, et par un groupement Boc sur l'extrémité N-terminale.

Une solution à 0.5M d'acide Fmoc-ε-aminohexanoïque est préparée dans le DMSO, cette solution sera utilisée pour l'insertion du linker sur la séquence.

Une fois l'élongation de la chaîne peptidique terminée, une déprotection Fmoc est effectuée sur la lysine portant le marqueur. Par la suite, une étape de couplage est effectuée en utilisant l'acide Fmoc- $\epsilon$ -aminohexanoïque comme espèce à coupler. Après la déprotection Fmoc du linker, sont ajoutés sur la résine, 5 équivalents de Boc-CHCA, préalablement mis en solution dans 3mL de DMF, 10 équivalents de DIEA et 5 équivalents d'HATU. Le mélange est agité pendant 30 minutes à 500 rpm.. Une fois la synthèse terminée, le solvant est filtré et la résine lavée 3 fois au DMF et une fois au DCM avant séchage à Et<sub>2</sub>O.

### Composé 1-B

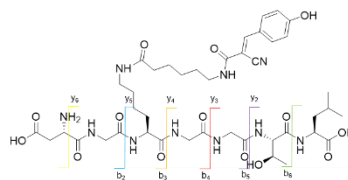
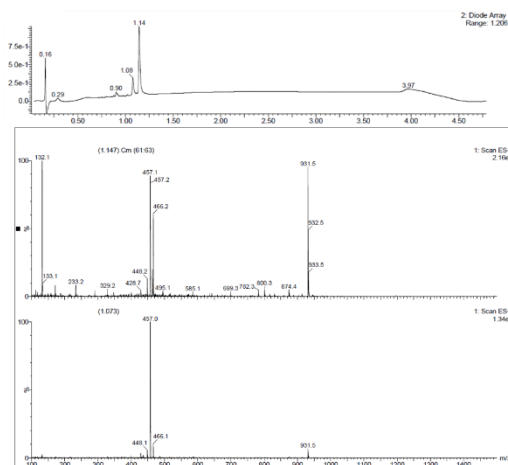
Séquence	H-DGK(Bn-CHCA)GGTL-OH
Résine utilisée	2-Chlorotrityle
Acides aminés utilisés	11-18-14-10-16
Rendement	12 %
HPLC-UV	1.22 minutes
ESI-MS – [M+H] <sup>+</sup>	951.3





## Composé 1-D

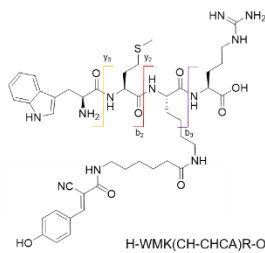
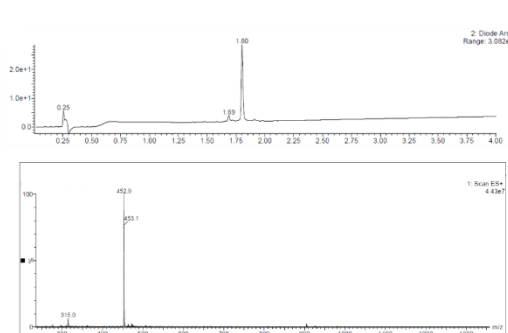
<b>Séquence</b>	H-DGK(CH-CHCA)GGTL-OH
<b>Résine utilisée</b>	2-Chlorotrityle
<b>Acides aminés utilisés</b>	11-18-14-10-16
<b>Rendement</b>	15 %
<b>HPLC-UV</b>	1.08 et 1.14 minutes
<b>ESI-MS – [M+H]<sup>+</sup></b>	931.5



1: TOF MSMS 931.40ES+  
6.54e5

## Composé 2-D

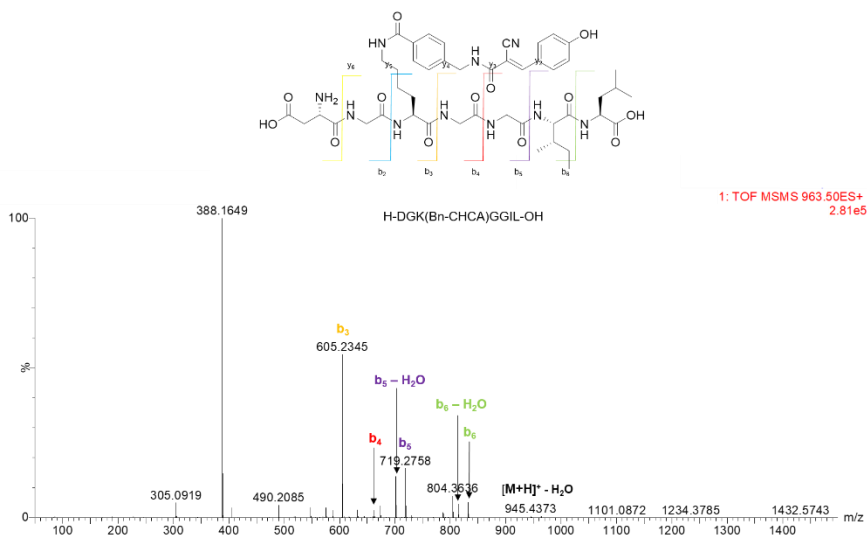
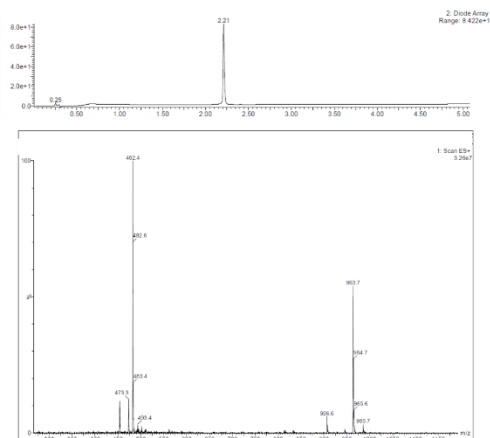
<b>Séquence</b>	H-WMK(CH-CHCA)R-OH
<b>Résine utilisée</b>	Wang
<b>Acides aminés utilisés</b>	10-17-7
<b>Rendement</b>	18 %
<b>HPLC-UV</b>	1.80 minutes
<b>ESI-MS – [M+2H]<sup>2+</sup></b>	451.9



1: TOF MSMS 904.40ES+  
5.03e4

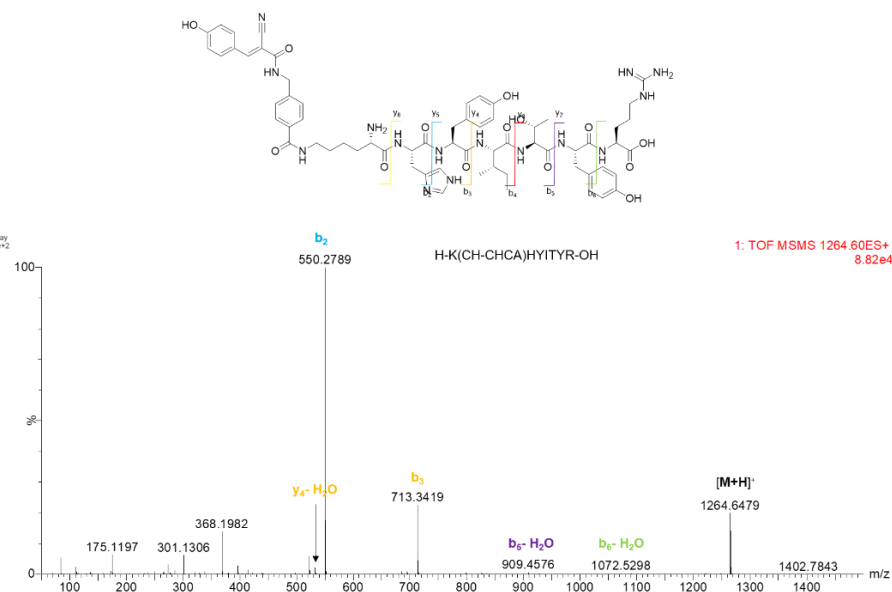
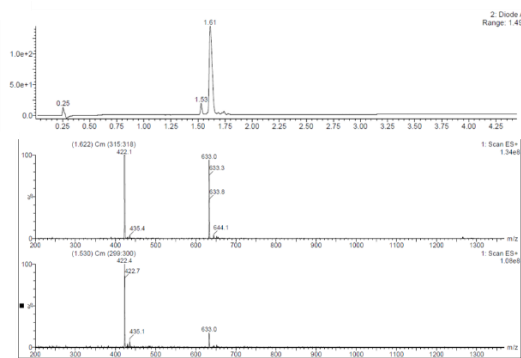
## Composé 3-B

Séquence	H-DGK(Bn-CHCA)GGIL-OH
Résine utilisée	2-Chlorotrityle
Acides aminés utilisés	11-5-14-10-16
Rendement	11 %
HPLC-UV	2.21 minutes
ESI-MS – $[M+H]^+$	963.7



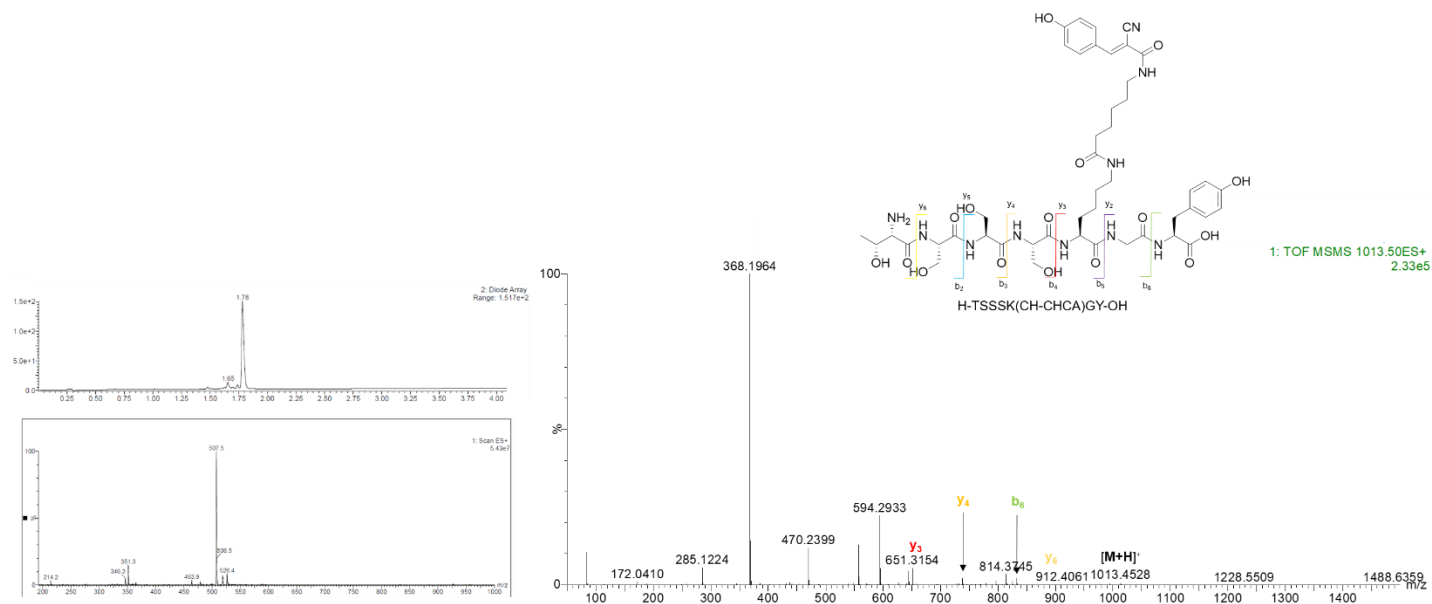
## Composé 4-D

Séquence	H-K(CH-CHCA)HYITYR-OH
Résine utilisée	Wang
Acides aminés utilisés	3-18-11-4-9
Rendement	11 %
HPLC-UV	1.53 et 1.62 minutes
ESI-MS – $[M+2H]^{2+}$	633



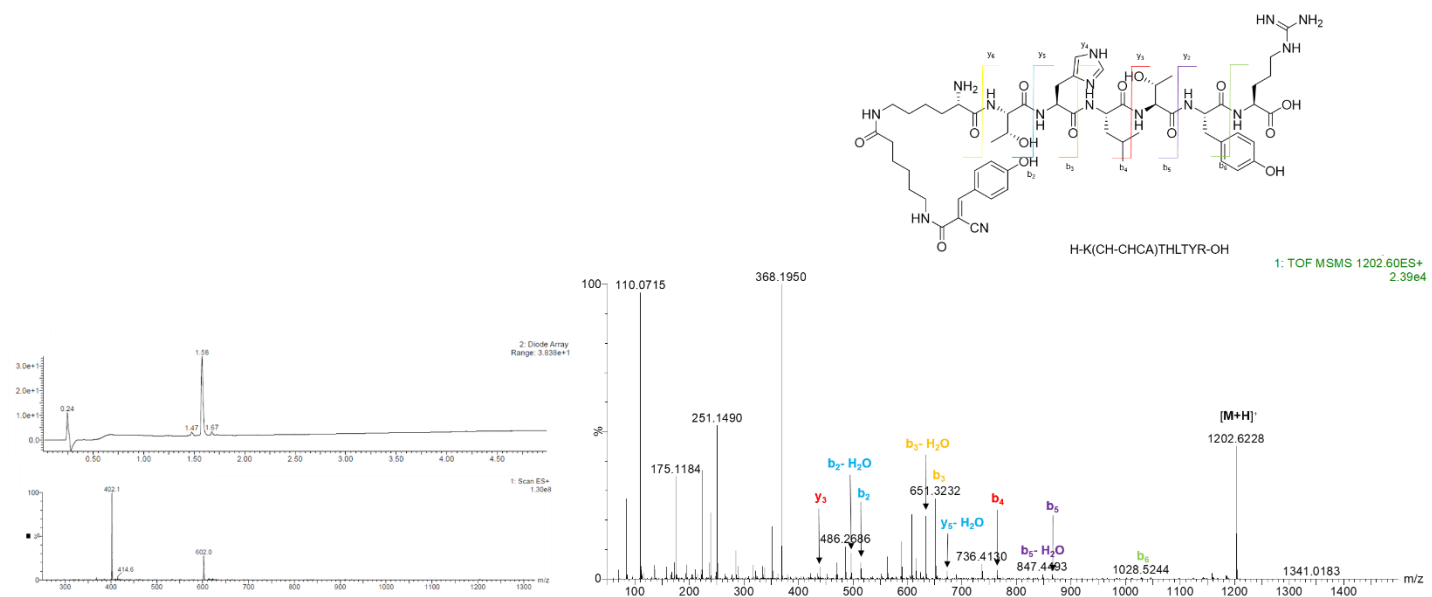
## Composé 5-D

Séquence	H-TSSSK(CH-CHCA)GY-OH
Résine utilisée	2-Chlorotrityle
Acides aminés utilisés	3-14-10-12-19
Rendement	16 %
HPLC-UV	1.78 minutes
ESI-MS – $[M+2H]^{2+}$	507.5



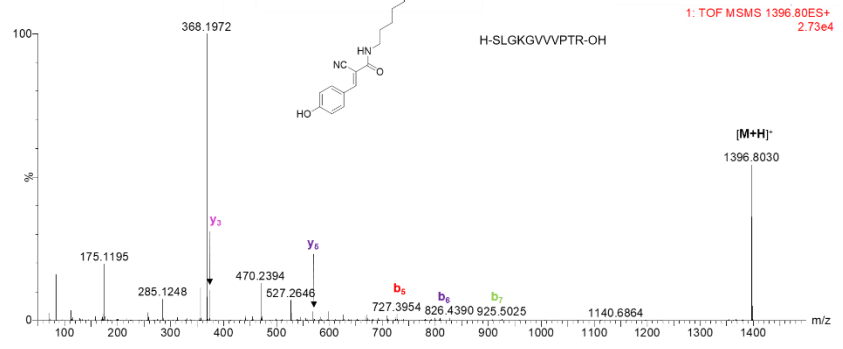
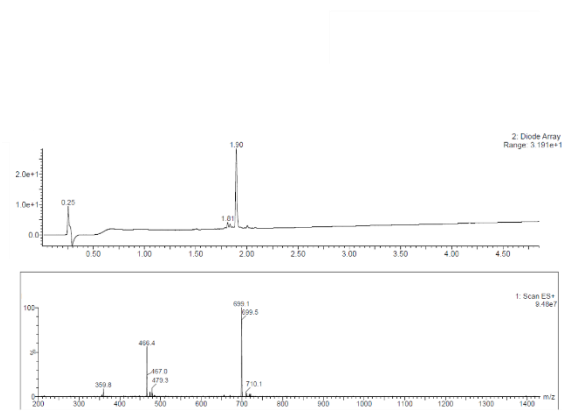
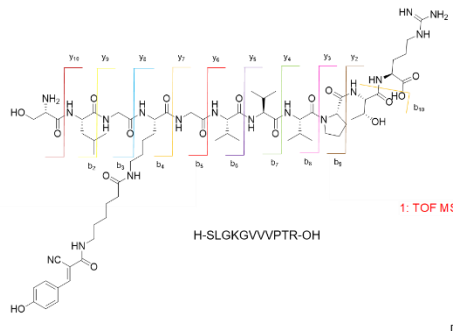
## Composé 6-D

Séquence	H-K(CH-CHCA)THLYR-OH
Résine utilisée	Wang
Acides aminés utilisés	3-18-11-4-9
Rendement	12 %
HPLC-UV	1.58 minutes
ESI-MS – $[M+2H]^{2+}$	602



# Composé 7-D

<b>Séquence</b>	H-SLGGK(CH-CHCA)GVVVPTR-OH
<b>Résine utilisée</b>	Wang
<b>Acides aminés utilisés</b>	18-20-2-14-10-11-13
<b>Rendement</b>	9 %
<b>HPLC-UV</b>	1.9 minutes
<b>ESI-MS – [M+2H]<sup>2+</sup></b>	699.1

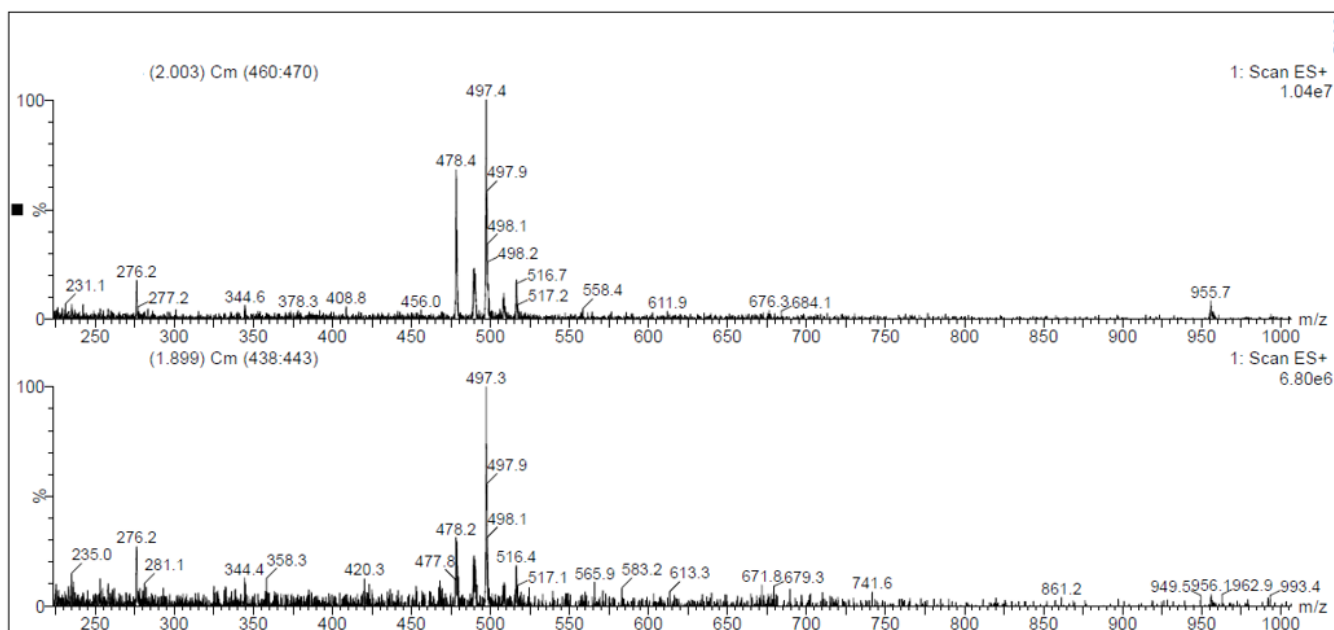
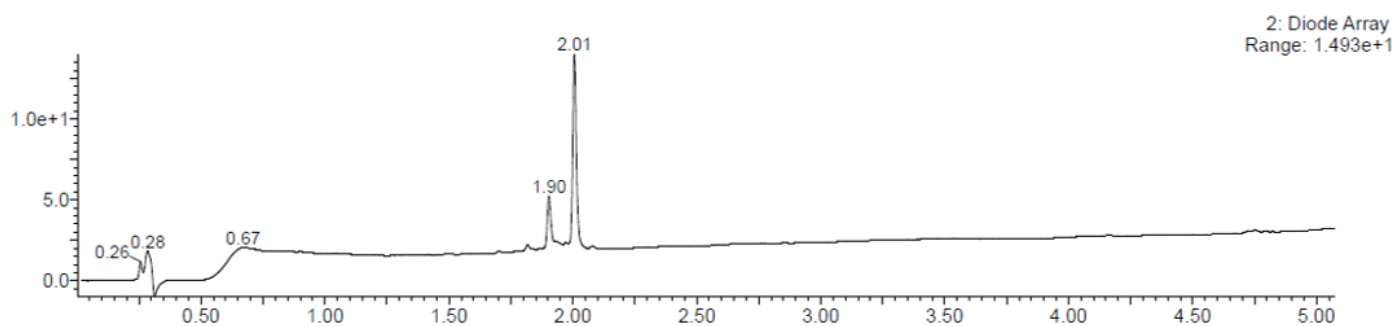


## 7. Synthèse des peptides marqués CHCA D<sub>4</sub>

Les protocoles sont identiques à ceux utilisés pour un marquage CHCA, à la différence près que l'ajout de Boc-CHCA est remplacé par l'ajout de CHCA D<sub>4</sub>.

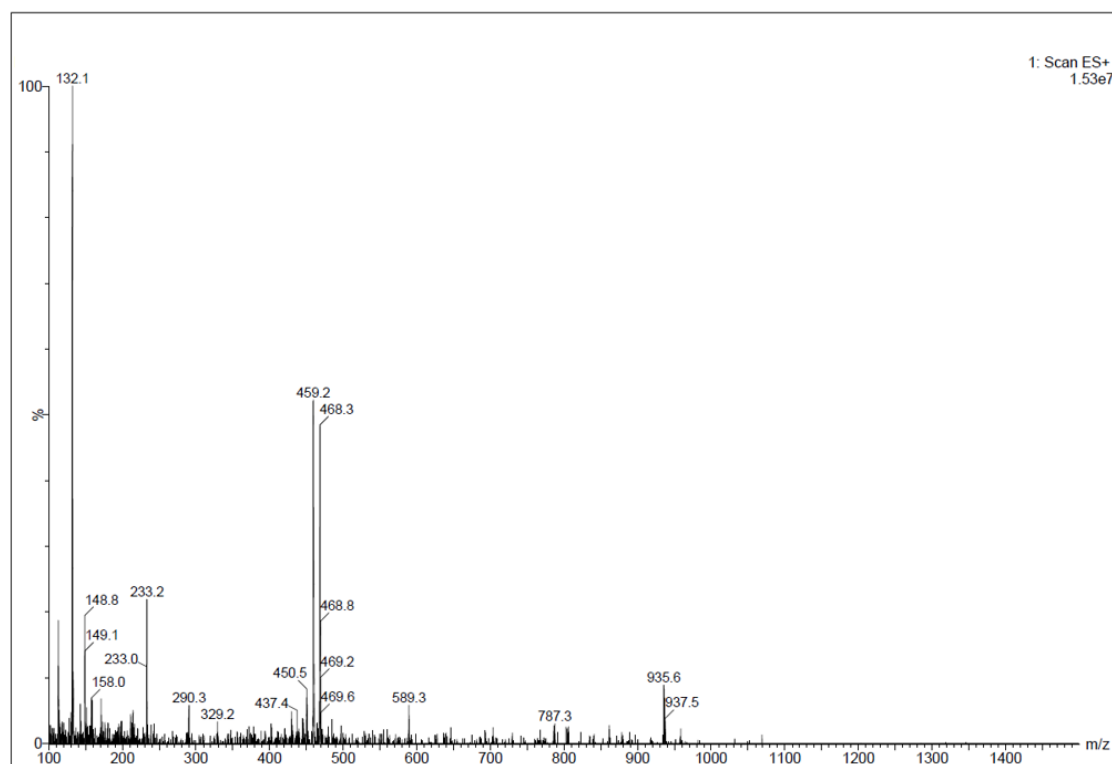
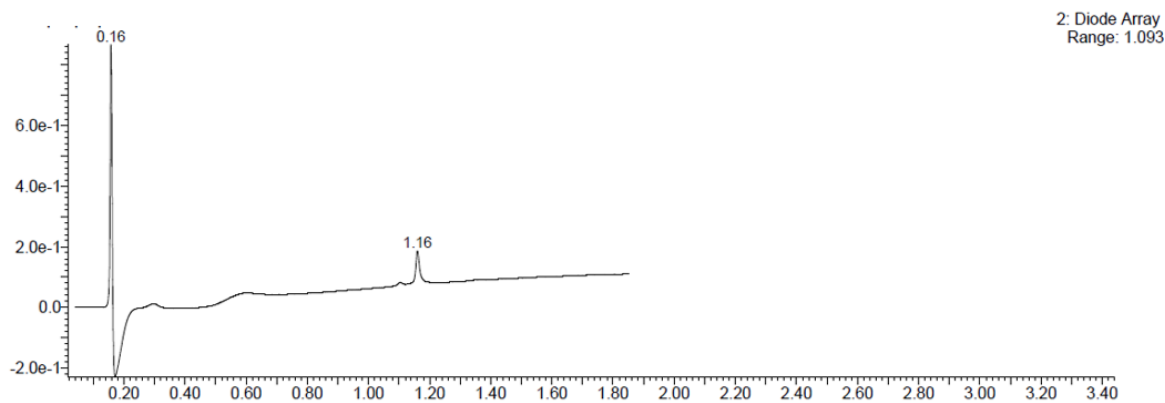
### Composé 1-C

<b>Séquence</b>	H-DGK(Bn-CHCA D <sub>4</sub> )GGTL-OH
<b>Résine utilisée</b>	2-Chlorotrityle
<b>Acides aminés utilisés</b>	11-18-14-10-16
<b>Rendement</b>	8 %
<b>HPLC-UV</b>	1.9 et 2.01 minutes
<b>ESI-MS – [M+H]<sup>+</sup></b>	955.7



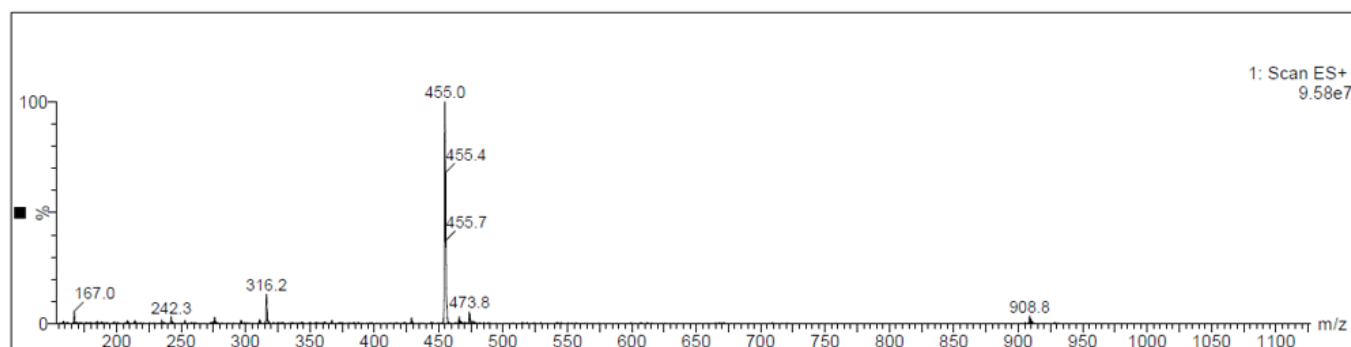
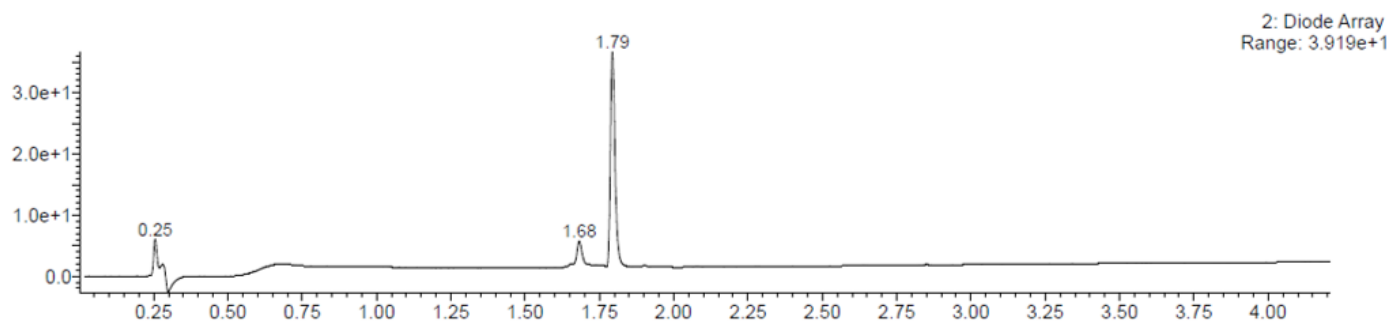
# Composé 1-E

<b>Séquence</b>	H-DGK(CH-CHCA D <sub>4</sub> )GGTL-OH
<b>Résine utilisée</b>	2-Chlorotrityle
<b>Acides aminés utilisés</b>	11-18-14-10-16
<b>Rendement</b>	6 %
<b>HPLC-UV</b>	1.16 minutes
<b>ESI-MS – [M+H]<sup>+</sup></b>	935.6



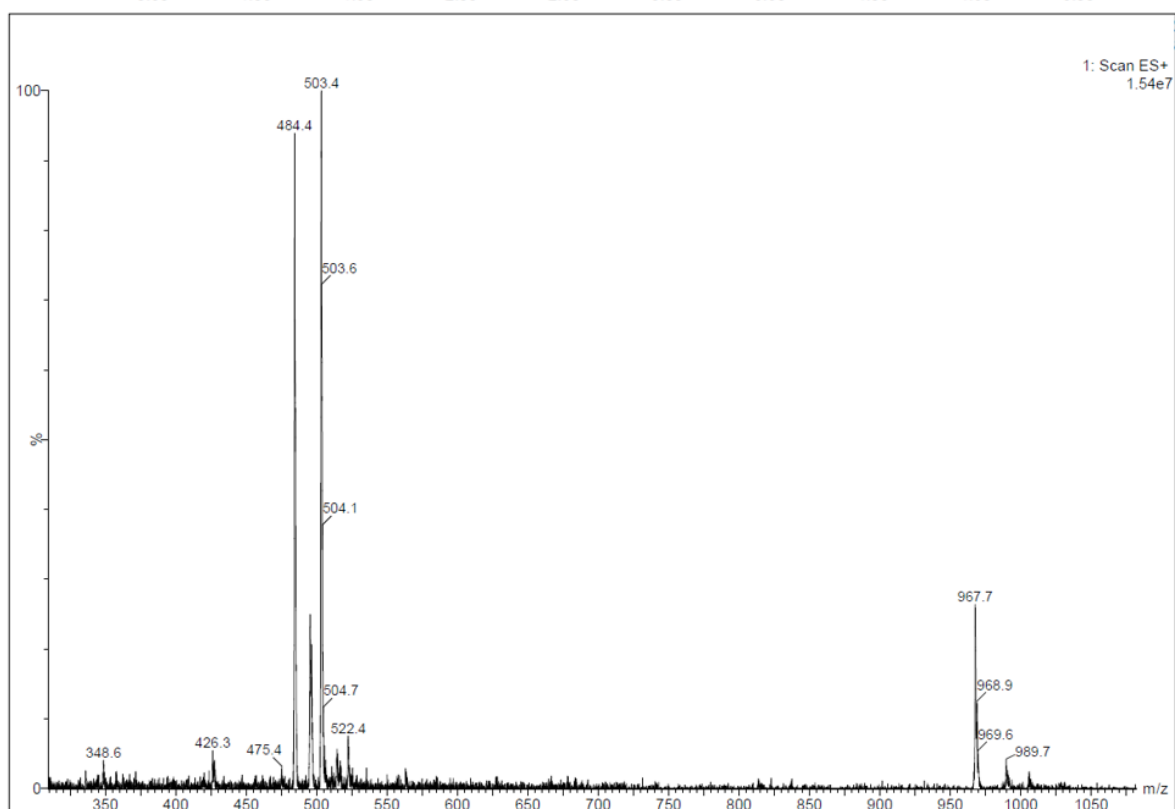
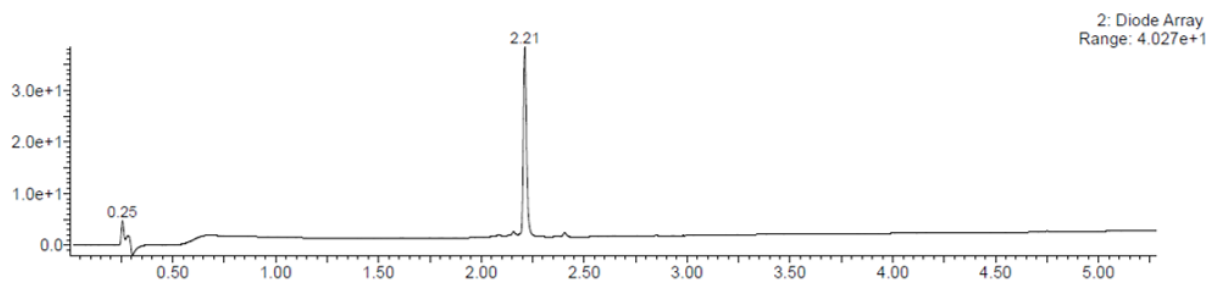
Composé 2-E

<b>Séquence</b>	H-WMK(CH-CHCA D <sub>4</sub> )R-OH
<b>Résine utilisée</b>	Wang
<b>Acides aminés utilisés</b>	10-17-7
<b>Rendement</b>	7 %
<b>HPLC-UV</b>	1.79 minutes
<b>ESI-MS – [M+H]<sup>+</sup></b>	908.8



## Composé 3-C

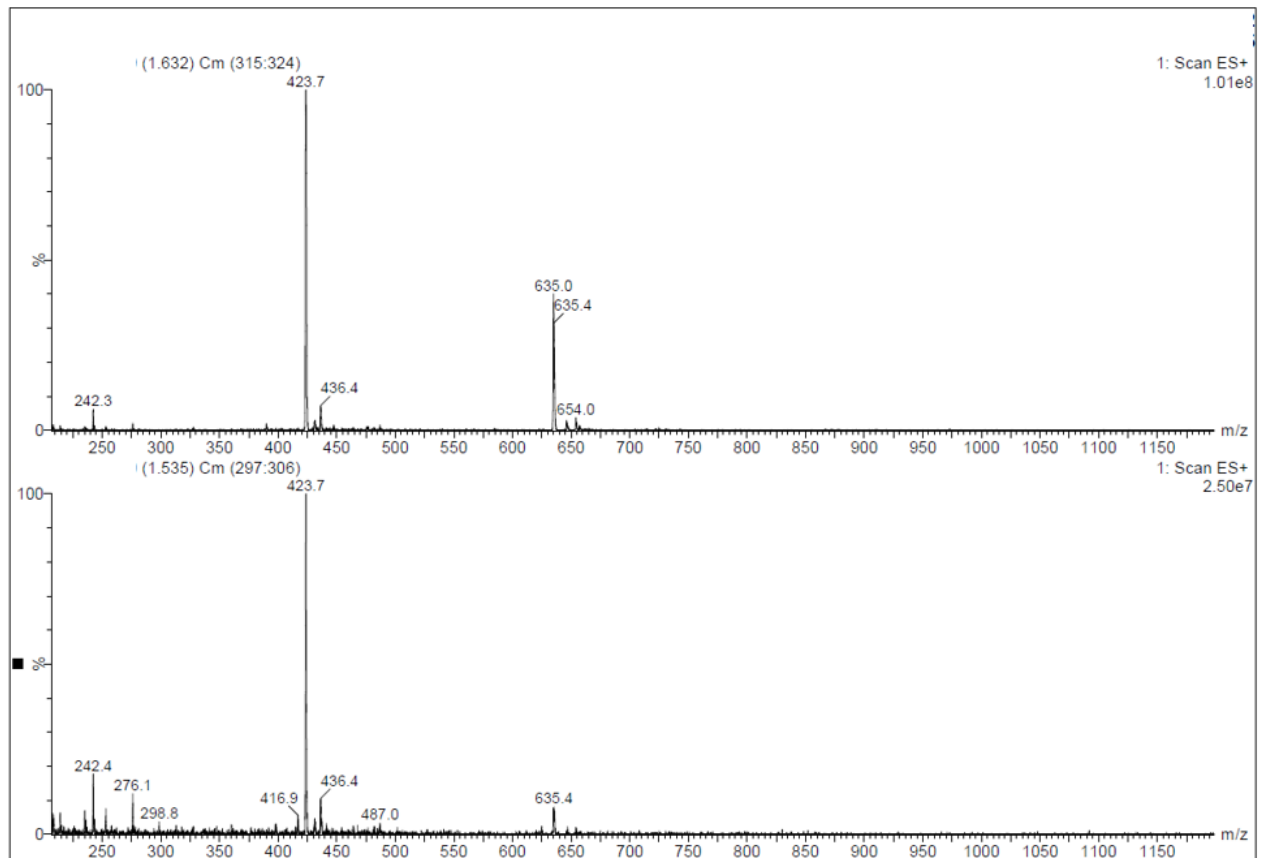
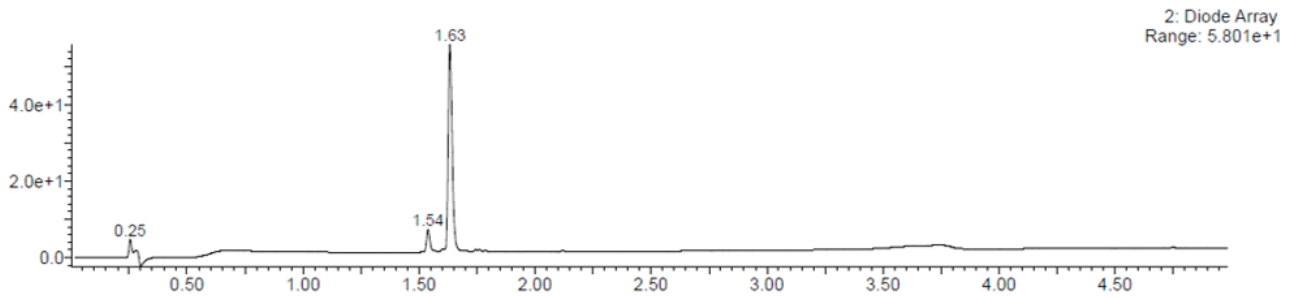
<b>Séquence</b>	H-DGK(Bn-CHCA D <sub>4</sub> )GGIL-OH
<b>Résine utilisée</b>	2-Chlorotrityle
<b>Acides aminés utilisés</b>	11-5-14-10-16
<b>Rendement</b>	8 %
<b>HPLC-UV</b>	2.21 minutes
<b>ESI-MS – [M+H]<sup>+</sup></b>	967.7





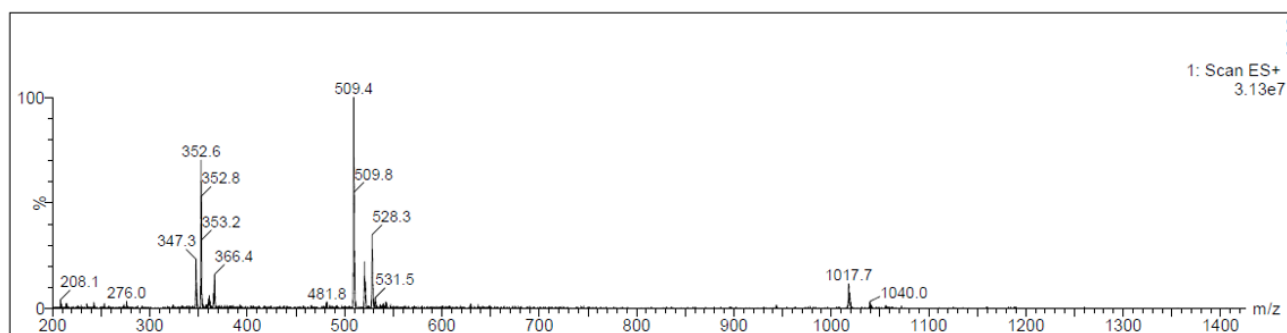
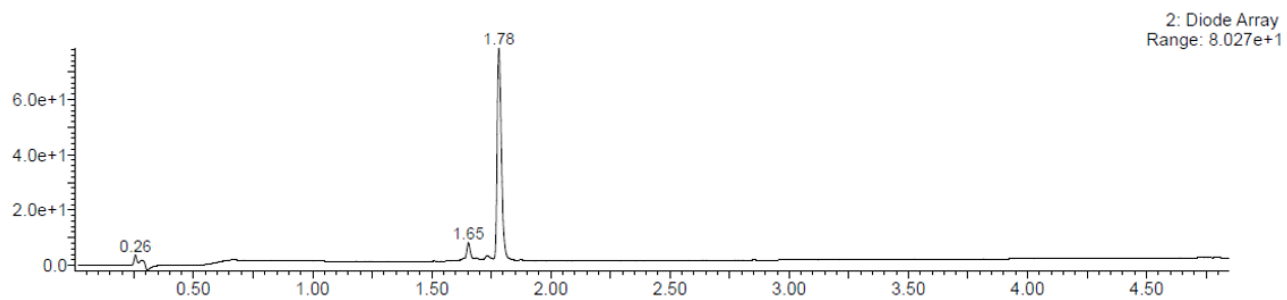
Composé 4-E

<b>Séquence</b>	H-K(CH-CHCA)HYITYR-OH
<b>Résine utilisée</b>	Wang
<b>Acides aminés utilisés</b>	3-18-11-4-9
<b>Rendement</b>	6 %
<b>HPLC-UV</b>	1.54 et 1.63 minutes
<b>ESI-MS – [M+2H]<sup>2+</sup></b>	635 et 635.4



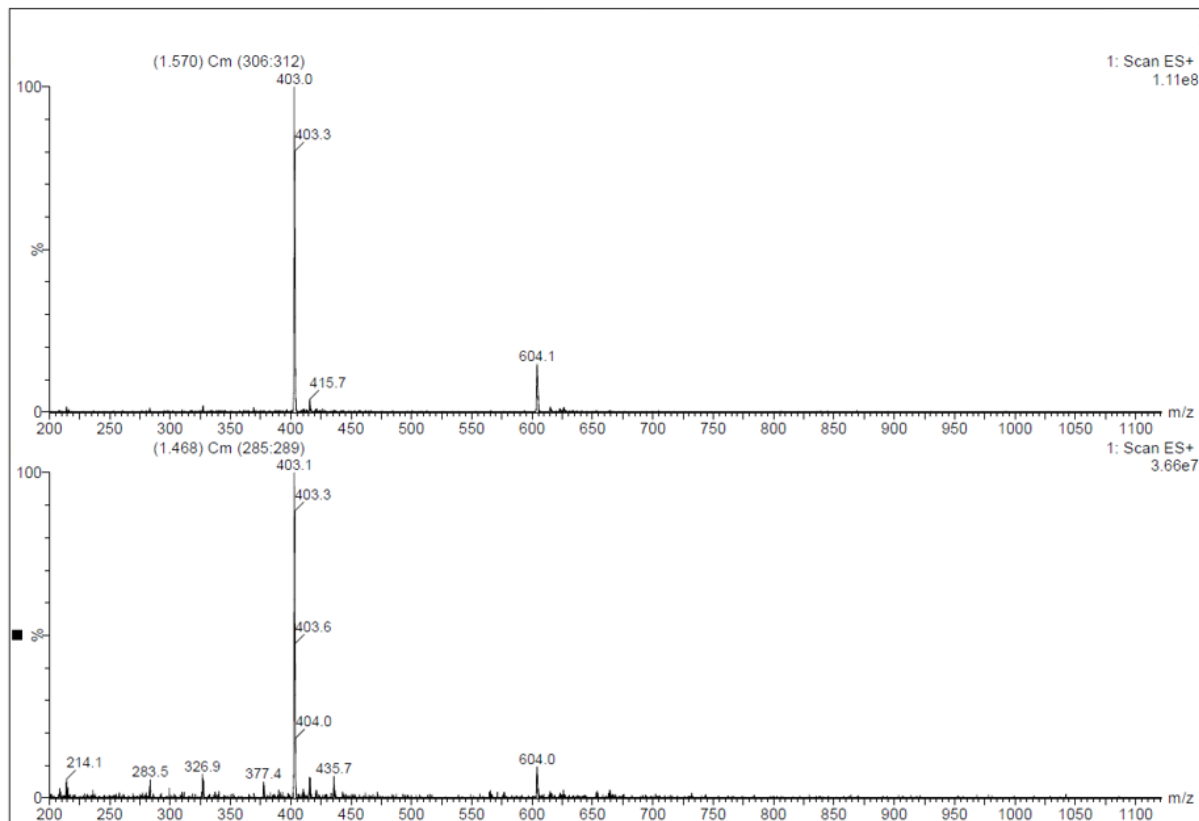
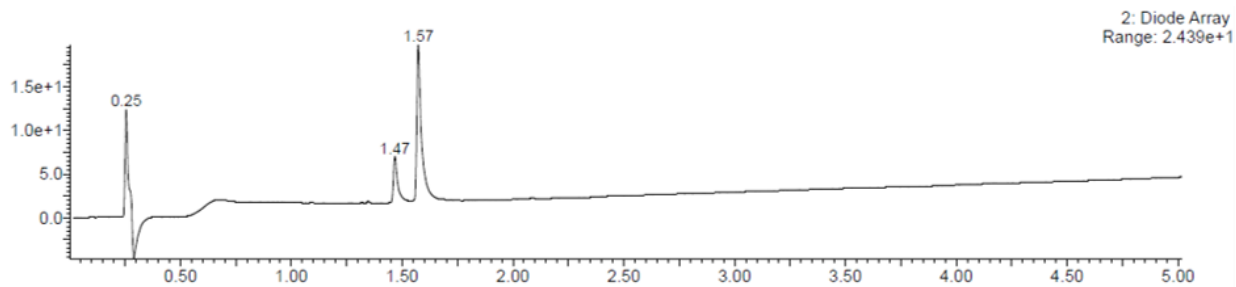
## Composé 5-E

<b>Séquence</b>	H-TSSSK(CH-CHCA D <sub>4</sub> )GY-OH
<b>Résine utilisée</b>	2-Chlorotrityle
<b>Acides aminés utilisés</b>	3-14-10-12-19
<b>Rendement</b>	9 %
<b>HPLC-UV</b>	1.78 minutes
<b>ESI-MS – [M+H]<sup>+</sup></b>	1017.7



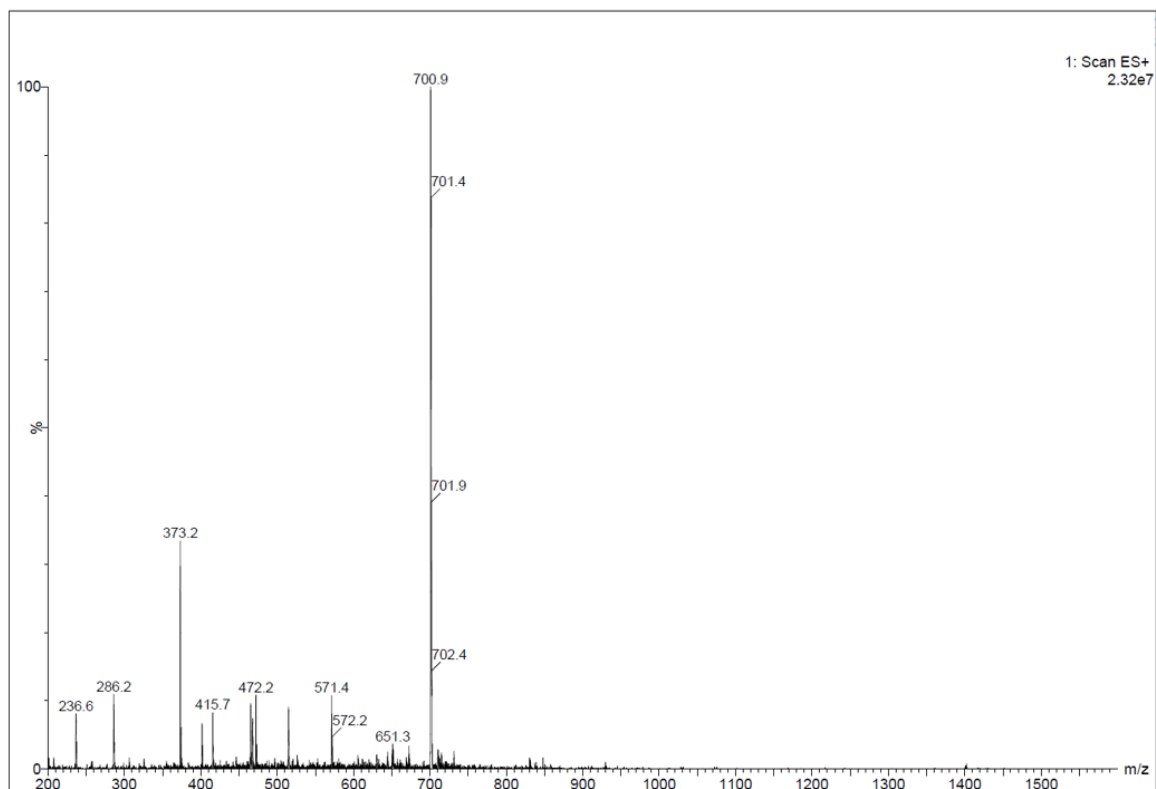
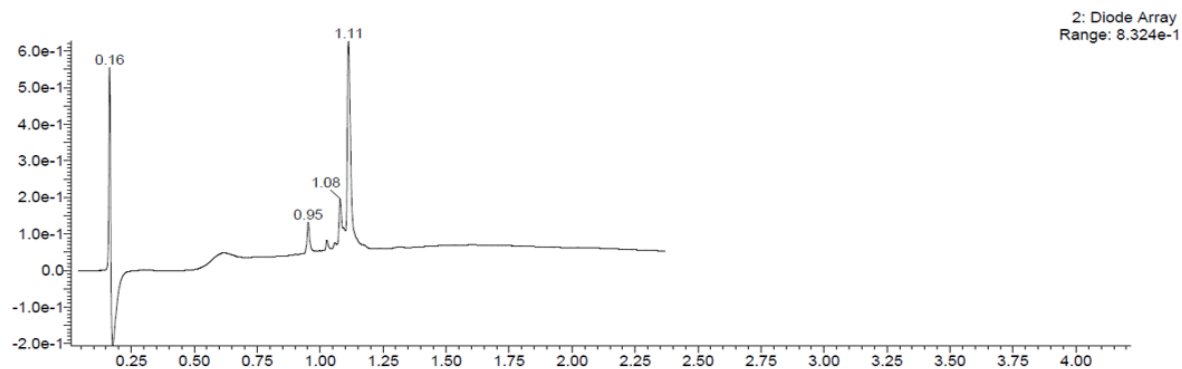
Composé 6-E

<b>Séquence</b>	H-K(CH-CHCA D <sub>4</sub> )THLYR-OH
<b>Résine utilisée</b>	Wang
<b>Acides aminés utilisés</b>	3-18-11-4-9
<b>Rendement</b>	5 %
<b>HPLC-UV</b>	1.47 et 1.57 minutes
<b>ESI-MS – [M+2H]<sup>2+</sup></b>	604



## Composé 7-E

<b>Séquence</b>	H-SLGK(CH-CHCA D <sub>4</sub> )GVVVPTR-OH
<b>Résine utilisée</b>	Wang
<b>Acides aminés utilisés</b>	18-20-2-14-10-11-13
<b>Rendement</b>	9 %
<b>HPLC-UV</b>	1.08 et 1.11 minutes
<b>ESI-MS – [M+2H]<sup>2+</sup></b>	700.9



## IV. Protocoles enzymatiques

Dans les protocoles suivants, le tampon TRIS 50 mM, CaCl<sub>2</sub>, 50 μM ZnCl<sub>2</sub> pH=7.5 sera désigné comme tampon de marquage.

### a. Protocoles de marquage

#### 1. Marquage des MMPs isolées en tampon biologiques

Une solution de MMP (domaine catalytique ou enzyme entière) à 1 μM dans un tampon TRIS 50 mM, NaCl est utilisée. 10 μL de cette solution sont introduits dans un eppendorf de 500 μL, puis dilués à l'aide de 90 μL de tampon de marquage, menant à l'obtention d'une solution fille à 100 nM en MMP. 99 μL de cette solution fille sont introduits dans un eppendorf de 500 μL, auxquels sont ajoutés 1 μL d'une solution de sonde à 30 μM dans le DMSO. Le mélange réactionnel est incubé à 26°C, à l'aide d'un thermomixeur, et maintenu sous agitation à 350 rpm pendant 4 heures. 4 volumes d'acétone à 0°C sont ajoutés à la solution, maintenue pendant 1 heure dans la glace afin de précipiter le contenu protéique. La solution est centrifugée à 4°C, à 13500 rpm, pendant 15 min, puis le surnageant est retiré. Le précipité est repris dans 20 μL de tampon de marquage et stocké à -20°C en attente de digestion.

#### 2. Marquage des MMPs exogènes en milieux complexes

Dans le cas d'expériences avec des milieux à 1mg/mL en protéines, les milieux biologiques sont utilisés directement. Dans le cas contraire, les échantillons de milieux complexes sont dilués par le tampon de marquage jusqu'à obtention d'une solution de travail à 0.1mg/mL en protéines.

Une solution de MMP (domaine catalytique ou enzyme entière) à 1 μM dans un tampon TRIS 50 mM, NaCl est utilisée. 10 μL de cette solution sont introduits dans un eppendorf de 500 μL, puis dilués à l'aide de 90 μL de milieu complexe, menant à l'obtention d'une solution fille à 100 nM en MMP. L'échantillon de milieu complexe utilisé pour la dilution est préalablement agité par vortex puis centrifugé pendant 5 min à 13500 rpm.

99 μL de la solution fille sont introduits dans un eppendorf de 500 μL, auxquels sont ajoutés 1 μL d'une solution de sonde à 30 μM dans le DMSO. Le mélange réactionnel est incubé à 26°C, à l'aide d'un thermomixeur, et maintenu sous agitation à 350 rpm pendant 4 heures. 4 volumes d'acétone à 0°C sont ajoutés à la solution, maintenue pendant 1 heure dans la glace afin de précipiter le contenu protéique. La solution est centrifugée à 4°C, à 13500 rpm, pendant 15 min, puis le surnageant est retiré. Le précipité est repris dans 20 μL de tampon de marquage et stocké à -20°C en attente de digestion.

### b. Protocoles de digestion

#### 1. Digestion des MMPs isolées

A la solution finale de marquage 1, sont ajoutés 0.5 μL d'une solution de trypsine ou de chymotrypsine à 1 mg/mL dans HCl 1mM. L'eppendorf est incubé à 50°C pendant 2 heures, puis la température est baissée à 37°C pour les 22 heures restantes. Le mélange est maintenu sous agitation à 350 rpm à l'aide d'un thermomixeur. La solution de digestat est ensuite dessalée sur colonne Zip-Tip, les échantillons sont alors prêts pour l'analyse MALDI.

## **2. Digestion des MMPs exogènes en milieux complexes**

A la solution finale de marquage 2, sont ajoutés 1  $\mu\text{L}$  d'une solution de trypsine ou de chymotrypsine à 1 mg/mL dans HCl 1mM. L'éppendorf est incubé à 50°C pendant 2 heures, et maintenu sous agitation à 350 rpm à l'aide d'un thermomixeur. La solution de digestat est ensuite dessalée sur colonne Zip-Tip, les échantillons sont alors prêts pour l'analyse MALDI.

## **3. Digestion des milieux complexes non marqués**

Dans le cas d'expériences avec des milieux à 1mg/mL en protéines, les milieux biologiques sont utilisés directement. Dans le cas contraire, les échantillons de milieux complexes sont dilués par le tampon de marquage jusqu'à obtention d'une solution de travail à 0.1mg/mL en protéines.

60  $\mu\text{L}$  d'une solution de milieu biologique complexe sont introduits dans un eppendorf de 500  $\mu\text{L}$ , auxquels sont ajoutés 1  $\mu\text{L}$  d'une solution de trypsine ou de chymotrypsine à 1 mg/mL dans HCl 1mM. L'éppendorf est incubé à 50°C pendant 2 heures, et maintenu sous agitation à 350 rpm à l'aide d'un thermomixeur. La solution de digestat est ensuite dessalée sur colonne Zip-Tip, les échantillons sont alors prêts pour l'analyse MALDI.

## **c. Marquage de MMPs endogènes en milieux biologiques complexes**

Dans le cas d'expériences avec des milieux à 1mg/mL en protéines, les milieux biologiques sont utilisés directement. Dans le cas contraire, les échantillons de milieux complexes sont dilués par le tampon de marquage jusqu'à obtention d'une solution de travail à 0.1mg/mL en protéines.

59  $\mu\text{L}$  d'une solution de milieu biologique complexe sont introduits dans un eppendorf de 500  $\mu\text{L}$ , auxquels sont ajoutés 1  $\mu\text{L}$  d'une solution de sonde à 18  $\mu\text{M}$  dans le DMSO. Le mélange réactionnel est incubé à 26°C, à l'aide d'un thermomixeur, et maintenu sous agitation à 350 rpm pendant 4 heures. 4 volumes d'acétone à 0°C sont ajoutés à la solution, maintenue pendant 1 heure dans la glace afin de précipiter le contenu protéique. La solution est centrifugée à 4°C, à 13500 rpm, pendant 15 min, puis le surnageant est retiré. Le précipité est repris dans 20  $\mu\text{L}$  de tampon de marquage auxquels sont ajoutés 1  $\mu\text{L}$  de trypsine ou de chymotrypsine à 1 mg/mL dans HCl 1mM. L'éppendorf est incubé à 50°C pendant 2 heures et maintenu sous agitation à 350 rpm à l'aide d'un thermomixeur. La solution de digestat est ensuite dessalée sur colonne Zip-Tip, les échantillons sont alors prêts pour l'analyse MALDI.

## **d. Mesure de l'activité protéolytique des MMPs**

Toutes les expériences de mesure de l'activité protéolytique ont été effectuées dans microplaques Corning™ à 96 puits à fond plats, noires. Chaque puit a été préparé en duplicata.

### **1. Mesure de l'activité enzymatique en tampon biologique**

Une solution de MMP (domaine catalytique ou enzyme entière) à 1  $\mu\text{M}$  dans un tampon TRIS 50 mM, NaCl est utilisée. 10  $\mu\text{L}$  de cette solution sont introduit dans un puit, puis dilués via l'ajout de 90  $\mu\text{L}$  de tampon de

marquage, menant à une concentration en MMP dans le puit de 100 nM. 1  $\mu$ L de DMSO sont ajoutés, puis 0.5  $\mu$ L d'une solution de Mca-MAT à 1.8 mM dans le DMSO. Dans le cas de la mesure de l'activité enzymatique en présence de sonde, le DMSO (1 $\mu$ L) est remplacé par 1  $\mu$ L d'une solution de sonde à 20  $\mu$ M.

Après une rapide homogénéisation des puits, la plaque est introduite dans le fluorimètre. L'ajout du substrat fluorogénique marque le début de l'analyse. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement fixées à 320 et 405 nm. Le suivi de fluorescence est assuré pendant 30 minutes, avec une mesure toutes les 30 secondes.

## **2. Mesure de l'activité enzymatique en présence de Brij-35**

Une solution de MMP (domaine catalytique ou enzyme entière) à 1  $\mu$ M dans un tampon TRIS 50 mM, NaCl est utilisée. 10  $\mu$ L de cette solution sont introduit dans un puit, puis dilués via l'ajout de 90  $\mu$ L de tampon TRIS 50 mM, CaCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 0.01% Brij-35  $pH=7.5$ , menant à une concentration en MMP dans le puit de 100 nM. 1  $\mu$ L de DMSO sont ajoutés, puis 0.5  $\mu$ L d'une solution de Mca-MAT à 1.8 mM dans le DMSO. Dans le cas de la mesure de l'activité enzymatique en présence de sonde, le DMSO (1 $\mu$ L) est remplacé par 1  $\mu$ L d'une solution de sonde à 20  $\mu$ M.

Après une rapide homogénéisation des puits, la plaque est introduite dans le fluorimètre. L'ajout du substrat fluorogénique marque le début de l'analyse. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement fixées à 320 et 405 nm. Le suivi de fluorescence est assuré pendant 30 minutes, avec une mesure toutes les 30 secondes.

## **3. Mesure de l'activité enzymatique en milieu biologique complexe**

Dans le cas d'expériences avec des milieux à 1mg/mL en protéines, les milieux biologiques sont utilisés directement. Dans le cas contraire, les échantillons de milieux complexes sont dilués par le tampon de marquage jusqu'à obtention d'une solution de travail à 0.1mg/mL en protéines.

Une solution de MMP (domaine catalytique ou enzyme entière) à 1  $\mu$ M dans un tampon TRIS 50 mM, NaCl est utilisée. 10  $\mu$ L de cette solution sont introduit dans un puit, puis dilués via l'ajout de 90  $\mu$ L de milieu biologique, menant à une concentration en MMP dans le puit de 100 nM. 1  $\mu$ L de DMSO sont ajoutés, puis 0.5  $\mu$ L d'une solution de Mca-MAT à 1.8 mM dans le DMSO. Dans le cas de la mesure de l'activité enzymatique en présence de sonde, le DMSO (1 $\mu$ L) est remplacé par 1  $\mu$ L d'une solution de sonde à 20  $\mu$ M.

Après une rapide homogénéisation des puits, la plaque est introduite dans le fluorimètre. L'ajout du substrat fluorogénique marque le début de l'analyse. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement fixées à 320 et 405 nm. Le suivi de fluorescence est assuré pendant 30 minutes, avec une mesure toutes les 30 secondes.

### **e. Utilisation de colonnes Zip-Tip**

Des pointes de pipette Zip-Tip® (Merck Millipore) de 10 µL contenant un lit de résine chromatographique C<sub>18</sub> de 0.6 µL sont utilisées pour le dessalage des échantillons d'analyse MALDI-MS.

La résine est préalablement mouillée avec 10 µL d'un mélange ACN/H<sub>2</sub>O 50/50 0.1% TFA. Le solvant est éliminé, en prenant soin de ne jamais sécher la résine. La colonne est équilibrée avec 10 µL d'H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, le solvant est par la suite éliminé. Les analytes sont fixés sur la colonne par 5 aller-retours dans la solution à dessaler. La colonne est ensuite lavée à l'aide de 10 µL d'H<sub>2</sub>O 0.1% TFA, qui sont éliminés dans la solution à de départ. Enfin, les analytes sont élués à l'aide de 10 µL d'une solution d'ACN/H<sub>2</sub>O 60/40 0.1% TFA, en prenant soin de réaliser 5 allers-retours dans un tube eppendorf propre.

### **f. Protocoles liés à l'utilisation de la résine 2-Chlorotrytyle**

L'utilisation de la résine 2-Chlorotrytyle a été systématiquement associée à l'utilisation de la plateforme FSPPS pour l'agitation et la filtration. Les synthèses ont toutes été réalisées dans des seringues de 25 mL munies d'un fritté.

#### **1. Préactivation de la résine**

Introduire dans un ballon 1mL de DCM anhydre pour 100 mg de résine. Après ajout de 2 équivalents de SOCl<sub>2</sub>, maintenir le mélange sous agitation, sous atmosphère inerte. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, la résine est filtrée sur fritté et rincée au DCM. Après séchage de la résine, celle-ci est stockée à +4°C.

#### **2. Insertion du premier acide aminé**

La résine est introduite dans une seringue, munie d'un fritté, et mise en suspension dans le DCM pendant 10 minutes. Le solvant est ensuite filtré sur fritté. Sont ensuite ajoutés sur la résine, à l'aide d'une micropipette, 1 mL de DCM, 3 équivalents d'acide aminé en solution dans le DMF à 0.5M et 6 équivalents de DIEA. Le mélange est agité à 500 rpm, à température ambiante, overnight. 5 mL de MeOH sont ajoutés, sans filtration, et le mélange est de nouveau agité à température ambiante, à 500 rpm, pendant 30 min. La solution est filtrée sur fritté et la résine est alors prête pour l'élongation du peptide.

#### **3. Dosage Fmoc**

Deux échantillons de résine, de masse précise, sont prélevés du milieu de synthèse et introduits dans des eppendorfs de 1.5mL. 1mL d'une solution de DMF/Pipéridine 80/20 sont ajoutés dans chacun des eppendorfs. Après agitation par vortex pendant 1 minute, les deux solutions sont diluées par 100 en utilisant le DMF comme diluant. L'absorbance des deux solutions filles est mesurée, en triplicatas, sur un spectromètre UV-Visible, à la longueur d'onde de 301nm. Un échantillon de DMF est utilisé pour faire le blanc sur l'appareil.



L'absorbance des deux solutions permet ainsi de remonter à la charge de la résine via le lien entre concentration en dibenzofulvène, issu de la déprotection Fmoc du premier acide aminé chargé, et masse des deux échantillons de résine pesés.

#### **4. Clivage de la résine**

La résine est mise en suspension dans un mélange TFA/TIS/H<sub>2</sub>O 95/2.5/2.5 et mise sous agitation à température ambiante. Après 30 minutes d'agitation, la résine est filtrée sur fritté, puis lavée au DCM. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. Après précipitation à Et<sub>2</sub>O, la solution est centrifugée 5 min à 4°C à 2000 rpm. Le surnageant est retiré et le culot est stocké à -20°C.



## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] T. Yoshida, K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, Detection of high mass ions by laser desorption TOF MS.pdf, (1988).
- [2] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules, *Anal. Chem.* (1985) 2935–2939.
- [3] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 78 (1987) 53–68. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(87\)87041-6](https://doi.org/10.1016/0168-1176(87)87041-6).
- [4] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2299–2301. <https://doi.org/10.1021/ac00171a028>.
- [5] R.C. Beavis, B.T. Chait, K.G. Standing, Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 3 (1989) 436–439. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290031208>.
- [6] P. Seng, M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. Fournier, J.M. Rolain, D. Raoult, Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Clin. Infect. Dis.* 49 (2009) 543–551. <https://doi.org/10.1086/600885>.
- [7] C. Cassagne, A.C. Normand, C. L'Ollivier, S. Ranque, R. Piarroux, Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification, *Mycoses.* 59 (2016) 678–690. <https://doi.org/10.1111/myc.12506>.
- [8] A. Mandal, M. Singha, P.S. Addy, A. Basak, Laser desorption ionization mass spectrometry: Recent progress in matrix-free and label-assisted techniques, *Mass Spectrom. Rev.* 38 (2017) 3–21. <https://doi.org/10.1002/mas.21545>.
- [9] F. Hillenkamp, P.-K. J, MALDI-MS : A practical guide to Instrumentation, Methods and Applications, Wiley, 2007.
- [10] K. Dreisewerd, The desorption process in MALDI, *Chem Rev.* 103 (2003) 395-426. <https://doi.org/10.1021/cr010375i>.
- [11] W.C. Wiley, I.H. McLaren, Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution, *Rev. Sci. Instrum.* 26 (1955) 1150–1157. <https://doi.org/10.1063/1.1715212>.
- [12] B. Mamyrin, V. Karataev, D. Shmikk, V. Zagulin, The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution, *Sov. J. Exp. Theor. Phys.* 37 (1973) 45.
- [13] Y. Wang, C. Wang, Y. Lai, Y. Ou, H. Chang, Y. Wang, Subject Areas : Author for correspondence : Critical factors determining the quantification capability of matrix-assisted laser desorption / ionization – time-of-flight mass spectrometry, *Philos. Trans. A.* 347 (2016). <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0371>.
- [14] O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann, Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3281–3287. <https://doi.org/10.1021/ac00091a044>.

- [15] V. Horneffer, R. Reichelt, K. Strupat, Protein incorporation into MALDI-matrix crystals investigated by high resolution field emission scanning electron microscopy, *Int. J. Mass Spectrom.* 226 (2003) 117–131. [https://doi.org/10.1016/S1387-3806\(02\)00979-X](https://doi.org/10.1016/S1387-3806(02)00979-X).
- [16] D.A. Allwood, I.K. Perera, J. Perkins, P.E. Dyer, G.A. Oldershaw, Preparation of “near” homogeneous samples for the analysis of matrix-assisted laser desorption/ionisation processes, *Appl. Surf. Sci.* 103 (1996) 231–244. [https://doi.org/10.1016/0169-4332\(96\)00530-2](https://doi.org/10.1016/0169-4332(96)00530-2).
- [17] M. Niehaus, J. Soltwisch, New insights into mechanisms of material ejection in MALDI mass spectrometry for a wide range of spot sizes, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25946-z>.
- [18] S. Xu, Y. Li, H. Zou, J. Qiu, Z. Guo, B. Guo, Carbon Nanotubes as Assisted Matrix for Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6191–6195. <https://doi.org/10.1021/ac0345695>.
- [19] B. C., C. T., C. B., Alpha-Cyano-4hydroxycinnamic Acid as a Matrix for Matrix- assisted Laser Desorption Mass-Spectrometry, *Org. Mass Spectrom.* 27 (1992) 156–158. <https://doi.org/10.1002/oms.1210270217>.
- [20] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 111 (1991) 89–102. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(91\)85050-V](https://doi.org/10.1016/0168-1176(91)85050-V).
- [21] G. Luo, I. Marginean, A. Vertes, Internal Energy of Ions Generated by Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6185–6190. <https://doi.org/10.1021/ac020339z>.
- [22] E. Schulz, M. Karas, Internal energy build-up in matrix-assisted laser desorption / ionization, *J. Mass Spectrom.* (2004) 579–593. <https://doi.org/10.1002/jms.651>.
- [23] R. Knochenmuss, Ion formation mechanisms in UV-MALDI, *Analyst.* 131 (2006) 966–986. <https://doi.org/10.1039/b605646f>.
- [24] R. Krüger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Glückmann, M. Karas, Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5812–5821. <https://doi.org/10.1021/ac010827r>.
- [25] R. Knochenmuss, An Introduction to MALDI Ionization Mechanisms for Users of Mass Spectrometry Imaging, in: T. Siegel (Ed.), *New Dev. Mass Spectrom.*, Royal Society of Chemistry, 2021. <https://doi.org/10.1017/cbo9781139149747.017>.
- [26] R. Knochenmuss, The Coupled Chemical and Physical Dynamics Model of MALDI, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 9 (2016) 365–385. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041750>.
- [27] K.M. Kirmess, R. Knochenmuss, G.J. Blanchard, G.R. Kinsel, MALDI ionization mechanisms investigated by comparison of isomers of dihydroxybenzoic acid, *J. Mass Spectrom.* 51 (2016) 79–85. <https://doi.org/10.1002/jms.3725>.
- [28] R. Knochenmuss, A. Stortelder, K. Breuker, R. Zenobi, Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 1237–1245. [https://doi.org/10.1002/1096-9888\(200011\)35:11<1237::AID-JMS74>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1096-9888(200011)35:11<1237::AID-JMS74>3.0.CO;2-O).
- [29] R. Knochenmuss, R. Zenobi, MALDI ionization: The role of in-plume processes, *Chem. Rev.* 103 (2003) 441–452. <https://doi.org/10.1021/cr0103773>.

- [30] R. Knochenmuss, A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization, *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 867–877. <https://doi.org/10.1002/jms.349>.
- [31] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 141 (1995) 127–148. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(94\)04108-J](https://doi.org/10.1016/0168-1176(94)04108-J).
- [32] G. McCombie, R. Knochenmuss, Small-molecule MALDI using the matrix suppression effect to reduce or eliminate matrix background interferences, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4990–4997. <https://doi.org/10.1021/ac049581r>.
- [33] X. Lou, B.F.M. De Waal, L.G. Milroy, J.L.J. Van Dongen, A sample preparation method for recovering suppressed analyte ions in MALDI TOF MS, *J. Mass Spectrom.* 50 (2015) 766–770. <https://doi.org/10.1002/jms.3587>.
- [34] J. Bastrup, S. Birkelund, A.A. Asuni, C. Volbracht, A. Stensballe, Dual strategy for reduced signal-suppression effects in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 33 (2019) 1711–1721. <https://doi.org/10.1002/rcm.8521>.
- [35] B. Spengler, Post-source Decay Analysis in Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry of Biomolecules, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 1019–1036. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199711\)32:10<1019::AID-JMS595>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199711)32:10<1019::AID-JMS595>3.0.CO;2-G).
- [36] D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, A. Holle, A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 952–965. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2057-0>.
- [37] E. Mirgorodskaya, P. Roepstorff, R.A. Zubarev, Localization of O-Glycosylation Sites in Peptides by Electron Capture Dissociation in a Fourier Transform Mass Spectrometer, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4431–4436. <https://doi.org/10.1021/ac990578v>.
- [38] A. Stensballe, O.N. Jensen, J. V Olsen, K.F. Haselmann, R.A. Zubarev, Electron capture dissociation of singly and multiply phosphorylated peptides.pdf, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1800 (2000) 1793–1800. [https://doi.org/10.1002/1097-0231\(20001015\)14:19<1793::AID-RCM95>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-0231(20001015)14:19<1793::AID-RCM95>3.0.CO;2-Q).
- [39] P. Roepstorff, J. Fohlman, Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides, *Biol. Mass Spectrom.* 11 (1984) 601–601. <https://doi.org/10.1002/bms.1200111109>.
- [40] K. Biemann, Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure, *Biol. Mass Spectrom.* 16 (1988) 99–111. <https://doi.org/10.1002/bms.1200160119>.
- [41] A.R. Dongré, J.L. Jones, Á. Somogyi, V.H. Wysocki, Influence of peptide composition, gas-phase basicity, and chemical modification on fragmentation efficiency: Evidence for the mobile proton model, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 8365–8374. <https://doi.org/10.1021/ja9542193>.
- [42] H. El Aribi, C.F. Rodriguez, D.R.P. Almeida, Y. Ling, W.W. Mak, A.C. Hopkinson, K.W.M. Siu, Elucidation of Fragmentation Mechanisms of Protonated Peptide Ions and Their Products : A Case Study on Glycylglycylglycine Using Density Functional Theory and Threshold Collision-Induced Dissociation, *JACS.* (2003) 9229–9236. <https://doi.org/10.1021/ja0207293>.

- [43] S. Zou, J. Oomens, N.C. Polfer, Competition between diketopiperazine and oxazolone formation in water loss products from protonated ArgGly and GlyArg, *Int. J. Mass Spectrom.* 316–318 (2012) 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2011.12.020>.
- [44] B. Palzs, S. Suhal, Fragmentation pathways of protonated peptides, *Mass Spectrom. Rev.* 24 (2005) 508–548. <https://doi.org/10.1002/mas.20024>.
- [45] L.A. Breci, D.L. Tabb, J.R. Yates, V.H. Wysocki, Cleavage N-terminal to proline: Analysis of a database of peptide tandem mass spectra, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1963–1971. <https://doi.org/10.1021/ac026359i>.
- [46] R.N. Grewal, H. El Aribi, A.G. Harrison, K.W.M. Siu, A.C. Hopkinson, Fragmentation of Protonated Tripeptides: The Proline Effect Revisited, *J. Phys. Chem. B.* 108 (2004) 4899–4908. <https://doi.org/10.1021/jp031093k>.
- [47] L. Mouls, J.L. Aubagnac, J. Martinez, C. Enjalbal, Low energy peptide fragmentations in an ESI-Q-ToF type mass spectrometer, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 1378–1391. <https://doi.org/10.1021/pr060574o>.
- [48] C. Bleiholder, S. Osburn, T.D. Williams, S. Suhai, M. Van Stipdonk, A.G. Harrison, B. Paizs, Sequence-scrambling fragmentation pathways of protonated peptides, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 17774–17789. <https://doi.org/10.1021/ja805074d>.
- [49] S. Wiese, K.A. Reidegeld, H.E. Meyer, B. Warscheid, Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research, *Proteomics.* 7 (2007) 340–350. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600422>.
- [50] C. Evans, J. Noirel, S.Y. Ow, M. Salim, A.G. Pereira-Medrano, N. Couto, J. Pandhal, D. Smith, T.K. Pham, E. Karunakaran, X. Zou, C.A. Biggs, P.C. Wright, An insight into iTRAQ: Where do we stand now?, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 1011–1027. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5918-6>.
- [51] J.R. Barr, V.L. Maggio, D.G. Patterson, G.R. Cooper, L.O. Henderson, W.E. Turner, S.J. Smith, W.H. Hannon, L.L. Needham, E.J. Sampson, Isotope dilution-mass spectrometric quantification of specific proteins: Model application with apolipoprotein, *Clin. Chem.* 42 (1996) 1676–1682. <https://doi.org/10.1093/clinchem/42.10.1676>.
- [52] F. Burlina, S. Sagan, G. Bolbach, G. Chassaing, A direct approach to quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides using MALDI-TOF mass spectrometry, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 200–205. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.30>.
- [53] F. Burlina, S. Sagan, G. Bolbach, G. Chassaing, Quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides by MALDI-TOF mass spectrometry, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44 (2005) 4244–4247. <https://doi.org/10.1002/anie.200500477>.
- [54] D. Paramelle, G. Subra, L.L. Vezenkov, M. Maynadier, C. André, C. Enjalbal, M. Calmès, M. Garcia, J. Martinez, M. Amblard, A straightforward approach for cellular-uptake quantification, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 49 (2010) 8240–8243. <https://doi.org/10.1002/anie.201003347>.
- [55] R.M.C. Peggi M. Angel, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Imaging Mass Spectrometry: In Situ Molecular Mapping, *Biochemistry.* 52 (2013). <https://doi.org/10.1021/bi301519p.Matrix-Assisted>.
- [56] P.J. Todd, T. Gregory Schaaff, P. Chaurand, R.M. Caprioli, Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 355–369. <https://doi.org/10.1002/jms.153>.

- [57] R.M. Caprioli, T.B. Farmer, J. Gile, Molecular Imaging of Biological Samples : Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4751–4760. <https://doi.org/10.1021/ac970888i>.
- [58] L.K. Schnackenberg, D.A. Thorn, D. Barnette, E.E. Jones, MALDI imaging mass spectrometry: an emerging tool in neurology, *Metab. Brain Dis.* 37 (2022) 105–121. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00797-2>.
- [59] N. Ogrinc, P. Saudemont, J. Balog, Y.M. Robin, J.P. Gimeno, Q. Pascal, D. Tierny, Z. Takats, M. Salzet, I. Fournier, Water-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for minimally invasive in vivo and real-time surface analysis using SpiderMass, *Nat. Protoc.* 14 (2019) 3162–3182. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0217-8>.
- [60] N. Ogrinc, P.D. Caux, Y.M. Robin, E. Bouchaert, B. Fatou, M. Ziskind, C. Focsa, D. Bertin, D. Tierny, Z. Takats, M. Salzet, I. Fournier, Direct Water-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Lipidomic Analysis and Classification of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Sarcoma Tissues without Dewaxing, *Clin. Chem.* 67 (2021) 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab160>.
- [61] Y. Aoki, A. Toyama, T. Shimada, T. Sugita, C. Aoki, Y. Umino, A. Suzuki, D. Aoki, Y. Daigo, Y. Nakamura, T.-A. Sato, A novel method for analyzing formalin-fixed paraffin embedded ( FFPE ) tissue sections by mass spectrometry imaging, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* 83 (2007) 205–214. <https://doi.org/10.2183/pjab/83.205>.
- [62] E.L. Gill, R.A. Yost, V. Vedam-Mai, T.J. Garrett, Precast Gelatin-Based Molds for Tissue Embedding Compatible with Mass Spectrometry Imaging, *Anal. Chem.* 89 (2016) 576–580. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04185>.
- [63] A.F.M. Altelaar, J. Van Minnen, C.R. Jime, R.M.A. Heeren, Direct Molecular Imaging of *Lymnaea stagnalis* Nervous Tissue at Subcellular Spatial Resolution by Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 735–741. <https://doi.org/10.1021/ac048329g>.
- [64] S.S. Dekeyser, K.K. Kutz-naber, J.J. Schmidt, G.A. Barrett-, L. Li, Imaging Mass Spectrometry of Neuropeptides in Decapod Crustacean Neuronal Tissues, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 1782–1791. <https://doi.org/10.1021/pr060603v.Imaging>.
- [65] N. Desbenoit, G. Hamm, H. Liang, P. Both, A. Brunelle, I. Fournier, V. Guerineau, R. Legouffe, J. Stauber, D. Touboul, M. Wisztorski, M. Salzet, O. Laprevote, A New Safety Concern for Glaucoma Treatment Demonstrated by Mass Spectrometry Imaging of Benzalkonium Chloride Distribution in the Eye , an Experimental Study in Rabbits, *PLoS One.* 7 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050180>.
- [66] P. Novák, F. Kaftan, M. Volný, J. Strohalm, K. Ulbrich, L. Krásný, M. Strohalm, V. Havlíček, Poly[ N -(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-Based Tissue-Embedding Medium Compatible with MALDI Mass Spectrometry Imaging Experiments, *Anal. Chem.* 83 (2011) 5458–5462. <https://doi.org/10.1021/ac2011679>.
- [67] T.C. Baker, J. Han, C.H. Borchers, Recent advancements in matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry imaging, *Curr. Opin. Biotechnol.* 43 (2017) 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.09.003>.
- [68] J.G. Swales, G. Hamm, M.R. Clench, R.J.A. Goodwin, Mass spectrometry imaging and its application in pharmaceutical research and development : A concise review, *Int. J. Mass Spectrom.* 437 (2019) 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2018.02.007>.

- [69] S. Schulz, M. Becker, M.R. Groseclose, S. Schadt, C. Hopf, Advanced MALDI mass spectrometry imaging in pharmaceutical search and drug development, *Curr. Opin. Biotechnol.* 55 (2019) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.08.003>.
- [70] C.N. Ferguson, J.W.M. Fowler, J.F. Waxer, R.A. Gatti, J.A. Loo, Mass Spectrometry-Based Tissue Imaging of Small Molecules, *Adv. Mass Spectrom. Biomed. Res.* (2019). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-15950-4>.
- [71] A. Zavalin, J. Yang, K. Hayden, M. Vestal, R.M. Caprioli, M. Spectrometry, Tissue protein imaging at 1  $\mu\text{m}$  laser spot diameter for high spatial resolution and high imaging speed using transmission geometry MALDI TOF MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2016) 2337–2342. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8532-6>.Tissue.
- [72] J. Yang, P. Chaurand, J.L. Norris, N.A. Porter, M. Richard, Activity-Based Probes linked with Laser-Cleavable Mass Tags for Signal Amplification in Imaging Mass Spectrometry: Analysis of Serine Hydrolase Enzymes in Mammalian Tissue, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3689–3695. <https://doi.org/10.1021/ac300203v>.Activity-Based.
- [73] A.C. Grey, M. Tang, A. Zahraei, G. Guo, N.J. Demarais, Applications of stable isotopes in MALDI imaging: current approaches and an eye on the future, *Anal. Bioanal. Chem.* 413 (2021) 2637–2653. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03189-8>.
- [74] J.A. Barry, R. Ait-Belkacem, W.M. Hardesty, L. Benakli, C. Andonian, H. Licea-Perez, J. Stauber, S. Castellino, Multicenter Validation Study of Quantitative Imaging Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 91 (2019) 6266–6274. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01016>.
- [75] T.H. Hahm, T. Matsui, M. Tanaka, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging of Tissues via the Formation of Reproducible Matrix Crystals by the Fluorescence-Assisted Spraying Method: A Quantification Approach, *Anal. Chem.* 94 (2022) 1990–1998. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03369>.
- [76] R. LEMAIRE, J. Stauber, M. Wisztorski, C. VAN CAMP, A. DESMONS, M. DESCHAMPS, G. PROESS, I. RUDLOF, A. WOODS, R. DAY, M. Salzert, I. Fournier, Tag-Mass: Specific Molecular Imaging of Transcriptome and Proteome by Mass Spectrometry Based on Photocleavable Tag, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 2057–2067. <https://doi.org/10.1021/pr0700044>.Tag-Mass.
- [77] T. KEOUGH, R.S. YOUNGQUIST, M.. LACEY, Sulfonic Acid derivatives for Peptide sequencing by MALDI-MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 156–165. <https://doi.org/10.1021/ac031274i>.
- [78] A. Pashkova, E. Moskovets, B.L. Karger, H. Avenue, Coumarin Tags for Improved Analysis of Peptides by MALDI-TOF MS and MS / MS . 1 . Enhancement in MALDI MS Signal Intensities, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4550–4557. <https://doi.org/10.1021/ac049638+>.
- [79] M.W. Patabandige, L.D. Pfeifer, H.T. Nguyen, H. Desaire, Quantitative clinical glycomics strategies: A guide for selecting the best analysis approach, *Mass Spectrom. Rev.* (2021). <https://doi.org/10.1002/mas.21688>.
- [80] T. Nishikaze, Sialic acid derivatization for glycan analysis by mass spectrometry, *Proc. JAPAN Acad. Ser. B-PHYSICAL Biol. Sci.* 95 (2019) 523–537. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.036>.
- [81] T. Abe, A. Kameyama, S. Natsuka, N. Suzuki, Sequential modifications of glycans by linkage-specific alkylamidation of sialic acids and permethylation, *Anal. Biochem.* 606 (2020) 113861. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113861>.
- [82] N. de Haan, S. Yang, J. Cipollo, M. Wuhrer, Glycomics studies using sialic acid derivatization and mass



spectrometry, *Nat. Rev. Chem.* 4 (2020) 229–242. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-0174-3>.

- [83] L. Wang, L. Yang, Y. Zhang, H. Lu, Dual isotopic labeling combined with fluoruous solid-phase extraction for simultaneous discovery of neutral/sialylated N-glycans as biomarkers for gastric cancer, *Anal. Chim. Acta.* 1104 (2020) 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.01.003>.
- [84] S. Škulj, M. Rožman, Study of the gas-phase fragmentation behaviour of sulfonated peptides, *Int. J. Mass Spectrom.* 391 (2015) 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2015.07.023>.
- [85] M. Uueki, MIYUKI Yamaguchi, Enhanced detection of sulfo-peptides as onium salts in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2006) 1457–1466. <https://doi.org/10.1002/rcm.2480>.
- [86] S. Cantel, L. Brunel, K. Ohara, C. Enjalbal, J. Martinez, J.-J. Vasseur, M. Smietana, An innovative strategy for sulfopeptides analysis using MALDI-TOF MS reflectron positive ion mode, *Proteomics.* 12 (2012) 2247–2257. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100525>.
- [87] X. Gao, X. BI, J. WEI, Z. PENG, H. Liu, Y. Jiang, W. WEI, Z. CAI, N-phosphorylation labeling for analysis of twenty natural amino acids and small peptides by using matrix- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Analyst.* 138 (2013) 2632–2639. <https://doi.org/10.1039/c3an00036b>.
- [88] V. Blagojevic, N. Zhidkov, S. Tharmaratnam, V.T. Pham, H. Kaplan, D.K. Bohme, Peptide quantitation with methyl iodide isotopic tags and mass spectrometry, *Analyst.* 135 (2010) 1456–1460. <https://doi.org/10.1039/c0an00003e>.
- [89] A.P. Topolyan, M.A. Belyaeva, E.E. Bykov, P. V. Coodan, E.A. Rogozhin, D.A. Strizhevskaya, O.M. Ivanova, A. V. Ustinov, I. V. Mikhura, I.A. Prokhorenko, V.A. Korshun, A.A. Formanovsky, Derivatization of aminoglycoside antibiotics with tris(2,6-dimethoxyphenyl)carbenium Ion, *Acta Naturae.* 8 (2016) 128–135. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-3-128-135>.
- [90] D.J. Harvey, Analysis of Carbohydrates and Glycoconjugates By Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: an Update for 2015–2016, *Mass Spectrom. Rev.* 00 (2021) 1–158. <https://doi.org/10.1002/mas.21651>.
- [91] Y. Wang, Y. Cai, Y. Zhang, H. Lu, Glycan reductive amino acid coded affinity tagging (GRACAT) for highly specific analysis of N-glycome by mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 1089 (2019) 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.08.054>.
- [92] H. Zhang, X. Shi, N.Q. Vu, G. Li, Z. Li, Y. Shi, M. Li, B. Wang, N. V. Welham, M.S. Patankar, P. Weisman, L. Li, On-Tissue Derivatization with Girard's Reagent P Enhances N-Glycan Signals for Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Sections in MALDI Mass Spectrometry Imaging, *Anal. Chem.* 92 (2020) 13361–13368. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02704>.
- [93] Y. Zhang, Z. Hu, C. Zhang, B.F. Liu, X. Liu, A robust glycan labeling strategy using a new cationic hydrazide tag for MALDI-MS-based rapid and sensitive glycomics analysis, *Talanta.* 219 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121356>.

- [94] Z. Song, H. Gao, W. Xie, Q. Sun, K. Liang, Y. Li, Quantitative MALDI-MS assay of steroid hormones in plasma based on hydroxylamine derivatization, *Anal. Biochem.* 616 (2021) 114089. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.114089>.
- [95] T. Ito, M. Hiramoto, Use of mTRAQ derivatization reagents on tissues for imaging neurotransmitters by MALDI imaging mass spectrometry: the triple spray method, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 6847–6856. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02052-1>.
- [96] S. Guo, W. Tang, Y. Hu, Y. Chen, A. Gordon, B. Li, P. Li, Enhancement of On-tissue Chemical Derivatization by Laser-Assisted Tissue Transfer for MALDI MS Imaging, *Anal. Chem.* 92 (2020) 1431–1438. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04618>.
- [97] C. Sun, W. Liu, Y. Geng, X. Wang, On-Tissue Derivatization Strategy for Mass Spectrometry Imaging of Carboxyl-Containing Metabolites in Biological Tissues, *Anal. Chem.* 92 (2020) 12126–12131. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02303>.
- [98] A. Fülöp, T. Bausbacher, S. Rizzo, Q. Zhou, H. Gillandt, C. Hopf, M. Rittner, New Derivatization Reagent for Detection of free Thiol-groups in Metabolites and Proteins in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging, *Anal. Chem.* 92 (2020) 6224–6228. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05630>.
- [99] Q. Zhou, A. Fülöp, C. Hopf, Recent developments of novel matrices and on-tissue chemical derivatization reagents for MALDI-MSI, *Anal. Chim. Acta.* 342 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03023-7>.
- [100] C. Harkin, K.W. Smith, F.L. Cruickshank, C. Logan Mackay, B. Flinders, R.M.A. Heeren, T. Moore, S. Brockbank, D.F. Cobice, On-tissue chemical derivatization in mass spectrometry imaging, *Mass Spectrom. Rev.* (2021) 1–33. <https://doi.org/10.1002/mas.21680>.
- [101] A. Kameyama, Y. Kaneda, H. Yamanaka, H. Yoshimine, H. Narimatsu, Y. Shinohara, Detection of oligosaccharides labeled with cyanine dyes using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4537–4542. <https://doi.org/10.1021/ac049897z>.
- [102] R. Watanabe, Y. Hu, K. Iio, K. Yoneda, A. Hattori, A. Arai, H. Kigoshi, M. Kita, Specific protein-labeling and ligand-binding position analysis with amidopyrene probes as LDI MS tags, *Org. Biomol. Chem.* 16 (2018) 7883–7890. <https://doi.org/10.1039/c8ob02222d>.
- [103] B. Salovska, A. Tichy, M. Rezacova, J. Vavrova, E. Novotna, Enrichment strategies for phosphoproteomics : State-of-the-art, *Rev. Anal. Chem.* 31 (2012) 29–41. <https://doi.org/10.1515/revac-2011-0025>.
- [104] L.G. Puente, R.E.C. Lee, L.A. Megeney, Chemical Tagging Strategies for Mass Spectrometry-Based Phosphoproteomics, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-834-8>.
- [105] Z. Qiao, F. Lissel, MALDI Matrices for the Analysis of Low Molecular Weight Compounds: Rational Design, Challenges and Perspectives, *Chem. - An Asian J.* 16 (2021) 868–878. <https://doi.org/10.1002/asia.202100044>.
- [106] Z.N. Qin, Q.W. Yu, P. Zhou, Y.Q. Feng, C60-based chemical labeling strategy for the determination of polyamines in biological samples using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Talanta.* 224 (2021) 121790. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121790>.
- [107] P. Wu, H.M. Xiao, J. Ding, Q.Y. Deng, F. Zheng, Y.Q. Feng, Development of C60-based labeling reagents for the determination of low-molecular-weight compounds by matrix assisted laser desorption ionization mass (I):

Determination of amino acids in microliter biofluids, *Anal. Chim. Acta.* 960 (2017) 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.018>.

- [108] D. Chen, J. Han, J. Yang, D. Schibli, Z. Zhang, C.H. Borchers, Supermolecule-assisted imaging of low-molecular-weight quaternary-ammonium compounds by MALDI-MS of their non-covalent complexes with cucurbit[7]uril, *RSC Adv.* 10 (2020) 34261–34265. <https://doi.org/10.1039/d0ra04604c>.
- [109] F. Tang, S.Y. Cen, H. He, Y. Liu, B.F. Yuan, Y.Q. Feng, Peptidylation for the determination of low-molecular-weight compounds by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Analyst.* 141 (2016) 3259–3265. <https://doi.org/10.1039/c6an00604c>.
- [110] K. Horatz, M. Giampà, Y. Karpov, K. Sahre, H. Bednarz, A. Kiriya, B. Voit, K. Niehaus, N. Hadjichristidis, D.L. Michels, F. Lissel, Conjugated Polymers as a New Class of Dual-Mode Matrices for MALDI Mass Spectrometry and Imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 11416–11423. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b06637>.
- [111] W.H. Müller, A. Verdin, E. De Pauw, C. Malherbe, G. Eppe, Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging: A review, *Mass Spectrom. Rev.* (2020) 1–48. <https://doi.org/10.1002/mas.21670>.
- [112] S.W. Kim, S. Kwon, Y.K. Kim, Graphene oxide derivatives and their nanohybrid structures for laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of small molecules, *Nanomaterials.* 11 (2021) 1–19. <https://doi.org/10.3390/nano11020288>.
- [113] P. Luo, L. Wang, L. Jiang, J. Sun, Y. Li, H. Liu, C. Xiong, Z. Nie, Application of Graphdiyne in Surface-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 13 (2021) 1914–1920. <https://doi.org/10.1021/acscami.0c18280>.
- [114] Y. Li, P. Luo, X. Cao, H. Liu, J. Wang, J. Wang, L. Zhan, Z. Nie, Enhancing surface-Assisted laser desorption ionization mass spectrometry performance by integrating plasmonic hot-electron transfer effect through surface modification, *Chem. Commun.* 55 (2019) 5769–5772. <https://doi.org/10.1039/c9cc02541c>.
- [115] S.A. Iakab, P. Ràfols, M. Tajés, X. Correig-Blanchar, M. García-Altares, Gold Nanoparticle-Assisted Black Silicon Substrates for Mass Spectrometry Imaging Applications, *ACS Nano.* 14 (2020) 6785–6794. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c00201>.
- [116] X.N. Wang, W. Tang, A. Gordon, H.Y. Wang, L. Xu, P. Li, B. Li, Porous TiO<sub>2</sub> Film Immobilized with Gold Nanoparticles for Dual-Polarity SALDI MS Detection and Imaging, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 12 (2020) 42567–42575. <https://doi.org/10.1021/acscami.0c12949>.
- [117] J. Kratochvíl, V. Prýsiazny, F. Dyčka, O. Kylián, P. Kúš, P. Sezemský, J. Štěrbá, V. Straňák, Gas aggregated Ag nanoparticles as the inorganic matrix for laser desorption/ionization mass spectrometry, *Appl. Surf. Sci.* 541 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.148469>.
- [118] Y. Chen, A. Huang, L. Zhang, Z. Bie, Crystalline MOF nanofilm-based SALDI-MS array for determination of small molecules, *Microchim. Acta.* 187 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04310-x>.
- [119] L. Chen, J. Ou, H. Wang, Z. Liu, M. Ye, H. Zou, Tailor-Made Stable Zr(IV)-Based Metal-Organic Frameworks for Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Analysis of Small Molecules and Simultaneous Enrichment of Phosphopeptides, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 20292–20300. 263

- [120] S.G. Musharraf, A. Bibi, N. Shahid, M. Najam-ul-Haq, N. Ambreen, M. Khan, K.M. Khan, M.I. Choudhary, A. ur Rahman, Benzimidazole, coumrandione and flavone derivatives as alternate UV laser desorption ionization (LDI) matrices for peptides analysis, *Chem. Cent. J.* 7 (2013) 1–13. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-77>.
- [121] C.D. Calvano, A. Monopoli, T.R.I. Cataldi, F. Palmisano, MALDI matrices for low molecular weight compounds: an endless story?, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 4015–4038. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1014-x>.
- [122] X.L. Hronowski, Y. Wang, Z. Susic, R. Wei, On-MALDI-Target N-Glycan Nonreductive Amination by 2-Aminobenzoic Acid, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10252–10256. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01748>.
- [123] M.S. Slyundina, N.Y. Polovkov, R.S. Borisov, V.G. Zaikin, Tryptamine: a Reactive Matrix for MALDI Mass Spectrometry, *J. Anal. Chem.* 72 (2017) 1295–1299. <https://doi.org/10.1134/S106193481713010X>.
- [124] R. Shariatgorji, A. Nilsson, N. Strittmatter, T. Vallianatou, X. Zhang, P. Svenningsson, R.J.A. Goodwin, P.E. Andrén, Bromopyrylium Derivatization Facilitates Identification by Mass Spectrometry Imaging of Monoamine Neurotransmitters and Small Molecule Neuroactive Compounds, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 31 (2020) 2553–2557. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00166>.
- [125] J.R. Hauser, E.T. Bergström, A.N. Kulak, S.L. Warriner, J. Thomas-Oates, R.S. Bon, Pyrene Tags for the Detection of Carbohydrates by Label-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry, *ChemBioChem.* 22 (2020) 1430–1439. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000721>.
- [126] M. Shariatgorji, A. Nilsson, E. Fridjonsdottir, T. Vallianatou, Comprehensive mapping of neurotransmitter networks by MALDI – MS imaging, *Nat. Methods.* (2018) 1–38.
- [127] I. Kaya, S.M. Brülls, J. Dunevall, E. Jennische, S. Lange, J. Martensson, A.G. Ewing, P. Malmberg, J.S. Fletcher, On-Tissue Chemical Derivatization of Catecholamines Using 4-(N-Methyl)pyridinium Boronic Acid for ToF-SIMS and LDI-ToF Mass Spectrometry Imaging, *Anal. Chem.* 90 (2018) 13580–13590. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03746>.
- [128] D. Lascoux, D. Paramelle, G. Subra, M. Heymann, C. Geourjon, J. Martinez, E. Forest, Discrimination and selective enhancement of signals in the MALDI mass spectrum of a protein by combining a matrix-based label for lysine residues with a neutral matrix, *Angew. Chemie.* 46 (2007) 5594–5597. <https://doi.org/10.1002/anie.200700811>.
- [129] D. Paramelle, S. Cantel, C. Enjalbal, M. Amblard, E. Forest, M. Heymann, C. Geourjon, J. Martinez, G. Subra, A new generation of cross-linkers for selective detection by MALDI MS, *Proteomics.* 9 (2009) 5384–5388. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900562>.
- [130] M. Rossato, G. Miralles, C. M’Kadmi, M. Maingot, M. Amblard, B. Mouillac, D. Gagne, J. Martinez, G. Subra, C. Enjalbal, S. Cantel, Quantitative MALDI-MS Binding Assays: An Alternative to Radiolabeling, *ChemMedChem.* 11 (2016) 2582–2587. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600447>.
- [131] L. Ling, C. Xiao, Y. Ma, L. Jiang, S. Wang, L. Guo, S. Jiang, X. Guo, 2-Phenyl-3-(p-aminophenyl) Acrylonitrile: A Reactive Matrix for Sensitive and Selective Analysis of Glycans by MALDI-MS, *Anal. Chem.* 91 (2019) 8801–8807.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01434>.

- [132] K.G. Stevens, T.L. Pukala, Conjugating immunoassays to mass spectrometry: Solutions to contemporary challenges in clinical diagnostics, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 132 (2020) 116064. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116064>.
- [133] N. Kang, J.-M. Lee, A. Jeon, H. Bin Oh, B. Moon, Design and synthesis of new mass tags for matrix-free laser desorption ionization mass spectrometry (LDI-MS) based on 6,11-dihydrothiochromeno[4,3-b]indole, *Tetrahedron*. 72 (2016) 5612–5619. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2016.07.052>.
- [134] M.B. Lorey, B. Adler, H. Yan, R. Soliymani, S. Ekström, J. Yli-kauhaluoma, T. Laurell, M.H. Baumann, Mass-tag enhanced immuno-LDI mass spectrometry for sensitive detection of intact protein antigens, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5255–5262. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00304>.
- [135] G. Thiery, E. Anselmi, A. Audebourg, E. Darii, M. Abarbri, B. Terris, J.C. Tabet, I.G. Gut, Improvements of Targeted multiplex mass spectrometry Imaging, *Proteomics*. 8 (2008) 3725–3734. <https://doi.org/10.1002/pmic.200701150>.
- [136] Y.H. Cheng, T.S.C. Tam, S.L. Chau, S.K.M. Lai, H.W. Tang, C.N. Lok, C.W. Lam, K.M. Ng, Plasmonic gold nanoparticles as multifaceted probe for tissue imaging, *Chem. Commun.* 55 (2019) 2761–2764. <https://doi.org/10.1039/c9cc00356h>.
- [137] Y. Cheng, Y. Cheung, T. Siu-Chung Tam, C. Lok, H. Sun, K. Ng, Plasmonic metal nanoparticles as efficient mass tags for ion signal amplification and ultrasensitive detection of protein markers, *Anal. Chim. Acta.* 1055 (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.057>.
- [138] N.K. Ham T. S., Cheng Y. H., LOK C., Au-Yeung H. Y., Ni W., Wei X., Surface optimization of gold nanoparticle mass tags for the sensitive detection of protein biomarkers via immuno-capture LI- MS, *Analyst*. 145 (2020) 6237–6242. <https://doi.org/10.1039/D0AN01121E>.
- [139] Y. Wang, K. Zhang, X. Huang, L. Qiao, B. Liu, Mass Spectrometry Imaging of Mass Tag Immunoassay Enables the Quantitative Profiling of Biomarkers from Dozens of Exosomes, *Anal. Chem.* 93 (2021) 709–714. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03904>.
- [140] Y. Wang, X. Han, Z. Li, J. Xie, Rapid detection of insulin by immune-enrichment with silicon-nanoparticle-assisted MALDI-TOF MS, *Anal. Biochem.* 577 (2019) 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.04.010>.
- [141] L.E. Edgington, M. Verdoes, M. Bogyo, Functional imaging of proteases: Recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15 (2011) 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.10.012>.
- [142] L. Wang, K. Main, H. Wang, O. Julien, A. Dufour, Biochemical Tools for Tracking Proteolysis, *J. Proteome Res.* 20 (2021) 5264–5279. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00289>.
- [143] L.E. Sanman, M. Bogyo, Activity-based profiling of proteases, *Annu. Rev. Biochem.* 83 (2014) 249–273. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035352>.
- [144] H.J. Bennis, C.J. Wincott, E.W. Tate, M.A. Child, Activity- and reactivity-based proteomics: Recent technological

advances and applications in drug discovery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 60 (2021) 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.06.011>.

- [145] F. Faucher, J.M. Bennett, M. Bogyo, S. Lovell, Strategies for Tuning the Selectivity of Chemical Probes that Target Serine Hydrolases, *Cell Chem. Biol.* 27 (2020) 937–952. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.07.008>.
- [146] M.J. Evans, B.F. Cravatt, Mechanism-based profiling of enzyme families, *Chem. Rev.* 106 (2006) 3279–3301. <https://doi.org/10.1021/cr050288g>.
- [147] A.E. Speers, G.C. Adam, B.F. Cravatt, Activity-based protein profiling in vivo using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4686–4687. <https://doi.org/10.1021/ja034490h>.
- [148] H. Deng, Q. Lei, Y. Wu, Y. He, W. Li, Activity-based protein profiling: Recent advances in medicinal chemistry, *Eur. J. Med. Chem.* 191 (2020) 112151. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112151>.
- [149] Y. Liu, M.P. Patricelli, B.F. Cravatt, Activity-based protein profiling: The serine hydrolases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 14694–14699. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14694>.
- [150] S.K. Hatzios, S. Abel, J. Martell, T. Hubbard, J. Sasabe, D. Munera, L. Clark, D.A. Bachovchin, F. Qadri, E.T. Ryan, B.M. Davis, E. Weerapana, M.K. Waldor, Chemoproteomic profiling of host and pathogen enzymes active in cholera, *Nat. Chem. Biol.* 12 (2016) 268–274. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2025>.
- [151] C.S. Lentz, J.R. Sheldon, L.A. Crawford, R. Cooper, M. Garland, M.R. Amieva, E. Weerapana, eric P. Skaar, M. Bogyo, Identification of a *S. aureus* virulence factor by activity-based protein profiling (ABPP), *Nat. Chem. Biol.* 14 (2018) 609–617. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0060-1.Identification>.
- [152] A.L. Chen, K.M. Lum, P.L. Gonzalez, D. Ogasawara, A.B. Cognetta, A. To, W.H. Parsons, G.M. Simon, A. Desai, M. Petrascheck, L. Bar-Peled, B.F. Cravatt, Pharmacological convergence reveals a lipid pathway that regulates *C. elegans* lifespan, *Nat. Chem. Biol.* 15 (2019) 453–462. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0243-4.Pharmacological>.
- [153] D. Ogasawara, T. Aki-Ichu, V. Vartabedian, J. Benthuisen, H. Jing, A. Reed, O. Ulanovskaya, J.J. Hulce, A. Roberts, S. Brown, H. Rosen, J.R. Teijaro, B.F. Cravatt, Selective blockade of the lyso-PS lipase ABHD12 stimulates immune responses in vivo, *Nat. Chem. Biol.* 14 (2018) 1099–1108. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0155-8.Selective>.
- [154] C. Wang, D. Abegg, B.G. Dwyer, A. Adibekian, Discovery and Evaluation of New Activity-Based Probes for Serine Hydrolases, *ChemBioChem.* 20 (2019) 2212–2216. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900126>.
- [155] K. Otrubova, S. Chatterjee, S. Ghimire, B.F. Cravatt, D.L. Boger, N-Acyl pyrazoles: effective and tunable inhibitors of serine hydrolases, *Bioorganic Med. Chem.* 27 (2019) 1693–1703. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.03.020.N-Acyl>.
- [156] A.F. Kornahrens, A.B. Cognetta, D.M. Brody, M.L. Matthews, B.F. Cravatt, D.L. Boger, Design of Benzoxathiazin-3-one 1,1-Dioxides as a New Class of Irreversible Serine Hydrolase Inhibitors: Discovery of a Uniquely Selective PNPLA4 Inhibitor, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 7052–7061. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b02985>.
- [157] M. Garland, C.J. Schulze, I.T. Foe, W.A. Van Der Linden, M.A. Child, M. Bogyo, Development of an activity-based probe for acyl-protein thioesterases, *PLoS One.* 13 (2018). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190255>.

- [158] L.A.R. Carvalho, E.F.P. Ruivo, S.D. Lucas, R. Moreira, Activity-based probes as molecular tools for biomarker discovery, *Medchemcomm.* 6 (2015) 536–546. <https://doi.org/10.1039/c4md00417e>.
- [159] G. Blum, S.R. Mullins, K. Keren, M. Fonovič, C. Jedeszko, M.J. Rice, B.F. Sloane, M. Bogyo, Dynamic Imaging of Protease Activity With Fluorescently Quenched Activity-Based Probes, *Nat. Chem. Biol.* 1 (2005) 203–209. <https://doi.org/10.1038/nchembio728>.
- [160] V. Lyo, F. Cattaruzza, T.N. Kim, A.W. Walker, M. Paulick, D. Cox, J. Cloyd, J. Buxbaum, J. Ostroff, M. Bogyo, E.F. Grady, N.W. Bunnett, K.S. Kirkwood, Active cathepsins B, L, and S in murine and human pancreatitis, *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 303 (2012) 894–903. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00073.2012>.
- [161] M.A. Chowdhury, I.A. Moya, S. Bhilocha, C.C. McMillan, B.G. Vigliarolo, I. Zehbe, C.P. Phenix, Prodrug-inspired probes selective to cathepsin B over other cysteine cathepsins, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 6092–6104. <https://doi.org/10.1021/jm500544p>.
- [162] D. Greenbaum, K.F. Medzihradzsky, A. Burlingame, M. Bogyo, Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools, *Chem. Biol.* 7 (2000) 569–581. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00014-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00014-4).
- [163] M. Fonovič, M. Bogyo, Activity-based probes as a tool for functional proteomic analysis of proteases, *Expert Rev. Proteomics.* 5 (2008) 721–730. <https://doi.org/10.1586/14789450.5.5.721>.
- [164] M.G. Paulick, M. Bogyo, Development of activity-based probes for cathepsin X, *Chem. Biol.* 6 (2011) 563–572. <https://doi.org/10.1021/cb100392r>.Development.
- [165] D.A. Shannon, E. Weerapana, Covalent protein modification: The current landscape of residue-specific electrophiles, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 24 (2015) 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.10.021>.
- [166] S. Kumar, Caspase function in programmed cell death, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 32–43. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402060>.
- [167] L.E. Edgington, A.B. Berger, G. Blum, V.E. Albrow, M.G. Paulick, N. Lineberry, M. Bogyo, Noninvasive optical imaging of apoptosis by caspase-targeted activity-based probes, *Nat. Med.* 15 (2009) 967–973. <https://doi.org/10.1038/nm.1938>.
- [168] A.B. Berger, M.D. Witte, J.B. Denault, A.M. Sadaghiani, K.M.B. Sexton, G.S. Salvesen, M. Bogyo, Identification of Early Intermediates of Caspase Activation Using Selective Inhibitors and Activity-Based Probes, *Mol. Cell.* 23 (2006) 509–521. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.021>.
- [169] A. David, D. Steer, S. Bregant, L. Devel, A. Makaritis, F. Beau, A. Yiotakis, V. Dive, Cross-linking yield variation of a potent matrix metalloproteinase photoaffinity probe and consequences for functional proteomics, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 3275–3277. <https://doi.org/10.1002/anie.200604408>.
- [170] J. Wang, Q. Chen, Y. Shan, X. Pan, J. Zhang, Activity-Based Proteomic Profiling: The Application of Photoaffinity Probes in the Target Identification of Bioactive molecules, *Trends Anal. Chem.* 115 (2019) 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.028>.
- [171] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B.F. Cravatt, Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004). <https://doi.org/10.1073/pnas.0402784101>.

- [172] C. Nury, B. Czarny, E. Cassar-Lajeunesse, D. Georgiadis, S. Bregant, V. Dive, A Pan Photoaffinity Probe for Detecting Active Forms of Matrix Metalloproteinases, *ChemBioChem*. 14 (2013) 107–114. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200583>.
- [173] Q. Zhu, A. Girish, S. Chattopadhyaya, S.Q. Yao, Developing novel activity-based fluorescent probes that target different classes of proteases, *Chem. Commun.* 4 (2004) 1512–1513. <https://doi.org/10.1039/b404471a>.
- [174] C. Forbes, Q. Shi, J.F. Fisher, M. Lee, D. Heseck, L.I. Llarrull, M. Toth, M. Gossing, R. Fridman, S. Mobashery, Active Site Ring-Opening of a Thiirane Moiety and Picomolar Inhibition of Gelatinases, *Chem. Biol. Drug Des.* 74 (2009) 527–534. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00881.x>.Active.
- [175] S.A. Testero, C. Granados, D. Fernández, P. Gallego, G. Covalada, D. Reverter, J. Vendrell, F.X. Avilés, I. Pallarès, S. Mobashery, Discovery of Mechanism-Based Inactivators for Human Pancreatic Carboxypeptidase A from a Focused Synthetic Library, *ACS Med. Chem. Lett.* 8 (2017) 1122–1127. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00346>.
- [176] M. Morell, T. Nguyen Duc, A.L. Willis, S. Syed, J. Lee, E. Deu, Y. Deng, J. Xiao, B.E. Turk, J.R. Jessen, S.J. Weiss, M. Bogoy, Coupling protein engineering with probe design to inhibit and image matrix metalloproteinases with controlled specificity, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 9139–9148. <https://doi.org/10.1021/ja403523p>.
- [177] S. Sakamoto, I. Hamachi, Recent progress in chemical modification of proteins, *Anal. Sci.* 35 (2018) 5–27. <https://doi.org/10.2116/analsci.18R003>.
- [178] T. Tamura, Y. Kioi, T. Miki, S. Tsukiji, I. Hamachi, Fluorophore labeling of native FKBP12 by ligand-directed tosyl chemistry allows detection of its molecular interactions in vitro and in living cells, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 6782–6785. <https://doi.org/10.1021/ja401956b>.
- [179] T. Miki, S.H. Fujishima, K. Komatsu, K. Kuwata, S. Kiyonaka, I. Hamachi, LDAO-based chemical labeling of intact membrane proteins and its pulse-chase analysis under live cell conditions, *Chem. Biol.* 21 (2014) 1013–1022. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.07.013>.
- [180] Y. Takaoka, Y. Nishikawa, Y. Hashimoto, K. Sasaki, I. Hamachi, Ligand-directed dibromophenyl benzoate chemistry for rapid and selective acylation of intracellular natural proteins, *Chem. Sci.* 6 (2015) 3217–3224. <https://doi.org/10.1039/c5sc00190k>.
- [181] K. Matsuo, Y. Nishikawa, M. Masuda, I. Hamachi, Live-Cell Protein Sulfonation Based on Proximity-driven N-Sulfonyl Pyridone Chemistry, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 57 (2018) 659–662. <https://doi.org/10.1002/anie.201707972>.
- [182] T. Tamura, T. Ueda, T. Goto, T. Tsukidate, Y. Shapira, Y. Nishikawa, A. Fujisawa, I. Hamachi, Rapid labelling and covalent inhibition of intracellular native proteins using ligand-directed N-Acyl-N-Alkyl sulfonamide, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04343-0>.
- [183] J. GROSS, C.M. LAPIERE, Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48 (1962) 1014–1022. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.6.1014>.
- [184] L.C. Chen, M.E. Noelken, H. Nagase, Disruption of the Cysteine-75 and Zinc Ion Coordination Is Not Sufficient To Activate the Precursor of Human Matrix Metalloproteinase 3 (Stromelysin 1), *Biochemistry.* 32 (1993) 10289–10295. <https://doi.org/10.1021/bi00090a003>.



- [185] N. Borkakot, F.K. Winkler, D.H. Williams, A. D'arcy, M.J. Broadhurst, P.A. Brown, W.H. Johnson, E.J. Murray, Structure of the catalytic domain of human fibroblast collagenase complexed with an inhibitor, *Nat. Struct. Biol.* 1 (1994) 106–110. <https://doi.org/10.1038/nsb0294-106>.
- [186] A. Tokito, M. Jougasaki, Matrix metalloproteinases in non-neoplastic disorders, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17071178>.
- [187] M.I. Mmpis, L. Rangasamy, B. Di Geronimo, I. Ort, C. Coderch, A. Ramos, B. De Pascual-teresa, Molecular Imaging Probes Based on Matrix, *Molecules.* 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24162982>.
- [188] F.X. Gomiz-Rüth, Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 15353–15357. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800069200>.
- [189] W. Stöcker, F. Grams, P. Reinemer, W. Bode, U. Baumann, F. -X Gomis-Rüth, D.B. McKay, The metzincins — Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases, *Protein Sci.* 4 (1995) 823–840. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040502>.
- [190] R.E. Vandenbroucke, C. Libert, Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 904–927. <https://doi.org/10.1038/nrd4390>.
- [191] E. Madzharova, P. Kastl, F. Sabino, U. auf dem Keller, Post-translational modification-dependent activity of matrix metalloproteinases, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms20123077>.
- [192] H.J. Ra, W.C. Parks, Control of matrix metalloproteinase catalytic activity, *Matrix Biol.* 26 (2007) 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.07.001>.
- [193] E.A. Bauer, M.D. Eisen, J.J. Jeffrey, Regulation of vertebrate collagenase activity in vivo and in vitro, *J. Investig. Dermatology.* 59 (1972). <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12625767>.
- [194] K. Brew, D. Dinakarpanian, H. Nagase, Tissue inhibitors of metalloproteinases : evolution , structure and functions, *Biochim. Biophys. Acta.* 1477 (2000) 267–283.
- [195] D.P. Jayawardena, N.P. Kulkarni, S.E. Gill, The role of tissue inhibitors of metalloproteinases in microvascular endothelial cell barrier dysfunction during sepsis, *Met. Med.* 6 (2019) 1–12.
- [196] G.A. Cabral-pacheco, I. Garza-veloz, C.C. Rosa, N. Martinez-avila, M.L. Martinez-fierro, The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>.
- [197] C.E. Brinckerhoff, L.M. Matrisian, Matrix metalloproteinases: A tail of a frog that became a prince, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 (2002) 207–214. <https://doi.org/10.1038/nrm763>.
- [198] Z. Piperigkou, K. Kyriakopoulou, C. Koutsakis, S. Mastronikolis, N.K. Karamanos, Key Matrix Remodeling Enzymes : Functions and Targeting in Cancer, *Cancers (Basel).* 13 (2021) 1–32. <https://doi.org/10.3390/cancers13061441>.
- [199] J.L. Johnson, S.J. George, A.C. Newby, C.L. Jackson, Divergent effects of matrix metalloproteinases 3 , 7 , 9 , and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005). <https://doi.org/10.1073/pnas.0506201102>.
- [200] V. Lagente, E. Boichot, Role of matrix metalloproteinases in the in fl ammatory process of respiratory diseases,

- [201] L.G.N. De Almeida, H. Thode, Y. Eslambolchi, S. Chopra, D. Young, S. Gill, L. Devel, A. Dufour, Matrix Metalloproteinases : From Molecular Mechanisms to Physiology , Pathophysiology , and, Pharmacol. Rev. 74 (2022) 712–768. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000349>.
- [202] R. Chaudhuri, C. Mcsharry, J. Brady, I. Donnelly, C. Grierson, S. McGuinness, L. Jolly, C.J. Weir, C.M. Messow, M. Spears, G. Miele, K. Nocka, D. Crowther, J. Thompson, M. Brannigan, J. Lafferty, M. Sproule, W. Macnee, M. Connell, J.T. Murchison, M.C. Shepherd, G. Feuerstein, D.K. Miller, N.C. Thomson, Sputum matrix metalloproteinase-12 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma: Relationship to disease severity, J. Allergy Clin. Immunol. 129 (2012) 655–663. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.996>.
- [203] W. Li, J. Li, Y. Wu, F. Rancati, S. Vallese, L. Raveglia, J. Wu, R. Hotchandani, N. Fuller, K. Cunningham, P. Morgan, S. Fish, R. Krykbaev, X. Xu, S. Tam, S.J. Goldman, W. Abraham, C. Williams, J. Sypek, T.S. Mansour, Identification of an Orally Efficacious Matrix Metalloprotease 12 Inhibitor for Potential Treatment of Asthma, J. Med. Chem. 52 (2009) 5408–5419. <https://doi.org/10.1021/jm900809r>.
- [204] S. Moz, A. Aita, D. Basso, R. Ramonda, M. Plebani, L. Punzi, Spondyloarthritis : Matrix Metalloproteinases Biomarkers of Pathogenesis and Response to Tumor Necrosis Factor ( TNF ) Inhibitors, Int. J. Mol. Sci. 18 (2017). <https://doi.org/10.3390/ijms18040830>.
- [205] B. Czarny, E.A. Stura, L. Devel, L. Vera, E. Cassar-Lajeunesse, F. Beau, V. Calderone, M. Fragai, C. Luchinat, V. Dive, Molecular determinants of a selective matrix metalloprotease-12 inhibitor: Insights from crystallography and thermodynamic studies, J. Med. Chem. 56 (2013) 1149–1159. <https://doi.org/10.1021/jm301574d>.
- [206] M. Kaminska, P. Bruyat, C. Malgorn, M. Doladilhe, E. Cassar-Lajeunesse, C. Fruchart Gaillard, M. De Souza, F. Beau, R. Thai, I. Correia, A. Galat, D. Georgiadis, O. Lequin, V. Dive, S. Bregant, L. Devel, Ligand-Directed Modification of Active Matrix Metalloproteases: Activity-based Probes with no Photolabile Group, Angew. Chemie - Int. Ed. 60 (2021) 18272–18279. <https://doi.org/10.1002/anie.202106117>.
- [207] M. Kaminska, New activity-based probes to detect matrix metalloproteases, Paris-Saclay, 2018.
- [208] P.R. Hansen, A. Oddo, Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis, Methods Mol. Biol. 1348 (2015) 33–50. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3>.
- [209] M. Dupré, S. Cantel, J. Martinez, C. Enjalbal, Occurrence of c-terminal residue exclusion in peptide fragmentation by ESI and MALDI tandem mass spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 23 (2012) 330–346. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0254-1>.
- [210] E.M. Hayes, A. Tsaousi, K. Di Gregoli, S.R. Jenkinson, A.R. Bond, J.L. Johnson, L. Bevan, A.C. Thomas, A.C. Newby, Classical and alternative activation and metalloproteinase expression occurs in foam cell macrophages in male and female ApoE null mice in the absence of T and B lymphocytes, Front. Immunol. 5 (2014) 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00537>.
- [211] G.P. Zeegers, R.F. Steinhoff, S.M. Weidner, R. Zenobi, Evidence for laser-induced redox reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization between cationizing agents and target plate material: a study with

polystyrene and trifluoroacetate salts, *Int. J. Mass Spectrom.* 416 (2017) 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2016.10.007>.

[212] M.E. Zorn, R.D. Gibbons, W.C. Sonzogni, Evaluation of approximate methods for calculating the limit of detection and limit of quantification, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2291–2295. <https://doi.org/10.1021/es981133b>.

[213] A.L. Gassner, J. Schappler, M. Feinberg, S. Rudaz, Derivation of uncertainty functions from validation studies in biological fluids: Application to the analysis of caffeine and its major metabolites in human plasma samples, *J. Chromatogr. A.* 1353 (2014) 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.047>.



## **Résumé de la thèse en français**

La technologie ABPP (Activity-based Probes Proteomic) consiste à analyser des protéomes à l'aide de molécules-sondes spécifiques, capables de reconnaître une ou plusieurs protéines d'intérêt. Grâce à une interaction de forte affinité avec sa cible, la sonde peut réagir et établir une liaison covalente avec la protéine en transférant un marqueur pour faciliter sa détection ou sa capture par exemple. L'ABP permet donc d'isoler ou de localiser la protéine ciblée dans un mélange complexe.

Les sondes permettant la détection d'enzymes ont été jusqu'à maintenant développés à partir d'inhibiteurs réversibles possédant un agent photo-réticulant. L'irradiation nécessaire à l'établissement d'une liaison covalente ne permet pas leur utilisation in vivo.

Le projet PROMAP vise à concevoir, synthétiser et utiliser de nouvelles sondes ciblant des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP) sans faire usage de la stratégie de photoactivation.

Les MMP constituent une famille d'enzymes très importante intervenant dans de très nombreux phénomènes physiopathologiques (cancers, cicatrisation, inflammation...). Leur présence, leur état d'activation, leur concentration et l'équilibre entre les différentes formes témoigne de processus tout à fait normaux ou, au contraire constituent des marqueurs de progression de maladies. Il est donc important de disposer d'outils permettant de documenter leur présence, leur activation spatiale et temporelle dans divers contextes biologiques. La spectrométrie de masse MALDI-MS est l'une des méthodes de choix pour réaliser cette cartographie.

Le suivi par spectrométrie de masse de ces protéines présentes en faible abondance dans un environnement complexe constitue cependant un réel défi.

## **Thesis synopsis**

Activity-based probes bind covalently to their target enzymes in a mechanism-based manner allowing unambiguous discrimination between the active enzyme and its inactive or inhibitor-bound counterparts. Since metalloproteases catalysis is non-covalent, activity-based probes targeting them have been developed using reversible inhibitors decorated with photo-crosslinkers, which limit their scope to ex vivo use. By relying on a favorable structural context and by exploiting targeted chemistry, ProMAP project will focus on development of novel activity-based probes capable of covalently modifying matrix metalloproteases without making use of photo-activation.

Within human protease family composed of more than 500 members with approximately one third of metalloproteinases, matrix metalloproteases (MMPs) constitute a small enzyme family of 23 members involved in very many pathophysiological phenomena (cancers, wound healing, inflammation). The role of these zinc-dependent endopeptidases remains to be clarified in numerous biological processes. Some MMPs participate in disease progression while others play a protective function, stressing the need to better document their spatial and temporal activation in various biological contexts. MALDI-MS mass spectrometry is one of the methods of choice to achieve this mapping. Mass spectrometry protein tracking, present in low abundance in a complex environment, represents a real challenge. In this context, chemical derivatization is a very promising technique for improving detection of peptides by mass spectrometry. This approach consists in conjugating a MS-tag to peptides for modifying their ionization properties. MALDI MS-tags enable to discriminate signals induced by labelled peptides from those of unlabeled ones. This discriminating effect represents a method of choice for the detection and quantification of low-abundance peptides in complex proteomes.

## **Chimie organique, minérale et industrielle**

**Mots-clés :** Digestion enzymatique, Interface Chimie/Biologie, Spectrométrie de masse, Imagerie MALDI

Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) – UMR 5247 – CNRS, Pôle Chimie Balard, 1919 route de Mende, 3400 Montpellier