

Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

Travail de Bachelor Diplôme 2017

Brice Fenner

*Quantification de l'arginine-vasopressine
dans le plasma par spectrométrie
de masse en tandem*

- *Professeur*
Marc Mathieu
- *Expert*
Eric Grouzmann
- *Date de la remise du rapport*
18.08.2017

Ce rapport est l'original remis par l'étudiant.
Il n'a pas été corrigé et peut donc contenir des inexactitudes ou des erreurs.

SYND	ETE	TEVI
X	X	X

Filière / Studiengang TEVI	Année académique / Studienjahr 2016/2017	No TD / Nr. DA ca\2017\27
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie, JOWA <input checked="" type="checkbox"/> Etablissement partenaire <i>Partnerinstitution</i>	Etudiant / Student Fenner Brice Professeur / Dozent Prof. M. Mathieu	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input checked="" type="checkbox"/> Etablissement partenaire <i>Partnerinstitution</i>
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja ¹ <input checked="" type="checkbox"/> non / nein	Expert / Experte (données complètes) Dr. Eric Grouzmann CHUV Laboratoire des Catécholamines et Peptides Hôpital Nestlé 5ème étage, Bureau 5017 Av Pierre Decker 1011 Lausanne Tel: 0213144396	

Titre / Titel Quantification de la Vasopressine dans le plasma par spectrometrie de masse en tandem
Description / Beschreibung Prévalidation d'une méthode analytique de dosage de la vasopressine dans des échantillons biologiques. <ul style="list-style-type: none"> - Sélection des ions de référence par MS-MS à partir d'un standard de référence - Séparation par micro-UPLC - Méthode d'extraction du peptide par micro-SPE - Etablissement d'une courbe de linéarité, LLOQ, LLOD, carry-over, effets matrice qualitatifs et quantitatif Délivrables <ul style="list-style-type: none"> - Obtenir les résultats préliminaires permettant d'aboutir à une méthode utilisable en production pour la vasopressine

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum Responsable de l'orientation / filière <i>Leiter der Vertiefungsrichtung / Studiengang:</i>  ¹ Etudiant / Student : 	Délais / Termine Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 01.05.2017 Fin des travaux de diplôme dans les laboratoires de l'école / Ende der Diplomarbeiten in den Labors der Schule : 14.07.2017 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 18.08.2017 / 12h00 Expositions / Ausstellungen der Diplomarbeiten: 01.09.2017 Défense orale / Mündliche Verfechtung: dès la semaine 35 / ab Woche 35
--	--

¹ Par sa signature, l'étudiant-e s'engage à respecter strictement la directive DI.1.2.02.07 liée au travail de diplôme.
Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der/die Student/in, sich an die Richtlinie DI.1.2.02.07 der Diplomarbeit zu halten.

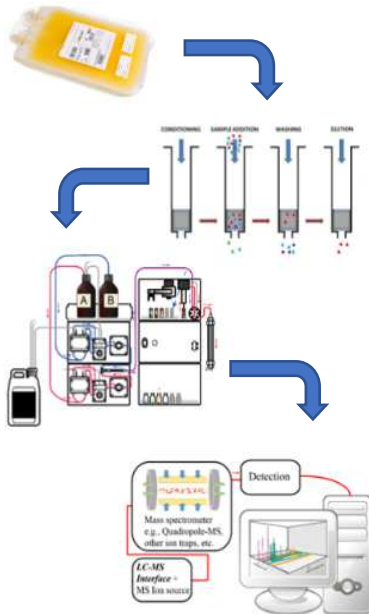


Figure 1 : Stratégie du dosage de l'AVP dans le plasma par SPE suivie de microLC-MS/MS

Dosage de la vasopressine dans le plasma par MS/MS

Diplômant/e Brice Fenner

Objectif du projet

Développer et optimiser une méthode de dosage de la vasopressine dans le plasma humain depuis le prélèvement sanguin jusqu'à l'analyse en LC-MS/MS en passant par une extraction en phase solide.

Méthodes | Expériences | Résultats

Le dosage de la vasopressine (AVP) dans le plasma est important pour détecter des pathologies telles que le diabète insipide. L'adsorption sur les surfaces et la stabilité de l'AVP ont été étudiées. La quantification de l'AVP a été réalisée par prélèvement de sang chez un volontaire avec ajout d'héparine liquide comme anticoagulant. Le plasma récupéré a été traité avec 3 inhibiteurs : Aprotinine, AEBSF et Ovomucoïd pour empêcher la dégradation de l'AVP par les protéases plasmatiques. Les protéines plasmatiques ont ensuite été précipitées avec ACN + 1% FA. L'AVP a été extraite du surnageant récupéré par SPE de type Weak Cation Exchange (WCX). Après les lavages, l'AVP est éluée avec ACN/Eau 75 :25 + 1% FA. Le rendement total (précipitation et SPE) est d'environ 30%. L'AVP a été quantifiée par standards externes et ajouts dosés. Les quantifications ont donné des concentrations d'AVP endogène de respectivement 12 pg/mL (12 pM) et 10 pg/mL (10 pM). Les valeurs trouvées correspondent aux concentrations attendues en fonction de la position assise du sujet et la température élevée lors de la prise de sang. La méthode peut être améliorée avec l'utilisation d'un standard interne.

Travail de diplôme
 | édition 2017 |

Filière
 Technologies du vivant

Domaine d'application
 Chimie analytique

Professeur responsable
 Dr Marc Mathieu
marc.mathieu@hevs.ch

Partenaire
 Dr Eric Grouzmann
Eric.Grouzmann@chuv.ch
 Centre hospitalier universitaire
 vaudois (CHUV)

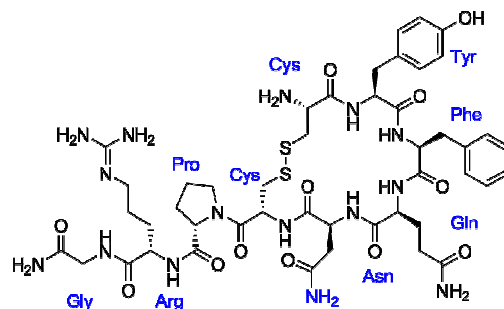


Figure 2 : Séquence et structure du nonapeptide arginine-vasopressine (AVP).



Remerciements

J'aimerais chaleureusement remercier **Dr Marc Mathieu** pour m'avoir offert la possibilité d'effectuer mon travail de Bachelor à l'extérieur de la HES de Sion. Ces 11 semaines passées au CHUV m'ont permis de sortir du cadre scolaire et d'explorer un autre monde. Ce fût une très belle expérience riche en surprises et découvertes.

Pour m'avoir accueilli à bras ouverts dans son unité de recherche, je remercie le **Dr Eric Grouzmann** du laboratoire des catécholamines. Merci de m'avoir suivi tout au long de mon travail et de m'avoir initié à la quantification par spectrométrie de masse. Le travail que vous m'avez proposé m'a permis d'acquérir de nouvelles connaissances analytiques et de grandement améliorer celles que je possédais déjà.

J'aimerais aussi remercier personnellement le **Dr Philippe Eugster** pour sa disponibilité et sa grande connaissance de la LC-MS/MS. Merci d'avoir toujours répondu à mes questions et de vous être inquiété en tout temps de l'avancement du projet.

Mes remerciements également à toute l'équipe du laboratoire des catécholamines composée de : **Marielle Dunand, Dr Karim Abid, Catherine Centeno, Caroline Seghezzi** et **Céline Vocat**. Merci pour cette très belle ambiance et tous les bons moments. L'atmosphère qui règne aux laboratoires, grâce à vous, a beaucoup contribué à la réussite de mon travail.

Un remerciement spécial au futur docteur **Baptiste Grund** qui a suivi le même chemin que moi et a donc su me fournir de précieux conseils. *Ne change pas !*

TABLE DES MATIERES

1	Liste des abréviations	1
2	Introduction	2
2.1	Compréhension globale de l'arginine-vasopressine.....	2
2.1.1	Généralité de l'AVP	2
2.1.2	Synthèse centrale et périphérique de l'AVP	2
2.1.3	Synthèse et dégradation du précurseur	3
2.1.4	Contrôle et régulation de la sécrétion d'AVP.....	4
2.1.5	Récepteurs et effets physiologiques.....	6
2.1.6	Physiopathologie de la vasopressine	7
2.2	Techniques de dosage : Historique et découvertes	8
2.2.1	Essai biologique.....	8
2.2.2	Essai immunologique.....	9
2.3	Stratégie du Dosage de l'AVP dans le plasma.....	10
2.3.1	Extraction en phase solide (SPE).....	10
2.3.2	LC-MS/MS	11
2.4	Dosage simultané vasopressine et ocytocine	12
2.4.1	Généralités de l'ocytocine	12
2.4.2	Effets physiologiques.....	13
2.4.3	Possibilité et utilité du dosage en tandem AVP et OT.....	13
3	Matériel et méthodes	14
3.1	Matériel	14
3.1.1	Appareils et colonnes	14
3.1.2	Réactifs et solvants.....	14
3.1.3	Monovettes et Inhibiteurs	15
3.1.4	Plaques SPE.....	15
3.2	Méthodes	15
3.2.1	Préparation des solutions d'AVP	15
3.2.2	Méthode LC pour UPLC	16
3.2.3	Méthode MS/MS pour UPLC	16

3.2.4	Adsorption de l'AVP	17
3.2.5	Stabilité des solutions AVP	17
3.2.6	Prélèvement et préparation du plasma.....	17
3.2.7	Précipitation des protéines plasmatiques	18
3.2.8	Extraction en phase solide	18
3.2.9	Méthode LC pour microLC	19
3.2.10	Méthode MS pour microLC.....	19
3.2.11	Quantification de l'AVP endogène.....	20
4	Résultats et discussions	21
4.1	Optimisation des voltages MS microLC.....	21
4.2	Etude de l'adsorption	24
4.3	Etude de la stabilité	25
4.4	Inhibition des protéases.....	25
4.5	Extraction en phase solide	27
4.6	Précipitation des protéines plasmatiques	34
4.7	Prélèvement du plasma.....	37
4.8	Quantification de l'AVP endogène.....	38
4.8.1	Courbe de calibration STD externes	38
4.8.2	Courbe de calibration par ajouts dosés	38
5	Conclusion et perspectives.....	39
6	Bibliographie	40
7	Annexes.....	43
7.1	Figures pour la stabilité	43
7.2	Chromatogrammes des STD externes	45
7.3	Courbe de calibration STD externes	48
7.4	Chromatogrammes des ajouts dosés.....	49
7.5	Courbe de calibration ajouts dosés	52
8	Travail complémentaire : Synthèse du pro-neuropeptide Y.....	53

1 LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide acétique
ACN	Acétonitrile
AEBSF	Fluorure de 4-(2-aminoéthyl)benzènesulfonyle
AVP	Arginine-vasopressine
AQP2	Aquaporine 2
CETI	Chicken Egg Trypsin Inhibitor
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EtOH	Ethanol
ESI	Electrospray ionisation
FA	Acide formique
LC	Chromatographie liquide
LLOQ	Limite inférieure de quantification
MeOH	Méthanol
MS	Spectromètre de masse
MS/MS	Spectromètre de masse en tandem
NG	Nonyl- β -D-galactopyranose
OT	Ocytocine
PP	Précipitation de protéines
RE	Réticulum endoplasmique
RIA	Radio-immunoassay
SIADH	Syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique
SPE	Solid Phase Extraction
STD	Standard
TFA	Acide trifluoroacétique
UPLC	Chromatographie liquide à ultra haute performance
UV	Ultra-violet
WCX	Weak Cation Exchange

2 INTRODUCTION

2.1 COMPRÉHENSION GLOBALE DE L'ARGININE-VASOPRESSINE

2.1.1 GÉNÉRALITÉ DE L'AVP

L'arginine-vasopressine (abrégée AVP ou ADH pour *antidiuretic hormone* en anglais) est un peptide hormonal constitué de 9 acides aminés dont 2 cystéines (en positions 1 et 6) reliées entre elles par un pont disulfure qui lui confère sa structure tridimensionnelle (1). Sa masse moléculaire est de 1084.25 g/mol. Sa structure complète est illustrée à la Figure 1.

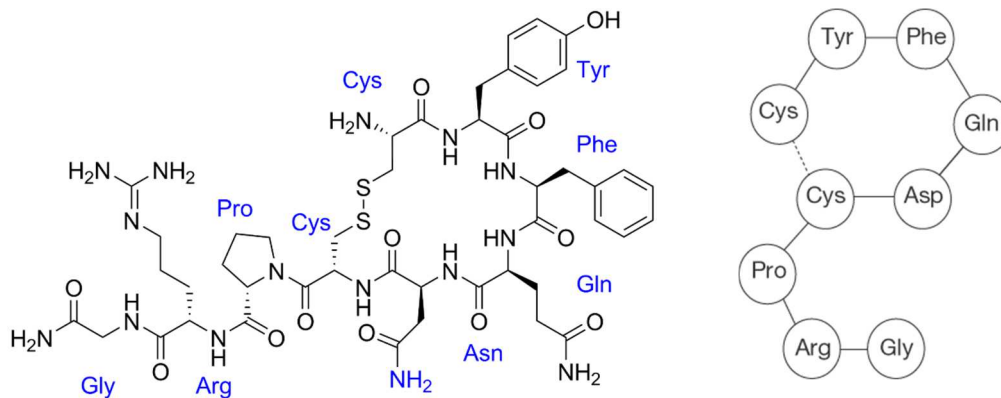


Figure 1: Structure de l'arginine-vasopressine

Si l'arginine-vasopressine fut découverte pour la première fois par le chimiste Oliver Kamm en 1928, (2), (3) ce n'est qu'en 1950 que sa séquence complète fut déterminée par le chimiste franco-américain Vincent du Vigneaud (4). L'arginine-vasopressine est appelée ainsi en référence à son acide aminé présent en position 8. En effet, il existe chez certaines espèces d'animaux, comme les suidés (porcins), une lysine⁸-vasopressine (abrégée LVP) c'est pourquoi la précision de l'acide aminé en position 8 de la séquence est faite.

2.1.2 SYNTHÈSE CENTRALE ET PÉRIPHÉRIQUE DE L'AVP

L'AVP n'est pas produite directement en tant que nonapeptide. Elle dérive d'un précurseur composé d'un porteur de protéine (neurophysine II) rattaché à un glycopeptide et un peptide signal (5). Cet ensemble, appelé pré-pro-vasopressine, est constitué en tout de 164 acides aminés. La structure de cette pré-pro-hormone est illustrée dans la Figure 2.

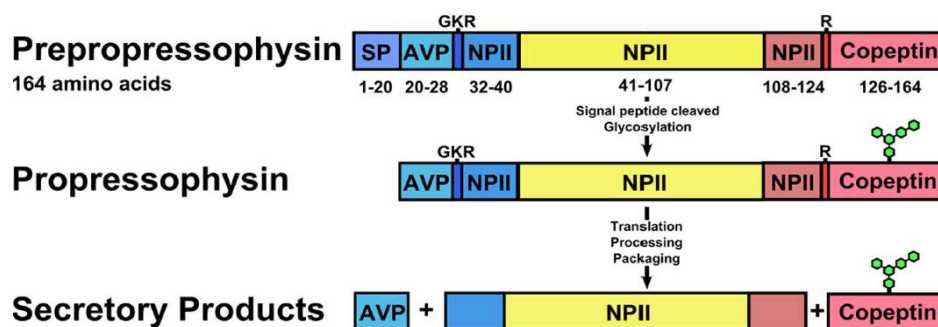


Figure 2: Structure de la pré-pro-hormone incluant l'AVP

La 1^{ère} partie de cette pré-pro-hormone est ce qu'on appelle le peptide signal. Constitué dans ce cas présent de 19 acides aminés, il sert à adresser le précurseur du peptide dans le réticulum endoplasmique. Le peptide signal est souvent présent sur des précurseurs de protéines lorsque ceux-ci sont synthétisés par le génome nucléaire et non par celui de l'organite en question. Les 9 acides aminés suivants constituent l'AVP qui représente finalement une toute petite fraction du précurseur (164 acides aminés). Vient ensuite la plus grosse partie, composée de 93 acides aminés, la neurophysine II qui fait office de protéine de transport « protein carrier » rattachée à un glycopeptide (39 acides aminés) qui module l'activité du SNC (système nerveux central).

2.1.3 SYNTHÈSE ET DÉGRADATION DU PRÉCURSEUR

La pré-pro-hormone de l'AVP est synthétisée principalement dans les noyaux supraoptiques et para ventriculaires (6), (7) se situant dans la zone du cerveau contrôlant entre autres la mémoire, l'hypothalamus (Figure 3).

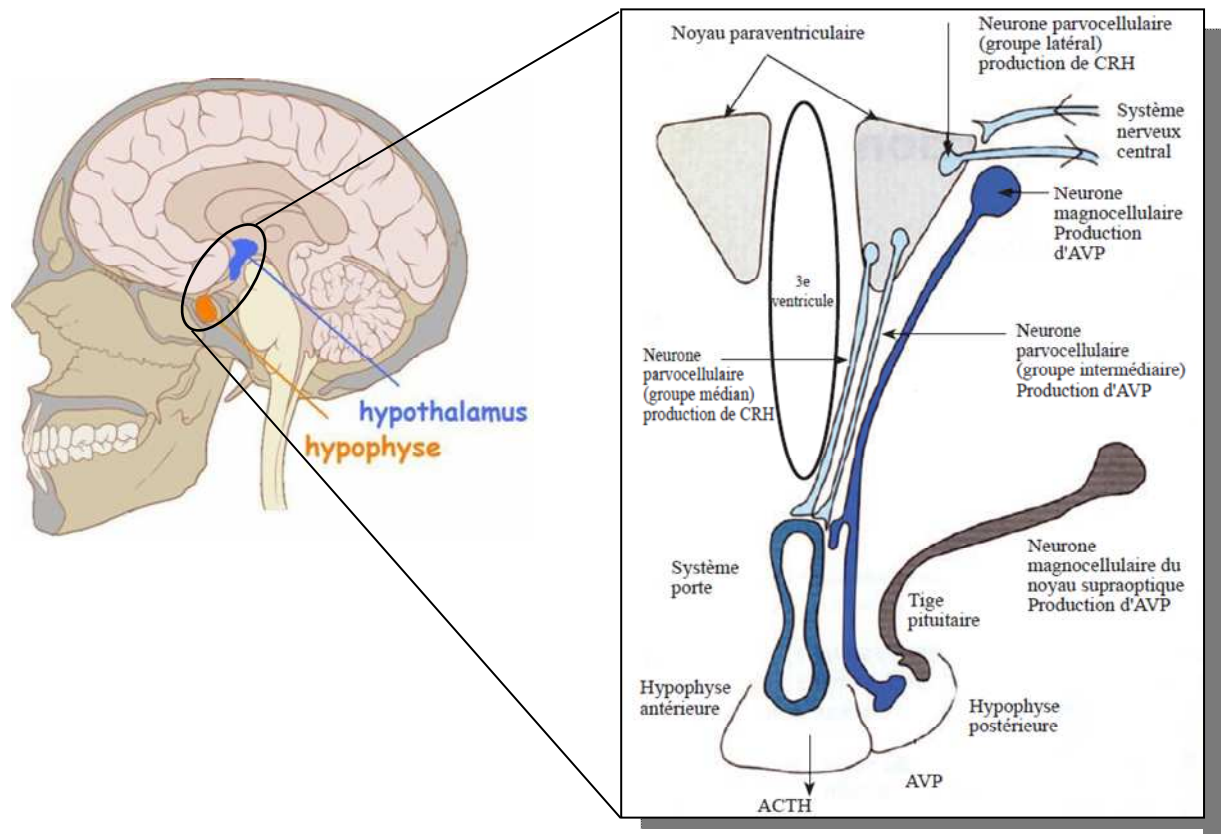


Figure 3: Structures de l'hypothalamus et de l'hypophyse et explications des parties composantes

Elle est ensuite transportée depuis l'hypothalamus jusqu'à l'hypophyse postérieure (*glande pituitaire*) par la tige pituitaire où les différentes parties la constituant sont clivées par des enzymes pour que, finalement, l'AVP soit stockée dans des vésicules et sécrétée depuis l'hypophyse postérieure de façon régulée. Le schéma de dégradation de l'AVP est illustré à la Figure 4.

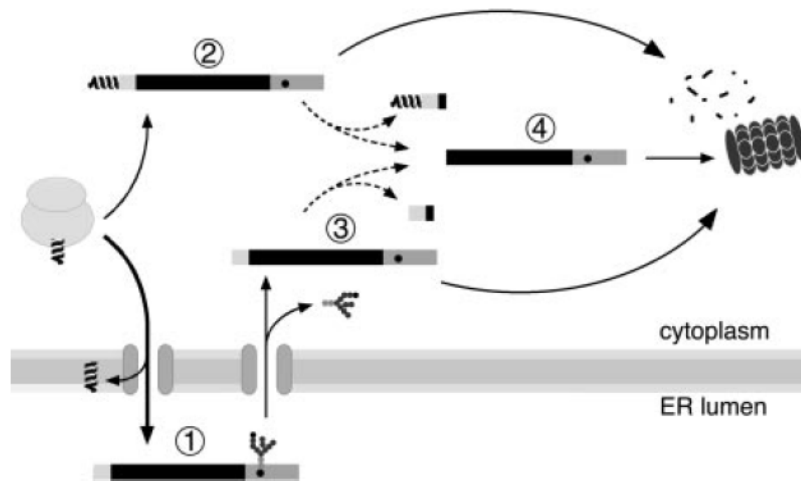


Figure 4: Schéma de la production de l'AVP à partir de la pré-pro-hormone

Les 3 principales étapes de la production du nonapeptide AVP par dégradation du précurseur sont :

- (1) La pré-pro-hormone est majoritairement amenée dans le réticulum endoplasmique (ER) pour cliver le peptide signal et y être glycosylée.
- (2) Une petite partie du précurseur garde son peptide signal et n'est pas glycosylé. Il est relâché en tant que pré-pro-vasopressine directement dans le cytoplasme
- (3) Les molécules glycosylées dans l'ER incapables de se replier sont déglycosylées et retransférées dans le cytoplasme. Les formes (2) et (3) sont stabilisées dans le cytosol par des inhibiteurs de protéases.

L'AVP stocké dans l'hypophyse est ensuite sécrété dans le sang sous l'influence de stimuli dépendant de l'osmolalité plasmatique, de la volémie ou encore de la pression artérielle (cf. chapitre 2.1.4). Bien que la majeure partie de l'AVP endogène soit synthétisée dans le cerveau, il peut être également produit localement, en plus faibles quantités, dans les ovaires, les testicules ou la glande surrénale (8).

Une fois dans le sang, l'AVP est dégradée assez rapidement par des protéases, notamment de type aminopeptidase (vasopressinase) présent dans le foie et les reins qui clivent l'acide aminé côté N-terminal du peptide (Cystéine en position 1). Sa concentration dans le sang se situe entre 1 et 20 pg/ml (9), (10) et (11). Cependant, cette concentration est sujette à beaucoup de facteurs (cf. chapitre 2.2.1). La demi-vie de l'AVP dans le sang peut varier entre 4 et 35 minutes selon les études et les personnes (12), (10), (13).

2.1.4 CONTRÔLE ET RÉGULATION DE LA SÉCRÉTION D'AVP

La sécrétion d'AVP dans le sang est principalement régulée par 2 stimuli :

- 1) Augmentation de l'osmolalité plasmatique
- 2) Réduction de la volémie et de la pression artérielle

L'osmolalité plasmatique, qui reflète l'état d'hydratation d'une personne, se mesure en mOsm.kg^{-1} d' H_2O . L'osmolalité plasmatique d'une personne normalement hydratée se situe entre 280 et 295 mOsm.kg^{-1} d' H_2O et est régulée par des osmorécepteurs situés dans l'hypothalamus. Lorsque la personne se déshydrate, la valeur d'osmolalité augmente et stimule la sécrétion d'AVP dans l'organisme et la soif du sujet.

Le seuil osmotique physiologique pour la sécrétion de l'AVP est d'environ 280 mOsm.kg^{-1} d' H_2O alors que le seuil de la soif se situe à environ 295 mOsm.kg^{-1} d' H_2O (14). Si la valeur est plus faible que 280 mOsm.kg^{-1} d' H_2O la quantité d'AVP en circulation dans le sang est indétectable. En dessus de 280 mOsm.kg^{-1} d' H_2O , la relation entre osmolalité plasmatique et concentration en AVP dans le sang est linéaire : une augmentation de 1 mOsm.kg^{-1} d' H_2O entraîne une augmentation de 0.5 pg/mL d'AVP dans le sang (7).

Le seuil de la soif se situant plus haut que le seuil physiologique de l'AVP, une déshydratation stimule d'abord la réabsorption rénale d'eau avant de stimuler la consommation d'eau due à la soif (15).

Une diminution de la volémie (volume totale de sang circulant dans l'organisme) ou de pression artérielle affecte également la sécrétion d'AVP dans l'organisme. Cependant, la corrélation entre volémie et concentration en AVP n'est pas linéaire comme dans le cas de l'osmolalité plasmatique, mais exponentielle (16). Une faible diminution de la volémie (<10%) entrainera une augmentation en AVP à peine détectable alors qu'une diminution plus importante (20%) fera varier la concentration en AVP à un niveau bien supérieur que celui dû à une augmentation de l'osmolalité (17). Les différences de relation de la concentration en AVP avec l'osmolalité ou la volémie sont représentées dans la Figure 5.

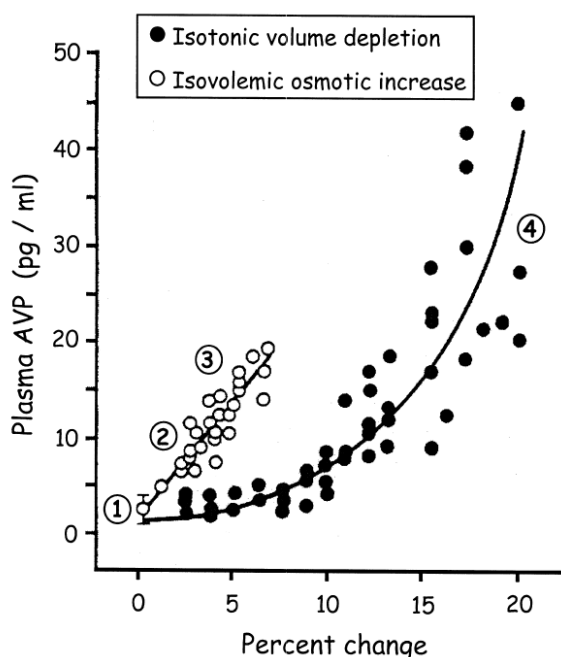


Figure 5: Relations entre l'osmolalité plasmatique et la volémie avec la concentration en AVP dans le plasma sanguin

Les situations 1 et 2 illustrent des cas d'osmolalité plasmatique courants de respectivement 295 et 305 mOsm.kg^{-1} d' H_2O (18). La situation 3 représente, elle, une déshydratation moyenne d'un sujet avec une valeur d'osmolalité plasmatique de 315 mOsm.kg^{-1} d' H_2O . Une différence de 20 mOsm.kg^{-1} d' H_2O (~5%) fait varier la concentration en AVP dans le sang de manière linéaire de 5 à 20 pg/ml .

Pour la volémie il est visible qu'un changement de 5 voire même 10 % n'entraîne pratiquement aucune variation de la concentration en AVP. En revanche, une diminution plus importante de 20% (situation 4) produit une augmentation de 5 à plus de 35 pg/ml.

D'autres stimuli peuvent encore affecter la sécrétion de l'AVP dans de moindres mesures comme les stimuli olfactifs, les chocs émotionnels, la douleur ou encore les nausées. Certaines substances peuvent également avoir un effet similaire comme la nicotine ou la morphine (7).

2.1.5 RÉCEPTEURS ET EFFETS PHYSIOLOGIQUES

Les 2 effets physiologiques de l'AVP sont la vasoconstriction et l'antidiurèse. Il a été démontré que ces 2 effets opèrent par 2 voies métaboliques différentes ; il semblait donc normal de les différencier. C'est en 1979 que Mitchell, Kirk et Billah proposèrent de distinguer 2 types de récepteurs pour la vasopressine (19).

- 1) Les récepteurs V1 pour l'effet vasoconstricteur
- 2) Les récepteurs V2 pour l'effet antidiurétique

Les récepteurs V1 sont principalement localisés dans les cellules musculaires lisses (20) ; lorsque la vasopressine s'y fixe, le récepteur est stimulé et augmente les concentrations cytoplasmiques de calcium ionisé ce qui entraîne une vasoconstriction. Les localisations secondaires du récepteur V1 sont nombreuses, dans le cerveau notamment, où la fixation de l'AVP déclenche la production de cortisol et d'aldostérone (20), ainsi que dans le foie, la rate, les reins et la vessie.

Les récepteurs V2 sont quant à eux localisés sur le pôle basal des cellules épithéliales du tube collecteur au niveau du rein. L'interaction de l'AVP avec ce type de récepteur stimule l'activité de molécules appelées Aquaporin-2 (AQP2) qui entraîne une réabsorption de l'eau et concentre ainsi l'urine (21). Le mécanisme complet est illustré à la Figure 6.

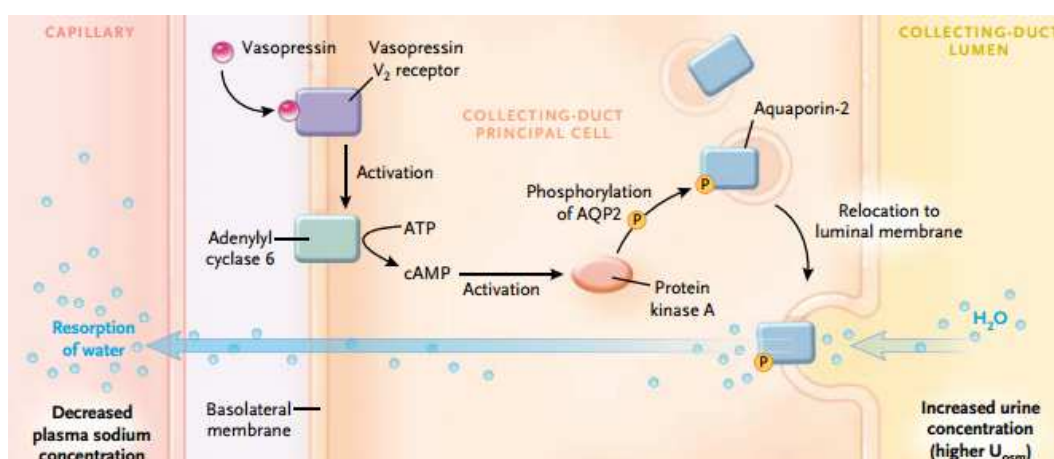


Figure 6: 1) L'AVP se fixe sur le récepteur de type V2 2) Ceci entraîne l'activation d'une enzyme membranaire appelée adénylyl-cyclase qui à partir d'ATP produit l'adénosine monophosphate cyclique 3) Cette adénosine permet d'activer la protéine kinase A qui peut à son tour phosphoryler l'aquaporin-2 4) L'AQP2 phosphorylée peut à nouveau se fixer dans la membrane luminale et provoquer une réabsorption de l'eau et ainsi une concentration de l'urine

2.1.6 PHYSIOPATHOLOGIE DE LA VASOPRESSINE

L'AVP régit donc la vasoconstriction et la concentration de l'urine. Toutefois, pour que cette régulation puisse être menée à bien, il faut une sécrétion minutieuse et précise de cette hormone peptidique. Un dérèglement de la sécrétion (hyposécrétion ou hypersécrétion) peut entraîner diverses pathologies.

« Tout est poison, rien n'est poison, c'est la dose qui fait le poison »

Paracelse, 1533

2.1.6.1 HYPOSÉCRÉTION ET HYPOACTIVITÉ

Une hyposécrétion d'AVP, l'incapacité de celle-ci à se lier aux récepteurs V2 ou encore une dégradation trop rapide du peptide peut déclencher un diabète insipide dont les caractérisations principales sont une soif excessive et une polyurie prononcée. Une personne atteinte de cette pathologie est susceptible de produire plus de 10 litres d'urine par jour. Il y a 3 cas de diabète insipide à distinguer en fonction de l'origine de la pathologie :

1. **Le diabète insipide central (DIC)**

Caractérisé par un défaut de synthèse ou une hyposécrétion d'AVP, le DIC est le cas le plus courant de diabète insipide. Cette déficience peut résulter de dommages causés aux sites impliqués dans la sécrétion de l'AVP tels que les noyaux supraoptiques et para ventriculaires (cf. chapitre 2.1.3) ou les osmorécepteurs situés dans l'hypothalamus (cf. chapitre 2.1.4). Malheureusement, si on estime que 1 à 2 % des cas sont dus à une forme héréditaire de DIC provoquée par des mutations sur le gène codant de l'AVP situé sur le chromosome 20, dans la plupart des cas, la cause exacte de cette hyposécrétion est inconnue (22).

2. **Le diabète insipide néphrogénique (DIN)**

Dans le cas du DIN, la synthèse de l'AVP et sa sécrétion sont normales mais le système rénal oppose une résistance à l'action du peptide. A l'inverse du DIC, les causes pouvant entraîner un DIN sont en grande partie connues. Plusieurs maladies rénales comme la PKD (polykystose rénale de type dominant) (23), l'amylose ou encore l'usage de médicaments antiviraux tels que le cidofovir (traitement contre le cytomégalovirus) peuvent entraîner le DIN (24). Des mutations du gène AVPR2 qui encode les récepteurs type V2 responsables de l'action antidiurétique (cf. chapitre 2.1.5) ou du gène AQP2 qui encode les canaux à eau (cf. Figure 6) sont aussi des causes possibles (22).

3. **Le diabète insipide gestationnel (DIG)**

Ce type de diabète touchant uniquement les femmes enceintes durant leur 3^{ème} trimestre de grossesse est de loin la pathologie la plus rare avec environ 5 cas sur 100'000 grossesses. La cause de ce type de diabète est la dégradation extrêmement rapide de la vasopressine dans le sang en raison de la concentration très élevée d'aminopeptidase (vasopressinase) dans le placenta durant cette période de la grossesse (22), (25).

2.1.6.2 HYPERSÉCRÉTION

Une hypersécrétion d'AVP dans l'organisme, couramment appelée SIADH (*Syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique*) est le mécanisme principal responsable de l'hyponatrémie (concentration en sodium insuffisante dans le sang). Les causes du SIADH peuvent être d'ordre neurologique, pulmonaire ou encore médicamenteuse. Etant donné que l'hormone antidiurétique favorise la réabsorption d'eau dans l'organisme (cf. chapitre 2.1.5), si la sécrétion d'ion sodium Na^+ est constante et que l'AVP est sécrétée en trop grande quantité, la molalité du sodium dans le sang (natrémie) diminue. La gravité d'une hyponatrémie dépend plus de sa vitesse de constitution que de son intensité (26). Les effets généraux sont le plus souvent non-spécifiques (nausées, vomissements, fatigue), mais dans le cas d'une hyponatrémie aiguë, les conséquences peuvent être beaucoup plus sévères, par exemple une hyper-tension crânienne.

2.2 TECHNIQUES DE DOSAGE : HISTORIQUE ET DÉCOUVERTES

2.2.1 ESSAI BIOLOGIQUE

Les premières méthodes existantes pour quantifier la vasopressine (ainsi que l'ocytocine) étaient des bioassays (*essais biologiques utilisant des plantes, animaux ou cellules in vitro*) mesurant la pression sanguine lors d'injections d'extraits de vasopressine dans des rats (6).

Cependant, cette méthode souffrait d'un gros problème de spécificité car plusieurs composés présents dans l'extrait, comme l'adrénaline et la noradrénaline, pouvaient influencer la pression sanguine du sujet.

Par la suite, une méthode basée sur le même principe d'injection d'extrait de vasopressine et mesurant comme signal réponse un degré de concentration de l'urine du sujet a été mise au point. Cette méthode présentait moins de problèmes de spécificité que la méthode de mesure de la pression sanguine. A partir des années 1950, les bioassays basés sur l'activité antidiurétique pouvaient mesurer l'AVP à des doses minimales de 10 pg. Malheureusement, cette sensibilité était toujours insuffisante pour quantifier l'AVP endogène chez l'être humain jusqu'à ce que Heller et Stulc (27) améliorèrent la méthode et réussirent à détecter des concentrations jusqu'à 1 pg/ml. Ils estimèrent d'ailleurs, pour la 1^{ère} fois, la concentration en AVP dans le plasma sanguin d'un être humain normalement hydraté à environ 4 pg/ml. L'amélioration continue de ces méthodes jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle permit une compréhension globale des effets biologiques de l'AVP et donna lieu à des découvertes et améliorations remarquables.

C'est ainsi que Segar et Moore (28) découvrirent que le taux d'AVP chez l'homme dépend de sa position et de la température ambiante. Basée sur 79 sujets, cette expérience a démontré que la concentration en AVP dans le sang est maximale lorsque la personne se tient debout (8 pg/ml), diminue lorsqu'elle s'assied (4 pg/ml) jusqu'à être minimale lorsqu'elle s'allonge (1 pg/ml). L'effet de la température a été déterminé en laissant les sujets pendant 2 heures à 50 °C, la concentration en AVP est alors montée jusqu'à 13 pg/ml. Les neurones dont le corps cellulaire sert à la sécrétion de l'AVP sont en effet thermosensibles, comme le confirmeront plus tard les radioimmunoassays.

2.2.2 ESSAI IMMUNOLOGIQUE

Au début du 21^{ème} siècle, même si les essais biologiques sont encore fréquemment utilisés, les essais immunologiques commencent à les remplacer. En effet, les essais biologiques sont chronophages et chers en raison de l'utilisation d'animaux comme sujet d'expériences. Les essais immunologiques, basés sur l'interaction antigène-anticorps, permettent des analyses plus rapides et moins onéreuses. En ce qui concerne l'AVP, les essais biologiques sont moins spécifiques que les essais immunologiques en raison des cross réactivités entre l'AVP et d'autres peptides sur leurs récepteurs respectifs dans le système biologique des animaux utilisés pour les tests.

Cependant, les essais immunologiques présentent également des problèmes, dont 2 majeurs. Premièrement, l'AVP a une petite masse moléculaire (~1000 g/mol) et possède donc un pouvoir immunogène faible. Afin de compenser ce défaut, il est nécessaire de posséder un anticorps possédant une haute spécificité pour ce peptide, une exigence qui n'est pas requise lorsque de plus grosses molécules sont analysées. Deuxièmement, le niveau endogène d'AVP est très bas (cf. chapitre 2.2.1) par rapport aux concentrations en insuline par exemple. Pour pallier à ce défaut il faut soit posséder un anticorps très spécifique et de haute affinité, soit effectuer une opération de concentration qui peut entraîner des interférences non-spécifiques (29).

Concernant les peptides, ces interférences proviennent principalement des protéines présentes dans le plasma pouvant se lier aux anticorps à la place du peptide à doser et donc augmenter la concentration en peptides marqués isotopiquement dans le surnageant qui, lorsqu'il est mesuré, conduit à une surestimation de la quantité de peptide dans l'échantillon (Figure 7).

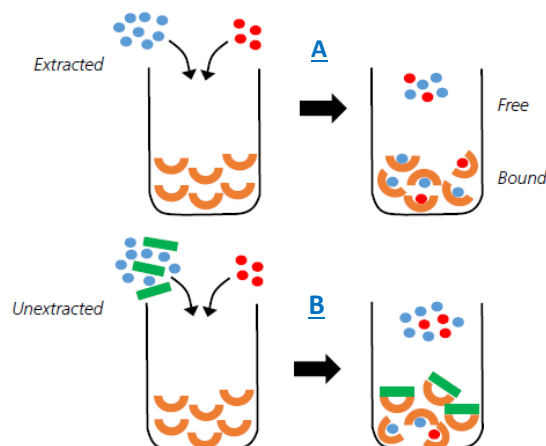


Figure 7: Illustration du principe de fonctionnement d'un essai immunologique RIA : **A :**1) Le peptide à doser dans l'échantillon (bleu) est mélangé avec une quantité connue d'une solution de concentration connue de ce même peptide mais qui est lui isotopiquement marqué. 2) Le mélange est ensuite introduit dans un puits où une quantité connue d'anticorps est déposée sur les parois. 3) Les 2 peptides (bleu et rouge) sont en compétition pour se lier à l'anticorps 4) La quantité restante de peptide marqué (rouge) resté en solution émet un signal radioactif en raison de son marquage isotopique 5) Des courbes standards peuvent être établies avec des concentrations connues de peptides à doser (bleu) et une quantité ajoutée connue de peptide marqué (rouge) **B :**1) Les protéines plasmatiques (vert) peuvent faire concurrence aux peptides et ainsi les empêcher de se lier aux anticorps 2) Une quantité anormalement élevée de peptide marqué reste alors en suspension et son signal radioactif donne alors une concentration erronée de peptide dans l'échantillon.

Afin de contourner le problème posé par ces interférences non-spécifiques, il fut nécessaire d'injecter une dose connue d'AVP dans des blancs de plasma humain afin de corriger les signaux d'AVP des échantillons. C'est ainsi que Fyhrquist (30) et ses collègues déterminèrent une concentration endogène en AVP variant de 2 à 6.2 pg/ml suivant la position (couché ou debout) du sujet. Ces résultats concordent avec les valeurs trouvées par Segar et Moore avec des essais biologiques (cf. chapitre 2.2.1). Il a finalement été établi par Tim Chard en 1974 que les meilleurs essais immunologiques n'étaient pas plus sensibles que les meilleurs essais biologiques (29). C'est d'ailleurs toujours le cas aujourd'hui. De ce fait, il est nécessaire, pour des dosages aussi exigeants que celui de l'AVP, de travailler avec des méthodes de dosages possédant une sélectivité et une sensibilité optimale. La technique qui s'est depuis imposée comme la référence pour les peptides et protéines est l'HPLC-MS/MS.

Toutefois, ces analyses sont difficiles à mettre au point en raison de la teneur endogène en vasopressine dans le sang de l'ordre du picogramme par millilitre (9) qui exige une sensibilité optimale. Malgré cela, les progrès scientifiques dans ce domaine pour des dosages par LC-MS ces dernières années ont considérablement augmentés. De récentes publications mettent en avant des méthodes possédant des limites de détection d'AVP endogène entre 0.2 et 1.0 pg/ml (31), (32).

2.3 STRATÉGIE DU DOSAGE DE L'AVP DANS LE PLASMA

Le but de ce travail est de développer une méthode LC-MS/MS afin de pouvoir quantifier l'AVP dans des échantillons biologiques tels que le plasma sanguin. Il faut par conséquent, à partir du plasma brut, pouvoir récupérer le peptide d'intérêt au moyen d'une extraction en phase solide (SPE) pour ensuite l'injecter en LC afin de le séparer des divers composés encore présents dans l'échantillon et finalement l'injecter dans le spectromètre de masse afin de pouvoir le doser.

2.3.1 EXTRACTION EN PHASE SOLIDE (SPE)

Le plasma sanguin, constitué à 90 % d'eau, contient des lipides, des bioamines, des ions, des sels minéraux, des gaz dissous, des protéines (fibrinogène, globuline, albumine) et encore une quantité importante d'autres composés (33). Afin de séparer l'AVP de ces composants, il faut jouer sur l'interaction du peptide avec une phase stationnaire. Plusieurs types de phases stationnaires existent ; pour l'AVP, une phase chargée négativement de type WCX (Weak cation exchange) préalablement conditionnée est utilisée. Il sera alors possible d'adsorber l'AVP sur cette phase en chargeant positivement la molécule d'AVP au moyen d'une solution acide et d'éliminer le reste de l'échantillon biologique. Il faudra ensuite récupérer le peptide adsorbé en substituant les molécules d'AVP adsorbées par des ions H⁺ en utilisant un solvant fortement acidifié avec le meilleur rendement possible. La Figure 8 montre schématiquement le principe de cette extraction sur phase solide.

Quantification de l'arginine-vasopressine dans le plasma par spectrométrie de masse en tandem

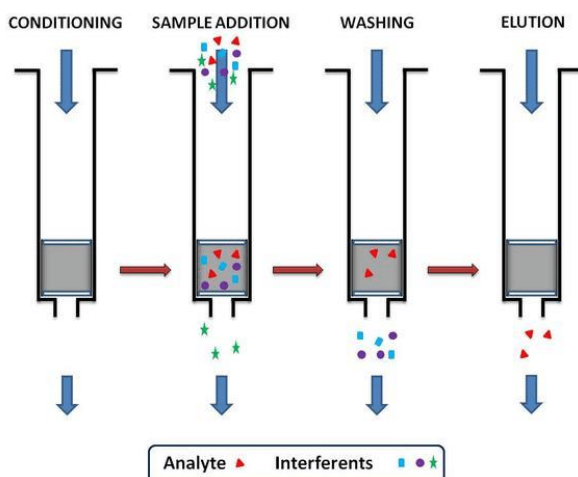


Figure 8: Schéma des différentes étapes d'une SPE avec 1) Le conditionnement de la phase adsorbante 2) Le chargement de l'échantillon 3) Les lavages pour nettoyer le puits avec l'analyte adsorbé 4) L'éluion de l'analyte avec un solvant adéquat

2.3.2 LC-MS/MS

Une fois l'AVP extraite du plasma, il faut procéder à l'analyse proprement dite qui consiste à séparer les composés encore présents dans l'échantillon par une chromatographie liquide et ensuite à le détecter dans le spectromètre de masse.

Pour ce travail, l'appareil utilisé est un microLC-MS/MS possédant une sensibilité idéale pour l'analyse de peptides et de protéines. Une fois sorti du système LC, l'échantillon va être ionisé au moyen d'un electrospray en appliquant une différence de potentiel importante entre la sortie de la LC et l'entrée du spectromètre de masse dans le but de former des microgoutellettes possédant une très haute densité de charges. La schématisation du fonctionnement de cette ionisation est illustrée à la Figure 9.

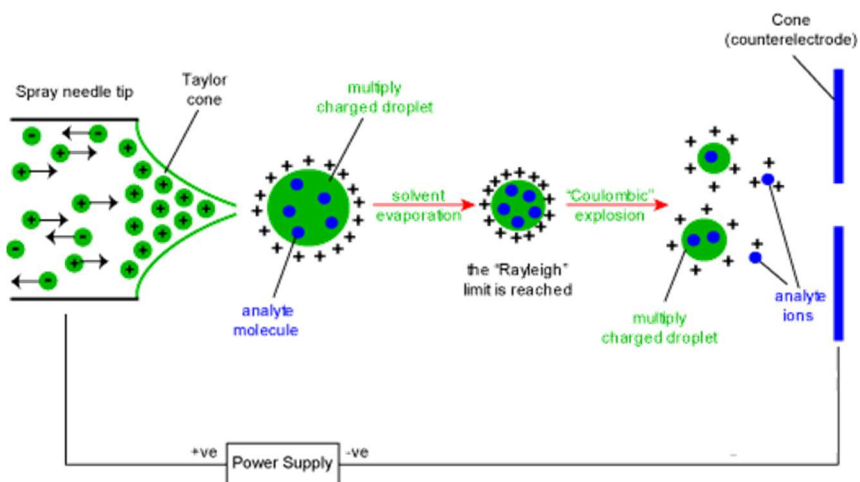


Figure 9: Principe de fonctionnement d'un ESI

Dans le schéma récapitulatif illustré à la Figure 10 sont représentées toutes les étapes nécessaires au dosage de l'AVP depuis l'échantillon de plasma brut jusqu'au résultat.

L'OT, contrairement à l'AVP, possède une structure unique chez tous les mammifères dont la masse moléculaire est 1007.2 g/mol (34). Découvert en même temps que l'AVP (Kamm, 1928), l'OT est présent dans l'organisme humain à des concentrations allant de 10 à 240 pg/ml (35) et possède une demi-vie de 4 à 10 minutes dans le sang (36).

2.4.2 EFFETS PHYSIOLOGIQUES

L'OT sécrété dans le sang depuis l'hypophyse est particulièrement impliqué chez les femmes lors de la période de grossesse. Sa sécrétion dans l'organisme, stimulée par la dilatation du col de l'utérus, facilite la naissance de l'enfant et joue ensuite un rôle important lors de l'allaitement (34).

Elle peut également avoir une fonction de neuromédiateur des émotions, du stress et du comportement lorsqu'elle agit de manière intracérébrale en se fixant sur les récepteurs situés dans le système limbique (37). Chez l'homme, elle a un rôle dans l'activité sexuelle et la confiance en soi, d'où son surnom de « hormone de l'amour ».

2.4.3 POSSIBILITÉ ET UTILITÉ DU DOSAGE EN TANDEM AVP ET OT

Comme les structures des 2 peptides sont proches, bien que leurs effets physiologiques soient drastiquement différents, il est raisonnable de penser que leurs comportements physico-chimiques et leurs interactions soient similaires. Il est alors judicieux de développer une méthode capable de doser simultanément ces 2 peptides dans des échantillons biologiques.

Pouvoir doser plus d'une molécule à la fois représente un gain de temps et d'argent non-négligeable. De plus, des études récentes mettent en avant l'OT et l'AVP comme biomarqueurs chez des personnes souffrant de troubles psychologiques (38). Même si ces études n'ont encore pas abouti à des résultats fiables et concluants, une méthode de détection simultanée de concentrations endogènes d'OT et d'AVP pourrait s'avérer d'une utilité cruciale.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 MATÉRIEL

3.1.1 APPAREILS ET COLONNES

Dans le Tableau 1 sont listés tous les appareils et colonnes ayant servi durant le travail de Bachelor.

Tableau 1: Appareils et colonnes utilisés

Appareils	Références
Lyophiliseuse	Heto FD3 avec pompe Edwards High vacuum pump
Spectromètre de masse	Xevo® TQ-S avec source ionisation ESI Zspray™ Waters
UPLC	Acquity ULPLC i-class avec injecteur FTN
Colonne UPLC	Acquity UPLC BEH300 C18 (1.7µm x 1 mm x 100 mm)
MS pour UPLC	Waters, Xevo TQ-S
Sécheuse	Biotage TurboVap® R96
Pression positive SPE	Waters <i>The science of what's possible</i> ™ Positive pressure-96
Scelleuse thermique	Waters® Thermi Combo-sealer
Centrifugeuse	Hettich Zentrifugen Rotina 420R
uLC	Acquity ULPLC m-class avec Trap et pompe auxiliaire
Colonne Trap	Acquity UPLC, M-Class Trap symmetry C18 (5 µm x 300 µm x 50 mm) 100 Å
MS pour uLC	Waters, Xevo TQ-S Système IonKey
Cartouche IonKey	Waters Peptide CSH C18 (150 µm x 50 mm) 130 Å, 1.7µm iKey™

3.1.2 RÉACTIFS ET SOLVANTS

Dans le Tableau 2 sont listés tous les lots et fournisseurs pour chaque produit utilisé.

Tableau 2: Produits utilisés

Produits	Fournisseur	N° de lot
Acétonitrile	Biosolve	1145941
		1159051
		1169641
		1159081
		1159841
		1123551
Méthanol	Merck	1122141
Eau		S5761162 619
Isopropanol		K44768928
Acide formique		BCBR4868V
Acide trifluoroacétique		BCBN7543
Ammoniaque		61200044
Acide phosphorique	Alfa Aesar	61200044
Nonyl-β-D-galactopyranose	Fluka	BCBN8507
Trifluoroéthanol	Roth	075224934
Ethanol	Bachem	1066309
Acide acétique	Biochemed	BC032211P31
Arginine-vasopressine		
Plasma déstripé		

3.1.3 MONOVETTES ET INHIBITEURS

Dans le Tableau 3 sont listés les monovettes et inhibiteurs utilisés pour le prélèvement et le traitement du plasma sanguin.

Tableau 3: Monovettes et inhibiteurs pour traitement du plasma

S-monovette EDTA	Sarstedt	02.1066.001
S-monovette héparine	Sarstedt	01.1604
AEBSF	Applichem	6P014992
Aprotinine	Axon Lab AG	65011017
Ovomucoïd (CETI)	Sigma	064K7007

3.1.4 PLAQUES SPE

Dans le Tableau 4 sont listées les plaques utilisées pour les SPE.

Tableau 4: Plaques pour SPE

Oasis WCX® uElution Plate (2 mg)	Waters	004736169B
Plaque collectrice Waters® Acquity UPLC 700 uL		0006341774
Plaque collectrice Waters® Acquity UPLC 2 mL		16004641
		13011641

3.2 MÉTHODES

Ce travail de Bachelor étant du développement de méthode, plusieurs parties distinctes sont présentées dans ce chapitre Méthodes. Tout d'abord, la préparation des solutions d'AVP utilisées durant ce Bachelor ; ensuite, les méthodes LC et MS sur l'UPLC servant au développement de la méthode SPE. Vient ensuite toute la partie traitant de l'étude des comportements physico-chimiques de l'AVP (adsorption, stabilité, ...). Puis le traitement des échantillons plasmatiques (prélèvements, inhibiteurs), la méthode SPE et finalement les méthodes LC et MS sur la microLC système IonKey pour la quantification de l'AVP endogène.

3.2.1 PRÉPARATION DES SOLUTIONS D'AVP

3.2.1.1 LYOPHILISATION

Afin de pouvoir conserver les aliquots d'AVP, il a été nécessaire de les lyophiliser. La totalité de l'AVP (environ 1 mg) a été solubilisée dans 1 mL d'une solution d'eau contenant 0.5% d'AA. Par pipetage de 50 uL de solution (50 ug d'AVP), 20 aliquots ont été réalisés dans des tubes MiniSorbe. Les tubes, fermés hermétiquement, ont été mis au congélateur à -80°C pendant 1 h. Une fois congelés, ils ont été placés ouverts dans la lyophiliseuse à -50°C et 125 mbar pendant une nuit. Une fois lyophilisés, ils sont conservés dans une chambre froide à -20°C.

3.2.1.2 PRÉPARATION DES SOLUTIONS DE TRAVAIL

Les aliquots lyophilisés ainsi que toutes les solutions d'AVP diluées (de 1 mg/ml à 100 pg/ml) ont été préparés dans un mélange Eau/ACN 95 : 5 + 1% AA. Toutes les solutions sont réalisées dans des tubes MiniSorb et sont gardées au frigo à 4°C.

3.2.2 MÉTHODE LC POUR UPLC

Les échantillons et standards d'AVP sont élués avec comme phase aqueuse : H₂O + 0.02% AA et comme phase organique : MeOH + 0.02 % AA avec un gradient large allant de 5% à 95% de phase organique. Le gradient complet est décrit dans le Tableau 5. Le débit d'éluant est de 0.200 ml/min, la température de l'autosampler est fixée à 10°C et celle de la colonne à 60°C. Le volume d'injection est de 5µL. La pression moyenne du système aux conditions initiales (5% phase organique) est d'environ 10'000 psi et la pression maximum autorisée sur l'appareil est de 15'000 psi. Les seal wash et weak wash utilisés sont Eau/ACN 95 : 5 et le strong wash est ACN/IPA/Eau/MeOH 1 :1 :1 :1.

Tableau 5: Gradient complet de la méthode

Temps [min]	Phase mobile B [%]
0 à 0.5	5
0.5 à 5.5	5 à 55
5.5 à 5.55	55 à 95
5.55 à 8.0	95
8.0 à 8.05	95 à 5
8.05 à 10.5	5

3.2.3 MÉTHODE MS/MS POUR UPLC

Pour quantifier l'AVP, un mode d'ionisation positif (ESI +) est utilisé. Le voltage du cône est de 50 V et celui du capillaire de 500 V. La température du gaz de nébulisation est de 300°C et son débit est fixé à 150 L/h (7 bars). Le débit du gaz de collision est quant à lui fixé à 0.15 mL/min. L'ion parent bichargé [M+2H]⁺², les transitions choisies pour l'AVP ainsi que les voltages de collision sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6: Transitions et voltages de collision

m/z ion parent [M+2H] ⁺²	m/z ions produits (daughters)	Voltage de collision [V]
542.777	70.096	60
	120.090	30
	328.100	20
	757.140	10

3.2.4 ADSORPTION DE L'AVP

L'étude de l'adsorption de l'AVP en fonction du solvant est effectuée avec une solution d'AVP de concentration de 100 ng/mL. La solution est diluée 25 fois dans un 1^{er} MiniSorb avec le solvant à tester. Le mélange est transféré dans un 2^{ème} MiniSorb, vortexé 10 secondes puis laissé sans agitation pendant 2 minutes. Cette manœuvre est effectuée 5 fois. Une fois les 5 passages effectués, la solution est rediluée 25 fois dans la solution Eau/ACN 95 : 5 + 1% AA (concentration finale = 160 pg/ml) pour être injectée sur le LC-MS/MS.

3.2.5 STABILITÉ DES SOLUTIONS AVP

La stabilité des solutions d'AVP à 4°C dans le mélange Eau/ACN 95 :5 +1% AA est étudiée sur une durée de plus de 2 mois (01.05.17 au 17.07.17). Des solutions de concentration 1000 pg/ml préparées à partir d'un aliquot lyophilisé (cf. chapitre 3.2.1.1) et d'un aliquot non-lyophilisé sont injectées en triplicat sur l'UPLC-MS/MS. Les aires des pics aux transitions m/z de 328.1 et 757.4 sont répertoriées sur un graphique.

3.2.6 PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DU PLASMA

3.2.6.1 PRÉLÈVEMENT

Le sang est prélevé chez un volontaire au moyen d'une monovette de 7.5 mL contenant 16 UI/mL (100 IU = 1mg) d'héparine (anticoagulant). Le sang est composé d'un peu plus 50% de plasma, la quantité de plasma approximative dans la monovette sera de 4 mL. Avant le prélèvement du sang, des inhibiteurs sont ajoutés dans la monovette en tenant compte du fait qu'il y aura environ 4 mL de plasma. Les volumes d'inhibiteurs sont donc adaptés en conséquence (cf. chapitre 3.2.6.2). Une fois la monovette remplie de sang, elle est centrifugée à 3000 rpm pendant 10 minutes. Le plasma (surnageant) est transféré dans un Falcon de 10 mL.

3.2.6.2 INHIBITION DES PROTÉASES PLASMATIQUES

3.2.6.2.1 PRÉPARATIONS DES SOLUTIONS STOCKS

Les échantillons plasmatiques sont traités avec 3 inhibiteurs : Aprotinine, AEBSF et Ovomucoïd (CETI) pour empêcher les protéases de dégrader l'AVP. Les préparations des solutions stocks d'inhibiteurs sont indiquées dans le Tableau 7.

Tableau 7: Préparations des solutions stocks d'inhibiteurs

Inhibiteur/Pesée	Solvant/Volume	Concentration	Stockage/Durée de validité
Aprotinine/1.953 mg	Eau/1000 uL	0.3 mM	Congélateur -80°C/2 ans
AEBSF/23.969 mg	Eau/1000 uL	100 mM	Congélateur -80°C/2 mois
CETI/7.5 mg	Eau/1000 uL	7.5 mg/mL	Congélateur -80°C/-

3.2.6.2.2 TRAITEMENT DU PLASMA

Les volumes de solutions stocks à ajouter au plasma et les concentrations finales sont décrits dans le Tableau 8. Cette préparation est définie pour un volume total de 1 mL, les volumes sont adaptés en fonction du volume de plasma à traiter.

Tableau 8: Traitement du plasma par ajout d'inhibiteurs

Volume plasma total [uL]	Inhibiteur	Volume inhibiteur [uL]	Concentration de l'inhibiteur dans le plasma
979	Aprotinine	1	0.3 μ M
	AEBSF	10	1 mM
	Ovomucoid	10	75 μ g/mL

3.2.7 PRÉCIPITATION DES PROTÉINES PLASMATIQUES

Dans l'optique d'injecter des échantillons plasmatiques sur le microLC-MS/MS système IonKey, il est nécessaire de précipiter les protéines de l'échantillon. Pour ce faire, dans un tube MiniSorb, 300 uL de plasma sont acidifiés avec 3 uL de solution FA 10% dans l'eau afin d'obtenir une concentration finale de 0.1% FA dans le plasma. La précipitation est opérée par un ajout de 1500 uL d'ACN (rapport plasma/solvant 1 :5). La solution est vortexée pendant 10 secondes avant d'être centrifugée 10 minutes à 3000 rpm. Une fois centrifugée, le surnageant de la solution (~1800 uL) est transféré dans une plaque collectrice de 2 mL. Le surnageant est séché à 45°C sous flux d'azote pendant 2 h, le résidu est ensuite repris dans 300 uL d'une solution Eau/ACN 95 : 5 + 1% AA. La plaque est agitée durant 1 minute, puis la solution sera utilisée pour la SPE.

3.2.8 EXTRACTION EN PHASE SOLIDE

Pour extraire l'AVP des échantillons plasmatiques, les puits de la plaque Oasis WCX sont d'abord conditionnés avec 200 uL d'ACN puis équilibrés avec 200 uL d'eau. Ensuite, 300 uL de solution, après précipitation et séchage (cf. chapitre 3.2.7), sont mélangés avec 100 uL d'une solution d'acide phosphorique 4% dans un tube MiniSorb. Les 400 uL de solutions sont ensuite chargés sur la plaque Oasis WCX. Les puits sont lavés avec 200 uL d'une solution d'ammoniaque 5%, suivit par 200 uL d'une solution Eau/ACN 25 : 75. L'élution est effectuée avec 100 uL d'une solution Eau/ACN 25 : 75 + 1% FA, les éluats sont récoltés dans une plaque de 700 uL. Ils sont ensuite séchés à 45°C sous azote pendant 30 minutes puis les résidus sont reconstitués dans 50 uL d'un mélange Eau/ACN 95 : 5 + 1% AA + 0.1% NG. La méthode est récapitulée dans le Tableau 9.

Tableau 9: Méthode SPE

Conditionnement	200 uL ACN
Equilibre	200 uL Eau
Load	300 uL plasma + 100 uL H3PO4 4%
Wash 1	200 μ L 5% NH ₄ OH
Wash 2	200 μ L ACN/Eau 75 : 25
Elution AVP	100 μ L ACN/Eau 75 : 25 + 1% FA
Séchage	Sous azote, 45°C, 30 min
Reprise du résidu	50 uL Eau/ACN 95:5 + 1% AA

3.2.9 MÉTHODE LC POUR MICROLC IONKEY

Les échantillons récupérés après SPE et séchage sont injectés sur un microLC-MS/MS équipé d'une trappe et d'un système IonKey (Figure 12). Les échantillons sont trappés avec Eau/MeOH 98 : 2 + 0.1% FA à un débit de 15.000 uL/min. Les composés sont ensuite élués de la trappe avec comme phase aqueuse : H₂O + 0.05% FA et comme phase organique : ACN + 4% TFE + 0.05 % FA avec un gradient variant de 2 à 95% comme le décrit le Tableau 10. Le débit est fixé à 3.000 uL/min. La température de l'autosampler est également fixée à 10°C. La colonne Trap est à 25°C et la cartouche iKey à 60°C. Le volume d'injection est de 10 uL. La pression du système aux conditions initiales est d'environ 4'000 psi et la pression maximale autorisée est de 10'000 psi.

Tableau 10: Gradient complet microLC IonKey

Temps [min]	Phase mobile organique [%]
0 à 1.0	2
1.0 à 3.5	2 à 50
3.5 à 4.0	50 à 95
4.0 à 7.0	95
7.0 à 7.5	95 à 2

Le fonctionnement du système « Trap » de la microLC avec pompe auxiliaire (pompe iKey sur figure) et le système IonKey sont illustrés à la Figure 12.

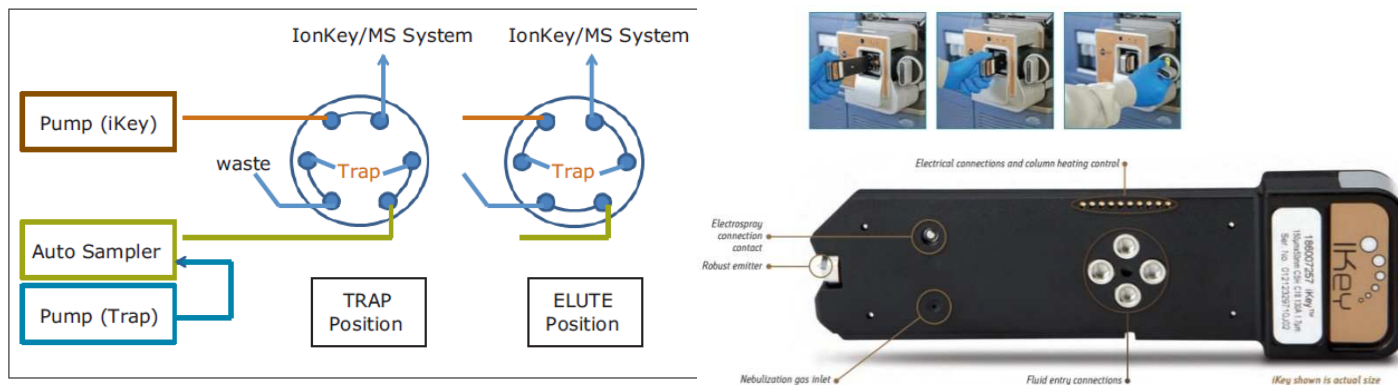


Figure 12: (Gauche) Principe de fonctionnement du système Trap (Droite) Système avec cartouche iKey

3.2.10 MÉTHODE MS POUR MICROLC IONKEY

Pour quantifier l'AVP avec le système microLC-MS/MS IonKey, un mode d'ionisation positif (ESI +) est utilisé. Le voltage du cône est de 50 V et celui du capillaire est fixé à 3'000 V. La température du gaz de nébulisation est de 350°C et son débit est fixé à 150 L/h (7 bars). Le débit du gaz de collision est quant à lui fixé à 0.25 mL/min. L'ion parent, les transitions et les voltages de collision sont les mêmes que ceux de la méthode MS pour UPLC (cf. Tableau 6) sauf pour la transition à m/z = 757.1 qui est ici de 15 V.

3.2.11 QUANTIFICATION DE L'AVP ENDOGÈNE

3.2.11.1 COURBE DE CALIBRATION STD EXTERNES

Pour quantifier l'AVP endogène dans le plasma, une courbe de standards d'AVP est réalisée dans du plasma déstripé au charbon actif (Biochemed). Les 6 standards sont réalisés à des concentrations de 0, 5, 10, 20, 50 et 100 pg/mL. Le STD à 100 pg/mL est préparé en prenant 100 uL d'une solution d'AVP de 1000 pg/mL auxquels sont ajoutés 900 uL de plasma stripé. La préparation des standards par dilution du standard le plus concentré (100 pg/mL) est détaillée dans le Tableau 11.

Tableau 11: Préparation des STD externes

Volume STD 100 pg/mL AVP [uL]	Volume plasma stripé [uL]	Concentration finale [pg/mL]
200	200	50
100	400	20
60	540	10
30	570	5

3.2.11.2 COURBE DE CALIBRATION PAR AJOUTS DOSÉS

La 2^{ème} méthode de quantification est réalisée par ajouts dosés dans l'échantillon plasmatique prélevé sur héparine. Dans le plasma, 5 ajouts dosés sont réalisés à des concentrations de 5, 10, 20, 50 et 100 pg/mL comme le montre le Tableau 12. Le volume final (Plasma + solution AVP) est toujours de 300 uL.

Tableau 12: Préparation des ajouts dosés

Concentration solution AVP [pg/mL]	Volume solution AVP [uL]	Volume plasma sur héparine [uL]	Concentration ajoutée finale [pg/mL]
1000	30	270	100
1000	15	285	50
200	30	270	20
100	30	270	10
100	15	285	5

4 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Afin de faciliter la lecture du rapport et de pouvoir suivre le cheminement effectué, les discussions seront placées directement après les résultats correspondants et ne ferons pas parties d'un chapitre à part.

4.1 OPTIMISATION DES VOLTAGES MS MICROLGC

Pour développer la méthode MS, plusieurs tests ont été effectués en utilisant une solution AVP 1000 pg/mL. Tout d'abord, le voltage de cône optimal a été déterminé en testant plusieurs valeurs allant jusqu'à 100 V. La Figure 13 représente les intensités des pics à m/z 70.096 et 120.09 en fonction du voltage d'ionisation.

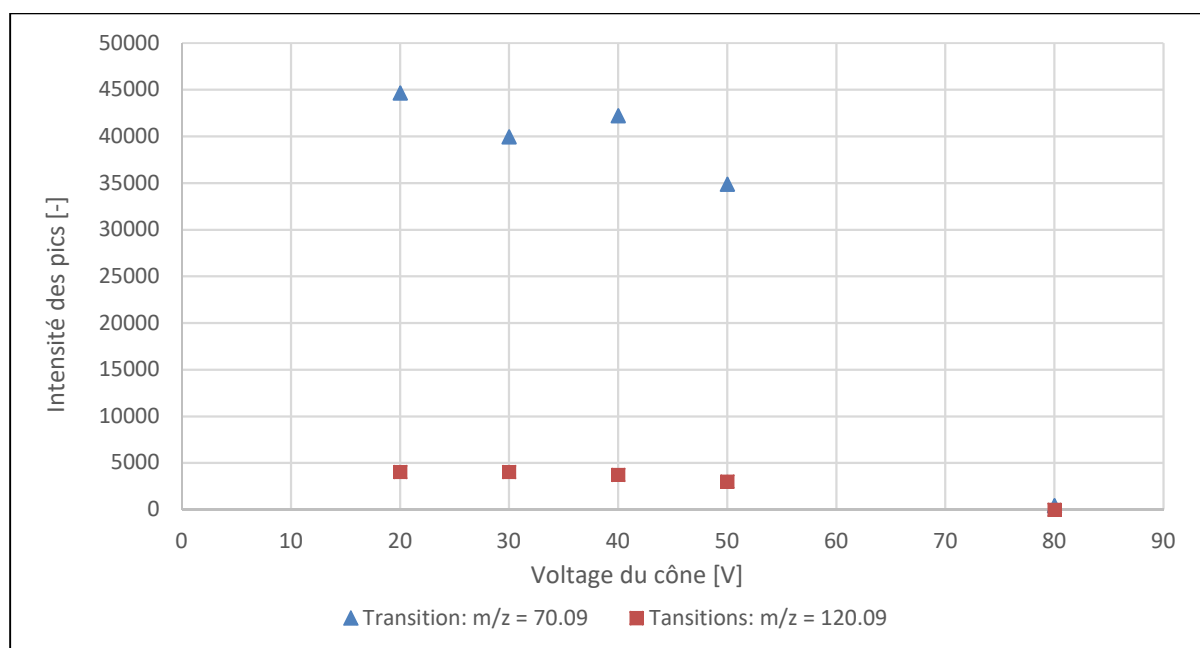


Figure 13: Intensités des transitions en fonction du voltage d'ionisation

Une trop grande énergie d'ionisation conduit à une perte totale de signal comme le montre l'essai avec 80 V. Le voltage optimal est de 20 V, cependant une énergie aussi basse entraîne une augmentation du bruit de fond. Le voltage choisi est donc 50 V qui offre pratiquement la même intensité que le 20 V avec un bruit de fond plus faible.

Le voltage d'ionisation est le même pour toutes les transitions car il s'agit ici simplement de charger positivement la molécule. En revanche, les énergies de collisions sont propres à chaque transition. Leurs optimisations ont été réalisées en fixant le cône à 50 V et en faisant varier le voltage de collision de 10 à 80 V par incrémentation de 10 V. La Figure 14 illustre les intensités des pics à toutes les transitions (cf. chapitre 3.2.3) pour chaque énergie de collision.

Quantification de l'arginine-vasopressine dans le plasma par spectrométrie de masse en tandem

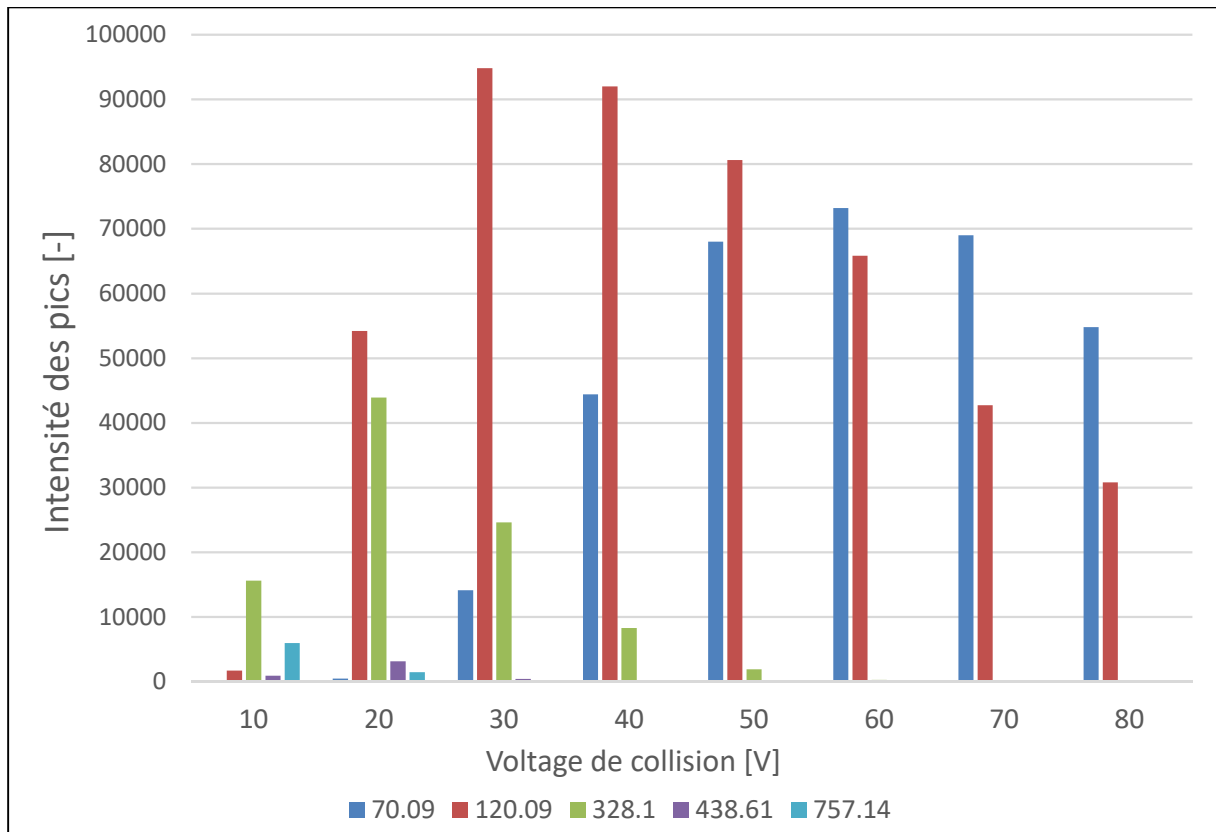


Figure 14: Intensités des pics pour chaque transition en fonction de chaque énergie de collision

Cette expérience montre que plus le fragment produit est grand plus l'énergie de collision optimale est faible. En effet, le fragment 70.09, issu de la chaîne latérale de l'arginine, demande une grande énergie de collision pour se former puisqu'il est nécessaire de réaliser une première fragmentation de la molécule d'AVP pour obtenir la partie y_2 , puis de réaliser une 2^{ème} fragmentation pour libérer l'ion prolinium (39), (40). Cet ion est néanmoins très abondant en raison de sa forme cyclisée qui lui confère une très bonne stabilité. Les fragmentations sont illustrées à la Figure 15.

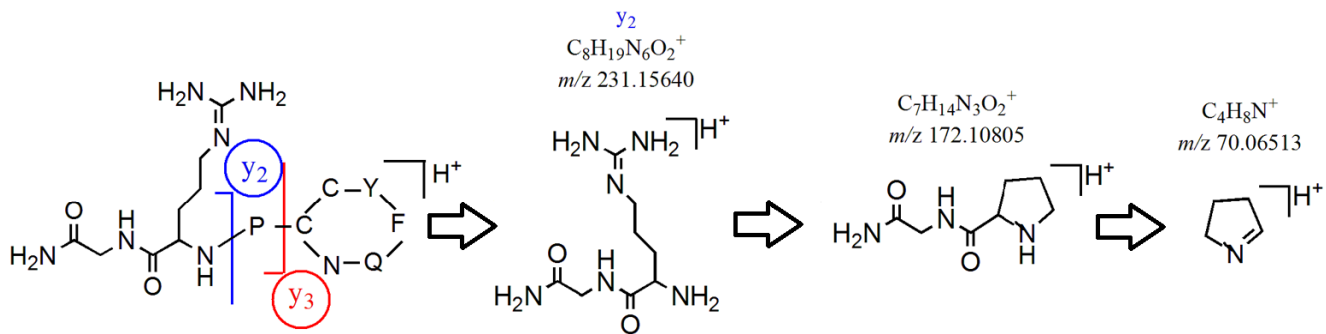


Figure 15: Fragmentations de l'AVP pour l'obtention de l'ion à $m/z = 70.09$

Le 2^{ème} fragment avec une masse sur charge de 120.09 est quant à lui issu d'une double fragmentation de type β de la molécule d'AVP produisant un intermédiaire (Phe^+) avec une masse de 148.09 qui, par la perte de son carbonyle (masse de 28), donne l'ion produit observé en MS/MS (40), (41). Le mécanisme de l'obtention de ce fragment est illustré à la Figure 16.

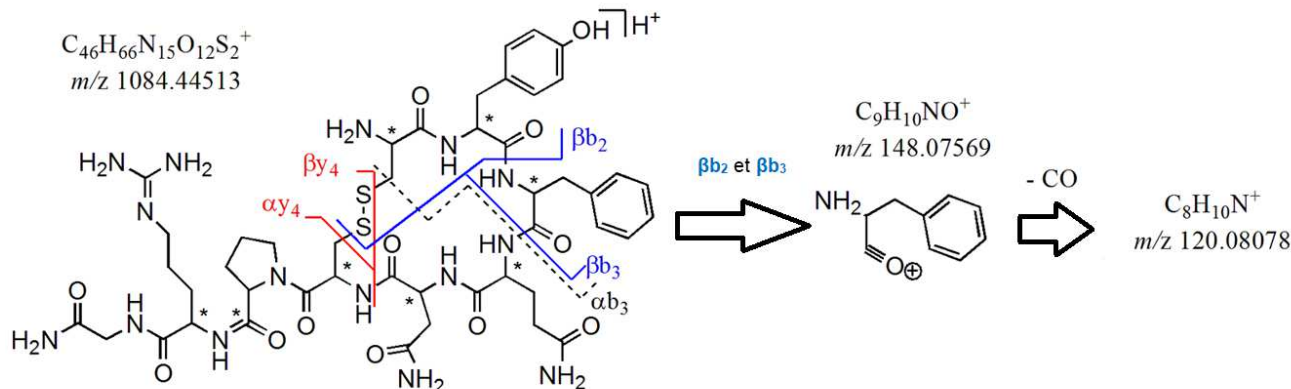


Figure 16: Fragmentations de l'AVP pour l'obtention de l'ion à $m/z = 120.09$

Les fragments possédant les masses les plus élevées avec 328.1 et 757.14 sont complémentaires et issus d'une seule et même fragmentation y_3 de la molécule d'AVP (40), (42) comme le montre la Figure 17. La fragmentation entre la proline et la cystéine est la plus favorable puisque la proline est un très bon accepteur de proton. Une énergie de collision de 10 à 20 V est donc suffisante pour briser la liaison amide reliant la proline à la cystéine.

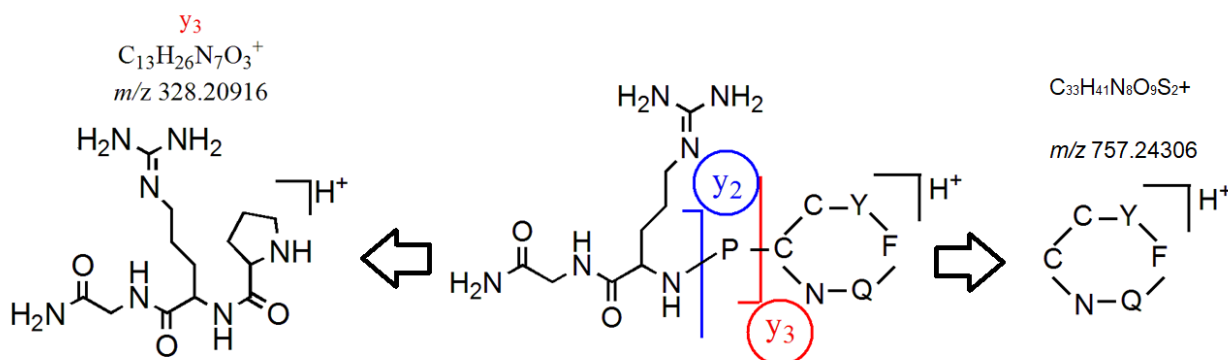


Figure 17: Fragmentations de l'AVP pour l'obtention des ions à $m/z = 328.1$ et 757.14

Les 2 premières transitions à $m/z = 70.09$ et 120.09 ne seront pas utilisées pour la quantification de l'AVP dans le sang. Car, même si elles sont bien plus intenses que les 2 autres, elles sont beaucoup moins spécifiques. En effet, n'importe quel peptide possédant une arginine produira un fragment à 70.09 et tous les peptides se terminant par une phénylalanine produiront un fragment à 120.09 . En revanche, les fragments avec des m/z plus élevés à 328.1 et 757.14 sont bien plus spécifiques. Le bruit de fond pour ces transitions sera très faible et donc la sensibilité très bonne.

4.2 ETUDE DE L'ADSORPTION

Les tests d'adsorption ont été effectués en triplicat avec 4 différents solvants. Pour chaque solvant, les aires des pics de chacune des 4 transitions sont comparées avec un contrôle à 160 pg/ml d'AVP dans la Figure 18. 160 pg/mL serait la concentration théorique finale si aucune adsorption n'était observée (cf. chapitre 3.2.4). Une étude préliminaire de l'adsorption de l'AVP avait déjà été réalisée avec les solvants présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13: Solvant pour l'étude préliminaire de l'adsorption

Solvants non-acidifiés	Solvants acidifiés
Eau/ACN 95 : 5	Eau/ACN 95 : 5 + 1% AA
Eau/ACN 50 : 50	Eau/ACN 50 : 50 + 1% AA
Eau/ACN 5 : 95	Eau/ACN 5 : 95 + 1% AA
Eau	Eau + 1% AA

Puisque aucune adsorption importante avec les 8 solvants du Tableau 13 n'avait été observée, seulement 4 solvants ont été re-testés en triplicat en gardant l'eau qui est le solvant avec lequel l'adsorption était maximale.

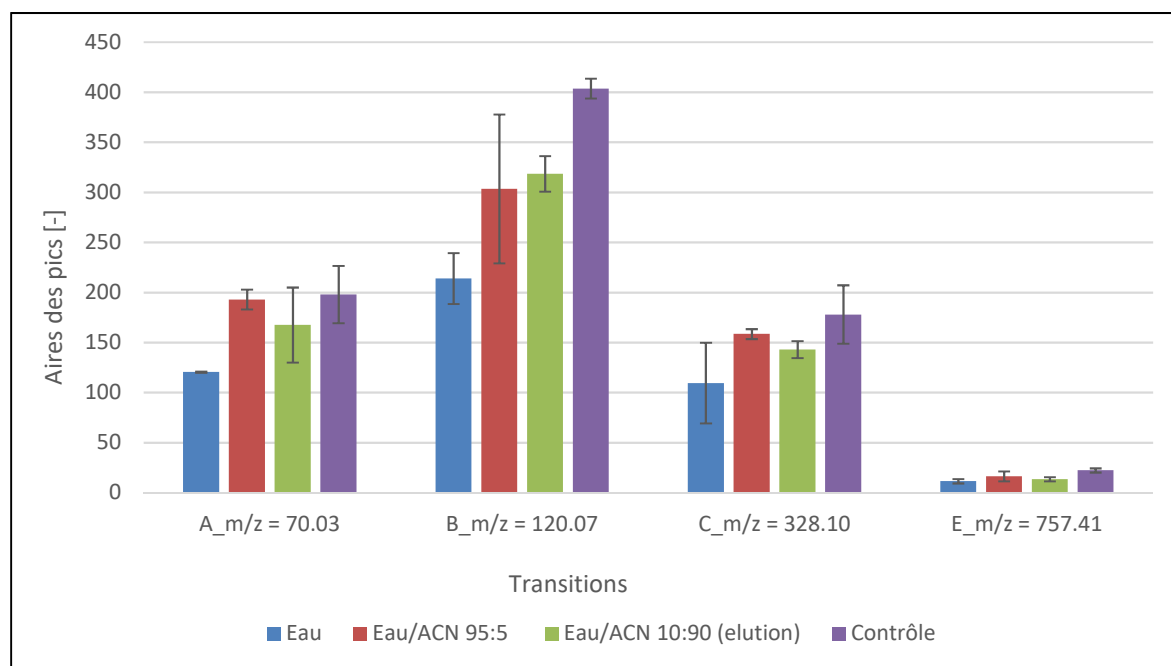


Figure 18: Aires des pics pour chaque solvant test (les barres d'erreurs sont des écarts-types)

Comme aucun standard interne n'est utilisé, les aires ne sont pas corrigées, ce qui explique les erreurs de l'ordre de 30% notamment lors des essais avec l'eau et eau/ACN 95 : 5. Cette grande variabilité est aussi due aux petites aires obtenues avec cette concentration de 160 pg/ml. Cependant, il est important de travailler à une faible concentration puisque l'adsorption dépend de la concentration. Un test d'adsorption avec une solution à une concentration de 1 ng/mL aurait certainement donné des erreurs plus faibles mais ne se serait pas avéré concluant car, avec des aires 10 fois plus grandes, aucune différence n'aurait pu être remarquée.

Malgré les incertitudes, toutes les aires sont proches du contrôle de 160 pg/mL, ce qui signifie qu'il y a bien un phénomène d'adsorption (maximum avec l'eau) mais très faible avec le solvant utilisé pour les préparations des solutions : Eau/ACN 95 :5 + 1% AA.

Comme la manœuvre d'adsorption (5 transvasements et vortexages) est exagérée par rapport à des manipulations usuelles de laboratoires, il est possible d'affirmer que l'AVP ne posera aucun problème d'adsorption durant les futures étapes du travail.

4.3 ETUDE DE LA STABILITÉ

La stabilité des solutions de travail à 4°C (conservées au réfrigérateur) est étudiée sur une durée de plus de 2 mois. Les graphiques répertoriant les aires des pics aux transitions 328.1 et 757.1 sont illustrés dans l'Annexe 7.1 du rapport. Les Figures de l'Annexe 7.1 ne montrent aucune dégradation de l'AVP en solution, que ce soit dans la solution préparée à partir de l'aliquot lyophilisé ou non. Les variations visibles au cours du temps sont similaires entre les 2 solutions et les 2 transitions, ces fluctuations proviennent sans doute de la sensibilité du MS qui varie au fil du temps. Certes, la concentration de 1 ng/mL utilisée pour tester la stabilité est élevée et il se peut qu'une dégradation de quelques pourcents ne soit pas visible.

Cependant, toutes les solutions de travail possédant une concentration plus basses sont préparées fraîchement à partir d'une solution de 1 ng/mL ou plus concentrée dont la stabilité est prouvée. Il n'y a donc pas de problème du point de vue de la stabilité des solutions d'AVP du moins sur la durée de ce travail de Bachelor.

Une fois la méthode de quantification développée, il sera nécessaire d'effectuer plusieurs autres tests de stabilité. Notamment les stabilités freeze-thaw (congelé, décongelé) et bench-top (conditions de laboratoire) des solutions stocks et la stabilité à long terme des solutions d'AVP dans le plasma congelé.

4.4 INHIBITION DES PROTÉASES

Afin de s'assurer que la concentration en AVP dans le plasma au moment de l'analyse correspond bien à la concentration lors de la prise de sang, il est nécessaire de traiter les échantillons plasmatiques avec des inhibiteurs de protéases. Les protéases plasmatiques susceptibles de dégrader l'AVP ainsi que les inhibiteurs (43) sont illustrés dans la Figure 19.

Quantification de l'arginine-vasopressine dans le plasma par spectrométrie de masse en tandem

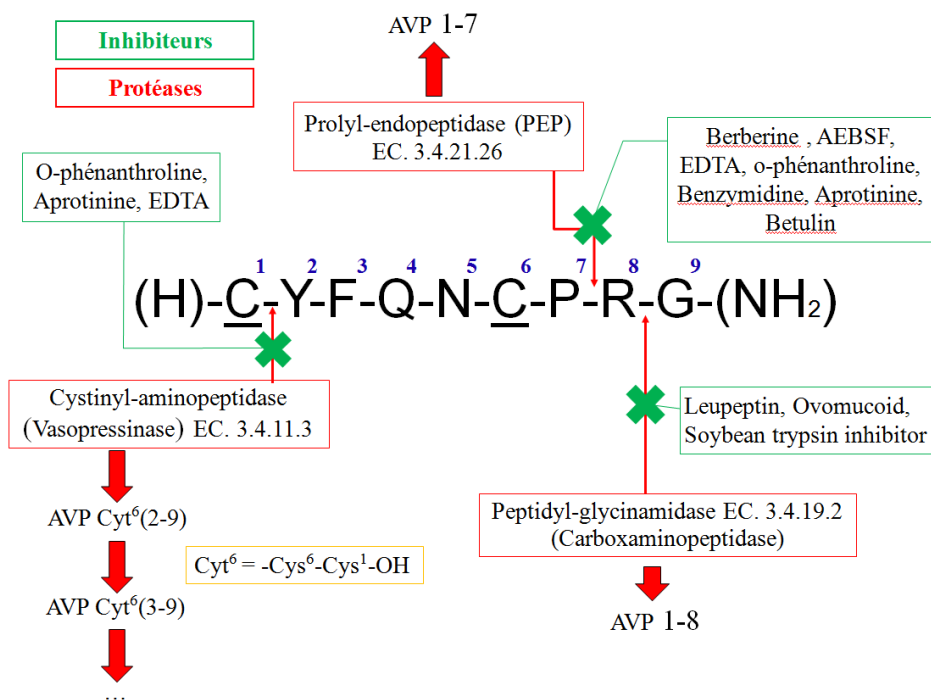


Figure 19: Sites de clivages des différentes protéases sur l'AVP et inhibiteurs correspondants

Les 5 inhibiteurs testés individuellement dans les échantillons plasmatiques sont :

1. L'EDTA inhibe la cystinyl-aminopeptidase et la prolyl-endopeptidase. Il est ordinairement utilisé comme inhibiteur générique et sert également d'anticoagulant lors des prises de sang (44).
2. L'aprotinine est un inhibiteur de sérine protéases (trypsine et chymotrypsine (45)) mais aussi de la cystinyl-aminopeptidase et prolyl-endopeptidase.
3. L'AEBSF est une petite molécule chimique de formule brute $C_8H_{10}FNO_2S \cdot HCl$ dont la masse molaire vaut 239.69 g/mol. Elle possède les mêmes propriétés inhibitrices que l'aprotinine (inhibe les sérines protéases (46)).
4. L'Ovomucoïd est une protéine présente dans le blanc d'œuf qui peut d'ailleurs déclencher une allergie aux œufs (47). C'est un inhibiteur de trypsine (48).
5. L'ortho-phénanthroline est un composé organique ($C_{12}H_8N_2$) de masse molaire 180.205 g/mol dont la structure est similaire au phénanthrène. Il inhibe les carboxyaminopeptidases A et les cystinyl-aminopeptidases (49).

Chaque échantillon de plasma dopé avec 1000 pg/ml d'AVP et traité avec un inhibiteur selon le Tableau 14 a été effectué en duplicat.

Tableau 14: Préparation des solutions d'AVP dans le plasma avec inhibiteurs

Volume solution AVP 1000 pg/ml	Inhibiteur/ volume solution stock	Concentration stock inhibiteur	Concentration finale inhibiteur
980 uL	EDTA/ 20 uL	500 mM	10 mM
990 uL	AEBSF/ 10 uL	100 mM	1 mM
999 uL	Aprotinine/ 1 uL	0.3 mM	0.3 uM
990 uL	CETI/ 10 uL	7.5 mg/ml	75 ug/ml
999 uL	Actinonine/ 1 uL	4 mg/ml	4 ug/ml
995 uL	o-phénanthroline/ 5 uL	200 mM	1 mM

Les aires des pics pour chaque transition sont comparées avec celles d'un contrôle de 1000 pg/ml d'AVP dans un plasma sans inhibiteur. La Figure 20 représente la comparaison des aires de chaque échantillon avec le contrôle de même concentration théorique.

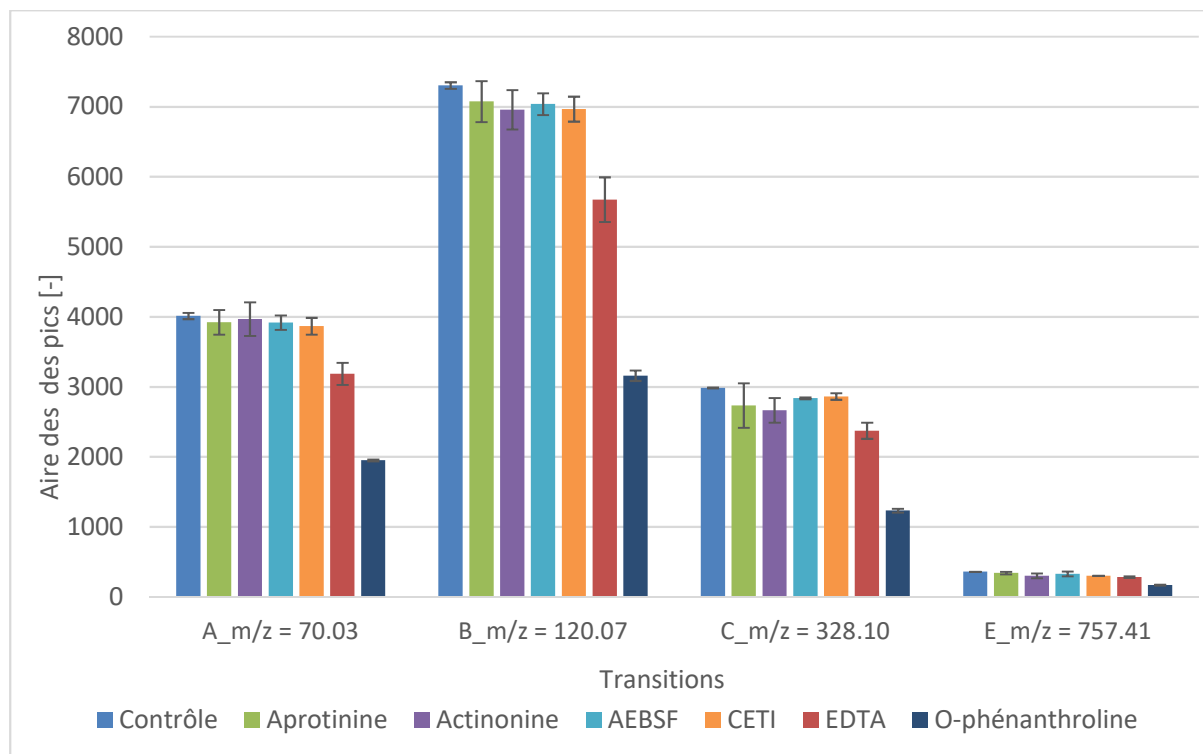


Figure 20: Aires des pics pour chaque plasma dopé à l'AVP et traité avec inhibiteur (les barres d'erreurs sont des écarts-types)

Il est important de tester d'abord les inhibiteurs individuellement pour observer s'ils produisent une modification du temps de rétention de l'analyte ou une diminution du signal. Parmi les inhibiteurs testés, l'aprotinine, l'AEBSF et l'ovomucoïd ne produisent aucun effet sur l'AVP. En revanche, l'EDTA induit une perte de signal d'environ 20% et l'ortho-phénanthroline une perte de plus de 50%. L'EDTA et l'ortho-phénanthroline ne seront donc pas utilisés pour traiter les échantillons plasmatiques. Les 3 inhibiteurs validés sont suffisants pour le traitement car ils inhibent les 3 protéases susceptibles de dégrader l'AVP (cf. Figure 19).

Le cocktail des 3 inhibiteurs ensemble a aussi été testé pour observer une possible altération du signal car, même si aucun des 3 inhibiteurs ne produit d'effet individuellement, il est possible d'avoir un effet de groupe une fois rassemblé. Le test du cocktail n'a démontré aucun effet sur le signal d'AVP.

4.5 EXTRACTION EN PHASE SOLIDE

Dans l'optique de pouvoir unifier les dosages de l'AVP et de l'OT, la 1^{ère} méthode de SPE testée était un compromis entre les méthodes de dosages d'AVP préexistantes citées dans (31), (32) et la méthode utilisée au laboratoire des catécholamines pour doser l'OT.

En se basant sur l'idée que l'AVP et l'OT possèdent des interactions physico-chimiques similaires dues à leurs constitutions (2 acides aminés différents), la méthode développée pour l'AVP s'inspire donc de la méthode OT (Tableau 15) et des méthodes des publications.

Tableau 15: Méthode SPE du CHUV pour l'OT

Type de cartouche	Oasis HLB 5 mg
Conditionnement	500 uL MeOH
Equilibre	500 uL 1% H ₃ PO ₄
Load	200 uL plasma + 200 ACN (vortex) + 1600 uL 4% H ₃ PO ₄
Wash 1	500 uL 1% H ₃ PO ₄
Wash 2	500 uL Eau/MeOH 95 :5
Elution AVP	200 uL Eau/ACN 70 :30 +0.1% FA +0.1% NG
Séchage	Sous azote, 45°C, flow max 60
Reprise du résidu	20 uL Eau +0.1% FA +0.1% NG

La 1^{ère} méthode testée pour la SPE de l'AVP est présentée dans le Tableau 16. La SPE a été effectuée en triplicat.

Tableau 16: 1^{ère} essai méthode SPE pour AVP

Type de cartouche	Oasis WCX 2 mg
Conditionnement	200 uL ACN
Equilibre	200 uL 4% H ₃ PO ₄
Load	200 uL solution 1000 pg/ml + 200 uL 4% H ₃ PO ₄
Wash 1	200 uL 4% H ₃ PO ₄
Wash 2	200 uL Eau/MeOH 80 :20
Elution	50 µL ACN/Eau 90 :10 + 1% AA
Séchage	Sous azote, 45°C, flow max 60
Reprise du résidu	20 uL Eau/ACN 95 :5 + 1% AA

La Figure 21 représente les aires moyennes sur les 3 essais pour l'échantillon spiké par rapport aux aires du contrôle de même concentration finale théorique (10 ng/mL).

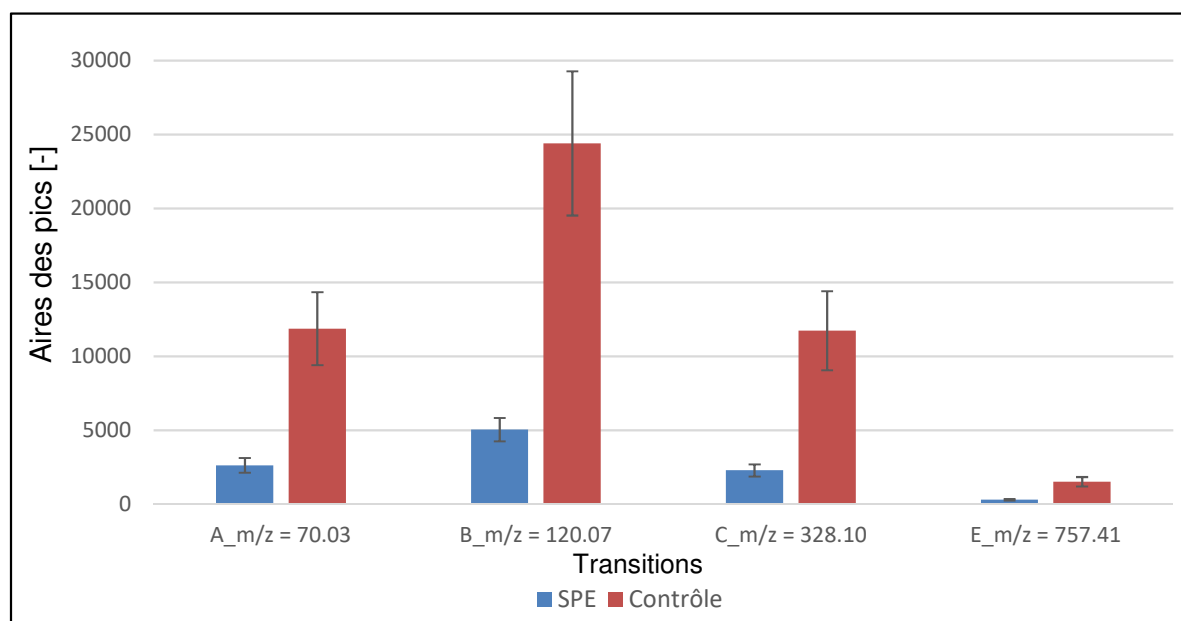


Figure 21: Aires des pics de l'AVP extrait du load par rapport au contrôle (les barres d'erreurs sont des écarts-types)

Le rendement d'extraction de cette 1^{ère} méthode SPE est d'environ 20 %. Les 80% non-élusés sont soit restés adsorbés sur la phase (force d'élution de ACN/Eau 90 :10 + 1% AA trop faible), soit ont été élués avec le wash 1 ou 2 (force d'élution de 4% H₃PO₄ ou de Eau/MeOH 80:20 trop forte). Un bon solvant d'élution pour une phase WCX requiert 2 caractéristiques : un pourcentage organique élevé et la présence d'un acide. Ce sont les protons H⁺ en solutions qui vont entrer en compétition avec l'AVP pour se lier sur la phase, libérer l'AVP et ainsi le permettre d'éluer. Une des explications de ce faible rendement d'extraction est qu'après le 1^{er} wash (4% H₃PO₄) le séchage avec la pression positive ne soit pas complet. Il resterait donc un peu de solution acide dans le puits et sur la phase. Lors de l'ajout du 2^{ème} wash (Eau/MeOH 80 :20), l'AVP serait alors soumis à un mélange contenant 20% de solvant organique et acidifié par les résidus du 1^{er} lavage. Il pourrait donc en grande partie éluer dans le wash 2. Cependant, cette méthode SPE a été réalisée une 2^{ème} fois en triplicat et les wash 1 et 2 ont été récoltés. Aucune trace d'AVP n'étant visible dans les wash, cette hypothèse a été écartée.

La 2^{ème} explication plausible est donc que le solvant d'élution (ACN/Eau 90 :10 + 1% AA) ne soit pas assez fort. Une 2^{ème} méthode de SPE avec une élution contenant 1% de FA à la place du AA est testée. Les aires moyennes de l'échantillon spiké par rapport aux aires du contrôle de même concentration finale théorique sont représentées dans la Figure 22.

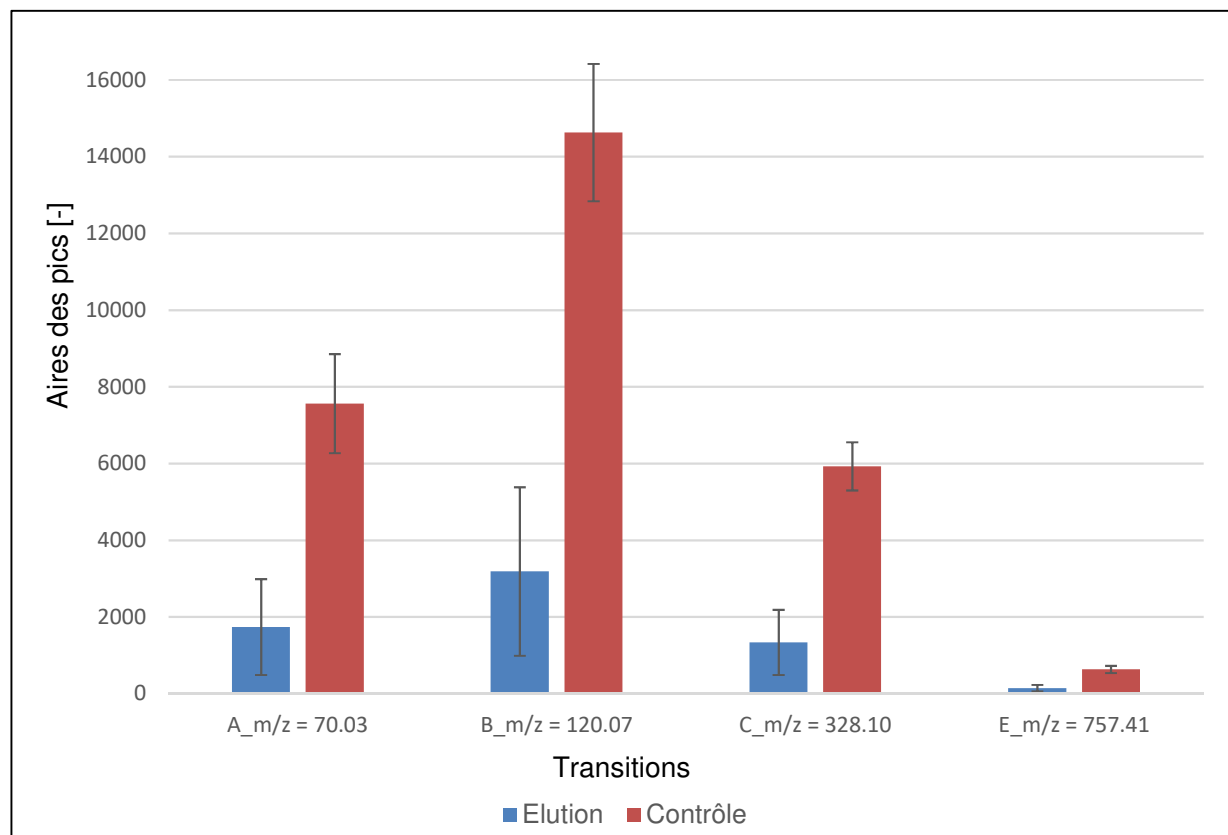


Figure 22: Aires des pics de l'AVP extrait du load par rapport au contrôle (élution 1% FA) (les barres d'erreurs sont des écarts-types)

Le solvant d'éluion contenant du FA possède un pH plus bas que la solution avec AA. Cependant, cela ne change pas le rendement de la SPE car le rendement d'extraction bas n'est pas dû au fait que l'AVP reste adsorbé sur la phase. Car, avec une composition de phase organique de 90% et 1% de FA, l'AVP a forcément élué. Toutes les méthodes et publications traitant une SPE de l'AVP utilisent des wash 1 et 2 radicalement différents. Le wash 1 utilisé dans les publications est fortement basique (5% NH₄OH) alors que le wash 1 utilisé jusqu'ici, pour se rapprocher de la méthode OT, est fortement acide (4% H₃PO₄). Le wash 2 possède une forte composante organique alors que celui employé dans ce travail ne possède que 20% de MeOH pour 80% eau.

Une nouvelle méthode SPE est tentée en changeant les washs pour se rapprocher des méthodes conventionnelles pour l'AVP. La 3^{ème} méthode SPE est présentée dans le Tableau 17. Les essais sont effectués en triplicat.

Tableau 17: 3^{ème} essai méthode SPE

Conditionnement	200 uL ACN
Equilibre	200 uL Eau
Load	100 uL solutions 1 à 3 + 10 uL Eau/ACN 95 :5 + 1% AA + 100 uL 4% H ₃ PO ₄
Wash 1	200 µL 5% NH ₄ OH
Wash 2	200 µL ACN/Eau 75 : 25
Elution AVP	100 µL ACN/Eau 75 : 25 + 1% FA
Séchage	Sous azote, 50°C, 20 min
Reprise du résidu	50 uL Eau/ACN 95 :5 + 1% AA

Solutions de load :

1. Eau/ACN 95 :5 + 1% AA + AVP 1000 pg/mL
2. Plasma + AVP 1000 pg/ml + Inhibiteurs
3. Eau/ACN 95 :5 + 1% AA + AVP 1000 pg/mL spiké après extraction
4. Plasma + AVP 1000 pg/mL+ Inhibiteurs spiké après extraction

La Figure 23 illustre les aires moyennes sur les 3 essais des différents échantillons par rapport aux aires d'un contrôle de concentration de 2 ng/mL, qui est la concentration théorique des échantillons si le rendement de SPE est de 100% (concentration d'un facteur 2 : load de 100 uL et reprise dans 50 uL).

Des essais sont réalisés dans le plasma pour observer un effet matrice positif ou négatif par rapport à la solution Eau/ACN 95 :5. Des essais dont l'AVP est spiké après extraction dans la solution Eau/ACN 95 : 5 et dans le plasma sont réalisés pour s'assurer que le faible rendement provient bien de la SPE et non d'une quelconque suppression de signal dans le MS.

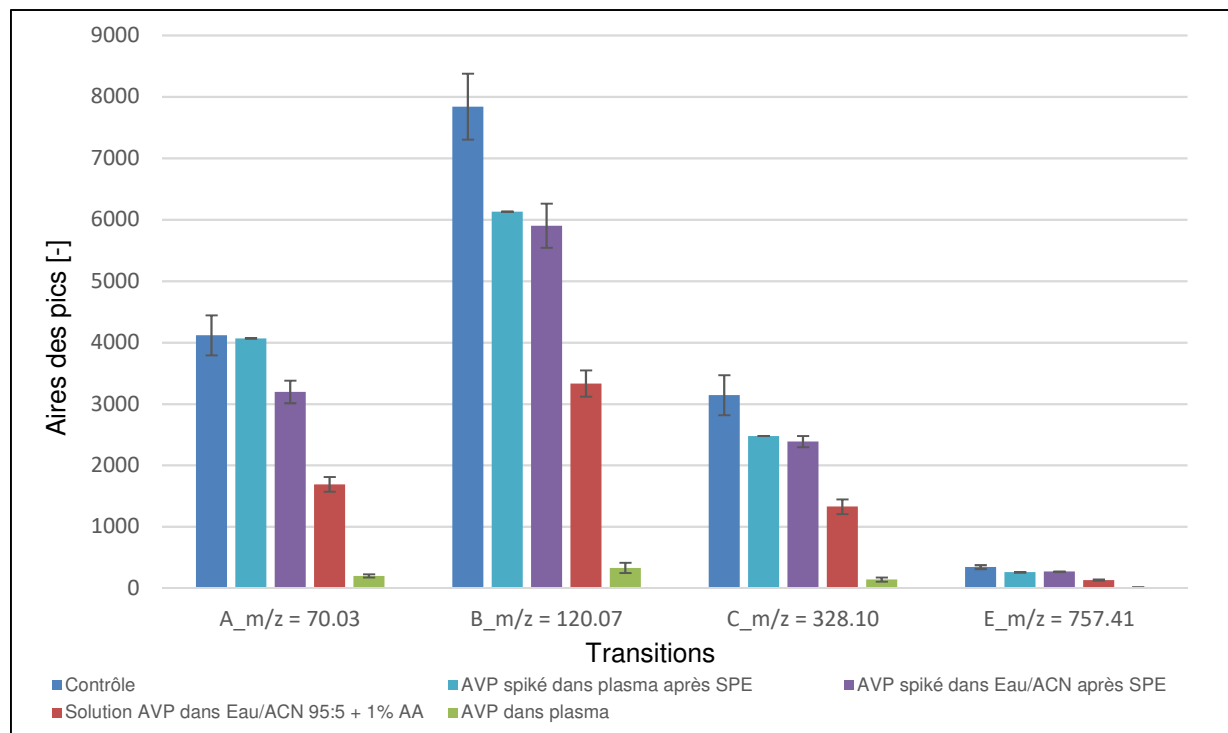


Figure 23: Aires des transitions de l'AVP extrait des loads par rapport au contrôle de 2 ng/mL (les barres d'erreurs sont des écarts-types)

La perte d'environ 20% entre le contrôle (bleu foncé) et les essais spiké après extraction dans Eau/ACN (violet) et dans le plasma (bleu clair) est due à l'étape de séchage et reprise. Le problème vient donc bien de la SPE puisque les 2 essais spikés après SPE montrent un très bon rendement. L'essai avec Eau/ACN (rouge) révèle un bien meilleur rendement de SPE avec cette nouvelle méthode. Le même essai dans le plasma (vert) montre un rendement beaucoup plus faible (environ 5%) dû certainement à un fort effet matrice négatif.

Pour augmenter le rendement de l'extraction de l'AVP d'un plasma, plusieurs compositions de loads sont testées. Une variation des proportions entre le plasma et la solution acide (4% H₃PO₄) lors du chargement sur la SPE peut augmenter le rendement d'extraction. Les différentes compositions du load sont répertoriées dans le Tableau 18. Le reste de la méthode (conditionnement, washs, élution) reste identique (Tableau 17).

Tableau 18: Compositions des loads chargés sur la SPE

Volume plasma spiké AVP 1000 pg/ml avec inhibiteurs	Solution H ₃ PO ₄ 4%
100 uL	100 uL
100 uL	300 uL
100 uL	500 uL
300 uL	100 uL
300 uL	300 uL
300 uL	500 uL

Les rendements des SPE avec les loads de 100 uL de plasma avec inhibiteurs spikés 1000 pg/ml par rapport à un contrôle de 2 ng/mL sont illustrés à la Figure 24. Tous les essais ont été effectués en triplicat.

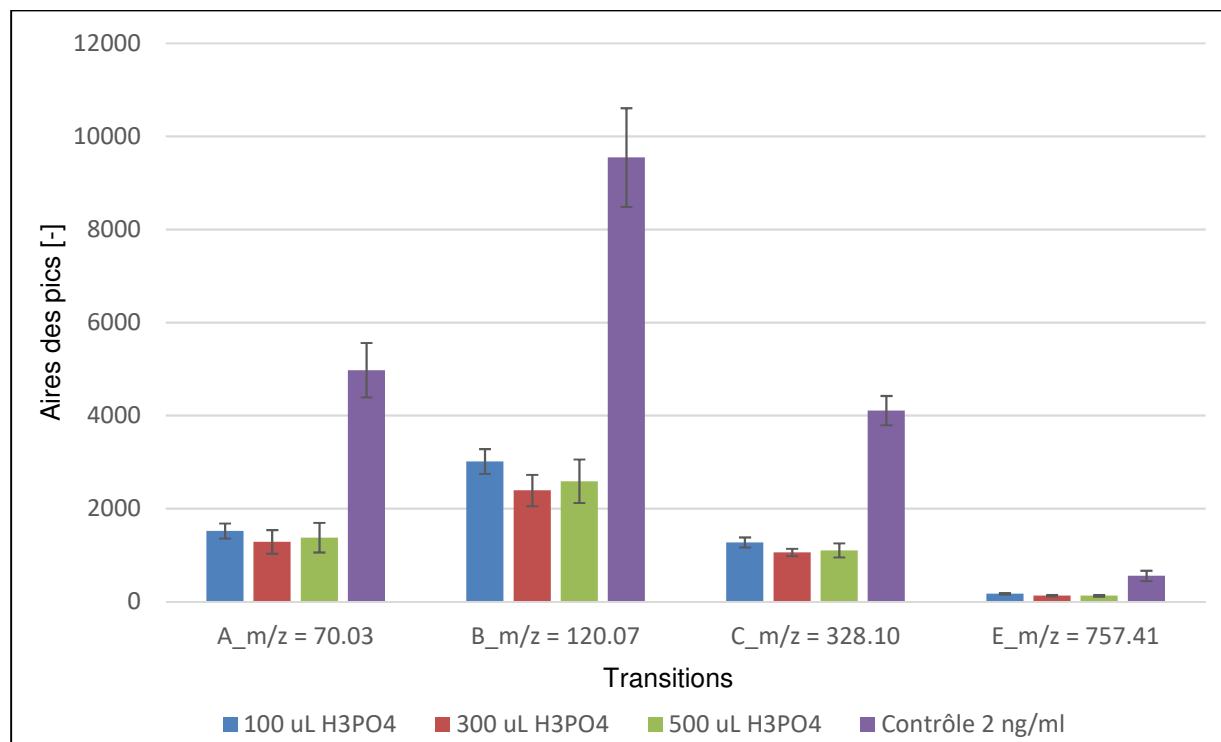


Figure 24: Aires des pics de l'AVP pour des loads contenant 100 uL de plasma par rapport au contrôle de 2 ng/ml (les barres d'erreurs sont des écarts-types)

Avec un load de plasma de 100 uL, la quantité de solution d'acide phosphorique 4% ajoutée avant le chargement sur la SPE ne semble avoir aucune influence sur le rendement. Les aires des 3 essais (rouge, bleu et vert) sont très proches les unes des autres. Il est donc préférable d'utiliser un ajout de 100 uL de solution acide. Premièrement, pour économiser de la solution et, deuxièmement, un load d'un volume total de 400 uL peut se charger en une fois sur la SPE alors qu'un load de 800 uL doit se charger en 2 fois. Le 2^{ème} essai réalisé avec des loads de 300 uL de plasma (triplicat) est représenté dans la Figure 25.

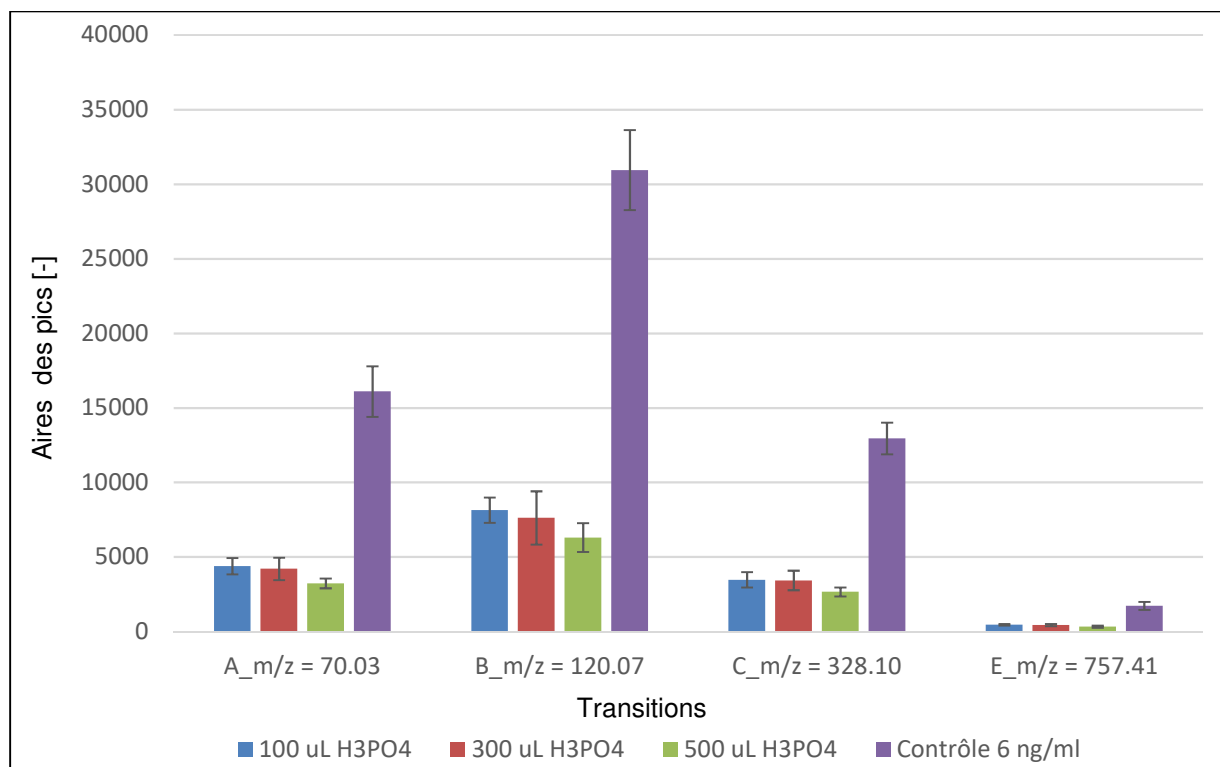


Figure 25: Aires des pics de l'AVP pour des loads contenant 300 uL de plasma par rapport au contrôle de 2 ng/mL (les barres d'erreurs sont des écarts-types)

Les loads avec 300 uL de plasma ne donnent pas de meilleurs rendements d'extraction que les loads avec 100 uL de plasma. La quantité de plasma ne semble avoir aucune influence sur le rendement. Pour les loads de 300 uL de plasma il en ressort de la Figure 25 que plus la quantité de solution H₃PO₄ % ajoutée est faible, meilleur est le rendement. Un ajout de 100 uL de solution acide semble donner de meilleurs résultats qu'un ajout de 500 uL. Cependant, comme les différences d'aires entre les échantillons sont très faibles et les barres d'erreurs importantes, il n'est pas possible de conclure à une réelle différence entre les ajouts de solution acide.

Le rendement d'extraction obtenu avec cette méthode d'environ 30% peut être suffisant pour quantifier l'AVP endogène dans des échantillons plasmatiques. Il reste encore à développer la méthode pour précipiter les protéines du plasma qui sera à double usage.

Premièrement, pour pouvoir quantifier l'AVP endogène dans les échantillons plasmatiques sur le microLC-MS/MS IonKey, une PP est indispensable car les diamètres des capillaires sont tellement petits qu'un échantillon non-précipité pourrait boucher le système.

Deuxièmement, il se peut qu'une interaction entre l'AVP et les protéines plasmatiques soit à l'origine du faible rendement d'extraction. Pour diminuer cette interaction, il faut soit ajouter une quantité définie de solution acide à l'échantillon de plasma avant de le charger sur la SPE (mais cette méthode n'a montré aucun résultat probant (cf. Figure 24 et Figure 25)), soit directement précipiter les protéines.

4.6 PRÉCIPITATION DES PROTÉINES PLASMATIQUES

Le 1^{er} test de précipitation a été réalisé avec de l'ACN pur qui est une méthode couramment utilisée pour les échantillons plasmatiques (50), (51). 500 uL d'ACN sont ajoutés à 100 uL de plasma spiké avec 1000 pg/mL d'AVP contenant les inhibiteurs choisis (cf. chapitre 4.4). Une fois vortexés et centrifugés, 100 uL du surnageant sont séchés sous azote et repris dans 50 uL Eau/ACN 95:5 + 1% AA + 0.1% NG.

L'échantillon d'AVP est dilué d'un facteur 6 avec l'ajout d'ACN et concentré d'un facteur 2 avec l'étape de séchage. La solution de contrôle est donc à une concentration de 333 pg/ml qui est la concentration théorique en AVP du surnageant si 100% de l'AVP reste en solution après la PP. Les résultats de la précipitation sont illustrés à la Figure 26.

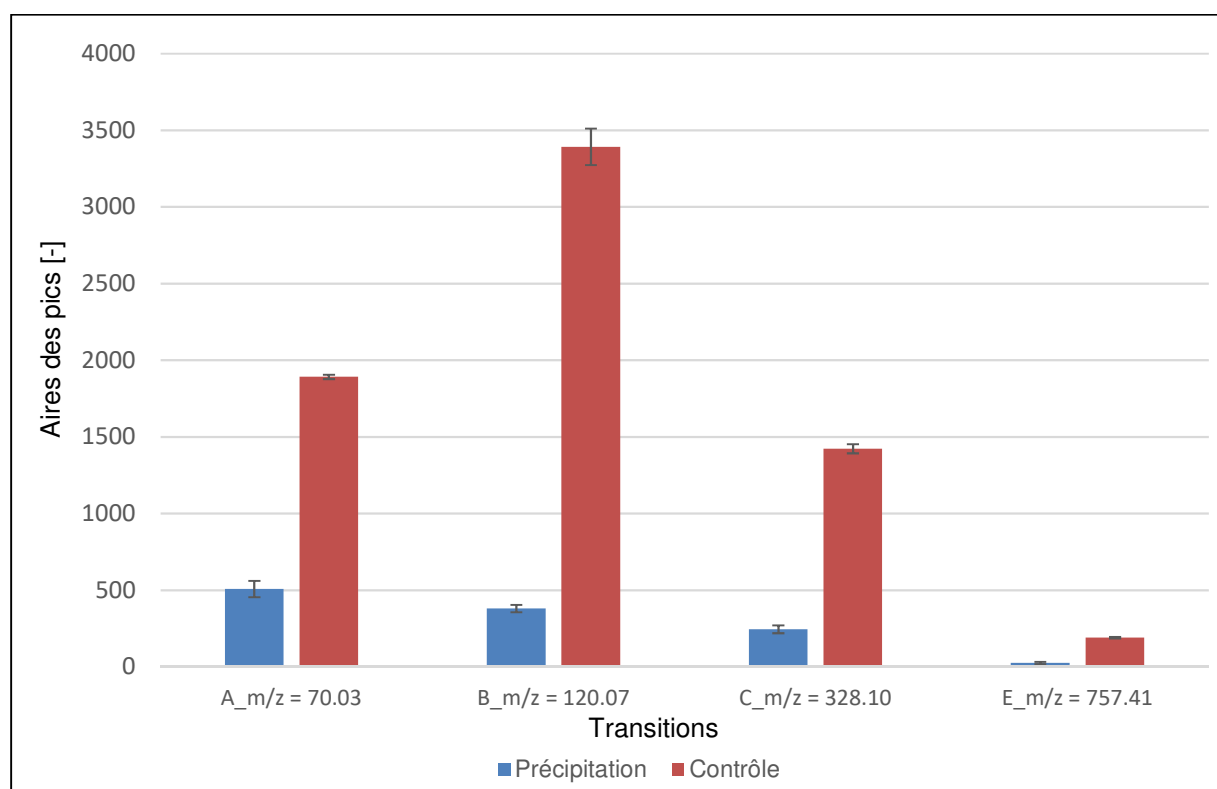


Figure 26: Aires des pics de l'AVP dans le surnageant après PP (les barres d'erreurs sont des écarts-types)

Le rendement de la précipitation est inférieur à 20%. Il se peut que ce mauvais rendement soit dû à une solubilisation incomplète de l'AVP dans le plasma en raison de la haute concentration ajoutée (1000 pg/mL).

Toutefois la raison la plus probable est que l'AVP se solubilise bien, mais se lie aux protéines plasmatiques et précipite avec elles. Il ne reste donc qu'une petite partie de l'AVP spiké dans le surnageant.

Cette interaction entre l'AVP et les protéines plasmatiques est très probablement la cause du mauvais rendement de la SPE avec le plasma (cf. Figure 23). Pour augmenter le rendement, plusieurs tests de précipitations sont effectués avec différents solvants (protiques et aprotiques) et ajouts d'acides. Les mélanges de solvants testés sont :

1. ACN + 0.1% FA
2. ACN + 0.1% NG
3. MeOH
4. EtOH

Les tests sont effectués avec 300 uL de plasma spikés avec 1000 pg/mL AVP contenant les inhibiteurs. Pour garder le rapport plasma/solvant précipitation 1 : 5, 1500 uL de solvant de précipitation sont ajoutés au plasma. Afin de gagner du temps, la SPE est effectuée à la suite de la PP pour obtenir directement le rendement global : précipitation + extraction. La méthode complète est décrite aux chapitres 3.2.7 et 3.2.8 et récapitulée dans la Figure 27.

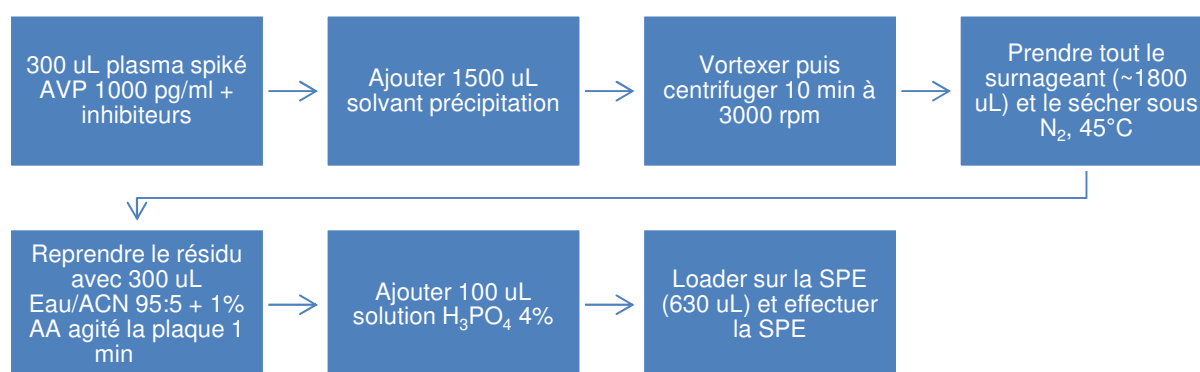


Figure 27: Récapitulatif de la méthode complète (traitement du plasma + précipitation + SPE)

Un essai sans étape de séchage sous azote après la précipitation est également effectué. La précipitation pour cet essai sans séchage est réalisée avec 900 uL d'ACN pur (rapport 1 :3). Après centrifugation, la totalité du surnageant (1200 uL) est loadée en plusieurs fois sur la SPE. Cet essai est réalisé pour déterminer si l'étape séchage-reprise est absolument nécessaire. Dans le cas contraire, le fait de ne pas sécher après la précipitation, représenterait un gain de temps conséquent (2 à 3 heures).

Les aires des pics pour chaque transition de chaque essai (4 test de précipitation avec séchage et reprise et 1 test sans) sont représentées dans la Figure 28. Elles sont comparées à celle d'un contrôle de 6 ng/mL qui est la concentration finale théorique des échantillons (load de 300 uL à 1000 pg/mL et reprise finale après SPE avec 50 uL).

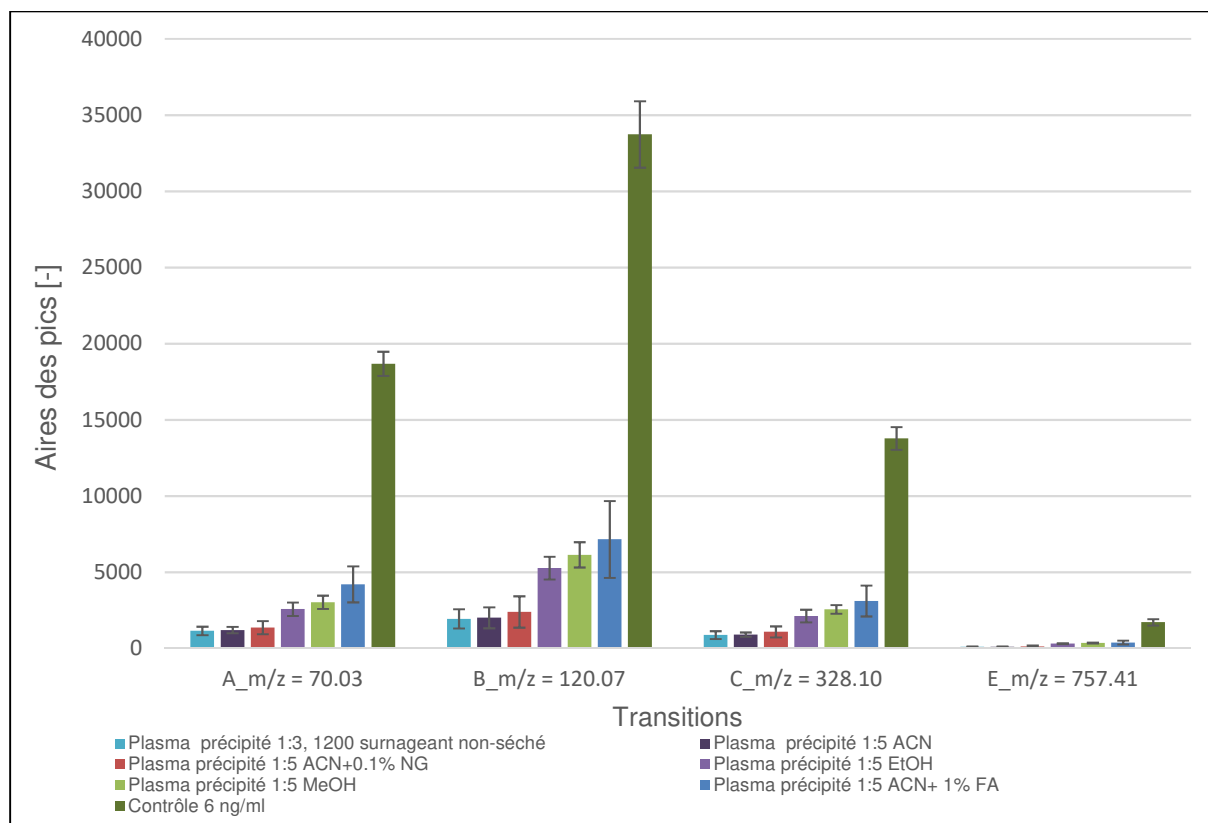


Figure 28: Aires des pics de l'AVP après PP et SPE par rapport au contrôle de même concentration théorique (les barres d'erreurs sont des écarts-types)

L'ajout de 0.1% du surfactant NG à l'ACN (rouge clair) n'a aucun effet positif ou négatif sur la précipitation, il est donc éliminé. L'essai sans séchage et reprise après précipitation (bleu clair) donne l'un des plus mauvais rendements de la série de tests. Il est donc impossible de loader directement le surnageant de la manœuvre de précipitation sur la SPE, l'étape de séchage est donc obligatoire. L'ajout de 1% FA dans le plasma avant l'ajout des 1500 uL d'ACN (bleu) donne un bien meilleur rendement qu'avec l'ACN pur (violet foncé). L'effet protique obtenu avec l'ajout de 1% FA aide apparemment à séparer l'AVP des protéines plasmatiques. Cet effet protique se retrouve également dans les essais de précipitations avec MeOH (vert clair) et EtOH (violet clair) qui donnent des rendements globaux de meilleure facture.

Suite à cette expérience, d'autres solvants de précipitations combinant EtOH, MeOH et ACN avec 1% FA ou 1% TFA ont été testés. Aucun de ces mélanges n'a montré de meilleur rendement que le solvant ACN + 1% FA, c'est donc ce dernier qui sera gardé pour la méthode de quantification de l'AVP endogène dans le plasma.

A ce stade du travail, les méthodes LC, MS, SPE et PP sont définies. Pour quantifier l'AVP endogène, il faut encore déterminer la méthode de prélèvement du plasma en choisissant un anticoagulant. Il est également nécessaire de réaliser une courbe de calibration dans du plasma stripé (traité au charbon).

4.7 PRÉLÈVEMENT DU PLASMA

Les plasmas ont été prélevés dans 2 types de monovettes, une contenant de l'EDTA comme anticoagulant et l'autre de l'héparine pour déterminer quel anticoagulant est préférable. Dans la Figure 29 sont représentés les chromatogrammes d'un échantillon plasmatique issu d'un prélèvement sur EDTA et d'un autre issu d'un prélèvement sur héparine. Les 2 échantillons ont tous les 2 été traités de la même manière (cf. chapitres 3.2.6 à 3.2.10) sans ajouts d'AVP. Les pics observés sur la Figure 29 représentent l'AVP endogène.

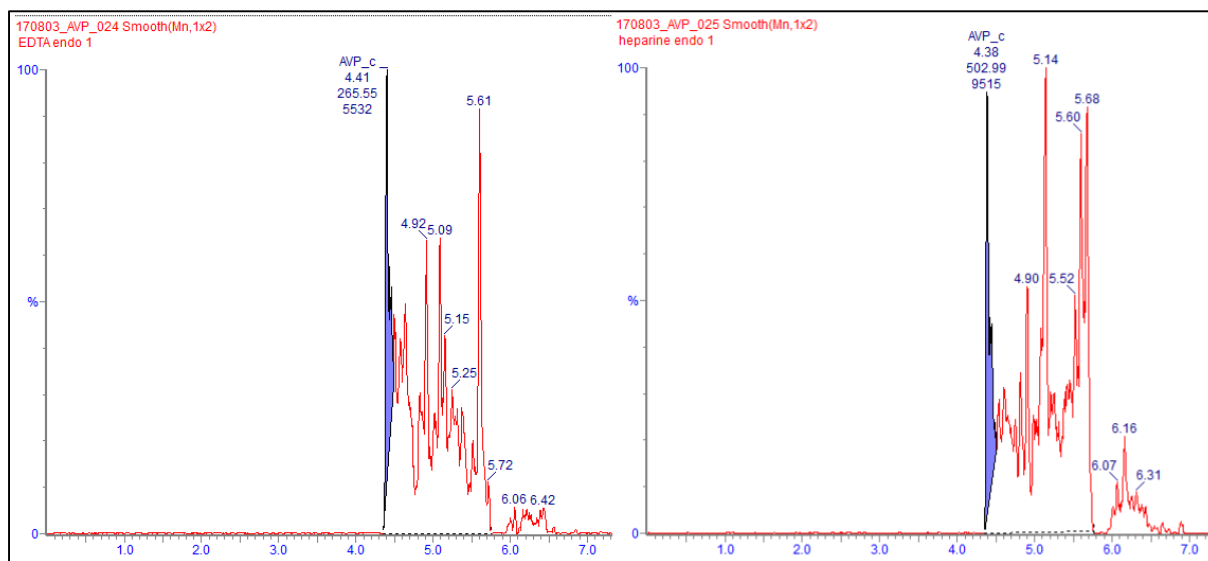


Figure 29: Pics d'AVP endogène obtenus d'un plasma prélevé sur EDTA (Gauche) et sur héparine (Droite)

Les 2 plasmas ont été prélevés l'un après l'autre, soit dans les mêmes conditions. Il est visible que le plasma prélevé sur héparine (Droite sur Figure 29) possède un pic d'AVP avec une aire plus importante que celui obtenu dans le plasma EDTA (Gauche sur Figure 29). Toutefois les aires sont très faibles (entre 200 et 500) et aucun standard interne n'est utilisé ; la différence d'aire n'est donc pas significative. Cette divergence n'est peut-être pas due à l'anticoagulant mais peut provenir de l'extraction ou d'une baisse/augmentation de la sensibilité du MS sur l'un des 2 échantillons. Quant à la quantification de l'AVP endogène, le prélèvement du plasma sur héparine est choisi pour 2 raisons. Premièrement, il a été démontré que l'EDTA produisait une baisse d'intensité du signal d'AVP lors du test des inhibiteurs (cf. chapitre 4.4), ce qui peut aussi expliquer la différence d'aire du pic d'AVP obtenue entre les 2 prélèvements. Deuxièmement, la méthode de quantification par ajouts dosés (cf. chapitre 4.8.2) a montré de bien meilleurs résultats (linéarité) avec le plasma prélevé sur héparine.

Pour les quantifications, la transition choisie est celle à $m/z = 328.1$. Cette transition est bien plus spécifique à l'AVP que les 2 premières (70.09 et 120.09) et donne des aires plus importantes que la transition à $m/z = 757.1$.

4.8 QUANTIFICATION DE L'AVP ENDOGÈNE

4.8.1 COURBE DE CALIBRATION STD EXTERNES

La 1^{ère} méthode de quantification utilisée pour l'AVP endogène est réalisée par établissement d'une courbe de standards externes d'AVP dans du plasma stripé (cf. chapitre 3.2.11.1). Les chromatogrammes des 6 standards sont illustrés à l'Annexe 7.2 et la courbe de calibration à l'Annexe 7.3. L'équation de la droite ($R^2=0.9928$) est :

$$\text{Aire pic AVP} = 28.282 * \text{Concentration AVP} \left[\frac{\text{pg}}{\text{mL}} \right] + 130.81$$

La quantification a été effectuée en duplicat. Les aires de chaque pic d'AVP, les concentrations et la concentration moyenne sont répertoriées dans le Tableau 19.

Tableau 19: Concentrations en AVP du plasma prélevé sur héparine

Essai	Aire pic AVP [-]	Concentration AVP [pg/mL]	Aire moyenne [-]	Concentration moyenne [pg/mL]
1	503	14	450	12
2	397	11		

Evidemment, cette concentration moyenne de 12 pg/mL est à titre indicatif. Il n'est pas possible de donner ce résultat avec 2 chiffres significatifs puisque la sensibilité de la méthode n'est pas bonne et que les sources d'erreurs sont bien trop nombreuses (variations du rendement global de la SPE + précipitation entre la courbe de calibration et les échantillons, pas de standard interne, fluctuations de la sensibilité du MS, incertitudes sur les volumes pipetés, ...). L'erreur sur la concentration moyenne obtenue peut être de 50 à 100%, il est uniquement possible de donner une fourchette en disant que la concentration endogène en AVP se situe entre 1 et 20 pg/mL. Néanmoins, le domaine de concentration déterminé correspond à la concentration endogène attendue chez un être humain. De plus, le plasma a été prélevé sur une personne située dans un environnement chaud et certainement quelque peu déshydratée ; ces facteurs influent fortement sur la concentration (cf. chapitres 2.1.4 et 2.2.1). Il serait alors normal que la concentration en AVP du sujet tende à augmenter. Pour confirmer la concentration trouvée par standard externe, une méthode par ajouts dosés a été effectuée.

4.8.2 COURBE DE CALIBRATION PAR AJOUTS DOSÉS

La courbe de calibration de cette 2^{ème} méthode de quantification réalisée par ajouts dosés est illustrée à l'Annexe 7.5. Les chromatogrammes des 5 ajouts dosés sont illustrés à l'Annexe 7.4. L'équation de la courbe ($R^2=0.9981$) est :

$$\text{Aire pic AVP} = 39.36 * \text{Concentration AVP totale (endogène + ajout)} \left[\frac{\text{pg}}{\text{mL}} \right] + 406.47$$

Par intrapolation de la droite de calibration, une concentration endogène en AVP de 10 pg/mL est déterminée. Comme pour la méthode par standards externes, la concentration obtenue par intrapolation de la droite est une estimation qui donne une idée de l'ordre de grandeur de la réelle concentration endogène.

Elle concorde cependant assez bien avec la concentration déterminée par standards externes (cf. chapitre 4.8.1) et donc avec la concentration endogène attendue en se basant sur la littérature disponible. Des 2 méthodes de quantifications, la méthode par ajouts dosés est certainement la plus fiable puisque la calibration se fait directement dans le plasma prélevé du sujet. L'effet matrice est par conséquent minimisé par rapport à la méthode par STD externes où la calibration se fait dans un plasma stripé au charbon actif qui est différent du plasma du sujet.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Une méthode de quantification de l'AVP endogène a été mise au point. Les diverses étapes de la méthode (prélèvement, inhibition, PP, SPE et calibration) ont fait l'objet d'une optimisation. La méthode actuelle n'est pas encore assez aboutie et ne peut pour l'instant que donner un intervalle dans lequel se trouve la concentration endogène. Des concentrations de l'ordre de 10 pg/mL (10 pM) ont pu être calculées. Cependant, les aires sont très faibles et les concentrations en AVP dans le plasma humain peuvent descendre jusqu'à 1 pg/mL (9). La méthode développée durant ce travail ne permet pas de quantifier une concentration si faible. Or, pour pouvoir diagnostiquer une hyposécrétion de l'AVP responsable du diabète insipide (cf. chapitre 2.1.6.1), il est nécessaire de posséder une méthode avec une LLOQ inférieure à 1 pM.

Afin d'améliorer la méthode de quantification, il sera dans un 1^{er} temps nécessaire d'optimiser la méthode LC sur la microLC (éluants, gradient, débits) car les paramètres choisis n'ont pas été changés durant tout le travail. D'autres éluants peuvent être testés ainsi qu'un gradient différent. Une rapide optimisation du gradient sur la microLC (*pas présentées dans le rapport*) a permis de gagner en sensibilité, il est donc encore possible d'obtenir des aires de pics plus intenses. Il faudra également optimiser les voltages de collisions pour les transitions sur la microLC-MS/MS IonKey au volt près afin d'obtenir une sensibilité optimale. Evidemment, l'utilisation d'un standard interne marqué isotopiquement pourrait faire toute la différence. Des sites comme Alsachim propose du [²H₇]-AVP et les publications faisant l'objet d'une quantification de l'AVP proposent un standard interne de type CYF*QNCPRG avec F*=Phe+10 (32). Quant à l'objectif final qui est d'unifier les méthodes de dosages de l'AVP et de l'OT, le challenge principal sera l'étape SPE. En effet, pour l'instant, la méthode utilisée au CHUV pour l'OT utilise une plaque de type HLB alors que le développement de l'AVP s'est fait sur une WCX. Il existe cependant des méthodes pour OT utilisant une MCX (52) qui se rapproche beaucoup de la WCX. Certaines publications proposent des quantifications des 2 nonapeptides simultanément mais avec des LLOQ beaucoup trop hautes (200 pM) pour pouvoir quantifier de l'AVP endogène dans le plasma (35).

6 BIBLIOGRAPHIE

1. Vasopressine sur wikipédia. [En ligne] [Citation : 08. 05. 2017.] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Vasopressine>.
2. O., Kamm. The dialysis of pituitary extracts. *Science*. 1928, Vol. 67, pp. 199-200.
3. Gaddum, J. H. Some properties of the separated active principles of the pituitary (posterior lobe). *National Institute for Medical Research*. pp. 434-440.
4. Turner R.A., Pierre J.G., du Vigneaud V. The purification and the amino acid content of the vasopressin preparation. *J. Biol. Chem.* 1951, Vol. 191, pp. 21-28.
5. Michael A. Friberg, Martin Spiess, and Jonas Rutishauser. Degradation of Wild-type Vasopressin Precursor and Pathogenic Mutants by the proteasome. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2004, Vol. 279, pp. 441-447.
6. Sabatier, G. Leng and N. Measuring Oxytocin and Vasopressin: Bioassays, immunoassays and Random Numbers. *Journal of Neuroendocrinology*. 2016.
7. Blanchard, A. La vasopressine: Physiologie et physiopathologie. *Département de Physiologie et Radio-isotopes*. Hôpital Universitaire Européen Georges Pompidou, 20/40 rue Leblanc, 75908 Paris cedex 15, France.
8. Perucca, Julie. *Rein, vasopressine et pression artérielle. Importance de l'urine et du rythme nyctéméral, d'excrétion d'eau et de sodium*. 2008.
9. Natalie F. Holt, MD, MPH, and Kenneth L. Haspel, MD. Vasopressin: A Review of Therapeutic Applications. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*. 2010, p. 330 à 347.
10. Andrew Sharman, James Low. Vasopressin and its role in critical care. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. 2008, Vol. 8, 4.
11. David R. Cool, David DeBrosse. Extraction of oxytocin and arginine-vasopressin from serum and plasma for radioimmunoassay and surface-enhanced laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2003, Vol. 792, pp. 375-380.
12. Treschan TA, Peters J. The vasopressin system: Physiology and clinical strategies. *Anesthesiology*. 2006, Vol. 105, pp. 599-612.
13. Lauson HD, Bocanegra M. Clearance of exogenous vasopressin from plasma of dogs. *Am J Physiol*. 1961, Vol. 200, pp. 493-497.
14. GL., Robertson. Abnormalities of thirst regulation. [éd.] NEPHROLOGY FORUM. *Kidney Int*. 1984, Vol. 25, pp. 460-469.
15. Zerbe R, Miller J and Robertson G. The reproductibility and heritability of individual differences in osmoregulatory function in normal human subjects. *J Lab Clin Med*. 1991, Vol. 117, pp. 51-59.
16. Caillens H, Pruszcynski W, Meyrier A, Ang K, Rousselet F and Ardaillou R. Relationship between change in volemia at constant osmolality and plasma antidiuretic hormone. *Miner Electrol Metab*. 1980, Vol. 4, pp. 161-171.
17. Bankir, Lise. Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovascular Research*. 2001, Vol. 51, pp. 372-390.
18. Dunn FL, Brennan TJ, Nelson AE, Robertson GL. The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *The Journal of Clinical Investigation*. 1973, Vol. 52, pp. 3212-3219.
19. R. H. Michell, C. J. Kirk and M. M. Billah. Hormonal Stimulation of Phosphatidylinositol Breakdown, with Particular Reference to the Hepatic Effects of Vasopressin. *Biochemical Society Transactions*. 1979, Vol. 7, pp. 861-865.

20. F. Lauzier, P. Lamarre, O. Lesur. Utilisation de la vasopressine lors du traitement du choc septique. *Réanimation*. 2004, Vol. 13, pp. 147-153.
21. Tomas Berl, M.D. Vasopressin Antagonists. *The new england journal of medicine*. Disorders of Fluids and Electrolytes, 2015.
22. Sana Qureshi, Sneha Galiveeti, Daniel G. Bichet, and Jesse Roth. Diabetes Insipidus: Celebrating a Century of Vasopressin Therapy. *History of endocrinology*. 2014, Vol. 155, pp. 4605–4621.
23. Gabow PA, Kaehny WD, Johnson AM, et al. The clinical utility of renal concentrating capacity in polycystic kidney disease. *Kidney International*. 1989, Vol. 35, pp. 675-680.
24. Carone FA, Epstein FH. Nephrogenic diabetes insipidus caused by amyloid disease. Evidence in man of the role of the collecting ducts in concentrating urine. 1960, Vol. 29, pp. 539–544.
25. V. Zhygalina (Dr), Nicolle-Barousse (Dr), A. Blanchard (Dr). Physiopathologie du diabète insipide de la grossesse, à propos de deux cas. *Annales d'Endocrinologie*. 2014, Vol. 75, p. 408.
26. A.-E. Heng, A. Lautrette, P. Deteix, B. Souweine. Syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique : diagnostic et prise en charge. *ScienceDirect*. 2006, Vol. 15, pp. 490-496.
27. Heller J, Stulc J. Significance of a new method of titration of antidiuretic. *Cesk Fysiol*. 1959, pp. 194-195.
28. Segar WE, Moore WW. The regulation of antidiuretic hormone release in man: I. Effects of change in position and ambient temperature on blood ADH levels. *J Clin Invest*. 1968, pp. 2143-2151.
29. Chard, T. The radioimmunoassay of oxytocin and vasopressin. *J. Endocr*. 1973, Vol. 58, pp. 143-160.
30. Fyhrquist F, Wallenius M, Hollemans HJ. Radioimmunoassay of vasopressin in unextracted plasma. *Scand J Clin Lab Invest*. 1976, Vol. 36, pp. 841-847.
31. Daping Zhang, Danielle R. Rios, Vincent H. Tam, Diana S.-L. Chow. Development and validation of highly sensitive LC-MS/MS assay for the quantification of arginine vasopressin in human plasma and urine: Application in preterm neonates and child. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014.
32. Yasuko Tsukasaki, Naoto Senda, Kinya Kubo, Shigeru Yamada, Hiroyuki Kugoh, Yasuhiro Kazuki, Mitsuo Oshimura. Development of a High-Sensitivity Quantitation Method for Arginine Vasopressin by High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, and Comparison with Quantitative Values by Radioimmunoassay. *Analytical Sciences*. 2016, pp. 153-159.
33. Plasma sanguin sur wikipédia. [En ligne] [Citation : 10 06 2017.] https://fr.wikipedia.org/wiki/Plasma_sanguin.
34. Ocytocine sur wikipédia. [En ligne] [Citation : 05 06 2017.] https://fr.wikipedia.org/wiki/Ocytocine#cite_note-3.
35. Xianrong (Jenny) Wei, Erica Pike, Brian Rivera and Sean Orłowicz. LC/MS/MS Analysis Oxytocin (OT) and ARG-Vasopressin (AVP) in Human Plasma/Serum using Strata™-X-CW Solid Phase Extraction (SPE) and a Luna® PFP(2) HPLC Column. *Phenomenex*. 2017.
36. Fabian M, Forsling ML, Jones JJ, Pryor JS. The clearance and antidiuretic potency of neurohypophysial hormones in man, and their plasma binding and stability. *J Physiol*. 1969, Vol. 204, pp. 653–668.
37. Pan, Dr R. C. Martin-Du. L'ocytocine: hormone de l'amour, de la confiance et du lien conjugal et social. *Med Suisse*. 2012, Vol. 8, pp. 627-630.
38. Rutigliano Grazia, Rocchetti Matteo, Paloyelis Yannis, Gilleen James, Sardella Alberto, Cappucciati Marco, Palombini Erika, Dell'Osso Liliana, Caverzasi Edgardo, Politi Pier Luigi, McGuire Philip, Fusar-Poli Paolo. Peripheral oxytocin and vasopressin: Biomarkers of psychiatric disorders ? A comprehensive systematic review and preliminary meta-analysis. *Psychiatry Research*. 2016.

39. Hunziker, Peter M. Gehrig and Peter E. Fragmentation Pathways of NG-Methylated and Unmodified Arginine Residues in Peptides Studied by ESI-MS/MS and MALDI-MS. *American Society for Mass Spectrometry*. 2004, Vol. 15, pp. 142-149.
40. Giuliana Bianco, Fabio G. Battista, Alessandro Buchicchio, Concetta G. Amarena, Philippe Schmitt-Kopplin and Antonio Guerrieri. Structural characterization of arginine vasopressin and lysine vasopressin by Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and infrared multiphoton dissociation. *European Journal of Mass Spectrometry*. 2015, Vol. 21, pp. 211-219.
41. Tamer Shoeib, Alwin Cunje, Alan C. Hopkinson, and K. W. Michael Siu. Gas-Phase Fragmentation of the Ag⁺ Phenylalanine Complex:Cation Interactions and Radical Cation Formation. *American Society for Mass Spectrometry*. 2002, Vol. 13, pp. 408-416.
42. Gross, Lambert C. M. Ngoka and Michael L. Multistep Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Cyclic Peptides in an Ion-Trap Mass Spectrometer. *American Society for Mass Spectrometry*. 1999, Vol. 10, pp. 732-746.
43. G.J. Boer, Don Gash. *Vasopressin: Principles and Properties*. s.l. : Springer Science & Business Media, 2012. p. 499.
44. EDTA sur Wikipédia. [En ligne] [Citation : 28 07 2017.] <https://fr.wikipedia.org/wiki/EDTA>.
45. Webster, A. M. Mahdy and N. R. Perioperative systemic haemostatic agents. *British Journal of Anaesthesia*. 2004, Vol. 93, pp. 842-858.
46. AEBSF sur Wikipédia. [En ligne] [Citation : 28 07 2017.] <https://en.wikipedia.org/wiki/AEBSF>.
47. K.-M. Järvinen, K. Beyer, L. Vila, L. Bardina, M. Mishoe, H. A. Sampson. Specificity of IgE antibodies to sequential epitopes of hen's egg ovomucoid as a marker for persistence of egg allergy. *The European Academy of Allergy and Clinical Immunology*. 2007, Vol. 62, pp. 758-765.
48. Ovomucoïd sur Wikipédia. [En ligne] [Citation : 28 07 2017.] <https://en.wikipedia.org/wiki/Ovomucoid>.
49. Chie Itoh, Maho Watanabe, Atsuo Nagamatsu, Shinji Soeda, Tatsuhiko Kawarabayashi, Hiroshi Shimeno. Two Molecular Species of Oxytocinase (L-Cystine Aminopeptidase) in Human Placenta : Purification and Characterization. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 1997, Vol. 20, pp. 20-24.
50. S. Souverain, S. Rudaz, J.-L. Veuthey. Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004, Vol. 35, pp. 913-920.
51. Cara Polson, Pratibha Sarkar , Bev Incedon, Vanaja Raguvaran, Russell Grant. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2003, Vol. 785, pp. 263-275.
52. Rainville, Cateline O. Doneanu and Paul. Ultrasensitive quantification assay for oxytocin in human plasma using a LC-MS microfluidic platform. *Waters corporation*.

7 ANNEXES

7.1 FIGURES POUR LA STABILITÉ

Dans le Tableau 20 sont répertoriées les valeurs pour les aires moyennes (triplicat) des pics d'AVP aux transitions 328.1 et 757.4 pour les solutions lyophilisées et non-lyophilisée à une concentration de 1000 pg/mL.

Tableau 20: Aires moyennes des pics d'AVP

		AVP 1000 pg/ml non-lyophilisé		AVP 1000 pg/ml lyophilisé	
		m/z = 328.10	m/z = 757.41	m/z = 328.10	m/z = 757.41
06.06.2017	Aire	1646	160	1758	208
13.06.2017		1941	259	2270	288
20.06.2017		1803	216	2179	258
17.07.2017		1807	184	2051	203

Dans le Tableau 21 sont répertoriés les écart-types sur les 3 essais pour chaque aire moyenne du Tableau 20.

Tableau 21: Ecart-types des aires moyennes des pics d'AVP

		AVP 1000 pg/ml non-lyophilisé		AVP 1000 pg/ml lyophilisé	
		m/z = 328.10	m/z = 757.41	m/z = 328.10	m/z = 757.41
06.06.2017	Ecart-type	40	16	31	11
13.06.2017		213	22	277	32
20.06.2017		217	26	251	31
17.07.2017		112	43	147	30

Dans la Figure 30 sont représentées les aires des pics d'AVP à la transition m/z=328.1 pour les solutions lyophilisées et non-lyophilisées.

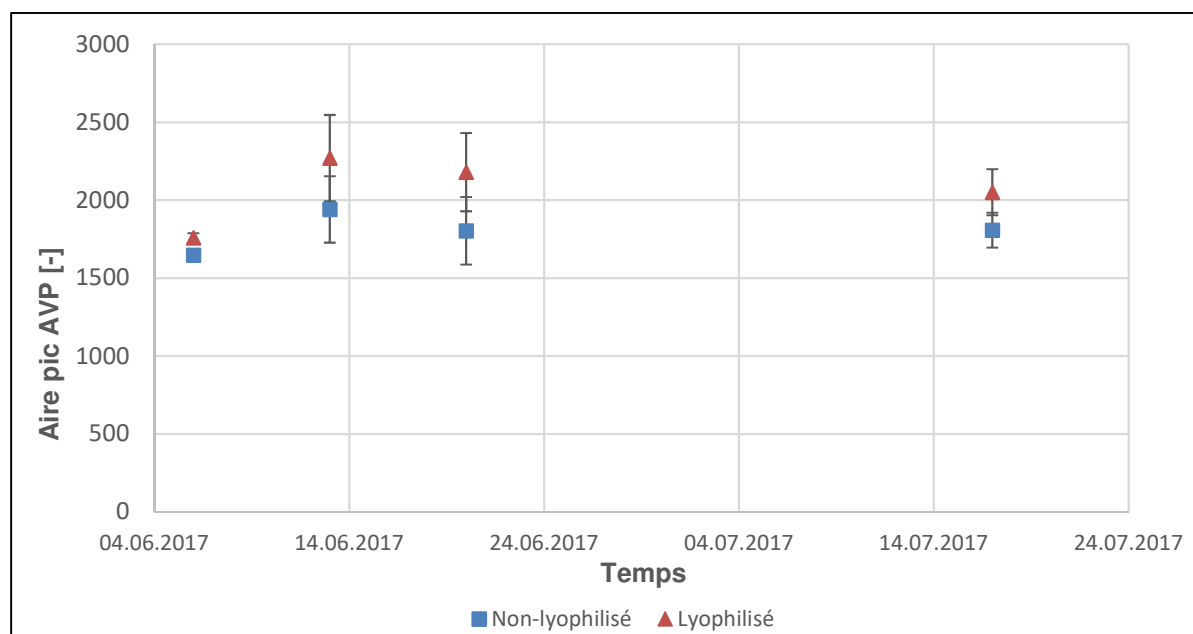


Figure 30: Stabilité des solutions d'AVP à 1000 pg/mL (transition 328.1) (les barres d'erreurs sont des écarts-types)

Quantification de l'arginine-vasopressine dans le plasma par spectrométrie de masse en tandem

Dans la Figure 31 sont représentées les aires des pics d'AVP à la transition $m/z=757.4$ pour les solutions lyophilisées et non-lyophilisées.

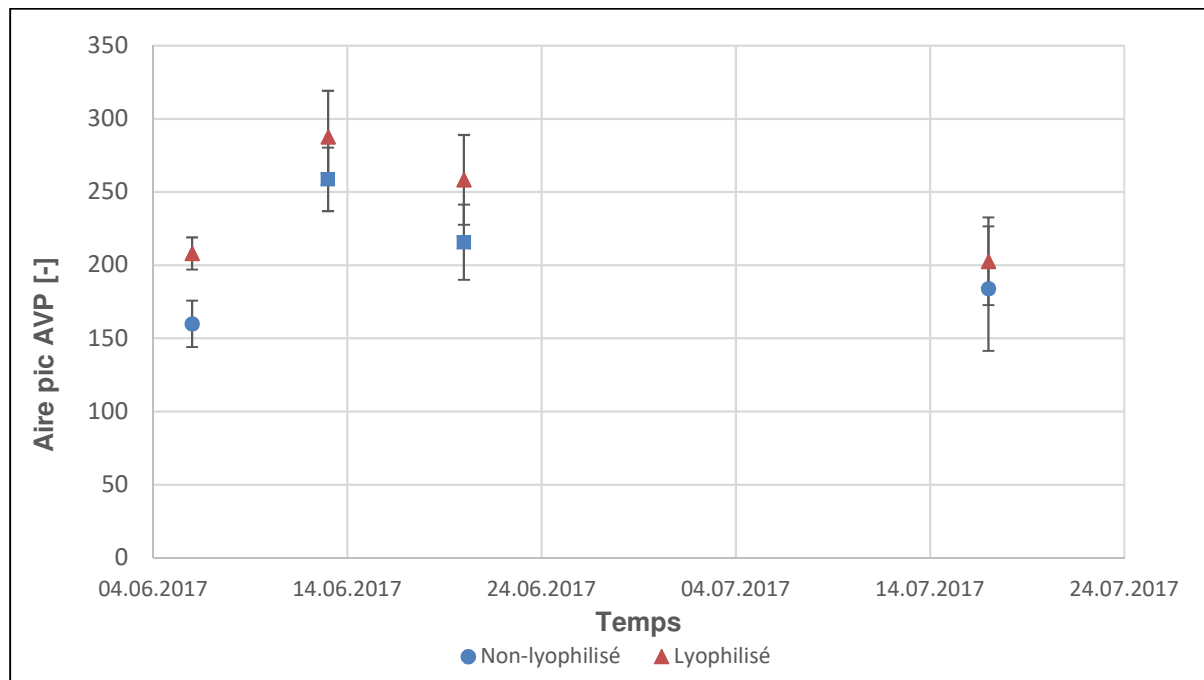


Figure 31: Stabilité des solutions d'AVP à 1000 pg/mL (transition 757.4) (les barres d'erreurs sont des écarts-types)

7.2 CHROMATOGRAMMES DES STD EXTERNES

Dans les Figure 32 à 37 sont illustrés les chromatogrammes de la transition à $m/z = 328.1$ des STD externes à respectivement 0, 5, 10, 20, 50 et 100 pg/mL.

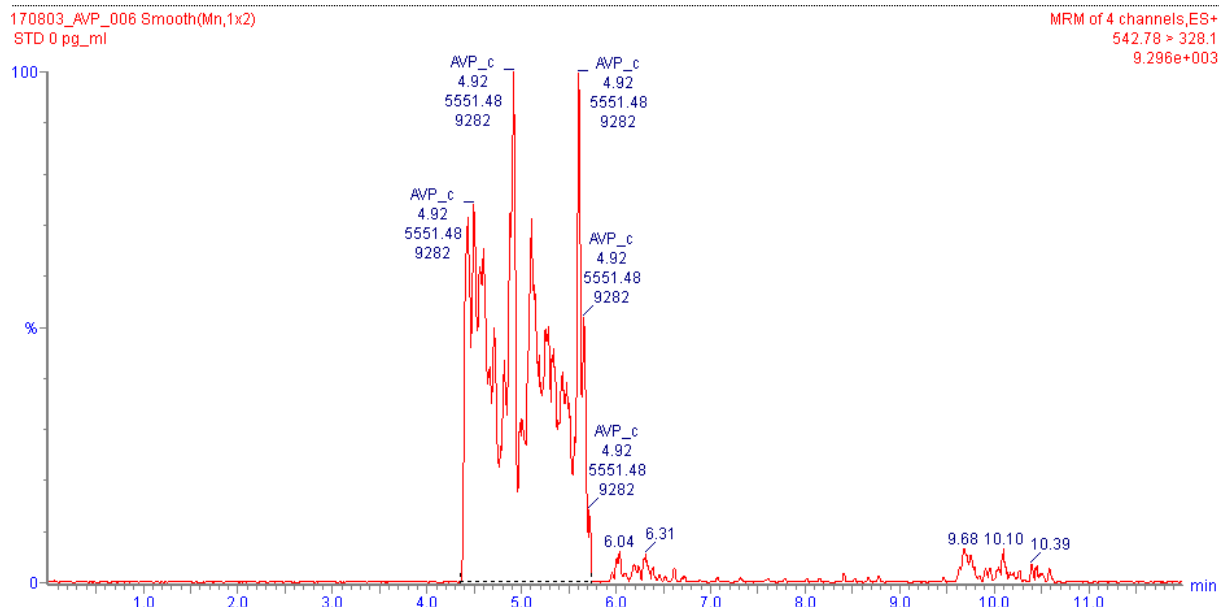


Figure 32: Chromatogramme du STD externe à 0 pg/mL

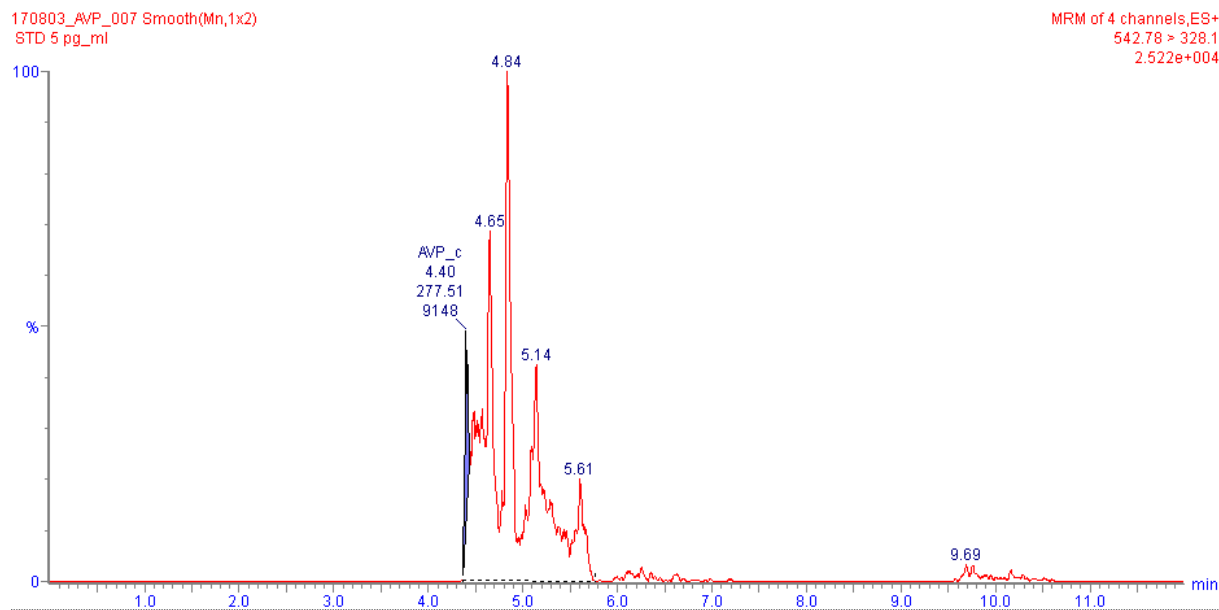


Figure 33: Chromatogramme du STD externe à 5 pg/mL

Quantification de l'arginine-vasopressine dans le plasma par spectrométrie de masse en tandem

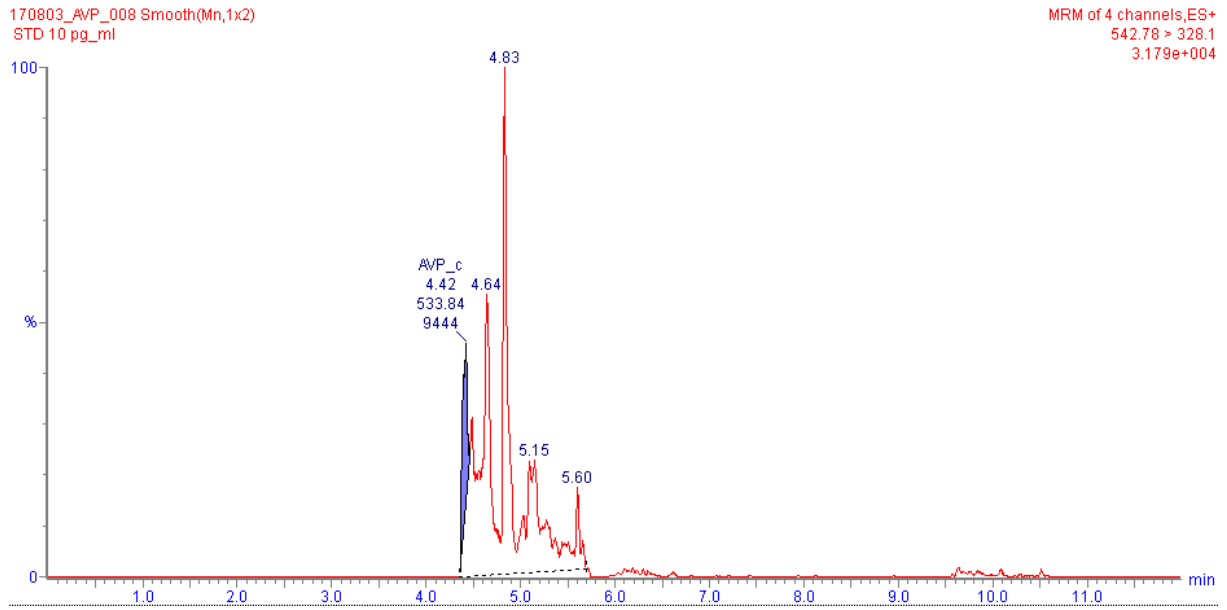


Figure 34: Chromatogramme du STD externe à 10 pg/mL

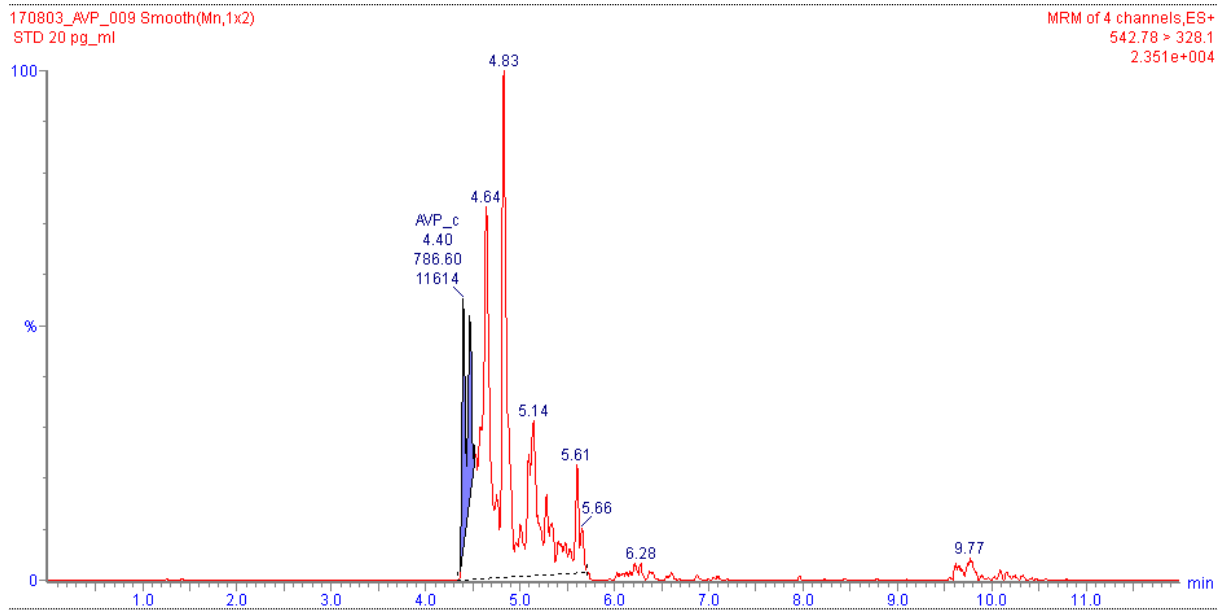


Figure 35: Chromatogramme du STD externe à 20 pg/mL

Quantification de l'arginine-vasopressine dans le plasma par spectrométrie de masse en tandem

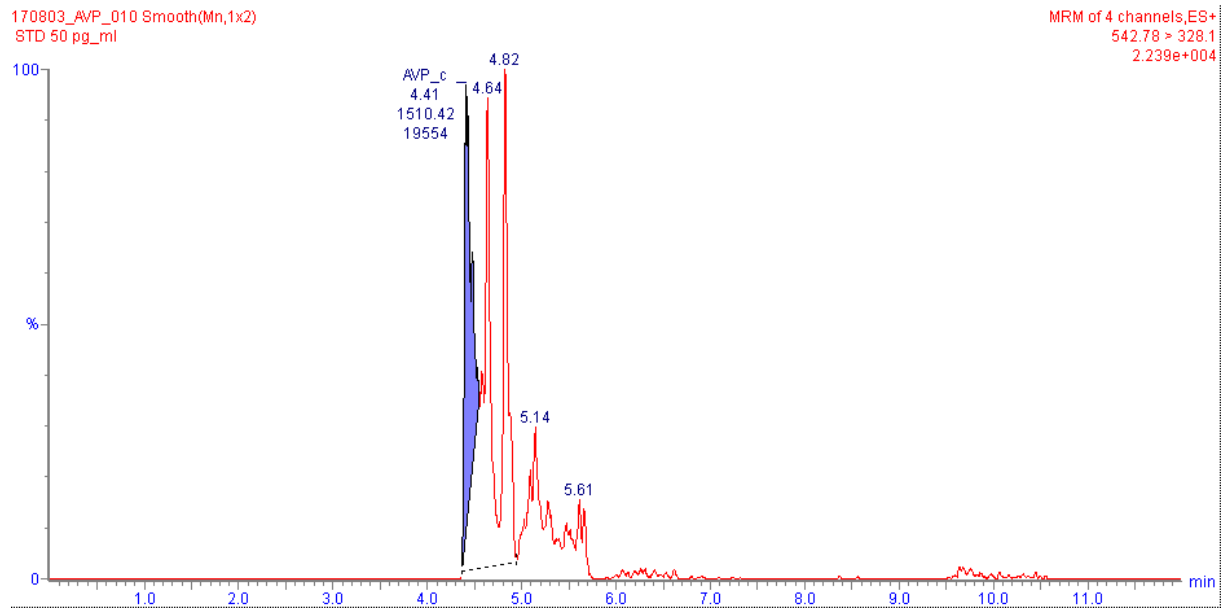


Figure 36: Chromatogramme du STD externe à 50 pg/mL

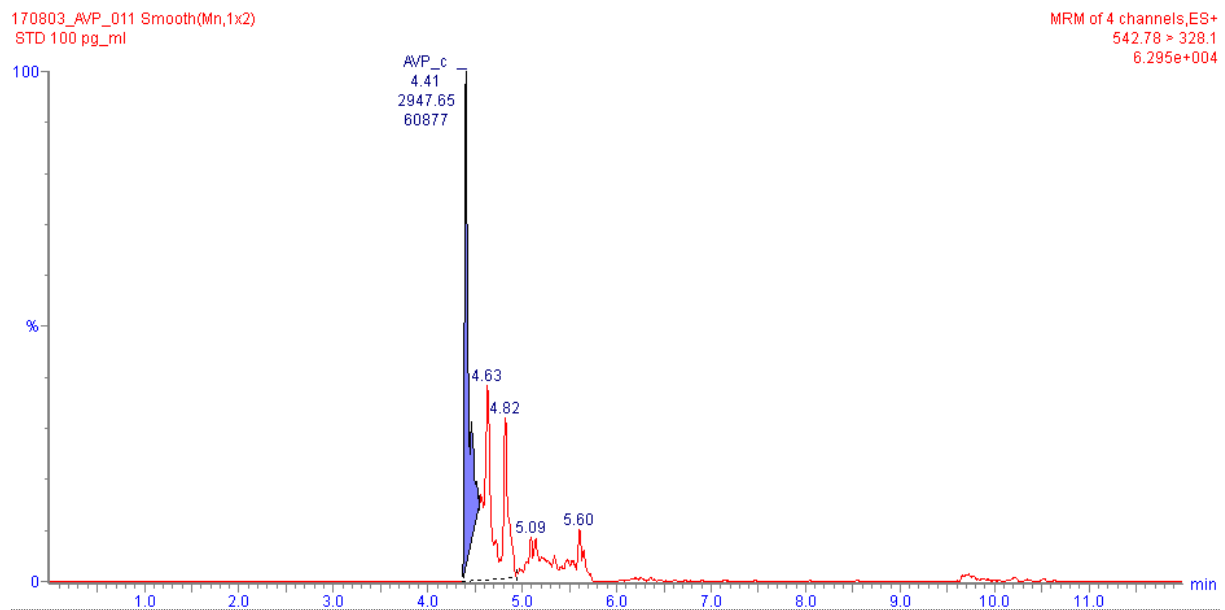


Figure 37: Chromatogramme du STD externe à 100 pg/mL

7.3 COURBE DE CALIBRATION STD EXTERNES

Dans le Tableau 22 sont répertoriés les aires des pics d'AVP pour chacun des 6 standards externes à la transition m/z=328.1.

Tableau 22: Concentrations et aires des pics d'AVP pour chaque standard externe

	Calibration dans plasma stripé biochemed					
Concentration AVP [pg/ml]	0	5	10	20	50	100
Aire transition m/z: 328.1	0	238	534	787	1510	2948

Dans la Figure 38 est illustrée la droite de calibration réalisée avec 6 standards d'AVP aux concentrations : 0, 5, 10, 20, 50 et 100 pg/mL dans du plasma stripé.

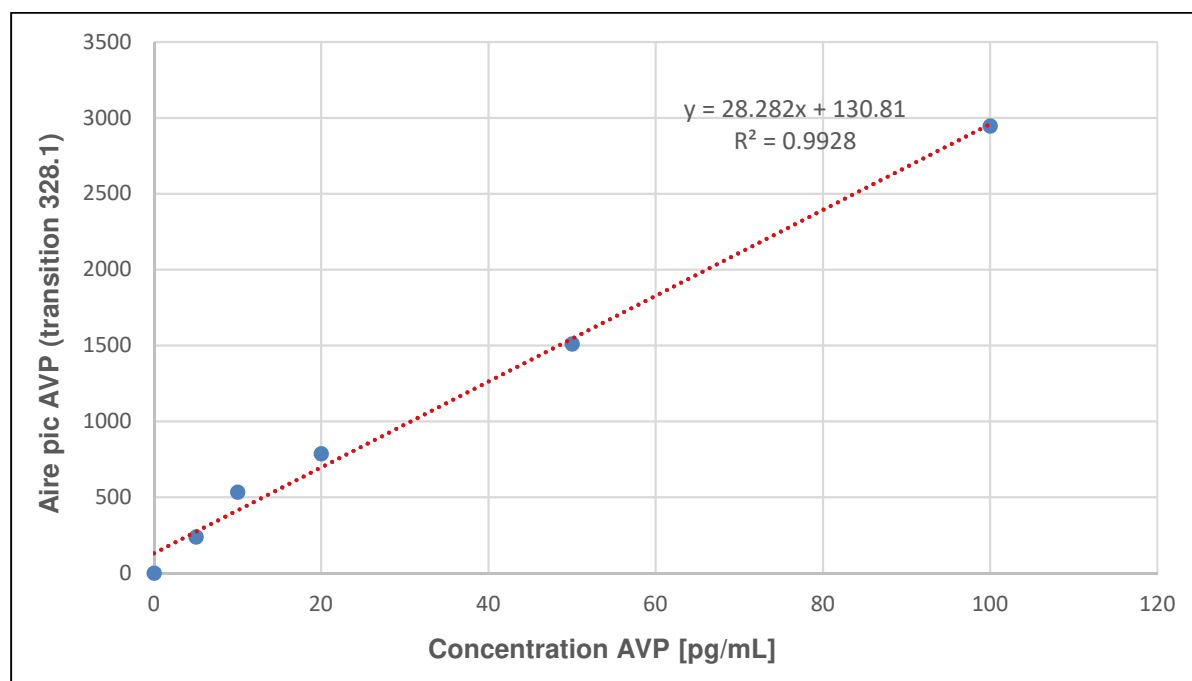


Figure 38: Courbe de calibration des standards externes d'AVP

7.4 CHROMATOGRAMMES DES AJOUTS DOSÉS

Dans les Figure 39 à 43 sont illustrés les chromatogrammes de la transition à $m/z = 328.1$ des ajouts dosés à respectivement 5, 10, 20, 50 et 100 pg/mL.

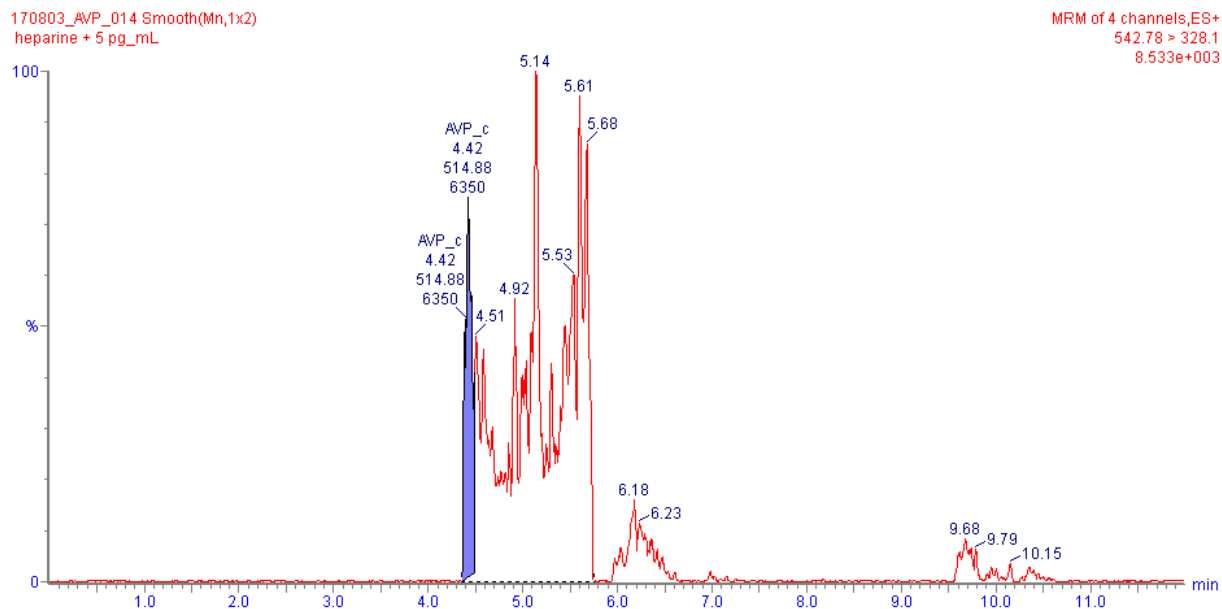


Figure 39: Chromatogramme de l'ajout dosé à 5 pg/mL

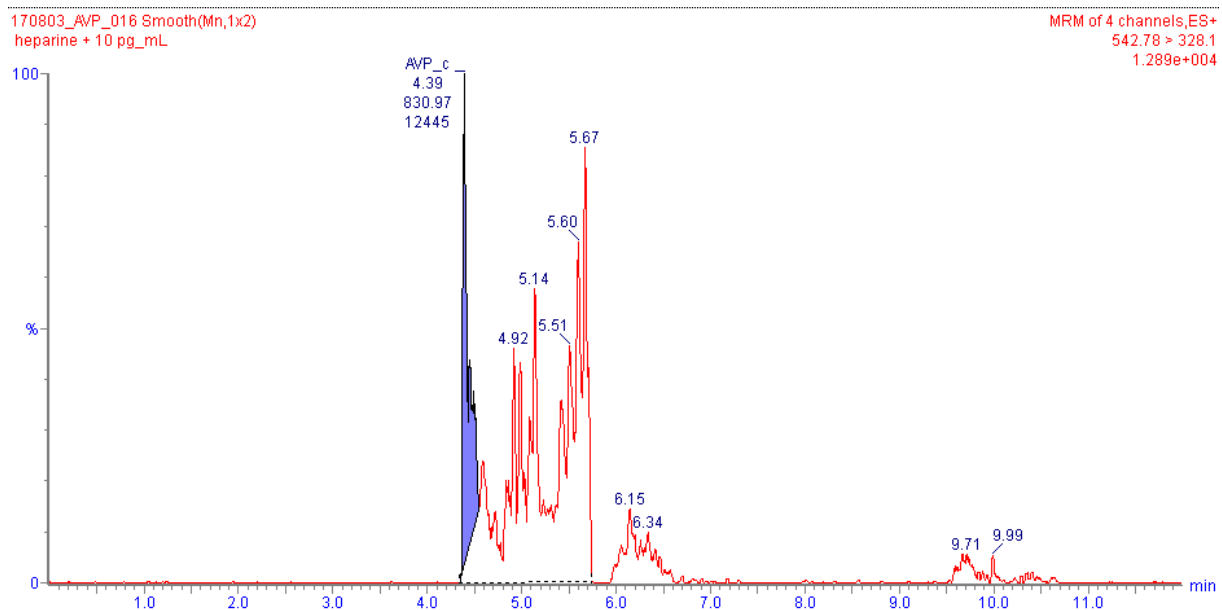


Figure 40: Chromatogramme de l'ajout dosé à 10 pg/mL

Quantification de l'arginine-vasopressine dans le plasma par spectrométrie de masse en tandem

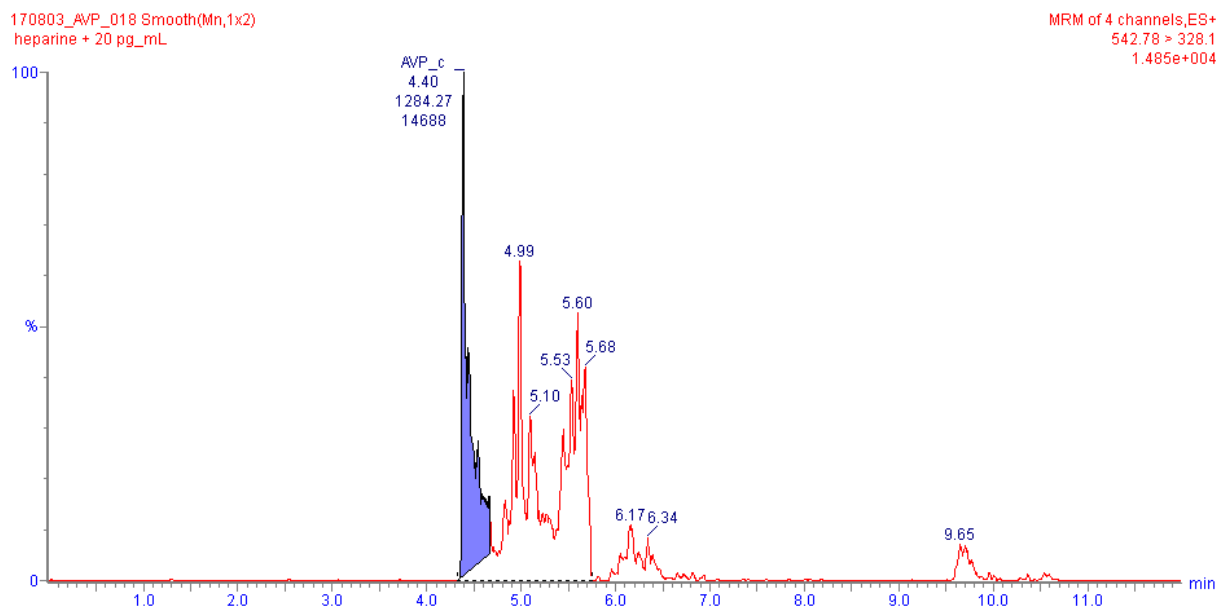


Figure 41: Chromatogramme de l'ajout dosé à 20 pg/mL

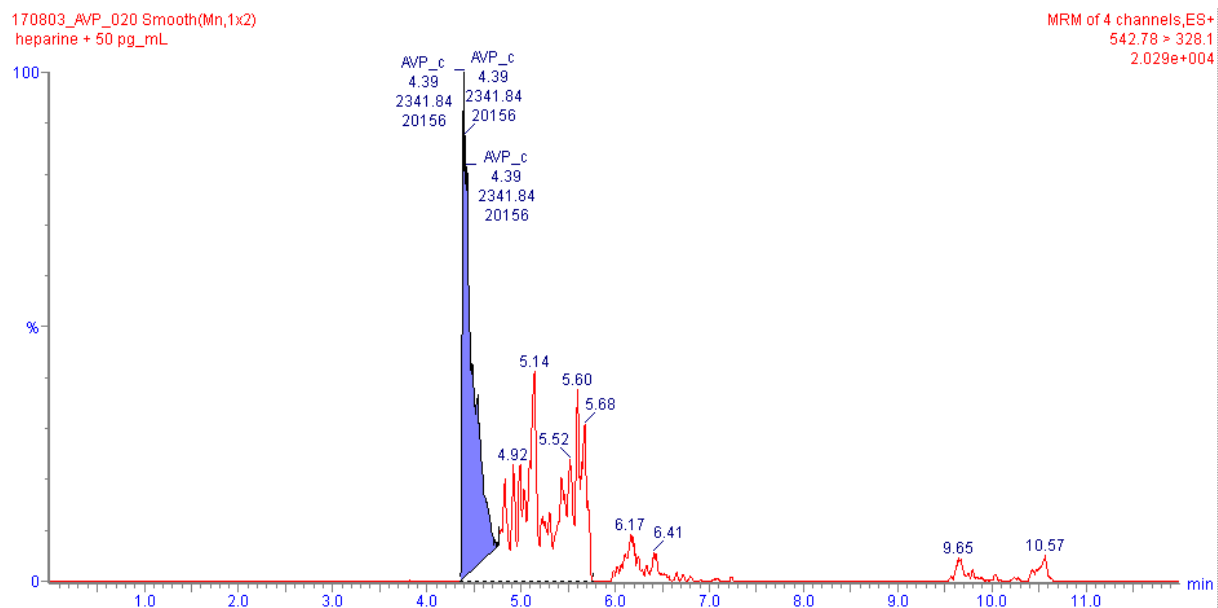


Figure 42: Chromatogramme de l'ajout dosé à 50 pg/mL

Quantification de l'arginine-vasopressine dans le plasma par spectrométrie de masse en tandem

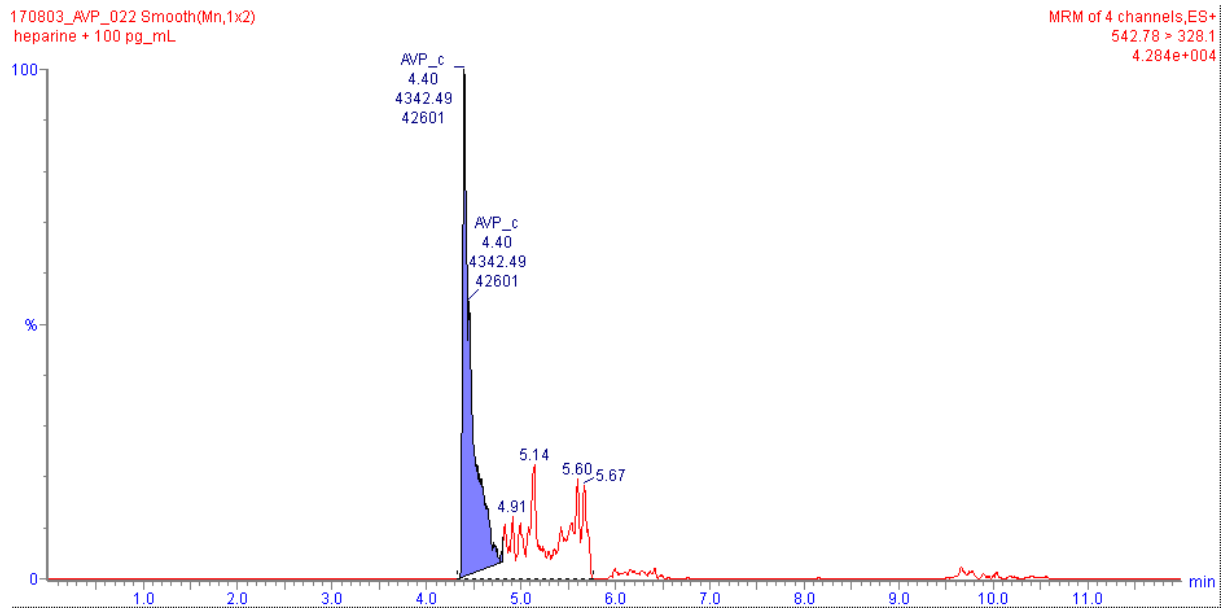


Figure 43: Chromatogramme de l'ajout dosé à 100 pg/mL

7.5 COURBE DE CALIBRATION AJOUTS DOSÉS

Dans le Tableau 23 sont répertoriés les aires des pics d'AVP pour chacun des 6 ajouts dosés à la transition $m/z=328.1$.

Tableau 23: Concentrations ajoutées et aires des pics d'AVP pour chaque ajout dosé

Ajouts dosés dans plasma sujet sur héparine					
Concentration ajoutée [pg/ml]	5	10	20	50	100
Aire transition $m/z: 328.1$	515	831	1284	2342	4342

Dans la Figure 44 est illustrée la droite de calibration réalisée avec les 5 ajouts dosés aux concentrations : 5, 10, 20, 50 et 100 pg/mL dans le plasma échantillon. La courbe est intrapolée jusqu'à l'intersection avec l'axe des abscisses (concentration endogène AVP).

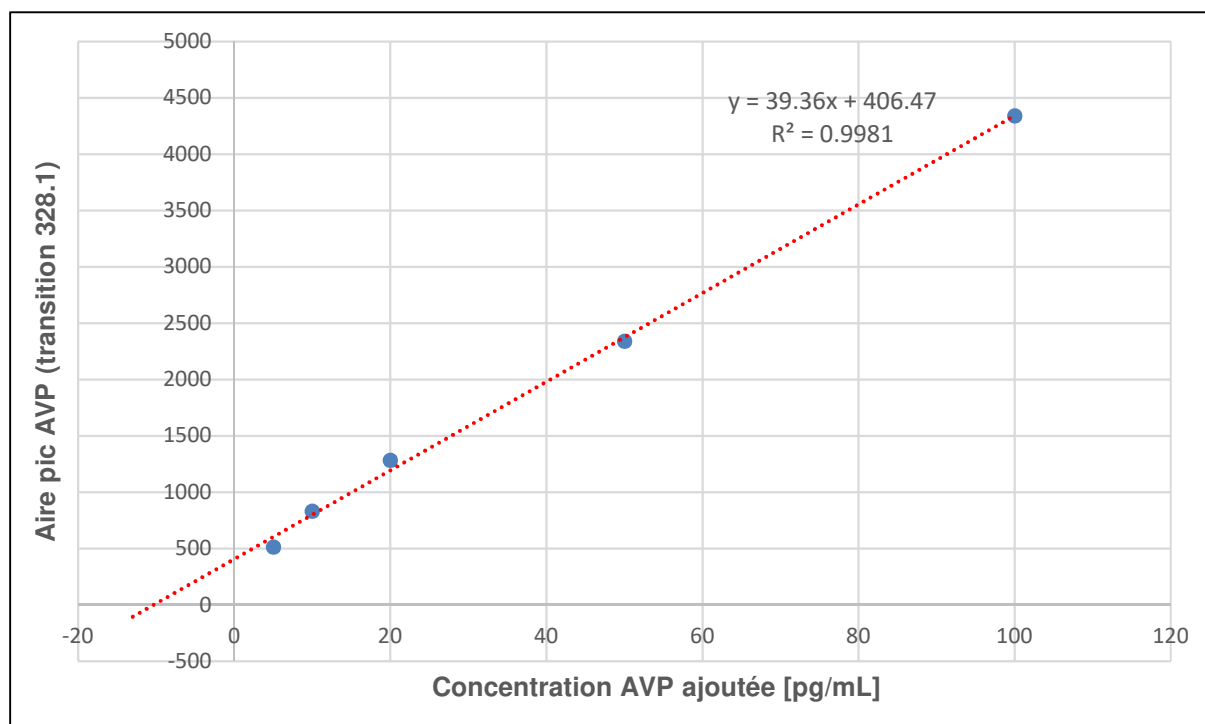


Figure 44: Courbe de calibration des ajouts dosés d'AVP

TABLE DES MATIÈRES

1	Liste des abréviations	1
1.1	Appareils et chromatogrammes.....	1
1.2	Solvants et Réactifs.....	1
1.3	Groupes protecteurs.....	1
2	Introduction	2
2.1	ProNPY 1-69.....	2
2.2	SPPS assistée par micro-ondes.....	2
3	Matériel et méthodes.....	4
3.1	Matériel.....	4
3.2	Méthodes.....	5
3.2.1	Préparation des solutions.....	5
3.2.2	Loading sur résine.....	5
3.2.3	Synthèse du peptide	5
3.2.4	Clivage du peptide.....	6
3.2.5	Méthodes LC	7
3.2.6	Méthodes MS	7
4	Résultats	8
4.1	Loading sur résine	8
4.1.1	Essai manuel selon le protocole.....	8
4.1.2	Essai manuel simplifié	9
4.1.3	Essai automatique sur synthétiseur.....	10
4.2	Synthèse du ProNPY 1-69	12
4.2.1	Fragment 53-69	12
4.2.2	Fragment 37-69	13
4.2.3	Fragments 18-69 et 1-69.....	15
5	Conclusion et perspectives	17
6	Bibliographie.....	19
7	Annexes	20

1 LISTE DES ABRÉVIATIONS

1.1 APPAREILS ET CHROMATOGRAMMES

ESI	Electrospray Ionisation
LC	Chromatographie liquide
MS	Spectromètre de masse
m/z	Masse sur charge
TIC	Total Ion Current
UV	Ultra-violet
Rpm	Rotation par minute
Psi	Livre-force par pouce carré

1.2 SOLVANTS ET RÉACTIFS

AA	Acide aminé
ACN	Acétonitrile
DCM	Dichlorométhane
DEBPT	3-(Diéthoxyphosphoryloxy)-1, 2, 3-benzotriazin-4(3H)-one
DIC	Diisopropylcarbodiimide
DIEA	N, N-Diisopropyléthylamine
DMF	N, N-Diméthylformamide
EDT	1, 2-éthanedithiol
TFA	Acide trifluoroacétique
TIS	Triisopropylsilane
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HOPO	N-Hydroxy-2-pyridone
Oxyma	Cyanohydroxyiminoacétate d'éthyle

1.3 GROUPES PROTECTEURS

Bno	5-butyl-5-nonyle
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
Dmb	2,4-diméthoxybenzyle
Fmoc	chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle
Hmb	2-hydroxy-4-méthoxybenzyle
Mpe	3-méthyl-3-pentyle
Mtt	Méthyltrityle
OtBu	<i>tert</i> -Butyl ester
Pbf	2, 2, 4, 6, 7-Pentaméthylidihydrobenzofuran-5-sulfonyle
Pmc	2, 2,5, 7, 8-Pentaméthylchroman-6-sulfonyle
Trt	Trityle

2 INTRODUCTION

2.1 PRONPY 1-69

Comme son nom l'indique, le proNPY 1-69 (lui-même obtenu par clivage du peptide signal du pré-proNPY) est le précurseur du neuropeptide Y qui appartient à la famille des neurotransmetteurs peptidiques (1). Le neuropeptide Y, découvert par Tatemoto en 1982 (2), a des effets vasoconstricteur et orexigène (stimule l'absorption de nourriture) (3), mais aide aussi à la mémorisation et est impliqué dans les situations d'anxiété, de stress chronique ou de dépression (4). Il est alors important de pouvoir doser le proNPY séquence humaine d'autant plus qu'il est fortement suspecté d'être également un biomarqueur chez les hommes atteints du cancer de la prostate (5). La séquence humaine du proNPY 1-69 est affichée dans la Figure 1.

Human Pro-NPY 1-69 $C_{351}H_{550}N_{102}O_{111}S_3$
 YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPPRTRLEDPAMW

Figure 1: Séquence humaine complète du proNPY 1-69

Les AA marqués en rouge et soulignés aux positions 3, 12 et 18 sont ceux qui diffèrent de la séquence de la souris (3S , ^{12}A et ^{18}K). La séquence proNPY humaine n'a encore pas pu être réalisée en SPPS. En effet les entreprises GeneCust et Schafer-N, spécialisées dans la synthèse de peptides, ont effectué plusieurs essais mais n'ont jamais été capables de livrer un échantillon de proNPY 1-69 humain pur. Curieusement, la séquence proNPY 1-69 de la souris est facilement faisable. La difficulté de la synthèse de la séquence humaine réside peut-être dans le greffage d'un des 3 AA différant de la séquence de la souris. Aucune publication n'a encore fait l'objet d'une tentative de SPPS du proNPY 1-69 humain assistée par micro-ondes. La synthèse réalisée dans ce travail annexe permettra de mettre en évidence les difficultés liées à ce pro-neuropeptide.

2.2 SPPS ASSISTÉE PAR MICRO-ONDES

Depuis son invention en 1963 par Bruce Merrifield (6), la synthèse peptidique en phase solide est devenue la méthode standard. Les problèmes majeurs de ce type de synthèse sont l'agrégation des chaînes peptides, la formation de feuilletts- β et l'encombrement stérique dû aux groupes protecteurs volumineux (7). Pour parvenir à obtenir les peptides désirés, les couplages (réalisés à température ambiante) prenaient, à l'époque, entre 30 min et 2 heures et les rendements de synthèses étaient souvent décevants. Dès les années 1990, les réactions de couplages et de déprotections étaient réalisées sous agitation magnétique à des températures élevées (60°C) pour accélérer le processus et améliorer les rendements. Si l'utilisation des micro-ondes a émergé en 1986 pour les synthèses organiques (8), ce n'est qu'en 1992 que la 1^{ère} combinaison des micro-ondes avec la SPPS a été tentée par Yu et al. (9) et son effet sur l'agrégation fut directement remarqué (Figure 2).

Synthèse du proNPY 1-69 en phase solide assistée par micro-ondes

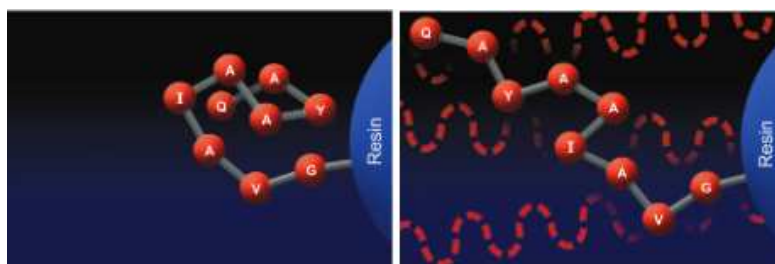


Figure 2: (Gauche) Agrégation du peptide (Droite) Annihilation de l'agrégation par micro-ondes

Depuis, l'efficacité de la synthèse par micro-ondes a été largement démontrée. Elle surpasse même la SPPS chauffée de manière conventionnelle puisque les micro-ondes apportent de l'énergie de manière beaucoup plus rapide. Le fait que les micro-ondes agissent directement au cœur du mélange réactionnel et non en surface (10) permet une nette diminution des temps de couplages et de déprotections. La Figure 3 illustre la différence des profils de température entre un chauffage aux micro-ondes et un chauffage conventionnel (bain d'huile).

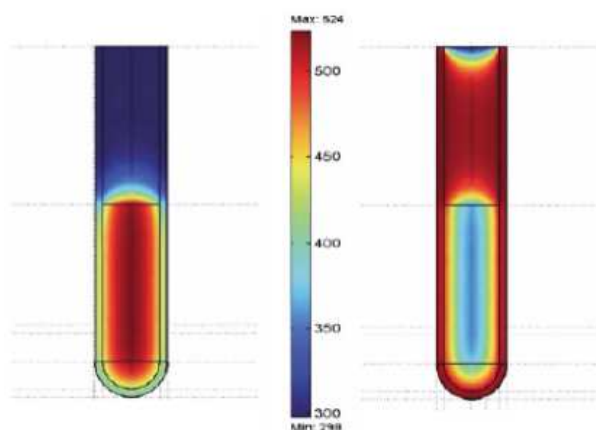


Figure 3: Profils de température d'un réacteur après 1 min avec système micro-ondes (gauche) et bain d'huile (droite)

Le Liberty Blue utilisé pour cette synthèse et développé par l'entreprise CEM corporation en 2003 (spécialiste des systèmes micro-ondes) cumule tous les avantages pour réussir la confection d'un peptide exigeant tel que le proNPY 1-69. Le Liberty Blue est entièrement automatisé et composé de 2 parties distinctes : le Manifold qui est la partie supérieure de l'appareil où sont fixés les AA et le Discover (zone micro-ondes) dans lequel est situé le réacteur où les solutions et la résine sont amenées. Le synthétiseur ainsi que le réacteur sont illustrés dans la Figure 4.

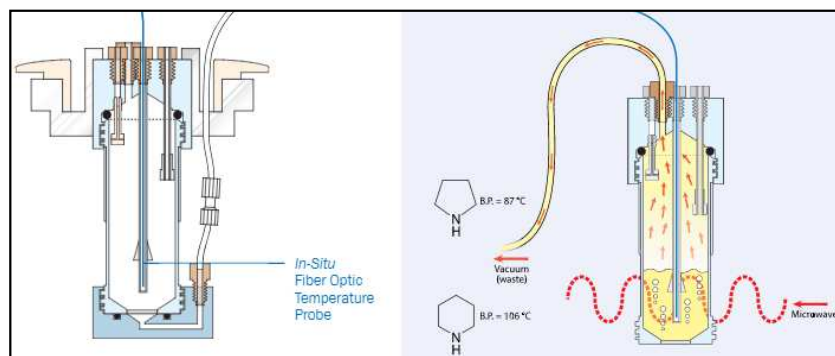


Figure 4: (Gauche) Réacteur (Droite) Synthétiseur Liberty

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 MATÉRIEL

Dans les Tableaux 1 à 5 sont répertoriés respectivement : les appareils et colonnes, les dérivés d'acides aminés, les réactifs et solvants et les résines utilisées pour la synthèse et les analyses du peptide.

Tableau 1: Appareils et colonnes utilisés

UPLC	Acquity TM Ultra performance LC Waters®
MS	Micromass Quattro Micro TM API
Synthétiseur de peptides	Liberty Blue™ Peptide Synthesizer
Colonne	Acquity UPLC® BEH C18 1.7 µm (2.1 x 50 mm)
Balance	Satorius TE64-OCE
Peptide shaker	Stuart Microtitre plate shaker SSM5
Centrifugeuse	MiniStar Silverline

Tableau 2: Dérivés d'acides aminés utilisés

Produit	Fournisseur	Code produit	N° de lot
Fmoc-Ala-OH	Aapptec	AFA101	9950752
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Aldrich	47349	BCBR0170V
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	Aapptec	AFR110	9950194
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Aapptec	AFN105	9950771
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Bachem	B-1065	1023188
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Aapptec	AFQ105	9950770
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Aapptec	AFE105	9951187
Fmoc-Gly-OH	Aapptec	AFG101	9950678
Fmoc-His(Trt)-OH	Aapptec	AFH105	9951660
Fmoc-Ile-OH	Aapptec	AFI101	9950807
Fmoc-Leu-OH	Aapptec	AFL101	9950746
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Aapptec	AFK105	9950765
Fmoc-Met-OH	Bachem	B-1360	1064163
Fmoc-Pro-OH	Aapptec	AFP101	9950693
Fmoc-Ser(tBu)-OH	Aapptec	AFS105	9950786
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Bachem	B-1245	1012050
Fmoc-Trp(Boc)-OH	Bachem	B-2065	1037967
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Aapptec	AFY105	9950762
Fmoc-Val-OH	Aapptec	AFV101	9950317

Tableau 3: Réactifs et solvants utilisés

Produit	Fournisseur	Code produit	N° de lot
Oxyma Pure	Iris	RL-1180	1702117001
DIC	Aldrich	D-125407	WXBC3254V
DIEA	Acros-Organics	115225000	A0370260
Iodure de potassium	Acros-Organics	196735000	A0372082
DMF	Fisher-Chemical	D-3848	1673620
DCM	Fisher-Chemical	D-1850/15	1556455
Pipéridine	Acros-Organics	147180010	A0380543
ACN	Macron	UN1648	1635001802
TFA	Sigma-Aldrich	302031	SHBG5666V
TIS	Acros-Organics	-	-
1,2-ethanedithiol	Fluka	02390	1430267V
Ether	-	-	-

Tableau 4: Résines utilisées

Type de résine	Fournisseur	Code produit	N° de lot
Tentagel R PHB	Rapp Polymere	R28013	1217.131
Cl-MPA ProTide (LL)	CEM Corporation	R006-B	LL-Cl-MPA16004

3.2 MÉTHODES

3.2.1 PRÉPARATION DES SOLUTIONS

3.2.1.1 ACIDES AMINÉS

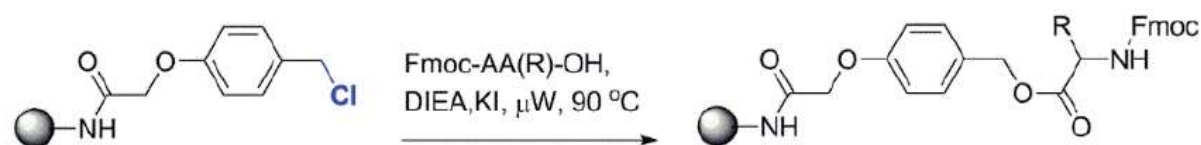
Toutes les solutions d'AA sont préparées dans les Falcons de 50 mL fournis avec le synthétiseur de peptides. Les pesées et les quantités de DMF à ajouter pour solubiliser les AA sont déterminées selon le calcul du logiciel du synthétiseur Liberty Blue. Une fois les AA pesés et les volumes de solvants adéquats ajoutés, les Falcons sont vortexés jusqu'à l'obtention d'une solution limpide, ils sont ensuite fixés aux positions indiquées sur la partie « Manifold » du Liberty Blue (cf. chapitre 2.2).

3.2.1.2 RÉSINE

La quantité de résine dépend de l'échelle « scale » choisie pour la synthèse. La synthèse du proNPY 1-69 est réalisée à une échelle de 0.10 mmol. La solution est préparée comme suit : 667 mg de résine de type Cl-MPA ProTide (LL) sont pesés dans un Falcon de 50 mL comme pour les solutions d'AA. Ensuite 25 mL d'un mélange DMF/DCM 50 : 50 sont ajoutés à la résine. Le Falcon est agité pendant quelques secondes avant d'être fixé sur le loader de résine HT12 du Liberty Blue.

3.2.2 LOADING SUR RÉSINE

Le loading du 1^{er} acide aminé de la séquence du proNPY 1-69 côté C-terminal (Trp) est réalisé automatiquement sur le synthétiseur selon le mode opératoire à l'Annexe 1. La Figure 5 représente la réaction entre l'AA et la résine.



Cl-MPA ProTide

Figure 5: Réaction du loading automatique

3.2.3 SYNTHÈSE DU PEPTIDE

La synthèse du ProNPY 1-69 depuis l'AA 69 est divisée en 7 parties. Tout d'abord le greffage automatique sur la résine suivi de 6 AA pour l'obtention du 1^{er} fragment 63-69, puis les 10 AA suivant afin d'obtenir le proNPY 53-69.

La 3^{ème} étape est le greffage des 15 AA suivants jusqu'à la position 37, puis enfin les 2 AA (Tyr et Arg) pour arriver à la moitié 35-69 du peptide. La 2^{ème} moitié jusqu'au N-terminal est effectuée en 2 étapes de même longueur (17 AA), pour obtenir dans un 1^{er} temps le fragment 18-69 et finalement le peptide entier 1-69.

Pour chaque partie, la séquence a été préparée sur le synthétiseur, tous les AA sont couplés avec la méthode « single coupling » (4 min, 90°C) sauf l'arginine qui bénéficie d'un « double coupling » (2x4 min, 75°C) pour empêcher la formation de δ -lactame ainsi que l'histidine qui est greffée avec un « single coupling » à 50°C pendant 10 minutes pour minimiser la racémisation (11). A la fin de chaque séquence, aucune déprotection finale n'est réalisée, le groupe Fmoc sur le dernier AA greffé est laissé. Chaque fragment obtenu est analysé en LC-MS en réalisant un micro-clivage de la résine (cf. chapitre 3.2.4.1). Les 6 méthodes avec toutes les étapes (couplage, déprotection, lavage) sont présentées dans les Annexes 2 à 7.

3.2.4 CLIVAGE DU PEPTIDE

3.2.4.1 MICRO-CLIVAGE

Une fois le fragment obtenu (cf. chapitre 3.2.3), une petite quantité de résine est clivée pour s'assurer de la qualité du peptide en LC-MS. Le micro-clivage est réalisé en prélevant 1 mL de la suspension de résine dans le mélange DMF/DCM 50 : 50 qui est ensuite filtré sur un petit Büchner muni d'un papier filtre. La résine est lavée avec 3 fois 5 mL de DCM puis séchée sous vide. Une fois l'échantillon de résine sec (environ 10 mg), il est transféré dans un eppendorf de 2 mL dans lequel sont ajoutés 200 μ L de la solution de clivage (TFA/TIS/Eau 180 :10 :10), l'eppendorf est ensuite agité pendant 1 heure à température ambiante. La résine est filtrée de la solution de clivage sur un tip de 100 μ L pour micropipette munis d'un filtre. Le filtrat est récolté dans un eppendorf de 2 mL et 400 μ L d'éther froid sont ajoutés pour précipiter le peptide. La solution est vortexée puis centrifugée pendant quelques secondes. Le surnageant est enlevé et l'étape de précipitation à l'éther est répétée une seconde fois. Le précipité de peptide est ensuite séché à l'air libre puis solubilisé dans 300 μ L d'une solution H₂O + 0.1% TFA/ACN + 0.1% TFA 50 :50. Les 300 μ L sont ensuite transférés dans un vial en verre muni d'un insert pour être injecter en LC.

3.2.4.2 CLIVAGE DU PRONPY 1-69

Lorsque la synthèse totale (obtention du proNPY 1-69) est terminée, la résine est récupérée par filtration sur phase poreuse dans un réacteur manuel en verre et lavée avec 3 fois 15 mL de DCM. Ensuite 15 mL de la solution de clivage (TFA/TIS/Eau/EDT 94 :2.5 :2.5 :1) sont ajoutés pour couvrir totalement la résine. La suspension est ensuite agitée pendant 3 heures à température ambiante. La suspension est ensuite filtrée en 2 fois à travers une seringue en plastique de 10 mL. Le filtrat est récupéré dans un Falcon de 50 mL. La solution (environ 12-13 mL) est ensuite concentrée en évaporant le TFA par barbotement d'azote jusqu'à réduire le volume de moitié (6-7 mL). Une fois la solution concentrée, le peptide est précipité par ajout de 40 mL d'éther froid. La suspension est vortexée puis placée au congélateur à -10°C pendant 30 minutes, suite à cela elle est centrifugée à 4'000 rpm pendant 4 min. Le surnageant est enlevé et la manipulation (éther, vortex et centrifugation) est effectuée une 2^{ème} fois. La poudre obtenue est ensuite séchée à l'air libre pendant 30 minutes.

3.2.5 MÉTHODES LC

Les échantillons sont élués en LC avec comme phase aqueuse : H₂O + 0.1% TFA et comme phase organique : ACN + 0.1% TFA à un débit de 0.617 mL/min. Le gradient complet de la méthode est décrit au Tableau 5. La température de l'autosampler est fixée à 4°C et celle de la colonne à 30°C. Le volume d'injection est variable entre 1 et 10 uL suivant la concentration en peptide de l'échantillon. Les pressions minimale et maximale du système sont fixées à 1'000 et 15'000 psi. La pression du système aux conditions initiales (5% phase organique) est d'environ 3'500 psi. La détection UV est effectuée à 214 nm.

Tableau 5: Gradient de la méthode LC pour les fragments jusqu'à 37-69

Temps [min]	Phase mobile organique [%]
0 à 4.00	5 à 95
4.00 à 4.30	95
4.30 à 4.31	95 à 5
4.31 à 5.40	5

Pour les fragments à partir de 18-69, une 2^{ème} méthode LC est utilisée avec un débit de 0.500 ml/min et un plus long gradient présenté dans le Tableau 6.

Tableau 6: Gradient de la méthode LC pour les fragments depuis 18-69

Temps [min]	Phase mobile organique [%]
0 à 8.00	5 à 75
8.00 à 8.30	75
8.30 à 8.31	75 à 5
8.31 à 9.00	5

3.2.6 MÉTHODES MS

Pour contrôler la qualité du peptide tout au long de la synthèse, un mode d'ionisation electrospray positif (ESI+) est utilisé. La fenêtre d'observation est réglée entre des m/z de 400 et 1300 pour les fragments jusqu'à 37-69. Le voltage du cône (ionisation) est de 30 V.

Pour les fragments depuis 18-69, une 2^{ème} fenêtre d'observation allant de m/z = 600 à 1700 est utilisée.

4 RÉSULTATS

4.1 LOADING SUR RÉSINE

4.1.1 ESSAI MANUEL SELON LE PROTOCOLE

Le loading du 1^{er} AA (Trp) sur la résine de type Tentagel R PHB a, dans un 1^{er} temps, été réalisé manuellement en suivant la « Symmetrical anhydrid method » décrite au point 3.3.1 dans la publication de Knud J. Jensen et al. (12). Le calcul rendement a été réalisé par une quantification du Fmoc à l'UV 219 nm décrite au point 3.8 de la publication. Le loading a été calculé selon la formule :

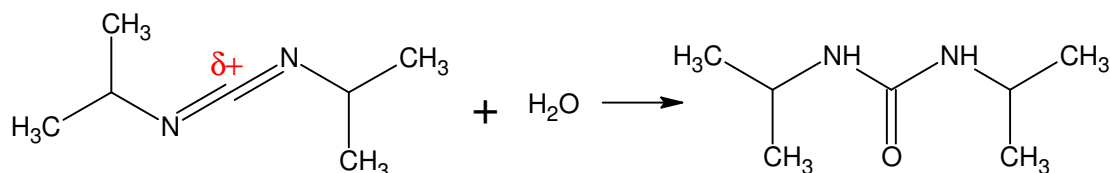
$$\text{Loading} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{(V \times (A_{290 \text{ nm}} - A_{\text{Blanc}}))}{(\epsilon \times d \times m_{\text{sample}})}$$

Dans la formule, V est le volume de liquide (2 mL) dans la cuvette pour la mesure à l'UV en [L], d est la profondeur de la cuvette (1 cm) et le coefficient d'extinction molaire ϵ vaut 5'800 [M⁻¹ x cm⁻¹]. L'absorbance du blanc (pipéridine pur) est de 0.873. Les valeurs d'absorbances, les loading de la résine obtenus par calculs et le rendement moyen sont décrits dans le Tableau 7. Le rendement est calculé par rapport au loading théorique de la résine qui est de 0.19 mmol/g.

Tableau 7: Valeurs du loading manuel

Essai	Masse de résine [mg]	Absorbance [-]	Loading [mmol/g]	Rendement moyen [%]
1	5.64	1.061	0.011	6
2	4.88	1.031	0.011	
3	5.56	1.048	0.011	

La publication spécifie que le rendement minimal pour pouvoir commencer une synthèse est de 70 %, le loading manuel n'a donc pas fonctionné. La principale cause de cet échec est certainement la présence d'eau lors de la réaction entre le Trp et la résine, activée par le DIC. L'utilisation d'une vieille bouteille de DMF et d'un montage pas étanche peuvent être les causes de cette présence d'humidité. Le DIC réagit très rapidement avec l'eau (13) selon la réaction suivante (14) :



Une fois l'urée disubstituée formée, la réaction entre l'AA et la résine ne peut plus être activée, le loading sur la résine sera donc très faible. Aucun essai de synthèse peptidique n'a été réalisé avec la résine loadée obtenue après cet essai.

4.1.2 ESSAI MANUEL SIMPLIFIÉ

Une 2^{ème} tentative de loading manuel du Trp sur la résine Tentagel a été effectuée dans une version simplifiée détaillée dans l'Annexe 8. Le test de rendement par quantification du Fmoc en solution n'a pas été réalisé car la manipulation prend trop de temps. Une fois la manœuvre de load terminée, un test de synthèse a été réalisé en greffant, après le Trp, les 6 AA suivants pour obtenir le fragment : Fmoc-LEDPAMW-Ø (Ø symbolise la résine).

Une fois la séquence terminée et le micro-clivage réalisé, l'échantillon est injecté en LC-MS. Les chromatogrammes UV et TIC sont présentés dans la Figure 6.

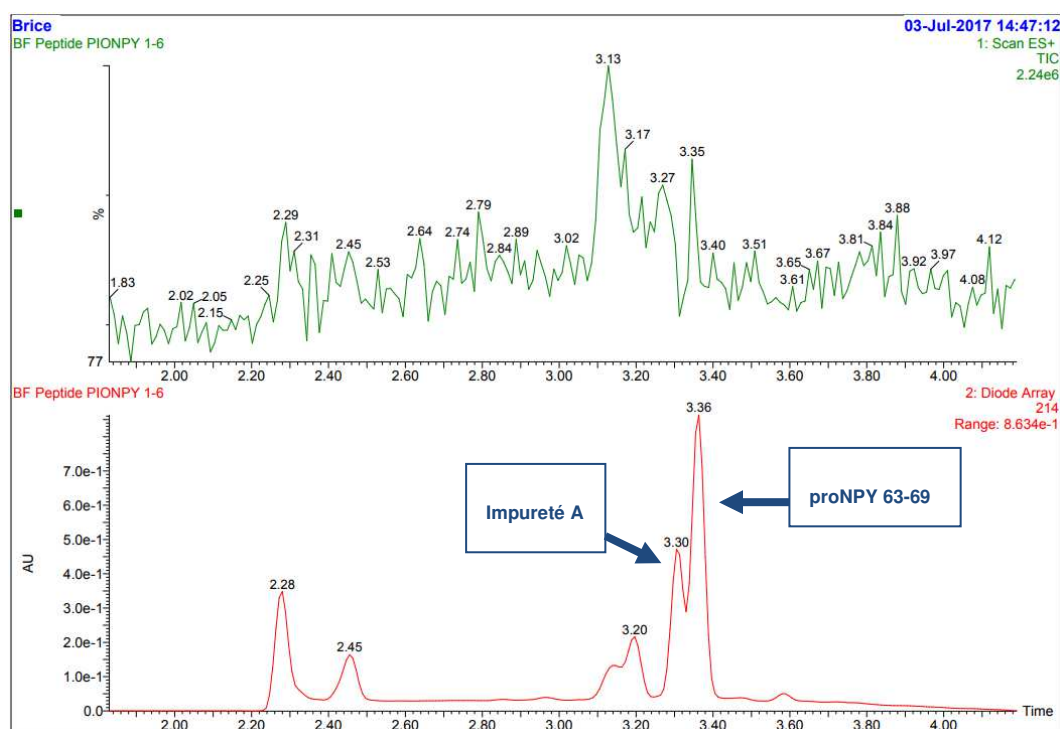


Figure 6: Chromatogrammes UV et TIC du fragment proNPY 63-69

Le chromatogramme révèle la présence de nombreuses impuretés dont la A (3.20 min) qui co-élue avec le produit principal à 3.36 min. Un chromatogramme UV de ce type après seulement 7 AA révèle que le loading manuel n'a pas fonctionné. Il ne devrait y avoir qu'un seul pic intense à un temps de rétention de 3.36 minutes. Pour cet essai une bouteille neuve de DMF a été utilisée, la possible présence d'humidité ne peut provenir que du DIC. Cependant, comme le loading automatique réalisé avec le même DIC a fonctionné (cf. chapitre 4.1.3), celui-ci ne peut pas être la source du problème. La cause la plus probable est que le Trp réagit de manière incomplète sur les sites de la résine Tentagel (15). La résine Tentagel étant gonflée dans du DMF pendant 30 min avant le loading, les sites réactifs sont libérés. Comme ces sites ne sont pas protégés, en cas de non-réaction avec l'AA ils peuvent réagir avec n'importe quels autres réactifs ou AA plus loin dans la synthèse. Cela conduit à la présence de nombreuses impuretés, une baisse du rendement global de la synthèse et annonce donc une purification difficile du produit.

De plus le spectre ESI du pic à 3.36 minutes n'a pas donné la masse attendue $[M+H]^+ = 1084$ pour le fragment : Fmoc-LEDPAMW comme le montre la Figure 7.

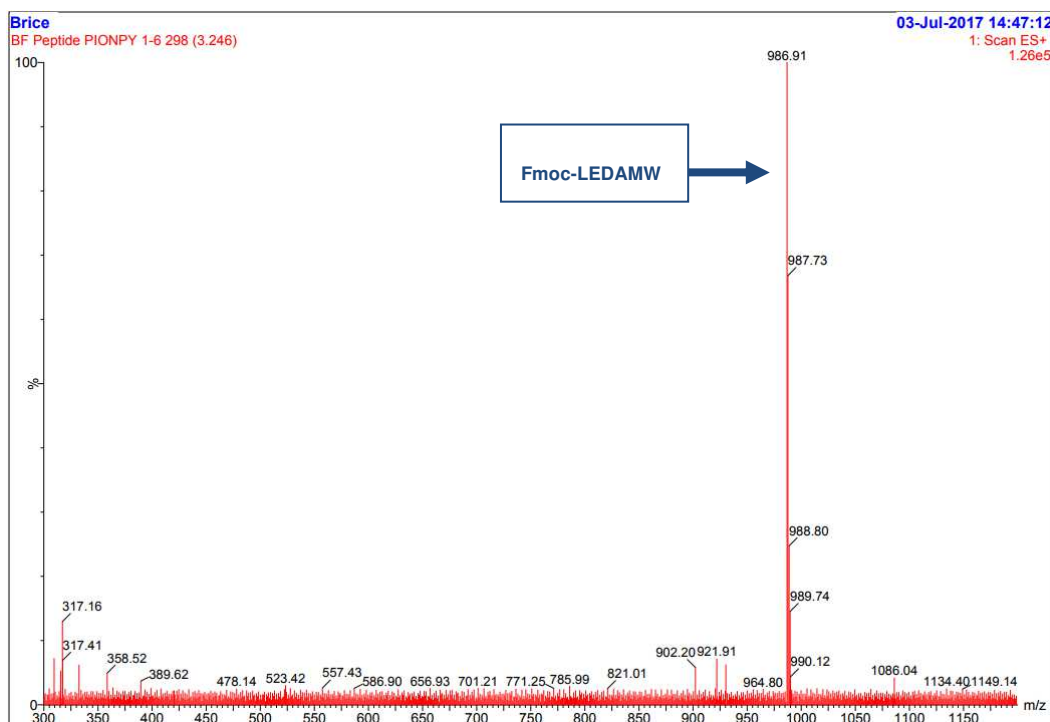


Figure 7: Spectre ESI du fragment proNPY 63-69

Le spectre montre une masse monochargée de 987 qui correspond au fragment 63-69 auquel manquerait la proline : Fmoc-LEDAMW. Il est possible que le Falcon contenant la solution de proline ait été placé au mauvais endroit sur le synthétiseur. Lors de l'étape de couplage de la proline l'appareil aurait alors simplement aspiré de l'air dans le Flacon vide et aurait effectué un couplage à vide. La séquence aurait ensuite continué en greffant l'AA Asp sur l'alanine. La suite de la synthèse n'a donc pas été réalisée.

4.1.3 ESSAI AUTOMATIQUE SUR SYNTHÉTISEUR

Suite aux 2 échecs de loading manuels, un loading automatique a été tenté (cf. chapitre 3.2.2) avec la résine CI-MPA ProTide recommandée par CEM Corporation pour les longues séquences (>70 AA) avec un AA C-terminal acide (16). Une fois les solutions décrites dans le mode opératoire, fourni sur le site CEM corporation (cf. annexe 1), préparées le même essai de synthèse a été réalisé (Fmoc-LEDPAMW-Ø) directement à la suite du loading automatique sans vérification du rendement de celui-ci. Les chromatogrammes UV et TIC de cet essai sont illustrés à la Figure 8.

Synthèse du proNPY 1-69 en phase solide assistée par micro-ondes

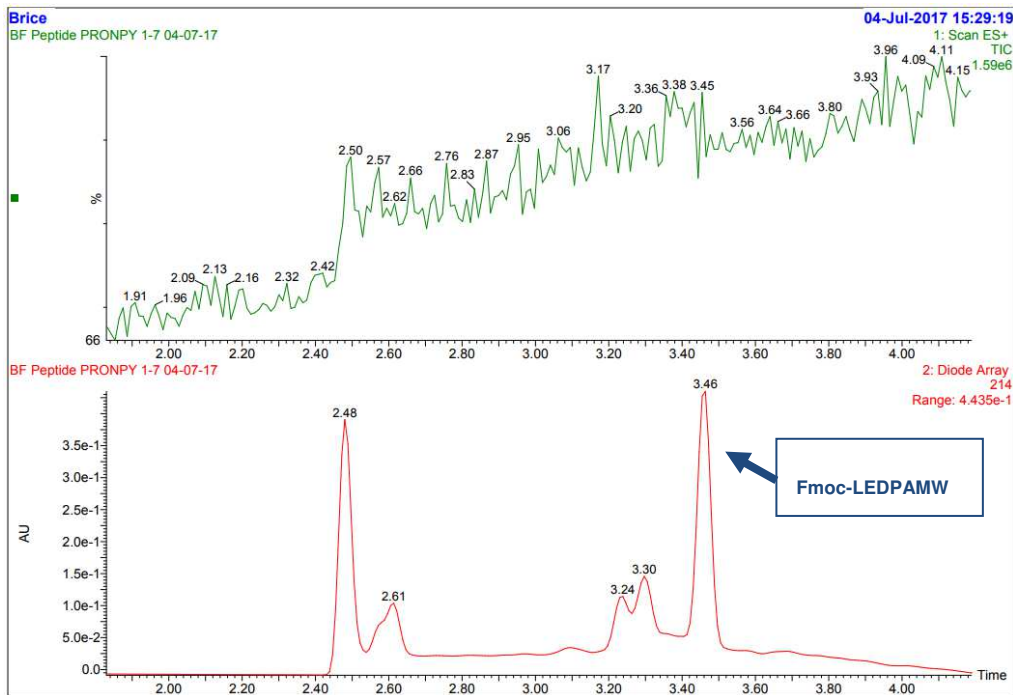


Figure 8: Chromatogrammes UV et TIC du fragment proNPY 63-69 (loading automatique)

Les quelques impuretés visibles à 2.61, 3.24 et 3.30 minutes (le pic à 2.48 est aussi présent dans le blanc) sont libérées lors du clivage du peptide. Ces impuretés peuvent être des séquences de peptides tronquées, modifiées, pas totalement déprotégées ou encore des groupes protecteurs liés à d'autres composés générant des « by-products » (17). Le pic correspondant au fragment de 7 AA (3.46 min) donne la bonne masse en ESI comme le montre la Figure 9. De plus, les impuretés présentes ne co-éluent pas avec le produit principal (pas de chevauchement des pics), la suite de la synthèse a donc été réalisée.

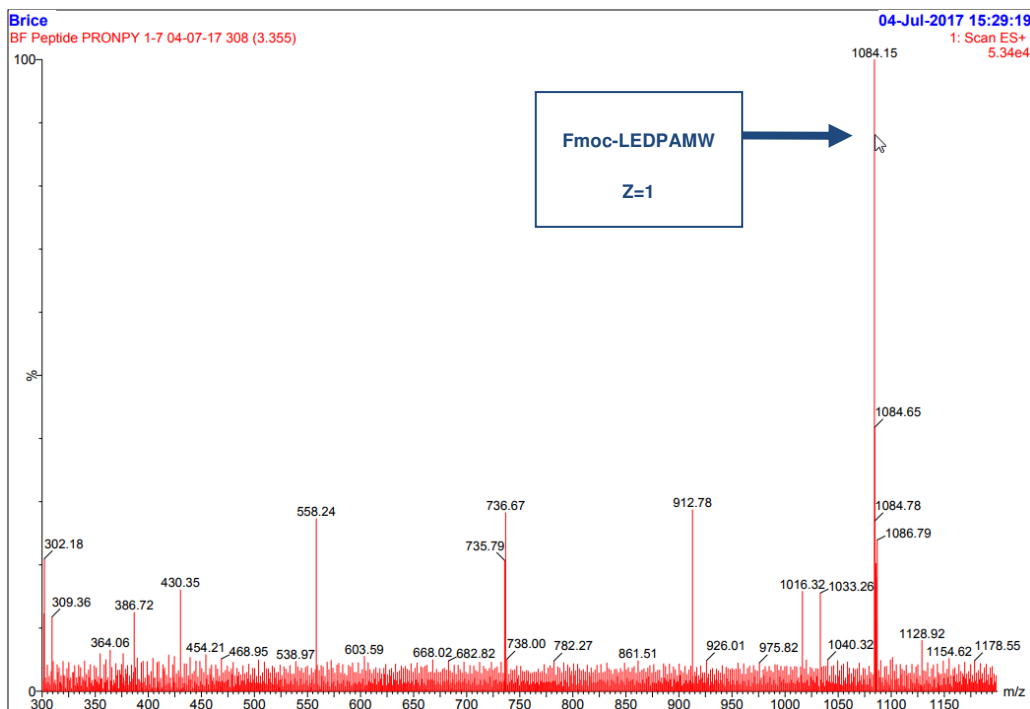


Figure 9: Spectre ESI du fragment proNPY 63-69 (loading automatique)

4.2 SYNTHÈSE DU PRONPY 1-69

4.2.1 FRAGMENT 53-69

Une fois le loading et greffage des 7 premiers AA réussis, la synthèse a été poursuivie en greffant les 10 prochains AA jusqu'à l'obtention du fragment proNPY 53-69 : Fmoc-ESTENVPRTRLEDPAMW-Ø. La valine en position 58 est le 2^{ème} AA différent par rapport à la séquence du proNPY de la souris qui contient une alanine (cf. chapitre 2.1). Les chromatogrammes UV et TIC du fragment 53-69 obtenu après clivage sont illustrés à la Figure 10.

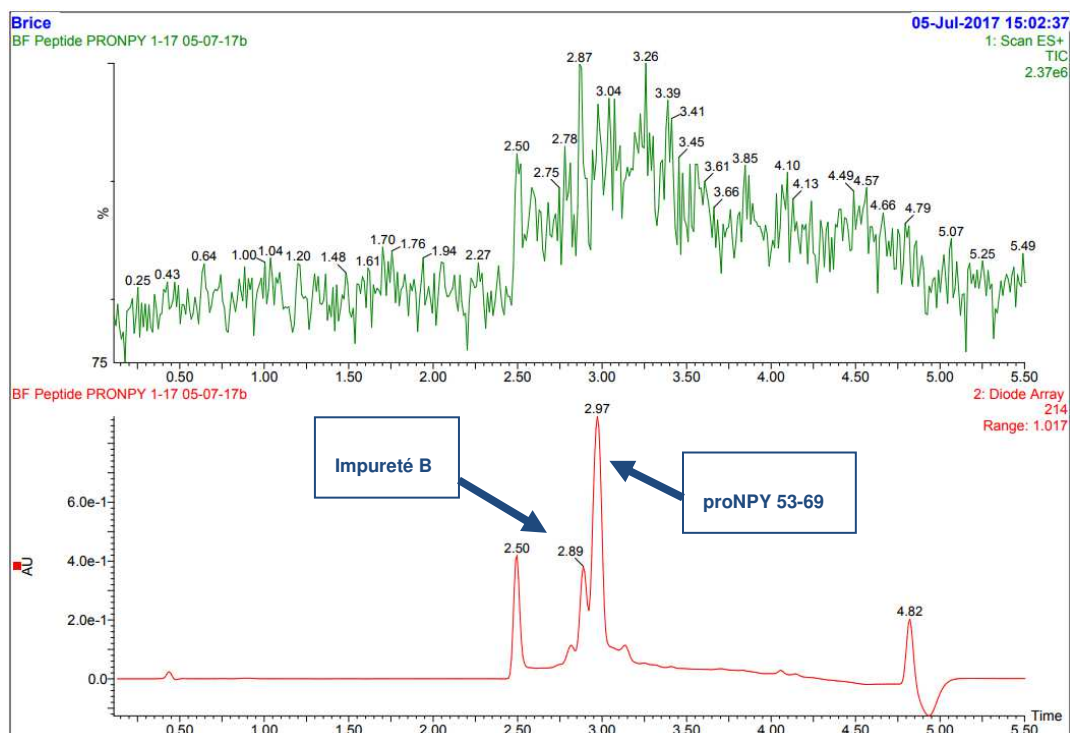


Figure 10: Chromatogrammes UV et TIC du fragment proNPY 53-69

La réussite de cette partie de la synthèse démontre que la difficulté empêchant de synthétiser la séquence humaine du proNPY n'est certainement pas la valine 58 puisqu'il n'y a pas de dégradation notable de la qualité du peptide en UV. Evidemment, comme les impuretés présentes à la Figure 8 n'ont pas été éliminées, les 10 AA ESTENVPRTR sont aussi greffés dessus. Plus la synthèse avance, plus ces impuretés (peptides modifiés) ressembleront au proNPY. Ils vont donc co-éluer de plus en plus avec le peptide d'intérêt comme le montre la Figure 10 où l'impureté B (2.89 min) se chevauche déjà avec le pic principal.

Le TIC montre que l'ionisation du fragment 53-69 est meilleure que celle du 63-69, cela est dû à la présence des 2 arginines en positions 60 et 62 qui s'ionisent très bien. De ce fait, la masse la plus abondante dans le spectre ESI est celle du fragment bichargé $[M+2H]^{+2} = 1128$ comme le montre la Figure 11. La masse du fragment trichargé, beaucoup moins intense, est aussi visible à 752.97.

Synthèse du proNPY 1-69 en phase solide assistée par micro-ondes

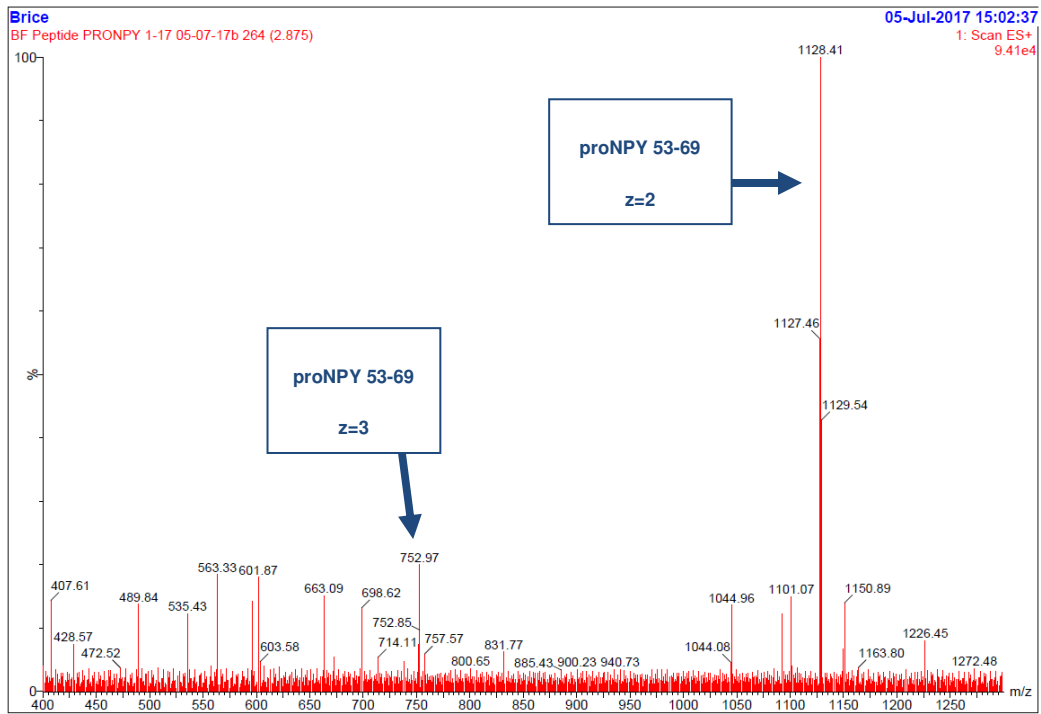


Figure 11: Spectre ESI du fragment proNPY 53-69

4.2.2 FRAGMENT 37-69

L'étape de synthèse suivante consistant à greffer les prochains 18 AA pour arriver à la moitié du peptide (proNPY 35-69) n'a pas pu être menée à bien. En effet, un problème de drainage du réacteur est survenu après le 16^{ème} AA. La synthèse a donc été stoppée à ce point-là et le fragment 37-69 a été analysé. Les chromatogrammes combinés UV et TIC sont illustrés dans la Figure 12.

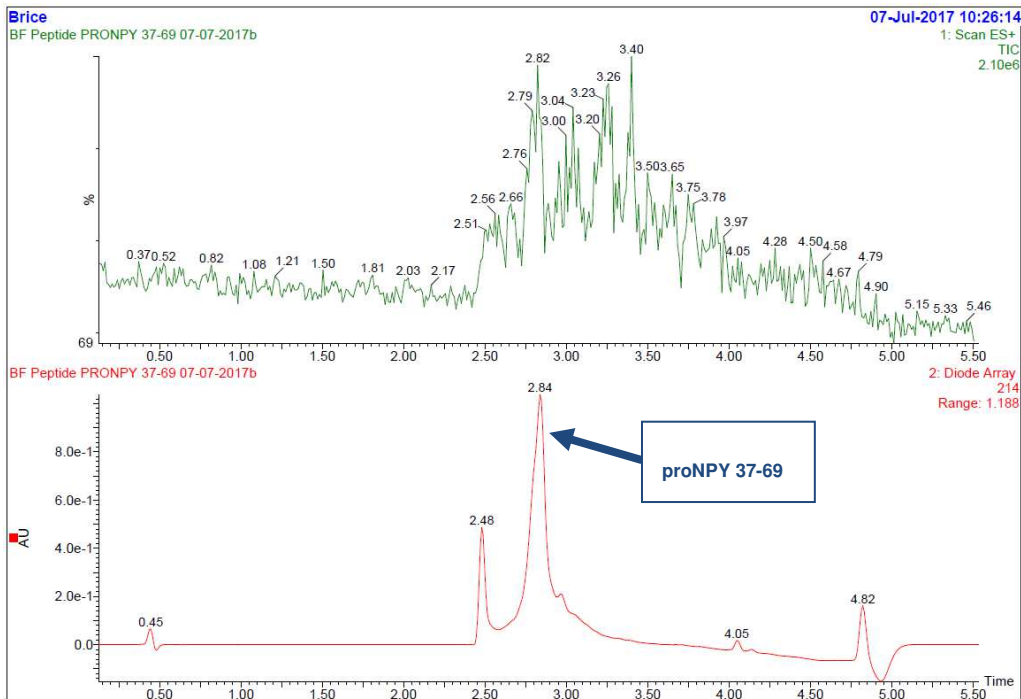


Figure 12: Chromatogrammes UV et TIC du fragment proNPY 37-69

Le peptide parasite, qui était totalement résolu du pic principal dans le fragment 63-69 (tr = 3.30), le chevauchait dans le fragment 53-69 (tr = 2.89) et co-élue pratiquement totalement pour former un épaulement du pic principal mieux visible dans la Figure 13.

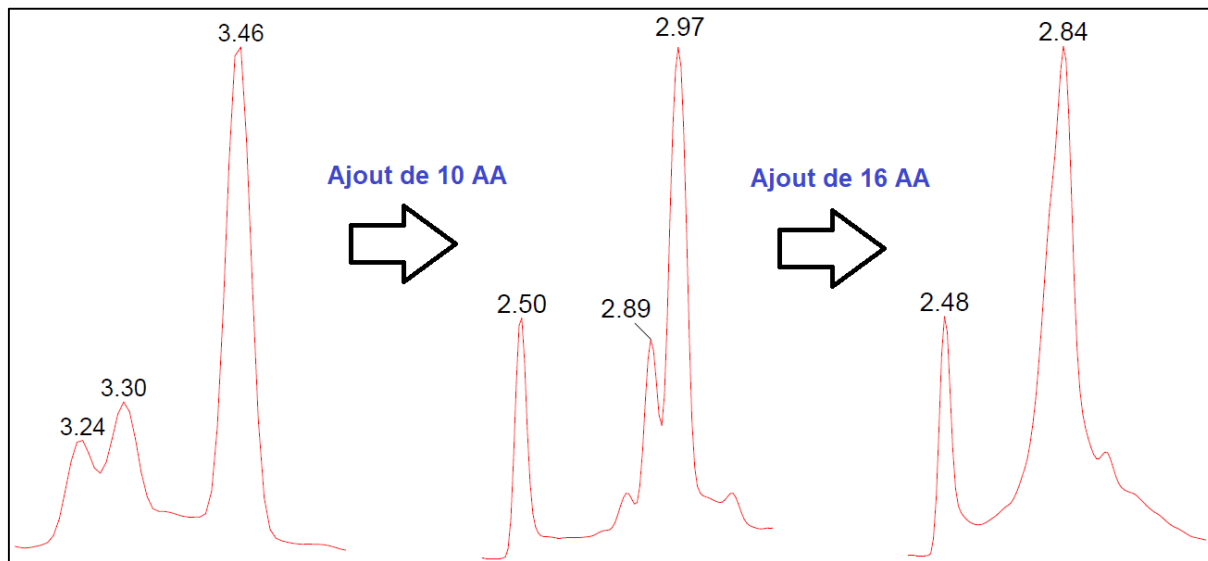


Figure 13: Progression de la co-élution de l'impureté

Sur le spectre ESI du proNPY 37-69 (*spectre non-illustré*) les fragments $[M+3H]^{3+}$ et $[M+4H]^{4+}$ avec des m/z de respectivement 1273 et 955 sont visibles. Cependant la quantité de peptide ayant la bonne séquence (GKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTLRLEDPAW) diminue et engendre en petites quantités beaucoup de peptides parasites qui éluent tous de manière très similaire. La ligne de base du chromatogramme UV se dégrade autour du pic principal au fur et à mesure que la synthèse avance. Cet effet est dû à l'agrégation des chaînes peptidiques entre-elles via des ponts hydrogènes situés sur les squelettes carbonés. Dans le cas de synthèse de peptides difficiles, la matrice réactionnelle est rendue inaccessible aux nouveaux AA à greffer au bout de 6 à 12 résidus (18), (7).

Le système de chauffage par micro-ondes empêche cet effet en écartant les chaînes peptidiques les unes des autres comme le montre la Figure 14. Cela permet une augmentation des rendements des réactions de couplages et de déprotections (19).

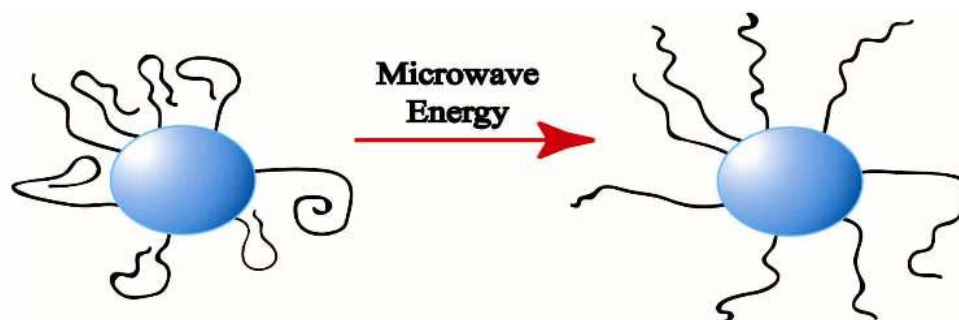


Figure 14: Annihilation de l'agrégation par utilisation de micro-ondes

Cependant une annihilation totale de l'agrégation est impossible étant donné la longueur des chaînes peptidiques à ce stade de la synthèse (33 AA). L'emploi de groupe comme le Hmb ou le Dmb tous les 6 ou 7 AA (20) ou l'utilisation de pseudoprolines (21) permet d'éviter les interactions de type ponts H entre les chaînes de peptides.

De plus, la réaction de déprotection utilisée n'est pas optimale puisqu'elle se fait avec une solution de 20% pipéridine dans du DMF. Une utilisation de pipérazine en place de la pipéridine a démontré une diminution significative de la formation d'aspartimide (22). Cette réaction, illustrée à la Figure 15, se produit lorsque l'acide aspartique contenu dans un peptide est soumis à l'action d'une forte base (23).

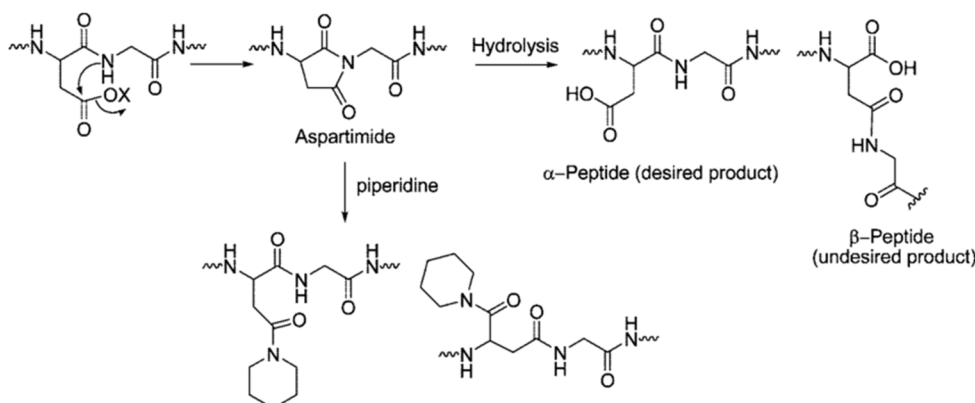


Figure 15: Formation d'aspartimide (32)

Le degré de formation d'aspartimide est totalement dépendant de l'AA qui suit l'acide aspartique. Le cas Asp-Gly est connu pour être le plus sensible. Viennent ensuite dans l'ordre décroissant de sensibilité : Asp-Asn, Asp-Asp, Asp-Arg, Asp-Ser/Thr, Asp-Cys, Asp-Ala (23). Une addition de 0.1 M de HOBT à la solution d'activation DIC/Oxyma aide à la suppression de l'aspartimide (11). Il est possible de maximiser le rendement de couplage en changeant le groupe protecteur de la chaîne latérale de l'acide aspartique. Il a été démontré que le dérivé Fmoc-Asp(Mpe)-OH est moins sujet à l'aspartimide dans les mêmes conditions de déprotection que le Fmoc-Asp(OtBu)-OH (24), (25).

Cette formation d'aspartimide peut expliquer la baisse rapide de la qualité du peptide puisqu'en positions 47-48 du proNPY se trouve la suite d'AA Ser-Asp. Même si l'ordre des AA est inversé, une réaction entre l'Asp et la liaison amine côté N-terminal pourrait avoir lieu.

4.2.3 FRAGMENTS 18-69 ET 1-69

La détérioration du peptide a continué avec les 2 dernières étapes de la synthèse. La 1^{ère} partie (AA 37 à 18) comportait une difficulté inédite, à savoir la présence de la seule Histidine de la séquence. Cet AA est connu pour être susceptible à la racémisation comme le montre la Figure 16.

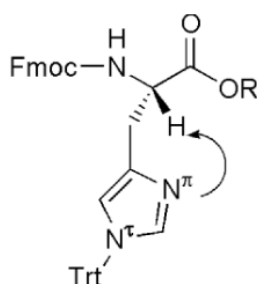


Figure 16: Mécanisme de racémisation potentielle de l'histidine

De plus la dernière des 8 arginines de la séquence proNPY est greffée durant cette partie 18-69 en position 19. Lors de l'étape de couplage, les AA sont activés (DIC/Oxyma) pour obtenir le meilleur rendement de couplage possible. Dans le cas de l'arginine, une réaction parallèle peut survenir lorsque la guanidine de la chaîne latérale (nucléophile) attaque le site électrophile du carbonyle de la fonction acide activée comme le représente la Figure 17. Cette réaction conduit à une formation de δ -lactame (cyclisation de l'arginine) et l'impossibilité de continuer la séquence. L'utilisation de doubles couplages à 75°C (cf. chapitre 3.2.3) doit normalement minimiser la production de lactame (11).

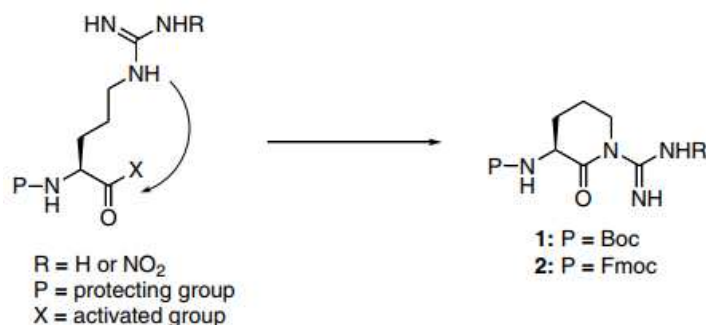


Figure 17: Formation de δ -lactame durant l'étape d'activation (26)

La 2^{ème} partie de la synthèse (ajout des AA 17 à 1) contient en positions 6 et une suite Asp-Asn qui, comme vue au chapitre 4.2.2, est l'une des plus sujettes à la formation d'aspartimide.

La combinaison de tous ces facteurs (Loading incomplet, 8 Arg sujettes au lactame, séquences Ser-Asp et Asp-Asn sensibles à l'aspartimide, racémisation de l'His et l'agrégation des chaînes dû à leur longueur de 70 AA) fait qu'une fois la séquence finie, le produit ne représente plus qu'une petite minorité du signal visible en UV (Figure 18). Il n'est pas possible de quantifier le proNPY 1-69 parmi l'ensemble de peptides présents dans le signal UV à 3.04 minutes.

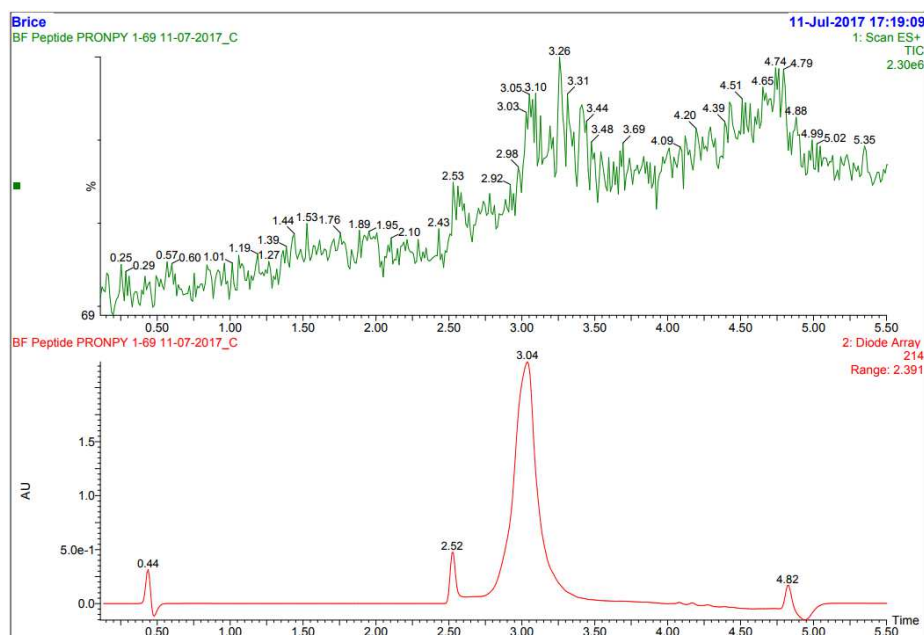


Figure 18: Chromatogrammes UV et TIC du proNPY 1-69

Le produit obtenu en fin de synthèse (Figure 18) est très difficilement purifiable par LC préparative. Un gradient de 30 minutes allant de 5 à 75% de phase organique n'a pas permis de séparer les composés. De plus, une erreur en fin de synthèse pourrait empêcher toute obtention du produit désiré. En effet, la déprotection finale du peptide n'a pas été effectuée. Il y a donc toujours un groupe protecteur Fmoc sur la tyrosine terminale. Il serait toutefois possible d'enlever ce Fmoc en solubilisant le peptide. Le groupe protecteur serait alors clivé du peptide suivant une méthode dédiée à la synthèse peptidique en phase liquide. En utilisant une résine de type « piperazine polymer-bound » (27), le Fmoc serait alors clivé du peptide et le dibenzofulvène (produit obtenu lors du clivage du Fmoc) serait trappé par la résine. La résine est ensuite éliminée par filtration.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La synthèse du proNPY 1-69 séquence humaine présente beaucoup de difficultés. Le système de chauffage par micro-ondes ainsi que les modes de couplages spécifiques permettent d'éviter l'agrégation (partiellement du moins) ainsi que la racémisation. Cependant, les formations de lactame et d'aspartimide ne peuvent pas être évitées car elles sont dépendantes du peptide.

Dans l'optique de tenter une nouvelle synthèse, les mesures suivantes devraient être prises. L'utilisation de pseudoprolines aux positions 47-48 peut s'avérer indispensable au bon déroulement de la synthèse comme l'ont montré Eggelkraut-Gottanka et al. (28). De plus, les pseudoprolines sont plus efficaces que les groupes de type Hmb ou Dmb pour éviter les interactions inter-chaînes (21). Il faudrait également remplacer la solution de déprotection utilisée (20% pipéridine dans DMF) par son équivalent en pipérazine afin de limiter la formation d'aspartimide. Pour maximiser les chances, il serait préférable d'utiliser un dérivé d'acide aspartique de type Fmoc-Asp(Mpe)-OH ou Fmoc-Asp(Bno)-OH (23). Le dérivé d'arginine à privilégier est le Fmoc-Arg(Pbf)-OH par rapport au Fmoc-Arg(Pmc)-OH car il est plus labile et s'élimine donc 2 fois plus rapidement lors du clivage du peptide au TFA (29). Les dérivés d'histidine disponibles dans le commerce tels que Fmoc-His(Trt)-OH ou Fmoc-His(Mtt)-OH ne permettent pas d'empêcher la racémisation du peptide, cependant un mode opératoire de couplage avec activation DEBPT/DIEA (décrite au point 4.2.2 de (29)) permet une diminution de la racémisation. L'activation avec DIC/Oxyma dans DMF ne doit pas changer (sauf pour l'histidine) car il s'agit de la méthode conseillée par CEM (11) et elle donne de bien meilleurs rendements que des activations par HOAt/DIC, HOBt/DIC ou encore HOPO/DIC (30), (31). Il faudrait cependant ajouter 0.1 M de HOBt dans l'activateur pour supprimer la formation d'aspartimide (11). Il sera évidemment important de s'assurer auparavant de la compatibilité de ces méthodes avec le synthétiseur Liberty Blue et le système à micro-ondes.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier **Dr Eric Grouzmann** et **Dr Philippe Eugster** de l'unité de recherche du laboratoire des catécholamines au CHUV, de m'avoir proposé ce travail annexe durant mon Bachelor. Cette opportunité m'a permis de grandement améliorer mes compétences dans la synthèse peptidique et ainsi de sortir des sentiers de la chimie analytique.

Je remercie également mon superviseur, **Dr Marc Mathieu**, pour m'avoir mis à disposition son laboratoire au sein de la HES et suivi pendant les 2 semaines que ce travail a duré. Sa disponibilité, ses connaissances et sa confiance m'ont guidé dans le bon chemin.

Mes remerciements également à **Vanessa Gaillard** et **Nadège Gsponer** du laboratoire des peptides pour leur accueil chaleureux, leur compréhension et tous les conseils qu'elles ont su m'apporter pour les manipulations utiles durant ce travail.

6 BIBLIOGRAPHIE

1. S.R.Bloom, J.M. Allen. Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. *Neurochemistry International*. 1986, Vol. 8, pp. 1-8.
2. Tatemoto, Kazuhiko. Neuropeptide Y: Complete amino acid sequence of the brain peptide. *Biochemistry*. 1982, Vol. 79, pp. 5485-5489.
3. Gehlert, D. R. Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. *Neuropeptides*. 1999, Vol. 33, pp. 329-338.
4. Lydia E. Kuo, Magdalena Czarnecka, Joanna B. Kitlinska, Jason U. Tilan, Richard Kvetnansk and Zofia Zukowska. Chronic Stress, Combined with a High-Fat/High-Sugar Diet, Shifts Sympathetic Signaling toward Neuropeptide Y and Leads to Obesity and the Metabolic Syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008, Vol. 1138, pp. 232-237.
5. Diego Iglesias-Gato et al., Amilcar Flores-Morales. The Proteome of Primary Prostate Cancer. *European Association of Urology*. 2015, Vol. 69, pp. 942-952.
6. Merrifield, R.B. *Journal of the American Chemical Society*. 1963, Vol. 85, pp. 2149-2154.
7. Jonathan M. Collins, Michael J. Collins, Rebecca C. Steorts. Novel Method for Solid Phase Peptide Synthesis : Using Microwave Energy. *Biopolymers*. 2003, Vol. 71, p. 361.
8. Gedye, R., Smith, F., Westaway, K., Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L. and Rousell, J. *Tetrahedron Letters*. 1986, Vol. 27, pp. 272-289.
9. Yu, H. M., Chen, S. T. and Wang, K. T. *Journal of organique chemistry*. 1992, Vol. 57, pp. 4781–4784.
10. Antonio de la Hoz, Ángel Díaz-Ortiz and Andrés Moreno. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chemical Society Reviews*. 2005, Vol. 34, pp. 164-178.
11. CEM Corporation. *Liberty Blue™ Automated Microwave Peptide Synthesizer*, *Chemistry Supplement*. Canada : s.n., 2015.
12. Jensen, Pernille Tofteng Shelton and Knud J. Linkers, Resins, and General Procedures for Solid-Phase Peptide Synthesis. *Peptide synthesis and applications*. 2013, Vol. 1047, pp. 23-41.
13. Pubchemn, DIC sur. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N_N_-Diisopropylcarbodiimide#section=Ecological-Information. [En ligne]
14. Ulrich, Henri. *Chemistry and technologies of carbodiimides*. [éd.] John Wiley & Sons. 2007. p. 83.
15. aaptec, Résine Tentagel sur. <https://www.aaptec.com/peptide-synthesis-resins-i-253.html>. [En ligne]
16. CEM, Résine Cl-MPA sur. <http://cem.com/en/spps-chemicals/resins/low-loading-cl-mpa-protide-resin.html>. [En ligne]
17. https://www.bachem.com/fileadmin/user_upload/pdf/Catalogs_Brochures/Bachem_Peptide_Guide.pdf. [En ligne] SPPS Peptide User.
18. Bernadett Bacsa, Bimbisar Desai, GAbor DibO, C. Oliver Kappe. Rapid solid-phase peptide synthesis using thermal and controlled microwave irradiation. *Journal of Peptide Science*. 2006, Vol. 12, pp. 633-638.
19. Stacey A. Palasek, Zachary J. Cox and Jonathan M. Collins. Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*. 2006, Vol. 13, pp. 143-148.
20. C. Hyde, T.J. Johnson, D. Owen, M. Quibell, R.C. Sheppard. *International journal of peptide and protein research*. 1994, Vol. 43, p. 431.
21. W.R. Sampson, H. Patsiouris, N.J. Ede. *Journal of peptide science*. 1999, Vol. 5, p. 403.
22. Wade JD, Mathieu MN, Macris M, Tregear GW. Base induced side reactions in Fmoc-solid phase peptide synthesis: Minimization by use of piperazine as N α -deprotection reagent. *Letters in peptide Science*. 2000, Vol. 7, pp. 107-112.

- 23.** Raymond Behrendt, Peter White and John Offer. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of peptide science*. 2016, Vol. 22, pp. 4-27.
- 24.** M. Mergler, F. Dick, B. Sax, P. Weiler and T. Vorherr. The Aspartimide Problem in Fmoc-based SPPS. Part I. *Journal of peptide science*. 2003, Vol. 9, pp. 36-46.
- 25.** M. Mergler, F. Dick, B. Sax, C. Stähelin and T. Vorherr. The Aspartimide Problem in Fmoc-based SPPS. Part II. *Journal of peptide science*. 2003, Vol. 9, pp. 518-526.
- 26.** Silverman, Jiwon Seo and Richard B. Synthesis of arginine-containing hydroxamate dipeptidomimetics. *Tetrahedron Letters*. 2006, Vol. 47, pp. 4069-4073.
- 27.** Fields, Gregg B. Methods for Removing the Fmoc Group. 1994, Vol. 35, pp. 17-27.
- 28.** Regula von Eggelkraut-Gottanka, Zuzana Machova, Eric Grouzmann, Annette G. Beck-Sickinger. Semisynthesis and Characterization of the First Analogues of Pro-Neuropeptide Y. *ChemBioChem*. 2003, Vol. 4, pp. 425-433.
- 29.** Bachem. *TIPS AND TRICKS FOR SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS FROM THE EXPERTS AT BACHEM*.
- 30.** Ramon Subiros-Funosas, Rafel Prohens, Rafel Barbas, Ayman El-Faham and Fernando Albericio. Oxyma: An efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion. *Chemistry European Journal*. 2009, Vol. 15, pp. 9394-9403.
- 31.** Tarfah I. Al-Warhi, Hassan M.A. Al-Hazimi, Ayman El-Faham. Recent development in peptide coupling reagents. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2012, Vol. 16, pp. 97-116.

7 ANNEXES

Annexe 1 : Mode opératoire du loading des résines Cl-MPA ProTide and Cl-TCP(Cl) ProTide

Annexe 2 : Méthode de la synthèse du fragment 63-69

Annexe 3 : Méthode de la synthèse du fragment 53-69

Annexe 4 : Méthode de la synthèse du fragment 37-69

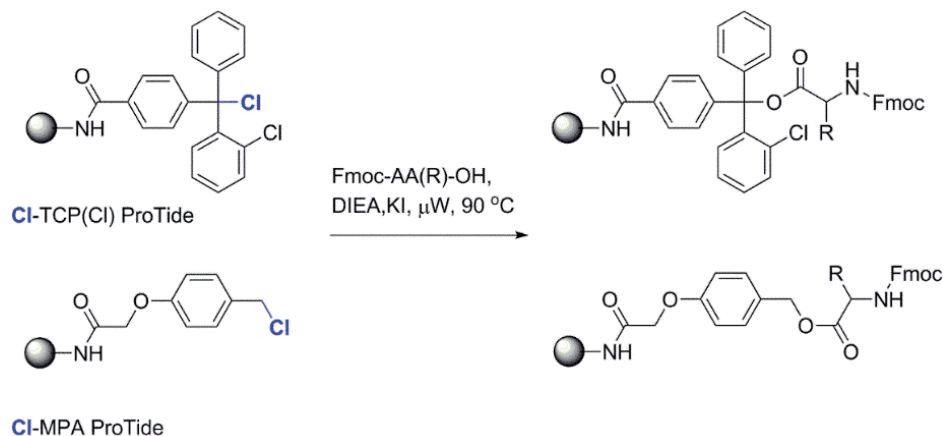
Annexe 5 : Méthode de la synthèse du fragment 35-69

Annexe 6 : Méthode de la synthèse du fragment 18-69

Annexe 7 : Méthode de la synthèse du fragment 1-69

Annexe 8 : Mode opératoire du loading de résine en version simplifiée

Cl-MPA ProTide and Cl-TCP(Cl) ProTide Resin Loading and Protected Cleavage Procedures



This universal loading procedure will allow the first amino acid to be coupled under no-hassle, programmable conditions using the Liberty Blue™ Automated Microwave Peptide Synthesizer, or manually with the Discover Bio™ microwave.

Programming the Chloride Loading Cycle

- In the Liberty Blue application software, open the Cycle Editor (Edit > Cycles...) and select Amino Acid, High Swelling, and the desired synthesis scale.
- Copy the “Trityl DCA Loading (HS)” method and rename to “Chloride Loading (HS)”.
- For the new Chloride Loading (HS) method, delete the first Cycle Step entitled “Coupling (Trityl Loading)”. Only one

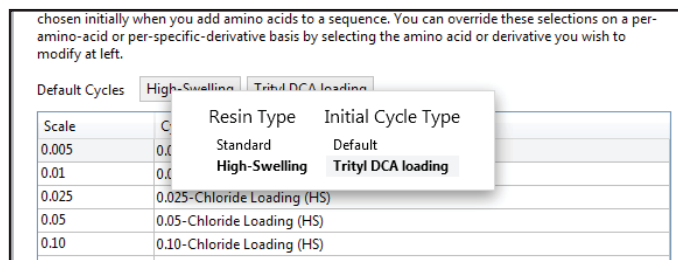
“Coupling (Trityl Loading)” step should remain.

- Verify the following parameter values for the Coupling (Trityl Loading) operation:
 - Reaction Method: DCA Trityl Loading
 - Amino Acid Volume: 5
 - Base Bottle Position: Position21
 - Base Volume: 2
- Save the cycle and close the screen.

Setting the Default Chloride Loading Cycle

- To set the default resin cycle for chloride loading, open the Reagent Editor (Edit > Reagents...).
- Select the Amino Acid folder and change the default cycles to “High-Swelling” and “Trityl DCA loading”.
- Select the “Chloride Loading” cycle for each scale. The Chloride Loading cycle must be created for each scale

before it can be set as a default.



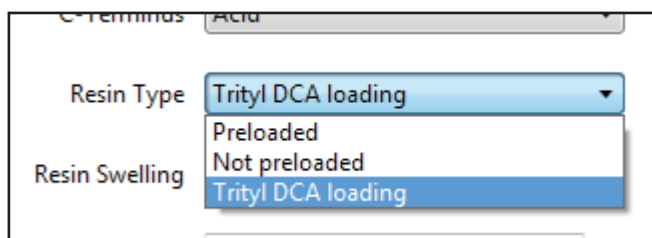
4. Save the changes and close the screen.

Chloride Loading Reagents

WARNING

When preparing an activator base solution on the Liberty Blue using HOBt or Oxyma Pure, 0.1 M DIEA should also be added to the solution. DIEA creates a more basic environment and stabilizes the Cl-TCP(Cl) linker during coupling cycles, preventing premature cleavage and increasing peptide yield.

1. Using the Reagent Calculator in the Liberty Blue Application software, weigh the appropriate amount of resin into the reaction vessel.
2. Connect the drain lines and place the reaction vessel assembly back into the microwave cavity, securing the attenuator.
3. A 1.0 M DIEA + 0.125M KI solution will need to be prepared and loaded onto Position 21 on the external manifold. Dissolve KI (0.52 g) in 20 mL DMF then add DIEA (4.35 mL) and dilute up to 25 mL total volume. Approximately 2 mL will be needed per loading cycle.
4. In the Method Editor, create or edit a peptide method. Be sure to select “Tryl DCA loading” for the Resin Type, “Acid” for the C-Terminus, and “High-Swelling” for the Resin Swelling. The first amino acid will default to the Chloride Loading cycle if the default has been set, otherwise the “Chloride Loading” cycle will need to be selected.



Amino Acid	Cycle
D	0.10-Chloride Loading
I	0.10-Single Coupling
T	0.10-Single Coupling
P	0.10-Single Coupling
E	0.10-Single Coupling
P	0.10-Single Coupling
H	0.10-Single 50°C 10 min Coupling

The Resin Cycle will default to “Chloride Loading No Swelling”.

5. Click and drag the method to the resin position and press the play button. The loading procedure will be followed by the remainder of the synthesis. There is no need to stop the method after the chloride loading step.
6. When the run is complete, the Loaded Method indicator will turn green, indicating the method was completed successfully and the peptide is ready to be cleaved.

CAUTION

If a “Change Deprotection Bottle” command is executed before using Cl-TCP(Cl) ProTide, the reaction vessel must first be washed with 15 mL DMF.

Discover Bio Procedure

1. Program a Chloride Loading method in SPS Power Mode with stirring and cooling off:

Stage	Temp (°C)	Power (W)	Time (sec)	Delta T
1	80	75	60	2
2	90	20	540	1

2. Weigh 0.1 mmol resin into the reaction vessel.
3. Prepare a 1.0 M DIEA + 0.125M KI solution by dissolving KI (0.52 g) in 20 mL DMF then add DIEA (4.35 mL) and dilute up to 25 mL total volume.
4. Prepare a 0.2 M amino acid solution in a clean centrifuge tube by dissolving in DMF.
5. Transfer dissolved amino acid (5 mL) and KI solution (2 mL) to the reaction vessel and place the vessel into the microwave cavity.
6. Set the right knob to N2 Bubbling.
7. Load the Chloride Loading microwave method, and press the Play/Pause key to begin the method.
8. When the microwave method is finished, remove the reaction vessel from the Discover cavity and drain the solution from the vessel.
9. Wash the loaded resin with DMF (3 x 5 mL). The resin can now be used as normal, proceeding with the first deprotection.

Protected Cleavage

Resins with hyper-acid sensitive linkers such as Cl-TCP(Cl) ProTide can be cleaved with 1% TFA to produce protected peptides. The Liberty Blue is not equipped to perform peptide cleavage for better system reliability. All cleavage procedures must be carried out at room temperature outside of the Liberty Blue system or in the Razor™ parallel peptide cleavage system.

1. Remove resin from the Liberty Blue reaction vessel.
 - a. Rinse the resin from the reaction vessel into a syringe vessel with DCM. DMF can be used, however DCM allows for easier removal of resin. If DMF is used, the resin needs to be washed thoroughly with DCM prior to cleavage.
2. Add approximately 3 mL (or double the volume of the resin bed) of 1% TFA in DCM to the syringe vessel. Allow the peptide 2 min to cleave at room temperature.
3. Filter the liquid into a centrifuge tube containing 3 mL of 10% pyridine in MeOH.
4. Repeat cleavage and filtration steps four more times for a total of five cleavages.
5. Combine all the filtrates in a 125 mL round bottom flask, rinsing each collection tube with additional MeOH.
6. Using a rotary evaporator, evaporate the solution to a volume of less than 3 mL.
7. Transfer the remaining solution to a clean 50 mL centrifuge tube using a small amount of MeOH (less than 2 mL).
8. Add enough ice cold deionized water to bring the volume to 35 mL and precipitate the protected peptide.
9. Centrifuge the peptide solution for 5 min at 3500 rpm or until a white or clear peptide pellet forms on the bottom of the tube. Repeat the centrifuge process if necessary to remove any floating particles.
10. Decant the water, leaving the precipitated peptide in the tube.
11. The peptide can be analyzed immediately on an HPLC or UPLC for purity, or can be lyophilized overnight then analyzed.
 - a. To lyophilize, suspend the peptide gel in 1% acetic acid in deionized water then freeze with liquid nitrogen before placing on the lyophilizer.



Liberty Blue

ProNPY 63-69

Total MW: 860.98

Sequence: L E D P A M W - COOH

Resin		Cycles	
Name	CI-MPA ProTide (LL)	Resin	0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)
Scale	0.10 mmol	Final Deprotection	0.10-No Final Deprotection (HS)
Loading	0.15 mmol/g		
Type	High-Swelling		
Preloaded	No		
C-Terminus	Acid		
Mass Required	0.667 g		

Notes:

Amino Acid	Specific Derivative	Cycle
Leu - L	Fmoc-Leu-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Glu - E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Asp - D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Pro - P	Fmoc-Pro-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ala - A	Fmoc-Ala-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Met - M	Fmoc-Met-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Trp - W	Fmoc-Trp(Boc)-OH	0.10-Chloride Loading (HS)

0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Wait	Time: 1	False

0.10-No Final Deprotection (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
2	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False

Reported: 10/08/2017 14:07:21

Page 1 of 2



Peptide synthesis made fast and efficient

3100 Smith Farm Rd. Matthews, NC 28106 • 800-726-3331 • <http://www.cem.com/peptide-synthesis.html>

ProNPY 63-69

Total MW: 860.98

3	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
4	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False

0.10-Single Coupling (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Deprotection	ID: Standard Deprotection Deprotection volume: 4	False
2	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
3	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
4	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
5	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
6	Coupling	ID: Standard Coupling Bottle position: (from method) Bottle position volume: 2.5 Activator bottle position: PositionACT Activator volume: 1 Activator base bottle position: PositionACTB Activator base volume: 1 Delay reagent time: 0 Delay reagent bottle position: PositionACTB Delay reagent volume: 0 Main solvent volume: 2 Value1: 1	False

ProNPY 53-62

Total MW: 1187.26

Sequence: E S T E N V P R T R - CONH₂

Resin		Cycles	
Name	CI-MPA ProTide (LL)	Resin	0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)
Scale	0.10 mmol	Final Deprotection	0.10-No Final Deprotection (HS)
Loading	0.15 mmol/g		
Type	High-Swelling		
Preloaded	No		
C-Terminus	Amide		
Mass Required	0.667 g		

Notes:

Amino Acid	Specific Derivative	Cycle
Glu - E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ser - S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Thr - T	Fmoc-Thr(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Glu - E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Asn - N	Fmoc-Asn(Trt)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Val - V	Fmoc-Val-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Pro - P	Fmoc-Pro-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Arg - R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0.10-Double Coupling (HS)
Thr - T	Fmoc-Thr(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Arg - R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0.10-Double Coupling (HS)

0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Wait	Time: 1	False

0.10-No Final Deprotection (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0	False

Reported: 10/08/2017 14:11:27

Page 1 of 2

ProNPY 53-62

Total MW: 1187.26

2	Wash	Drain type: Default Main solvent volume: 4 Time: 5.0	False
3	Wash	Drain type: Default Main solvent volume: 4 Time: 5.0	False
4	Wash	Drain type: Default Main solvent volume: 4 Time: 5.0	False

0.10-Single Coupling (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Deprotection	ID: Standard Deprotection Deprotection volume: 4	False
2	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
3	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
4	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
5	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
6	Coupling	ID: Standard Coupling Bottle position: (from method) Bottle position volume: 2.5 Activator bottle position: PositionACT Activator volume: 1 Activator base bottle position: PositionACTB Activator base volume: 1 Delay reagent time: 0 Delay reagent bottle position: PositionACTB Delay reagent volume: 0 Main solvent volume: 2 Value1: 1	False

ProNPY 37-52

Total MW: 1802.11

Sequence: GKRSSPETLISDLLMR - CONH₂

Resin		Cycles	
Name	CI-MPA ProTide (LL)	Resin	0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)
Scale	0.10 mmol	Final Deprotection	0.10-No Final Deprotection (HS)
Loading	0.15 mmol/g		
Type	High-Swelling		
Preloaded	No		
C-Terminus	Amide		
Mass Required	0.667 g		

Notes:

Amino Acid	Specific Derivative	Cycle
Gly - G	Fmoc-Gly-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Lys - K	Fmoc-Lys(Boc)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Arg - R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0.10-Double Coupling (HS)
Ser - S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ser - S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Pro - P	Fmoc-Pro-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Glu - E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Thr - T	Fmoc-Thr(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Leu - L	Fmoc-Leu-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ile - I	Fmoc-Ile-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ser - S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Asp - D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Leu - L	Fmoc-Leu-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Leu - L	Fmoc-Leu-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Met - M	Fmoc-Met-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Arg - R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0.10-Double Coupling (HS)

0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Wait	Time: 1	False

Reported: 10/08/2017 14:13:32

Page 1 of 2

ProNPY 37-52

Total MW: 1802.11

0.10-No Final Deprotection (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
2	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
3	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
4	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False

0.10-Single Coupling (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Deprotection	ID: Standard Deprotection Deprotection volume: 4	False
2	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
3	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
4	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
5	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
6	Coupling	ID: Standard Coupling Bottle position: (from method) Bottle position volume: 2.5 Activator bottle position: PositionACT Activator volume: 1 Activator base bottle position: PositionACTB Activator base volume: 1 Delay reagent time: 0 Delay reagent bottle position: PositionACTB Delay reagent volume: 0 Main solvent volume: 2 Value1: 1	False

proNPY 35-36

Total MW: 336.37

Sequence: R Y - CONH₂

Resin		Cycles	
Name	CI-MPA ProTide	Resin	0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)
Scale	0.10 mmol	Final Deprotection	0.10-No Final Deprotection (HS)
Loading	0.15 mmol/g		
Type	High-Swelling		
Preloaded	No		
C-Terminus	Amide		
Mass Required	0.667 g		

Notes:

Amino Acid	Specific Derivative	Cycle
Arg - R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0.10-Double Coupling (HS)
Tyr - Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS) without deprotection

0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Wait	Time: 1	False

0.10-No Final Deprotection (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
2	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
3	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
4	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False

0.10-Double Coupling (HS)

Reported: 10/08/2017 14:14:05

Page 1 of 2

proNPY 35-36

Total MW: 336.37

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Deprotection	ID: Standard Deprotection Deprotection volume: 4	False
2	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
3	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
4	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
5	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
6	Coupling	ID: Standard Coupling Bottle position: (from method) Bottle position volume: 2.5 Activator bottle position: PositionACT Activator volume: 1 Activator base bottle position: PositionACTB Activator base volume: 0.5 Delay reagent time: 0 Delay reagent bottle position: PositionACTB Delay reagent volume: 0 Main solvent volume: 2 Value1: 1	False
7	Coupling	ID: Standard Coupling Bottle position: (from method) Bottle position volume: 2.5 Activator bottle position: PositionACT Activator volume: 1 Activator base bottle position: PositionACTB Activator base volume: 0.5 Delay reagent time: 0 Delay reagent bottle position: PositionACTB Delay reagent volume: 0 Main solvent volume: 2 Value1: 1	False

ProNPY 18-34

Total MW: 2137.47

Sequence: ARYY SALRHYINLITRQ - CONH₂

Resin		Cycles	
Name	Cl-MPA ProTide	Resin	0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)
Scale	0.10 mmol	Final Deprotection	0.10-No Final Deprotection (HS)
Loading	0.15 mmol/g		
Type	High-Swelling		
Preloaded	No		
C-Terminus	Amide		
Mass Required	0.667 g		

Notes:

Amino Acid	Specific Derivative	Cycle
Ala - A	Fmoc-Ala-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Arg - R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0.10-Double Coupling (HS)
Tyr - Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Tyr - Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ser - S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ala - A	Fmoc-Ala-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Leu - L	Fmoc-Leu-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Arg - R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0.10-Double Coupling (HS)
His - H	Fmoc-His(Trt)-OH	0.10-Single 50°C 10 min Coupling (HS)
Tyr - Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ile - I	Fmoc-Ile-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Asn - N	Fmoc-Asn(Trt)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Leu - L	Fmoc-Leu-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ile - I	Fmoc-Ile-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Thr - T	Fmoc-Thr(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Arg - R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0.10-Double Coupling (HS)
Gln - Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH	0.10-Single Coupling (HS)

0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
------	-----------	------------	-------

Reported: 10/08/2017 14:14:47

Page 1 of 2

ProNPY 18-34

Total MW: 2137.47

1	Wait	Time: 1	False
---	------	---------	-------

0.10-No Final Deprotection (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
2	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
3	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
4	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False

0.10-Single Coupling (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Deprotection	ID: Standard Deprotection Deprotection volume: 4	False
2	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
3	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
4	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
5	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
6	Coupling	ID: Standard Coupling Bottle position: (from method) Bottle position volume: 2.5 Activator bottle position: PositionACT Activator volume: 1 Activator base bottle position: PositionACTB Activator base volume: 1 Delay reagent time: 0 Delay reagent bottle position: PositionACTB Delay reagent volume: 0 Main solvent volume: 2 Value1: 1	False

ProNPY 1-17

Total MW: 1831.92

Sequence: Y P S K P D N P G E D A P A E D M - CONH₂

Resin		Cycles	
Name	CI-MPA ProTide	Resin	0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)
Scale	0.10 mmol	Final Deprotection	0.10-No Final Deprotection (HS)
Loading	0.15 mmol/g		
Type	High-Swelling		
Preloaded	No		
C-Terminus	Amide		
Mass Required	0.667 g		

Notes:

Amino Acid	Specific Derivative	Cycle
Tyr - Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Pro - P	Fmoc-Pro-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ser - S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Lys - K	Fmoc-Lys(Boc)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Pro - P	Fmoc-Pro-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Asp - D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Asn - N	Fmoc-Asn(Trt)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Pro - P	Fmoc-Pro-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Gly - G	Fmoc-Gly-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Glu - E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Asp - D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ala - A	Fmoc-Ala-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Pro - P	Fmoc-Pro-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Ala - A	Fmoc-Ala-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Glu - E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Asp - D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	0.10-Single Coupling (HS)
Met - M	Fmoc-Met-OH	0.10-Single Coupling (HS)

0.10-DCA Trityl Loading No Swelling (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
------	-----------	------------	-------

Reported: 10/08/2017 14:15:17

Page 1 of 2

ProNPY 1-17

Total MW: 1831.92

1	Wait	Time: 1	False
---	------	---------	-------

0.10-No Final Deprotection (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
2	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
3	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False
4	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5.0 Drain type: Default	False

0.10-Single Coupling (HS)

Step	Operation	Parameters	Pause
1	Deprotection	ID: Standard Deprotection Deprotection volume: 4	False
2	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
3	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
4	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
5	Wash	Main solvent volume: 4 Time: 5 Drain type: Default	False
6	Coupling	ID: Standard Coupling Bottle position: (from method) Bottle position volume: 2.5 Activator bottle position: PositionACT Activator volume: 1 Activator base bottle position: PositionACTB Activator base volume: 1 Delay reagent time: 0 Delay reagent bottle position: PositionACTB Delay reagent volume: 0 Main solvent volume: 2 Value1: 1	False

Méthode courte pour Loading

1) $m(\text{résine}) = 479,8 \text{ mg}$

Ajout ~ 10 mL DMF (bouteille neuve)

Swell de la résine 30' (13h25 - 13h55)

$$0,19 \text{ mmol} \rightarrow 1 \text{ g}$$

$$0,09116 \text{ mmol} \leftarrow 0,4798 \text{ g}$$

2) Dans un ballon peser 10. 0,09116 mmol de Fmoc-Trp (Boc)-OH

$$m(\text{AA à peser}) = 0,9116 \text{ mmol} \cdot 526,34 \text{ g/mol} \\ = 0,4798 \text{ g}$$

$$m(\text{AA}) = 0,4790 \text{ g}$$

Ajouter 3 mL. 0,9116 \approx 3 mL DMF sec

$$\text{Tare (erlenmeyer)} = 32,0316 \text{ g}$$

3) Ajouter à solution AA 5. 0,09116 mmol DIC

$$V(\text{DIC}) = \frac{5 \cdot 0,09116 \cdot 126,2}{0,806} = 71,4 \text{ mL}$$

Ajouter aussi 1 mL DMF par mmol de DIC

$$V(\text{DMF}) = 0,45 \text{ mL}$$

4) A 13h55 filtrer la résine sur phase poreuse

5) Ajouter DMAP 0,1. 0,09116 mmol

$$m(\text{DMAP}) = 0,009116 \cdot 122,17 = 1,1 \text{ mg}$$

$$m(\text{DMAP réelle}) = 1,5 \text{ mg}$$

Ajouter à la solution AA, puis ajouter la résine sèche, laisser réagir 1h (14h20 - 15h10)

⇒ Essai synthèse 7 premiers AA